



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN CITOGENÉTICA Y MOLECULAR DE PACIENTES
CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA, TRATADOS CON
INHIBIDORES DE LA CINASA DE TIROSINA**

TESIS

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

PRESENTA

BEATRIZ ERENDIRA SÁNCHEZ LAVARIEGA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI _____

VOCAL: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS _____

SECRETARIO: ROSA MARÍA ARANA TREJO _____

1er. SUPLENTE: MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO _____

2DO. SUPLENTE: LAURA CARMONA SALAZAR _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE ONCOHEMATOLOGÍA, S.C

ASESOR DEL TEMA: Q.F.B ROSA MARÍA ARANA TREJO _____

SUSTENTANTE: BEATRIZ ERENDIRA SÁNCHEZ LAVARIEGA _____

A abuelito Pablo, A tío Rogelio y a mí persona especial; abuelita Vicenta.
Se han adelantado, pero los tres dejaron en mí, amor, sabiduría, y gran parte de lo que
ahora soy, con inmenso amor, cariño y respeto.
Los amaré y vivirán por siempre en mí.

Agradecimientos

Mamá, Papí, Hermanita, por la familia que somos y gracias a ello, soy lo que soy, juntos hemos llegado hasta aquí, por el profundo amor, confianza, apoyo, preocupación y todo lo que me dan, sepan que los amo. A mis abuelitos, tías, tíos y primos por el valor de la familia, los quiero a todos.

Maestra Rosy Arana, por confiar en mí, ver mis cualidades y capacidades, por la oportunidad, conocimientos, experiencias compartidas y el tiempo dedicado a este trabajo.

Maestra Alicia Cervantes, por la oportunidad que me dio en el servicio social, porque gracias a ello conocí el maravilloso universo de la citogenética.

Adriana Del Castillo, Georgina González, Verónica Madrid, Adrian Pérez, Héctor Pohlmayer por enseñarme citogenética, dar consejos con su vasta experiencia y brindarme su amistad. Israel Saldívar, por tanta paciencia, enseñar y compartir sus conocimientos de biología molecular y por contribuir con este trabajo.

Al Equipo Genos; Cuahutli Azotla, Leonardo Pérez, Luz del Carmen Márquez, Melania Abreu y Ocelotl Azotla, por la enorme oportunidad de ser parte del equipo, la confianza y ver mis cualidades y potencial. Ana Aparicio, Luz María Garduño, por seguir enseñándome más sobre citogenética, las recomendaciones y su amistad. Nancy Cordero y Julián Arenas amigos, por la paciencia, y momentos de diversión.

Viridiana Hernández, juntas comenzamos con la aventura, has sido un gran apoyo en este camino, por compartir días de trabajo, pues juntas todo es más fácil y divertido

A mis amigos, Jazmín Rojas, siempre juntas apoyándonos, por ser mi hermana más que mi amiga, por estar siempre aquí. Gerardo Ortiz, apoyándome y queriéndome, demostrando la verdadera amistad. Isaac Hernández, comenzamos juntos este pequeño tramo del camino, haz sido un gran amigo, lejos, pero presente en los momentos indicados. Verónica González, por tantos momentos juntas de diversión, la enseñanza y consejos. José Hugo Rey, por las pláticas, la compañía, el cariño y la ayuda en este proceso. Elizabeth Rivas, por las horas de clase y estudio compartidas, diversión, consejos. Por la amistad, los quiero.

A mis amigos Emmanuel Torres, Aldo Romero, Gabriel Jiménez, Octavio Amancio, gracias por su amistad.

A cada uno de los profesores que me dieron clases y a mi Universidad, por ser mi casa y el lugar donde aprendí sobre la ciencia y la vida.

Gracias Totales!

Por mi Raza Hablara el Espíritu

México, Pumas, Universidad!!

Contenido

1. Resumen	10
2. Marco Teórico. Leucemias	12
2.1 Leucemia Mieloide Crónica	12
a) Descripción	13
b) Características Clínicas	14
c) Epidemiología	16
d) Etiología	17
e) Diagnóstico	18
2.2 Antecedentes del cromosoma Filadelfia	21
a) Descripción	22
2.3 Alteraciones cromosómicas secundarias en la LMC	23
2.4 Citogenética Convencional y FISH	26
2.5 Monitoreo Citogenético de pacientes con LMC	32
2.6 Aspectos moleculares de la LMC	33
a) Gen BCR	33
b) Gen ABL	36
c) Gen de fusión BCR/ABL	40
d) Proteína Bcr- Abl	41
e) Monitoreo Molecular de Pacientes con LMC	45
2.7 Tratamiento de la LMC	49
a) Antecedentes del Tratamiento para pacientes con LMC	50
2.7.1 Interferon- α	51
2.7.2 Inhibidores de la cinasa de tirosina	52
a) Mesilato de Imatinib	52
b) Resistencia a Imatinib	56
c) Mutaciones implicadas en la resistencia a Imatinib	57
2.7.3 Inhibidores de la cinasa de tirosina de segunda Generación	58
2.7.4 Trasplante de células hematopoyéticas	60
2.7.5 Quimioterapia oral (Busulfan e Hidroxiurea)	61
3. Objetivos	62
4. Justificación	62
5. Metodología	63
5.1 Selección de casos	63
5.2 Técnicas citogenéticas	63
5.3 Técnicas moleculares	65
a) RT-PCR para amplificación de Transcritos de <i>BCR/ABL</i>	68
6. Resultados	70
7. Discusión	77
8. Conclusiones	83
9. Referencias	85

Índice de Figuras

Figura 1. Comparación de morfogénesis de células madre.....	14
Figura 2. Frotis en sp y mo de paciente con LMC-FC, teñidos con tinción Wrigth	19
Figura 3. Algoritmo de diagnóstico	21
Figura 4. Cromosoma Filadelfia t(9;22)(q34;q11)	22
Figura 5. Cromosoma Ph´y derivado.....	23
Figura 6. Comparación de distintas técnicas de bandeo	29
Figura 7. FISH para <i>BCR/ABL</i>	31
Figura 8. Dominios de proteína Bcr.....	36
Figura 9. Estructura tridimensional de Abl	37
Figura 10. Dominios de Abl y homólogos.....	39
Figura 11. Sitios de ruptura de <i>BCR</i>	41
Figura 12. Implicación de <i>BCR/ABL</i> en vías de transducción de señales	45
Figura 13. Esquema de la PCR convencional y la formación de productos.....	46
Figura 14. Estructura de Abl elmatinib.....	55
Figura 15. Estructura cristalina de Abl- ICT.....	60
Figura 16. Cariotipo representativo	65
Figura 17. Gel de agarosa en electroforesis de una reacción PCR- multiplex.....	68
Figura 18. Gel de agarosa Reacción anidada para p210.....	69
Figura 19. Sitios de reconocimiento de oligonucleotidos	70

Índice de Tablas

Tabla 1. Características generales de las fases de la LMC	16
Tabla 2. Características distintivas de las neoplasias mieloproliferativas	20
Tabla 3. Criterios citogenéticos para el monitoreo de pacientes con LMC.....	33
Tabla 4. Características de la proteína p 210.....	43
Tabla 5. Monitoreo molecular de pacientes con LMC	74
Tabla 6. Pacientes con monitoreo molecular y citogenético	75
Tabla 6. continuación. Pacientes con monitoreo molecular y citogenético	76

Abreviaturas

- Ara-C:** Arabinidosido de citosina.
- CB:** Crisis Blástica.
- CTH:** Célula tallo hematopoyética
- EI:** Escala Internacional.
- EMR:** Enfermedad Mínima Residual.
- FA:** Fase acelerada.
- FAL:** Fosfatasa alcalina leucocitaria.
- FC:** Fase crónica.
- INF- α :** Interferon alfa.
- ICT:** Inhibidores de la cinasa de tirosina
- IRIS:** International Randomized Study of Interferon vs. STI571.
- LLA:** Leucemia Linfocítica Aguda.
- LMC:** Leucemia Mieloide Crónica.
- LMC- CB:** Leucemia Mieloide Crónica- Crisis Blástica.
- LMC-FC:** Leucemia Mieloide Crónica- Fase Crónica
- M-bcr:** Región de Ruptura Mayor.
- MI:** Mesilato de Imatinib.
- m-bcr:** Región de ruptura menor.
- μ - bcr:** Región de ruptura micro.
- MMM:** Mielofibrosis con metaplasia mieloide
- MO:** Médula ósea.
- Ph⁺:** Cromosoma Filadelfia
- Ph⁺:** Cromosoma Filadelfia Positivo.
- PGM:** Progenitores Granulocito Macrófago
- PV:** Policitemia Vera
- RCgC:** Respuesta Citogenética Completa.
- RCgP:** Respuesta Citogenética Parcial.
- RCgM:** Respuesta Citogenética Menor o Mínima.
- RHC:** Respuesta Hematológica Completa.
- RMM:** Respuesta Molecular Mayor.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa- Transcriptasa Reversa.

RQ-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa- en tiempo real Cuantitativa.

SP: Sangre Periférica.

TE: Trombocitosis esencial



1. Resumen

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC), es definida por la OMS como una neoplasia mieloproliferativa, originada en una célula madre pluripotencial, que está asociada a la t(9;22) y al gen de fusión *BCR/ABL*. El cromosoma Filadelfia (Ph⁺), o t(9;22)(q34;q11), es el marcador citogenético de esta enfermedad, presente en más del 95% de los pacientes diagnosticados con este tipo de leucemia. El gen de fusión *BCR/ABL* origina la sobreexpresión de una proteína Bcr/Abl (p210) con actividad cinasa de tirosina; que es el blanco del tratamiento con Mesilato de Imatinib (MI), un inhibidor de la actividad de la cinasa de tirosina de *BCR/ABL*. Para el monitoreo del tratamiento existen criterios de respuesta citogenética (carga leucémica) y molecular (detección de enfermedad mínima residual (EMR)), los cuales están establecidos internacionalmente.

El objetivo de este trabajo es realizar el monitoreo de pacientes mexicanos con LMC en tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina, mediante el análisis citogenético y molecular, para determinar los tiempos en los cuales, se logra la Respuesta Citogenética Completa (RCgC) y cuando ya no son detectables los transcritos *BCR/ABL*.

Se incluyeron 51 pacientes con LMC, a los que se les realizó seguimiento molecular y/o citogenético, 19 tuvieron únicamente monitoreo molecular y el resto (32) los dos estudios, por el tipo de muestras recibidas: en su mayoría fueron de sangre periférica (SP) 54.9% (28), 30.8% (18) de Médula ósea (MO) y el restante 17.3% las dos mo/sp. La distribución por sexo fue 62.2% mujeres y 37.3% hombres; con edad promedio de 44.8 y 39.4 años respectivamente.

El tiempo promedio en el cual los pacientes lograron la respuesta molecular completa fue de 12.3 meses, el tipo de transcrito predominante fue b3a2 (47.0%), b2a2 (35.3%) y tres casos con “doblete” (b3a2/b2a2). En 4

casos, se observó desaparición y posterior recaída al presentar transcritos de *BCR/ABL*, suponiendo mal pronóstico. Un caso fue estudiado post- trasplante con monitoreo únicamente molecular, en el cual conservó la respuesta molecular completa por mas de 18 meses.

En cuatro pacientes con seguimiento citogenético, se observó una RCgC obtenida en promedio a los 6 meses de tratamiento, mientras que uno mas logró RCgP en promedio a los 7 meses. Se observaron cariotipos con alteraciones secundarias como hiperploidia y doble cromosoma Filadelfia en 4 casos.

Se logró observar la progresión y “negativización” de las clonas Ph+/BCR-ABL+ en algunos pacientes, siendo la RT-PCR la técnica de preferencia, por el nivel de sensibilidad del método, sin embargo la citogenética sigue siendo muy importante para la evaluación de pacientes con LMC. Los tiempos a los cuales se obtuvieron las RCgC y desaparición de transcritos, no fueron los esperados; sin embargo, se debe tomar en cuenta diversos factores que influyen, pincipalmente factores sociales de cada país. Implementar practicas para el registro de los datos de cada uno de los pacientes, sería de gran utilidad para facilitar el análisis individual de cada uno de ellos, además de dar paso al desarrollo de nuevas investigaciones acerca del tratamiendo para pacientes con este tipo de padecimiento, mejorando la calidad de vida.

2. Marco Teórico. Leucemias.

La leucemia es una enfermedad neoplásica resultante de la proliferación de células hematopoyéticas, producto de la alteración de una célula madre cuya progenie da origen a las clonas leucémicas. Con frecuencia existen una serie de alteraciones genéticas más que eventos aislados, que contribuyen a la transformación maligna que van desde la inapropiada expresión de oncogenes, hasta la pérdida de funciones de los genes supresores de tumores.

Las alteraciones genéticas que llevan a la transformación leucémica, frecuentemente resultan en cambios mayores en los cromosomas, las cuales pueden ser detectadas por examen microscópico de células en mitosis. Otro tipo de cambios son detectados a nivel sub-microscópico, los que pueden ser analizados en DNA o RNA por técnicas de biología molecular.

Las leucemias por su curso clínico se dividen en agudas; que son de evolución grave y si no son tratados tempranamente llevan a la muerte en semanas o meses; y las crónicas que son de curso clínico más indolente con tiempos de evolución de meses o años. Por el tipo de células que afectan a la Médula Ósea, se pueden dividir en linfoides, mieloides y bifenotípicas.¹ Las leucemias mieloides pueden originarse en una célula madre de linaje restringido o en una célula multipotencial que es capaz de diferenciarse en células de linaje eritroide, granulocítico, monocítico y megacariocítico.

2.1 Leucemia Mieloide Crónica, (LMC)

La LMC fue primeramente descrita por dos patólogos, el Dr. Rudolf Virchow y el Dr. John Hughes Bennett en 1845.^{2,3} Es definida por la OMS como una neoplasia mieloproliferativa, originada en una célula madre pluripotencial, asociada con un gen de fusión *BCR/ABL*, el cual se origina del cromosoma Filadelfia, que es producto de la translocación recíproca del

cromosoma 9 en su región q34 y el cromosoma 22 en su región q11.⁴ Aproximadamente del 90-95% de los casos con LMC son caracterizados por presentar clonas con el cromosoma Filadelfia.⁵

Representa entre el 15-20 % del total de las leucemias y su incidencia en países occidentales está estimada en 1,6 casos por cada 100, 000 habitantes/año. La edad media de aparición es de 53 años, teniendo una incidencia máxima entre los 40 y los 60 años, predominando ligeramente en varones con una relación de 1,3:1.⁶

a) Descripción de la LMC.

La historia natural de la LMC se caracteriza por una evolución bifásica (60%) o trifásica (40%).^{7,8} La primera de las fases es la llamada Fase Crónica, caracterizada por la expansión de células mieloides con maduración normal; el 90% de los pacientes se diagnostican en esta etapa y de ellos, el 15 o 20% son asintomáticos al diagnóstico. Posteriormente algunos pacientes pueden evolucionar a una etapa más agresiva que sigue 2 grandes patrones clínico-hematológicos: la Fase Acelerada (FA) y la Crisis Blástica (CB), en las cuales, las células leucémicas pierden la capacidad para una diferenciación terminal.⁹

Figura 1.

La evolución a CB sin FA previa, es semejante a un cuadro de Leucemia Aguda (LA), con la invasión por blastos de forma más o menos rápida de la MO, SP y a veces otros órganos. Este patrón evolutivo es el más frecuente, ya que se observa en el 60% de los pacientes.¹⁰

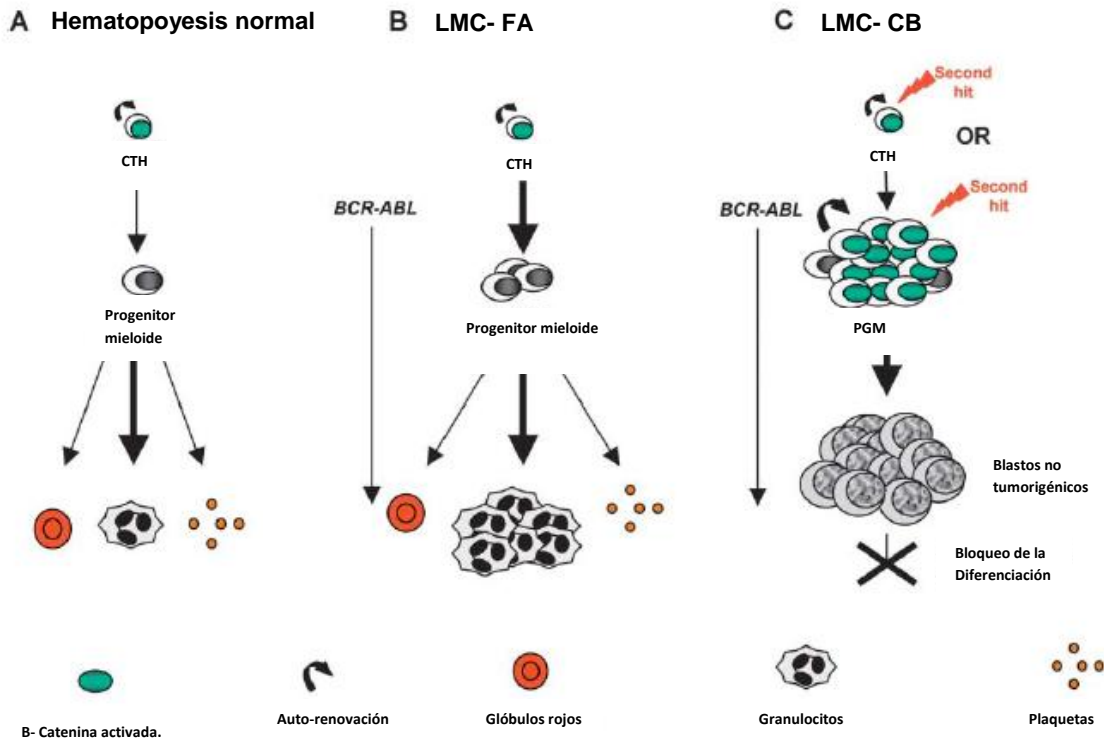


Figura 1. Comparación de morfogénesis de células madre. Diferencias entre una hematopoyesis normal, la FC y la CB de la LMC, en **B** hay incremento en la proliferación de la serie granulocítica y en **C** el bloqueo de la diferenciación.

b) Características Clínicas

Los signos y síntomas de presentación, en general pueden incluir anemia, fatiga, pérdida de peso, mareo, sensación de plenitud abdominal, sangrado, esplenomegalia (dolor, hinchazón y saciedad). En sangre se puede presentar trombocitosis, alto número de granulocitos y sus precursores, basofilia absoluta, conteo normal o elevado de plaquetas. Ocasionalmente, el paciente se presenta con dolor de huesos o hiperviscosidad asociada con un elevado conteo de células blancas.^{11,12}

El periodo inicial o FC, está caracterizado por esplenomegalia y leucocitosis; con síntomas generalmente leves, esta fase es fácilmente controlada con el tratamiento. El principal objetivo terapéutico durante la misma

es el control de los síntomas y complicaciones resultantes de la anemia, la trombocitopenia, leucocitosis y la esplenomegalia.

La fase de CB, se caracteriza por el incremento del recuento de blastos ($\geq 30\%$ y según la OMS $\geq 20\%$) en MO o SP o bien por la infiltración leucémica tisular. Los signos más característicos son: incremento de la anemia, trombocitopenia, basofilia, el aumento del tamaño del bazo y la falla en la respuesta a los medicamentos usuales para el control de la leucocitosis y esplenomegalia. Las manifestaciones de la CB son muy similares a las de las LA. En un 40% de los pacientes se intercala entre la FC y la CB, una fase intermedia, denominada de Aceleración (FA), que surge de 3 a 6 meses antes de la CB y se caracteriza por manifestaciones intermedias entre las propias de las otras dos fases. La Crisis Blástica aún representa un problema clínico importante y está caracterizada por un tiempo de supervivencia corto. En la **Tabla 1** se pueden observar algunos parámetros y síntomas generales característicos de cada una de las fases de la LMC.^{8,11}

Tabla 1. Características generales de las Fases de la LMC.¹²

	Fases Avanzadas		
Parámetros	Fase Crónica	Fase Acelerada	Crisis Blástica
Duración media de la enfermedad	3-5 años	6-9 meses	3-6 meses
Porcentaje de Blastos	1-15%	>15%	>30%
Hemoglobina	Normal/ Ligeramente bajo	Bajo	Muy Bajo
Plaquetas	Normal/ Alto/ Bajo	Alto/ Bajo	Bajo
Médula ósea	Hiperplasia Mieloide		
Citogenética	Ph´	Ph´	Ph´
		Cambios genéticos secundarios: Ph´ adicional, i17q, +8. Perdida de myc y p53	
Síntomas	Fatiga, sangrado, pérdida de peso	Fiebre sin causa alguna, esplenomegalia, hepatomegalia, dolor de huesos	Anemia severa, sangrado, incremento de infecciones, linfadenopatía.



c) Epidemiología

La LMC es una enfermedad relativamente rara, con una incidencia anual en un rango menor de 1.0 a 2.0 por cada 100, 000 personas, en varios países del mundo; y entre un 7 a 20 % del total de todas las leucemias son LMC, con alta incidencia en Suiza, Estados Unidos, Italia, Australia, Alemania y Reino Unido, y baja incidencia en países como Países Bajos, Suecia y China. Sin embargo en Estados Unidos, aproximadamente 3400-4500 casos nuevos son

diagnosticados anualmente y en Reino Unido, hay un estimado de 700 pacientes nuevos diagnosticados al año.

La Leucemia Mieloide Crónica, es más común en personas de la tercera edad, sin embargo también puede presentarse en cualquier rango de edad y su incidencia se incrementa exponencialmente al transcurrir los años, presentándose comúnmente y en mucha mayor proporción alrededor de los 40-60 años. La incidencia en niños es rara, con solo aproximadamente 10% de nuevos casos. Entre 1995 y 1999 en Estados Unidos, personas con más de 65 años tuvieron incidencia de 7.3/100, 000 personas, mientras que los menores de 65 años tuvieron una incidencia de solo 0.68/100,000 personas.¹³

Es más común en hombres que en mujeres, en general la relación entre hombres y mujeres es aproximadamente de 2.2 y 1.3 por 100,000 personas, respectivamente, además de ser más común en blancos y Negros que en otras razas.¹³

d) Etiología

La LMC al ser un tipo de cáncer, es una enfermedad multifactorial, en la cual el desarrollo de esta, dependerá de los factores de riesgo a los cuales esté expuesto el individuo, el tipo y la calidad de vida del mismo, donde se incluye; alimentación, estilo de vida, trabajo y el lugar de origen, la edad, entre otras, que conjuntamente pueden dar paso al desarrollo del cáncer. En cuanto a la LMC, el único riesgo que se sabe es un factor para el desarrollo, son altas dosis de radiación ionizante y exposición ocupacional al benceno. Esto se evidencia con los sobrevivientes de la bomba atómica, siendo entre 20-25 veces mayor la incidencia de este tipo de leucemia. Sin embargo, hasta ahora no se sabe que exista predisposición genética para la LMC, tampoco se asocia con virus oncogénicos y la enfermedad no es generalmente prevenible.¹³

e) Diagnóstico.

Aproximadamente 85-90% de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica de la LMC (LMC-FC) y un 40% son asintomáticos, con el diagnóstico incidental a través de una prueba de rutina en sangre. Comúnmente en el examen físico y características de laboratorio, se presenta fatiga, debilidad, pérdida del apetito, fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, esplenomegalia, anemia, conteo plaquetario bajo, infecciones frecuentes, sangrados, purpura, leucocitosis, trombocitosis y anomalías extramedulares.¹³

El diagnóstico, también se puede realizar, mediante frotis de SP, el cual muestra una desviación a la izquierda, aunque se encuentran granulocitos en todas las etapas de maduración, las células predominantes son los neutrófilos segmentados y mielocitos, mientras que los promielocitos y blastos no suelen exceder 20% del total de leucocitos, y con frecuencia son menos de 10%. La proporción de blastos superior a 20% puede indicar LMC-CB o presentarse cuando la cifra de leucocitos es muy grande, frecuentemente eosinófilos y basófilos aumentan en términos tanto relativos como absolutos. La basofilia progresiva puede indicar que el paciente ha entrado en CB, los monocitos están moderadamente aumentados y casi siempre pueden encontrarse signos de displasia mieloide, incluso la anomalía de pseudo Pelger- Huet.

Un frotis de médula ósea, se puede observar hiper celular en 90 a 100% con un incremento notable en la proporción mieloide- eritroide (10:1 a 50:1). La médula roja activa, puede extenderse al interior de los huesos largos y entonces se presenta adelgazamiento de la corteza y erosión de las trabéculas. Las células hematopoyéticas de la MO son principalmente granulocitos inmaduros con menos de 30% de blastos, lo cual es una característica importante que diferencia a la LMC de la LA. En cuanto a los megacariocitos, pueden aumentar y frecuentemente tienen formas inmaduras y atípicas. A

diferencia de los megacariocitos grandes presentes en otros subgrupos de las neoplasias mieloproliferativas, la LMC tiene megacariocitos pequeños. **Figura 2.**

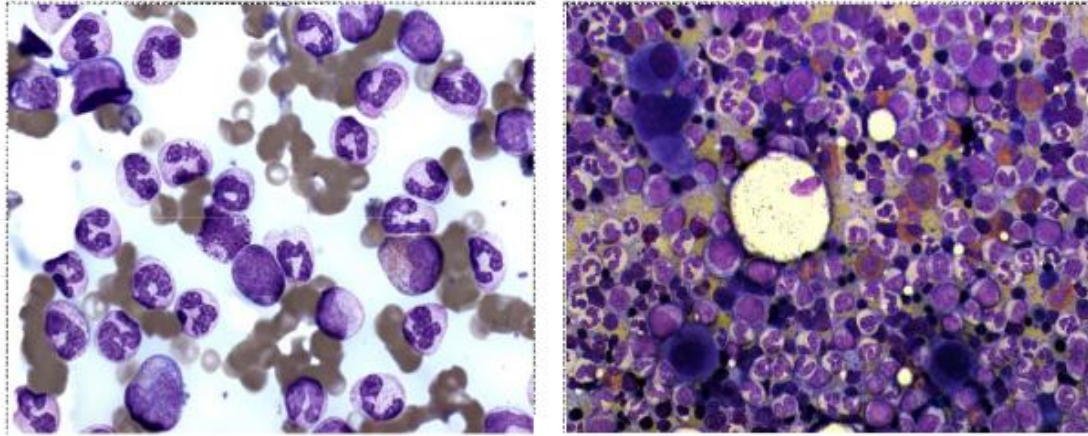


Figura 2. Frotis en SP y MO de paciente con LMC-FC, teñidos con tinción Wrigth. **Izquierda.** Frotis de SP, donde se observan leucocitos. **Derecha.** Frotis de MO hiper celular y con neutrófilos en diferente estado de maduración.¹⁴

De manera secundaria al aumento del recambio celular, aumentan las concentraciones de ácido úrico y Lactato deshidrogenasa (LDH). La muraminidasa es normal o puede estar ligeramente aumentada, la disminución o ausencia de la Fosfatasa Alcalina Leucocitaria (FAL) no es específica de la LMC, pero si es característica.

La LMC pertenece al grupo de neoplasias mieloproliferativas, por lo cual, se deben revisar parámetros como hematocrito, plaquetas, cromosoma Filadelfia (Ph⁺), tamaño del bazo, entre otras, para poder diferenciar entre las mismas.¹⁵ **Tabla 2.**

Tabla 2. Características distintivas de las neoplasias mieloproliferativas.

Parámetro	LMC	MMM*	PV**	TE***
Hematocrito	No ↓	↓	↑	No ↓
Leucocitos	↑↑↑	↑ ○ ↑↑	No ↑	No ↓
Plaquetas	↓ ○ ↑	N, ↑ ↓		↑↑↑
Granulocitos inmaduros	↑↑↑	↑↑	Ausente o ↑	raro
FAL	↓	N ↑ ↓	N ↑	No ↑
Cromosoma Ph´	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Tamaño del bazo	No ↑	↑↑↑	↑	No ↑
Fibrosis de la MO	Ausente o ↑	↑↑↑	Ausente o ↑	Ausente o ↑

*MMM: mielofibrosis con metaplasia mieloide;**PV: policitemia vera;***TE: Trombocitosis esencial

Finalmente, se realiza la confirmación del diagnóstico mediante cariotipo en médula ósea, FISH y/o RT-PCR, para detectar ya sea el Ph´ y/o los transcritos de *BCR/ABL*, existen esquemas que indican como se puede realizar la confirmación del diagnóstico con técnicas citogenéticas y moleculares.

Figura 3.

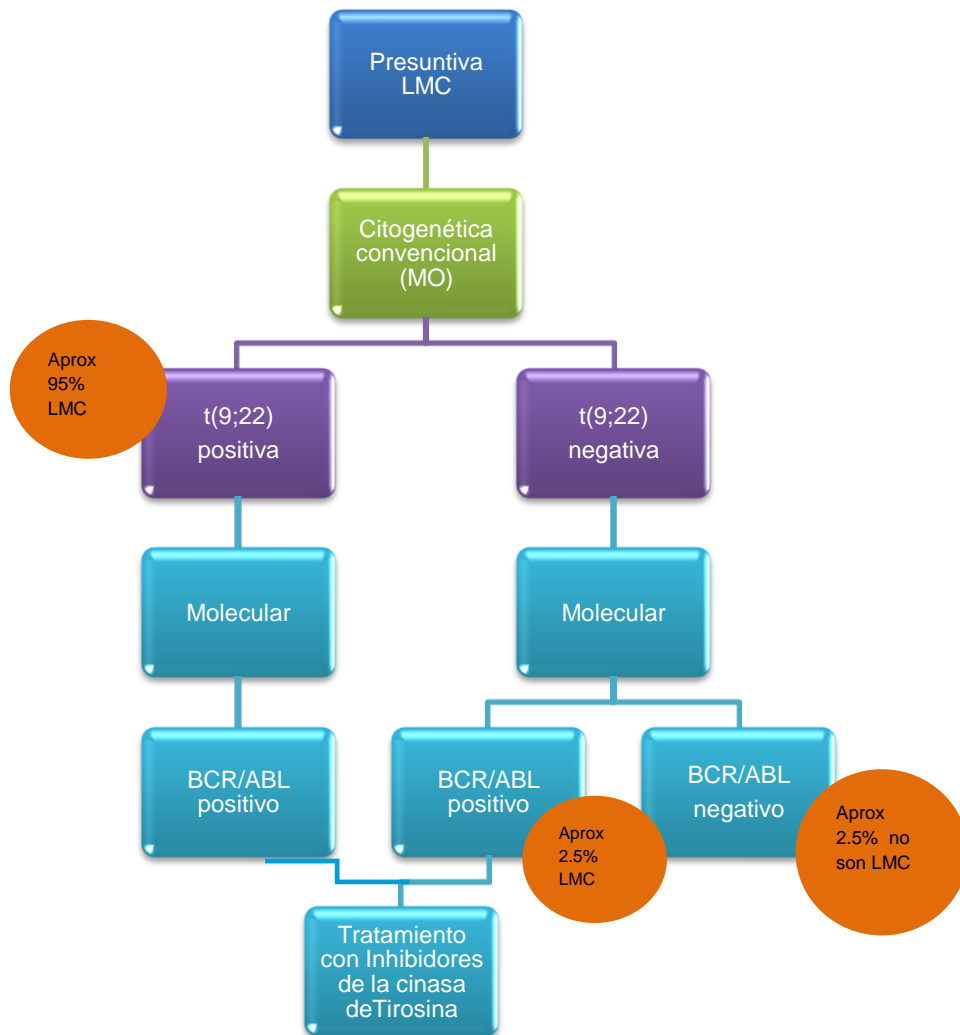


Figura 3. Algoritmo de Diagnóstico. Esquema donde se muestra el algoritmo para el diagnóstico de una presumible LMC.

2.2 Antecedentes del Cromosoma Filadelfia.

En 1960 Peter Nowel y David Hungerford, trabajando en Filadelfia, describieron una anomalía cromosómica consistente en pacientes con LMC, un cromosoma acrocéntrico que se pensaba era una delección cromosómica. Este fue el primer ejemplo de una anomalía cromosómica ligada a una enfermedad maligna específica, en su artículo ellos escriben *“Los resultados sugieren una relación causal entre la anomalía cromosómica observada y la leucemia mieloide crónica”*. Esta declaración no fue aceptada del todo, ya que

se consideró que la anomalía cromosómica había sido un fenómeno casual y no asociado. Con las técnicas de bandeado cromosómico mejoradas, se hizo evidente que la anomalía era un cromosoma 22 acortado. En 1973, Janet Rowley determinó que el cromosoma 22 acortado, llamado cromosoma filadelfia (Ph⁺), era el producto de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, $t(9;22)(q34;q11)$ **Figura 4.**^{1,3,16}

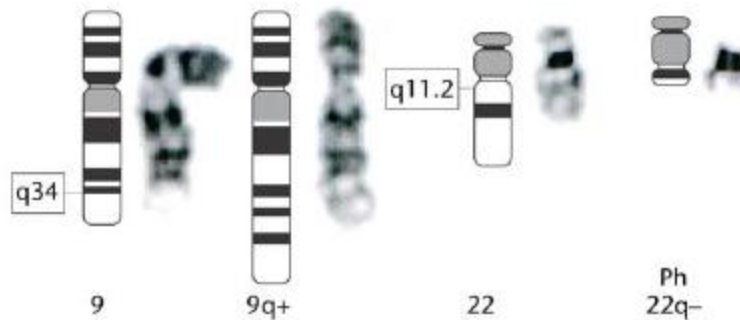


Figura 4. Cromosoma Filadelfia $t(9;22)(q34;q11)$. Se muestran los puntos de ruptura de los cromosomas 9 y 22.¹⁷

a) Descripción del Cromosoma Filadelfia.

El Ph⁺ es el resultado de la translocación recíproca y balanceada entre el brazo largo del cromosoma 9, en su región q34 y una parte del brazo largo del cromosoma 22, en la región q11 con punto de ruptura específico en el gen *BCR*. Dicha translocación, genera el acortamiento de cromosoma 22q formando el gen de fusión *BCR/ABL* en la región de unión con el cromosoma 22 y la elongación del cromosoma 9 (9q+) generando el *ABL/BCR*.^{11,18,19}

La clásica $t(9;22)(q34;q11)$ o Ph⁺, es detectada por citogenética convencional en aproximadamente 85% de los pacientes con LMC, en 5% el Ph⁺ es el resultado de intercambios complejos, usualmente entre tres o más cromosomas y siempre están involucrados los cromosomas 9 y 22 **Figura 5.**¹¹

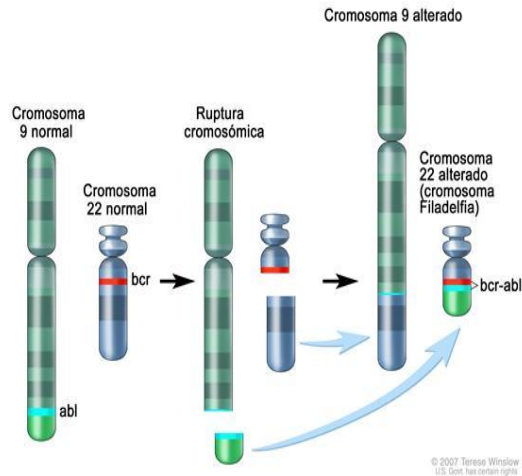
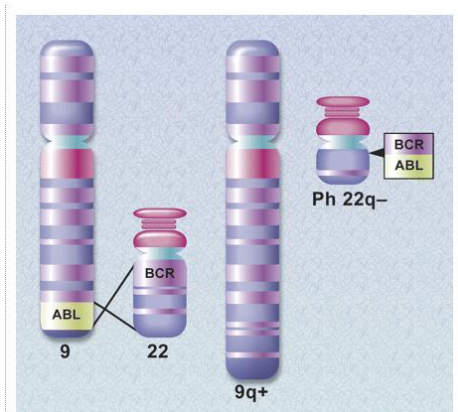


Figura 5. Cromosoma Filadelfia y derivado. Se observa el cromosoma 9 y 22 normal (izquierda) y el cromosoma 9q+ y el Ph⁺ producto de la translocación recíproca.³

2.3 Alteraciones cromosómicas secundarias en la LMC.

El cariotipo puede hacer evidente la evolución clonal, o sea, la transformación de la enfermedad a un nivel más agresivo, por la aparición de alteraciones adicionales a la t(9;22). En el momento de la transformación a FA o CB, el 60-80% de los pacientes muestran cambios citogenéticos, que son secundarios al Ph⁺. Las anomalías secundarias más comunes incluyen trisomía del cromosoma 8 (34%), Ph⁺ adicional (30%), e i(17q) en 20% de los pacientes y entre las menos comunes se encuentran la pérdida del cromosoma Y, monosomía del cromosoma 7, 17 y trisomía del 17 y 21.²⁰ Las alteraciones complejas secundarias en el cariotipo de pacientes con LMC, son resultado de la inestabilidad genómica de las células leucémicas.^{21,22} Aún no ha sido comprobado el vínculo que existe entre el progreso de la enfermedad y las anomalías cromosómicas secundarias.

*Trisomía del cromosoma 8.

El gen *MYC* está localizado en el cromosoma 8(q24), se sugiere que está relacionado con que la trisomía 8 se asocie con la sobre-expresión de la proteína c-Myc y por lo tanto, involucrada patogénicamente con la progresión de la enfermedad. El gen *MYC* ocasionalmente amplifica o se sobre-expresa en pacientes con LMC- CB, pero no está bien definida la correlación entre la trisomía 8 y la sobreexpresión de *MYC*. Además algunos casos descritos con análisis de microarreglos de AML, con trisomía 8 como la única anomalía cromosómica, revelaron un patrón complejo de la sobreexpresión de varios genes, que no puede limitarse a la sobreexpresión de un subconjunto de genes o un solo gen. Sin embargo, **la expresión negativa dominante** de las moléculas de c-Myc suprime la transformación dependiente de *BCR/ABL*.^{23,24}

* Isocromosoma 17.

Aún no se ha establecido una correlación entre esta anomalía genética y el mecanismo molecular de la progresión de la enfermedad. El i(17q) conduce a la pérdida de 17p y se ha pensado que está asociado con la pérdida de un alelo de P53. Mutaciones en P53 del alelo normal no han sido reportadas en casos de LMC con i(17q), incrementando la posibilidad de que el mecanismo patogénico relevante en pacientes con LMC-CB e i(17q), es la pérdida de la función de genes no identificados. También es posible que la inactivación genética de un alelo P53 en combinación con los efectos *BCR/ABL* dependiente en la expresión /actividad siga siendo el mecanismo patogénicamente relevante LMC-CB con esta anomalía cromosómica.²⁵

*Doble Ph´

El efecto del doble Ph´ en la progresión de la enfermedad, puede ser la mayor expresión de *BCR/ABL*, sin embargo, la relación entre los niveles de *BCR/ABL* y la presencia de un segundo cromosoma Ph´ no se ha probado formalmente y por tanto no se ha podido comprobar si el aumento de expresión

de *BCR/ABL*, *per se*, es suficiente para inducir el fenotipo de las células leucémicas.²³

*Translocación (3;21) y (7;11).

Los efectos patogénicos de las alteraciones genéticas secundarias en la LMC-CB son más claras en t(3;21)(q26;q22) asociada a la proteína de fusión *AML1/EVI-1* y t(7;11)(p15;p15) que fusiona los genes *NUP98/HOXA9*. La t(3;21) ha sido encontrada en aproximadamente 2% de pacientes con LMC-CB, mientras que la t(7;11) es menos frecuente. En estudios con médula de ratones se observó que la co-expresión de *BCR/ABL* y *AML-1/EVI-1* inducía un proceso de la enfermedad caracterizada por la acumulación de células blásticas con bloqueo en la diferenciación. Esto es consistente con la observación que *AML1/EVI-1* suprime la trans-activación dependiente de *AML1* de los genes que regulan la diferenciación e inhibe la diferenciación inducida por G-CSF de células precursoras mieloides 32Dc13. Sin embargo aparentemente la proteína quimérica *Aml-1/Evi-1* interactúa con *SMAD3*, un efector nuclear del factor transformante de crecimiento beta, suprimiendo así los efectos inhibitorios de crecimiento de *TGF-β*.

La translocación (7;11) es una anomalía cromosómica poco frecuente, pero la proteína quimérica *Nup98/Hoxa9* aparentemente es relevante en la progresión de la enfermedad, ya que, en un estudio se observó que los ratones que fueron inoculados con células de médula que expresaban esta proteína, desarrollaban desordenes mieloproliferativos que progresaban a Leucemia Mieloide Aguda después de 4 a 9 meses. La co-expresión de *BCR/ABL* y *NUP98/HOXA9* causa rápidamente la progresión de la enfermedad. Algunos otros estudios relacionan los mecanismos por los cuales *NUP98/HOXA9* coopera con *BCR/ABL*, funcionando el primero, como un potente factor de transcripción e induce los desordenes mieloproliferativos que aparentemente dependen del incremento de la proliferación y supervivencia de los progenitores mieloides. Se sabe que la actividad acumulada de *BCR/ABL* y

NUP98/HOXA9 causa la expansión de las células tronco progenitoras que no son sensibles al estímulo inducido de diferenciación.²³

De 20 a 40% de los pacientes con LMC-CB no presentan anormalidades cromosómicas y presuntamente, sólo una fracción de estos pacientes tiene inactivación molecular del gen *P53*, sin embargo, su supervivencia general es sólo un poco mejor que los que las presentan. Es “tentador” suponer que la carga de la enfermedad de los pacientes sin anomalías cromosómicas es una consecuencia de los cambios epigenéticos.

2.4 Citogenética convencional y FISH.

La citogenética, es el estudio de la estructura de los cromosomas, patología, función y comportamiento de los mismos. Los cromosomas son estudiados en estadio de metafase mitótica o meiótica. La división celular puede encontrarse espontáneamente en MO, ganglios linfáticos, vellosidades coriónicas o placenta y en algunos tumores sólidos. Algunas otras células para estudio citogenético (sin división espontánea) incluyen linfocitos, líquido amniótico, piel y otros tejidos que contienen fibroblastos.²⁶

El análisis citogenético se realiza mediante el ordenamiento de los cromosomas, el cual recibe el nombre de cariotipo, este es la imagen de los cromosomas apareados, los cuales son analizados observando los patrones de bandeo característicos de cada cromosoma. Los patrones de bandeo, se logran usando diferentes técnicas que ponen en evidencia la heterocromatina, contenido de proteínas o regiones nucleares organizadas. Existen diversos tipos de bandeo, el más común es el bandeo GTG, pero también hay otros métodos como bandeo C, Q, R y NOR.²⁷ **Figura 6.**

*Bandas GTG.

Las bandas GTG, G o bandeo Giemsa son el método de rutina preferido para el análisis cromosómico, en este método están involucradas proteasas, tales como la tripsina o incubación en solución salina de citrato.²⁷ El patrón de bandeo obtenido, es el reflejo de la composición estructural y funcional de los cromosomas. Las bandas oscuras están relacionadas con cromómeros en paquiteno, generalmente replicados después de la fase S, conteniendo DNA rico en adenina y timina, contienen relativamente pocos genes activos y pueden diferir de las bandas claras en cuanto a composición de contenido protéico. En general las laminillas para bandas GTG se dejan deshidratar a 56-60 °C, durante una noche o a temperatura ambiente de 3 a 5 días, para obtener mejores resultados.²⁸

*Bandas Q.

Es un tipo de bandeo con fluorescencia, recibe su nombre debido a que se utiliza Diclorhidrato de Quinacrina, el cual es un colorante de acridina que se une al DNA por intercalación de uniones externas iónicas. Se sabe que las bases nucleotídicas adenina y timina fluorescen más que guanina y citocina.²⁹ Mientras que la composición de base de fracciones de cromatina aislados, puede afectar la fluorescencia de ese colorante, el patrón de bandeo observado con esta técnica es influenciado por la variación en la composición protéica de los cromosomas.²⁸ Esta técnica está en desuso por que requiere un microscopio con epifluorescencia y las laminillas no perduran mucho tiempo para su análisis.

*Bandas C

Las bandas C, llevan ese nombre debido a que este método pone en manifiesto la heterocromatina constitutiva no codificante²⁹, tal como el DNA

repetitivo, que en los cromosomas humanos se encuentra generalmente localizado en los centrómeros, con excepción del cromosoma Y donde la banda oscura está localizada en la región distal del brazo largo.²⁸ Para el bandeo C, los cromosomas se exponen a desnaturalización con una solución saturada de hidróxido de bario y HCl, antes de teñirse con Giemsa.³⁰ Las bandas C tiene un uso limitado en el laboratorio clínico y son principalmente para identificar el potencial de genes codificantes o varios segmentos del genoma, especialmente cuando pequeños marcadores cromosómicos, de origen desconocido están presentes y para el estudio de polimorfismos en la población. Los brazos cortos y los satélites de los cromosomas acrocéntricos, la cromatina pericéntrica y muchos de los brazos largos del cromosoma Y son Bandas C- positivas, contienen genes no activos y muestran variantes en el tamaño en individuos normales.²⁹ En las leucemias se usa en casos de LAM-M4 con sospecha de inv(16) que involucra la región heterocromática del cromosoma 16.

*Bandas R

Son las bandas claras, que se observan en el bandeo G,²⁷ el nombre de bandas R, proviene de “reverso”, ya que en este método, las bandas claras observadas en el bandeo G, se observan oscuras. Los cromosomas se desnaturalizan mediante calor en solución salina antes de teñirse con naranja de acridina o pueden también ser teñidas con colorante de Giemsa. El tratamiento con calor, desnaturaliza DNA abundante en adenina y timina y las bandas R son Q negativas.³⁰ Su uso es en general para localizar rearrreglos en la parte distal de los cromosomas. Se pueden visualizar pequeños rearrreglos estructurales en partes del genoma que son muy conocidas y resultan en anomalías fenotípicas.²⁹

*Bandas NOR

Ponen en manifiesto las regiones nucleares organizadas, las cuales se sabe contienen los genes para el rRNA 18S y 28S, que pueden ser teñidas con nitrato de plata, también tiñen proteínas selectivas adyacentes a las regiones NOR. Los genes que codifican para esos rRNA's en humanos están localizados en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13,14,15, 21 y 22).

29

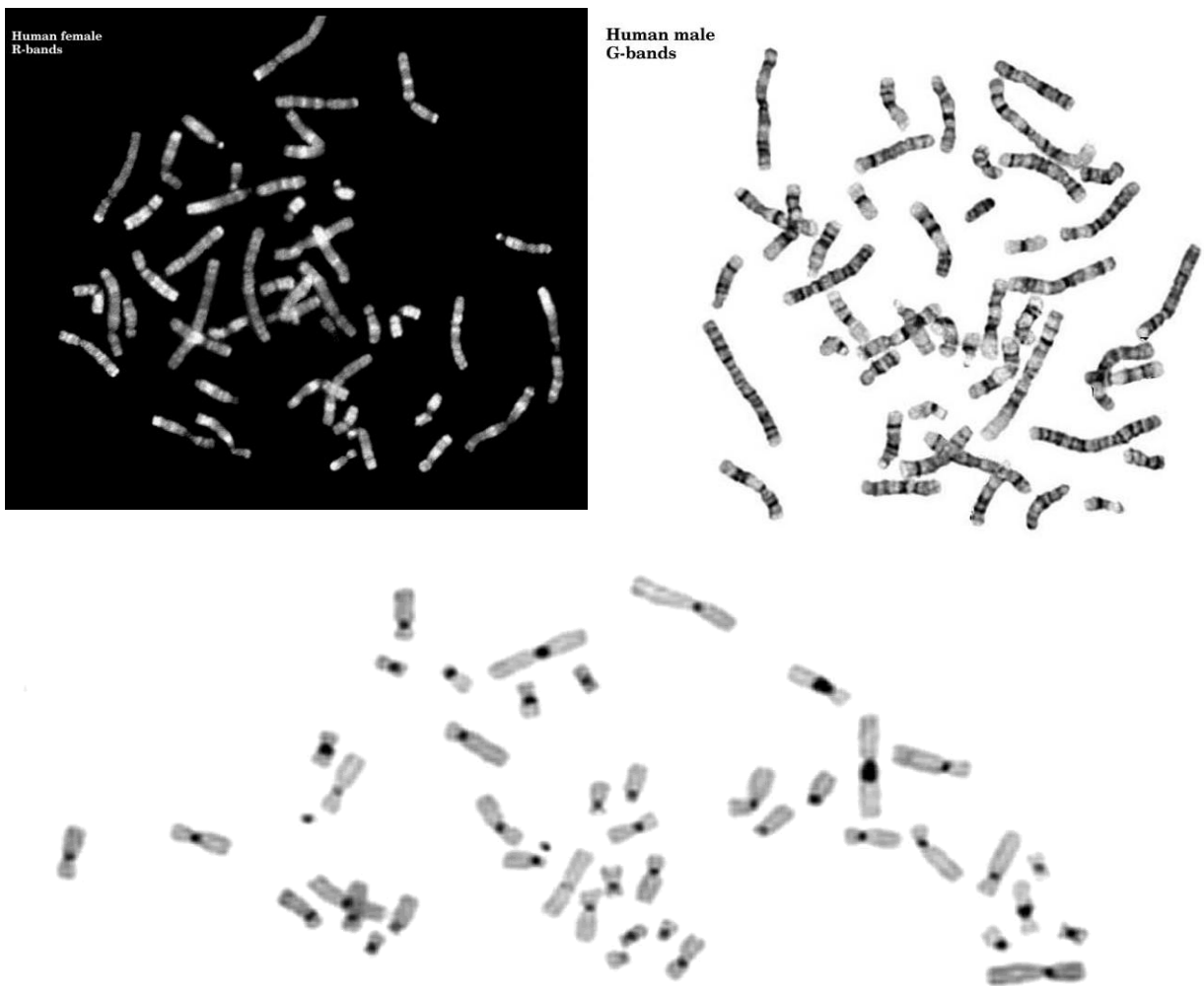


Figura 6. Comparación de distintas técnicas de bandeo. Metafasas. Arriba izquierda. Bando R. Arriba derecha. Bandas GTG y Abajo. Bandas C.

*Hibridación In Situ con Fluorescencia (*FISH*)

En 1969, Pardue y Gall usaron sondas radiactivas de secuencias altamente repetidas de ratón y mostraron que esas secuencias hibridaban con regiones centroméricas de cromosomas. En 1986, Pinkel desarrolló un método para visualizar cromosomas utilizando sondas marcadas con fluorocromos, lo que fue llamado *Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)*.³¹ Los expertos en FISH, refieren a su campo como **citogenética molecular**, porque su obra cruza los campos de la genética molecular (sondas de DNA) y citogenética (evaluación de cromosomas).

Las sondas de *FISH* se clasifican generalmente por el lugar en donde hibrida en el genoma o por el tipo de anomalía cromosómica que detectan. Estas técnicas son útiles en el diagnóstico de diversas enfermedades congénitas y trastornos neoplásicos malignos, especialmente como auxiliar en el estudio cromosómico convencional.³¹

En la LMC, en la técnica de FISH “convencional”, la sonda marcada directamente contiene la porción 5´del gen BCR en 22q11 (color verde) y la porción 3´de *ABL* (roja) en 9q34. En las células con la t(9;22), se observan los cromosomas normales como señales verde y roja respectivamente y una señal de fusión de color amarillo en el Ph´. Esta técnica presenta una baja especificidad debido a la superposición aleatoria de color naranja. Esto conduce a resultados falsos positivos, que limitan seriamente el uso del FISH de primera generación, para la detección de Enfermedad Mínima Residual (EMR).

También existen las llamadas sondas de señal adicional, con este tipo de sondas las secuencias de DNA flanquean los puntos de ruptura en los cromosomas y se fusiona originando una señal amarilla. Sin embargo, parte de las secuencias de DNA reconocida por una de las sondas (*ABL*) permanece en el sitio original, dando lugar a una señal roja.³²

El otro tipo de sondas, las llamadas de fusión dual, las sondas abarcan los genes involucrados, se emplean dos sondas de *ABL/BCR*, uno hibrida al extremo 5' y la otra al 3' de los puntos de ruptura habituales en *ABL*. En las células normales, estas dos señales de color naranja se superponen, originando una señal intensa y grande de color naranja las células con t(9;22) tiene una señal roja y una verde en los cromosomas normales y una señal de fusión amarilla que se observa en ambos derivados (der22 y der9) **Figura 7.**^{33,34,35}

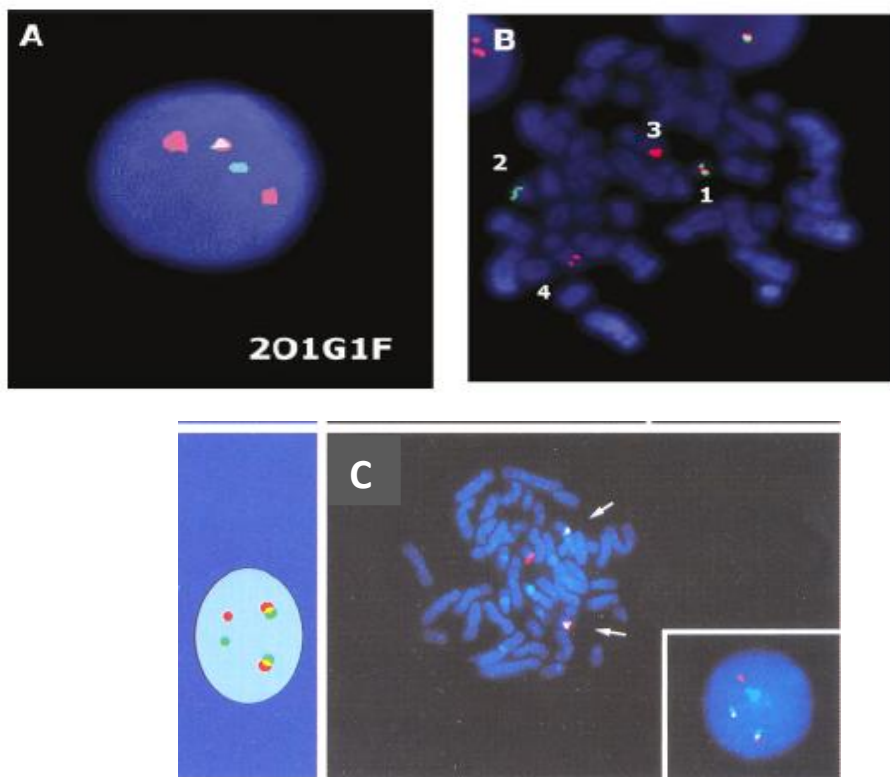


Figura 7. FISH para *BCR/ABL*. En **A** se observa una célula en interfase y en **B** una metafase; en color rojo se observan las señales de los cromosomas 9 y 9q+, la señal amarilla es la señal del cromosoma filadelfia y la señal en verde está referida al cromosoma 22 normal.³⁴ **C** se observa interfase y metafase con FISH de sonda dual.

2.5 Monitoreo citogenético de pacientes con LMC.

Los estudios citogenéticos siguen siendo el “estándar de oro” en el monitoreo del tratamiento de pacientes con LMC. Las definiciones actuales de respuestas citogenéticas se derivaron del análisis citogenético en al menos 20 metafases evaluables. Estos criterios se definieron en los años 90`s en la época del tratamiento con interferón. Los criterios para la evaluación de la respuesta son los siguientes: **Respuesta citogenética completa (RCgC)** con 0% metafases Ph+; **Respuesta citogenética parcial (RCgP)** de 1% a 35% metafases Ph+, y **Respuesta citogenética menor o mínima (RCgM)** de 36% a 90%- 95% metafases Ph+. Una respuesta citogenética mayor se refiere a un porcentaje de 0- 35% de metafases Ph+ **Tabla 3.**^{36,37}

Para los cariotipos de seguimiento posterior a trasplante de células madre hematopoyéticas, se analizan las células en metafase, y para el caso de la evaluación de pacientes con LMC, se requiere una muestra de MO. Además, se sugiere la revisión de por lo menos 30 metafases para detectar el marcador específico de las células del donador y/o receptor. En pacientes que logran desaparición de la clona Ph+ con el tratamiento (RCgC), se ha informado la aparición de alteraciones clonales en las células Ph+ negativas, con una frecuencia variable entre el 2-17%. Las alteraciones que se presentan son características de otros tipos de desórdenes hematológicos como LA o síndromes mielodisplásicos; sin embargo, el significado clínico de estos hallazgos aún es incierto.³⁸

Tabla 3. Criterios citogenéticos para el monitoreo de pacientes con LMC.¹⁴

Nivel de Respuesta Citogenética	% de Metafasas Ph+	
Completa	0%	RESPUESTA CITOGÉNICA MAYOR
Parcial	1- 35%	
Menor	36-95%	
Sin Respuesta	> 95%	

2.6 Aspectos moleculares de la LMC.

a) Gen BCR

Se trata de un gen localizado en el cromosoma 22q11.2, que tiene un tamaño de 130 kb.⁵ y consiste en 23 exones de los cuales, los dos primeros son exones alternativos en el extremo 5'. Han sido encontrados dos diferentes mRNAs de *BCR* de 4.5 y 7 Kb que codifican para proteínas de 100 y 160 KDa respectivamente.¹⁴

El gen *BCR* es una molécula compleja con varios dominios funcionales: el dominio cinasa de treonina/ serina, el de unión SH2, de oligomerización, un dominio central, el relacionado con GEF, Interacción con Gen producto de XPB y Dominio terminal COOH. **Figura 8.**

El primer exón de *BCR* es de significancia crítica, debido a que está incluido en todas las proteínas de fusión de Bcr/Abl. Dentro de esta región de *BCR*, reside el dominio cinasa, dos **cajas** ricas en serina que contienen dominios de unión **SH2**, y un dominio de oligomerización.

Dominio cinasa de serina/treonina

La proteína Bcr tiene actividad de serina/treonina en el primer exón, una secuencia consenso homóloga al sitio de unión del ATP de otras cinasas, y ha sido identificado un dominio de fosfotransferasa. Bcr, puede autofosforilarse en residuos de serina y treonina, así como caseína e histonas transfosforiladas en técnicas *in vitro* (estos últimos son sustratos conocidos para cinasas de serina/treonina). En la LMC Ph+, las fosfotirosinas están presentes en *BCR* y en *BCR/ABL*, debido a la actividad tirosina cinasa de Bcr/Abl. El primer exón del componente Bcr de Bcr/Abl es también fosforilado en residuos de serina/treonina. De hecho, la mayoría de la autofosforilación de Bcr/Abl se produce dentro del segmento de Bcr más que en Abl. Este dominio es de gran significancia debido a que, al tener una actividad similar a la de una cinasa de tirosina, aumenta la actividad de autofosforilación y por consiguiente la desregulación de diversas funciones celulares, donde Bcr/Abl está implicada.

Dominio de unión SH2

Es un dominio altamente conservado. Se trata de una región no catalítica de aprox. 100 aminoácidos que unen los sitios de unión SH2 consistiendo de 3 a 5 aminoácidos incluyendo fosfotirosina. Esta interacción es importante en el ensamble de señales complejas de traducción. Bcr es la única, en que los dominios SH2 de otras proteínas pueden unir el fosfoaminoácido de serina, treonina o tirosina (solo en uno), en dos de sus sitios de unión a SH2.

Un dominio SH2 que se une a Bcr es el de Abl, y esta interacción está mediada a través de las serinas y treoninas fosforiladas. Algunas secuencias de Bcr involucradas en esta falsa interacción entre los aminoácidos 192-242 y 298-413 son esenciales para la activación de oncogén *BCR/ABL*. También ha sido encontrada una tercera región de *BCR* de unión a SH2, que interactúa a

través de una tirosina fosforilada con la proteína adaptadora Grb2 (una proteína esencial en la vía de transducción de señal Ras).³⁹

Dominio de oligomerización

El tercer dominio funcional se encuentra entre el exón 1 de *BCR* y es caracterizado por repetidos heptavalentes de residuos hidrofóbicos entre los aminoácidos 28 y 68. Las mutaciones dentro del dominio de oligomerización atenúan la actividad enzimática de la cinasa de tirosina de *BCR/ABL*. Este dominio también tiene efectos en la localización.³⁹

35

Dominio central

Es una región que incluye la interacción con la proteína G en múltiples niveles. Esas proteínas son esenciales en: señales intracelulares, organización citoesquelética, crecimiento celular y desarrollo normal. Las proteínas G cíclicas tienen una interacción de unión con GDP en estado inactivo, el estado activo es determinado por un proceso que es regulado por GAPs y GEFs (factor de intercambio de guanina). GEFs activa a la proteína G por conversión de GDP a GTP, en contraste, GAPs inactiva la proteína G por activación de GTPasa, a su vez, regula a la baja la proteína por hidrólisis de GTP.³⁹

Dominio relacionado con GEF

La región central del gen *BCR* presenta homología con la expresión del protooncogen *VAV hematopoyético*. En adición, las secuencias centrales demuestran homología con división de células de levadura del gen cíclico *CDC24*, su contraparte en el humano es el oncogén *DBL* que codifica para GEF. EL *CDC24* codifica para un regulador del ciclo de división celular, controlando la proteína y también juega un papel importante en la organización citoplasmática y citoesquelética, polaridad celular.³⁹

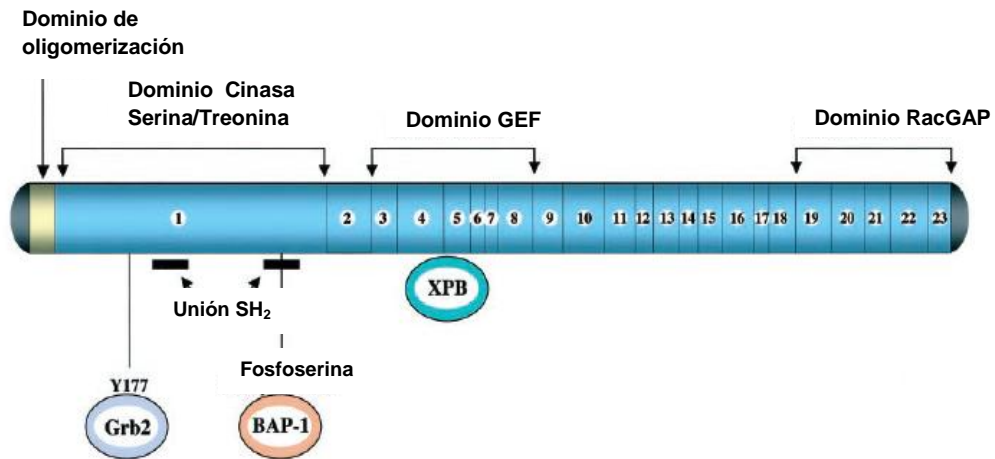


Figura 8. Dominios de proteína Bcr. Se muestran los diferentes dominios de la proteína BCR. **GEF:** Factor de Intercambio de Guanina; **Grb2:** Factor de crecimiento de proteína de unión al receptor; **BAP-1:** BRCA1 asociada a la proteína-1 (ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal); **XPB:** Xeroderma Pigmentoso B ; **RacGAP:** Rac- Proteína activadora de GTPasa -1

La proteína de *BCR* se expresa primariamente en estados tempranos de la diferenciación mieloide y los niveles se reducen significativamente conforme maduran los leucocitos polimorfonucleares,¹⁴ se expresa de forma ubicua, fue considerada primero como una proteína citoplásmica, pero en estudios posteriores demostró su capacidad para asociarse al DNA condensado. También se ha implicado en la regulación de la vía de señalización WNT y tiene un papel importante en el acarreo de receptores del factor de crecimiento. Adicionalmente, Bcr interactúa con la proteína del xeroderma pigmentoso B (XPB), posiblemente afín a Bcr o reparación de DNA.¹⁴

b) Gen ABL

La cinasa de tirosina del gen *ABL* es homólogo del gen viral de leucemia murina de Abelson (ABL, ABL1), localizado en la región q34 del cromosoma 9. Contiene en total 11 exones, y puede ser 1a o 1b dependiendo del procesamiento (*splicing*) alternativo. La transcripción de *ABL* genera dos distintos mRNAs de 5 o 6.5 Kb que son traducidos a dos proteínas isofórmicas

de 145 KDa **la e Ib**, difiriendo en 19 residuos amino terminal. La isoforma **Ib** contiene el ácido graso C14 Miristoil, afín a este amino terminal y es expresado en más altos niveles que la forma no-miristolada (**Ia**).⁴⁰ La proteína es expresada ubicuamente y se encuentra localizada en citoplasma y núcleo de las células, siendo capaz de transportarse a través de estos dos compartimientos. **Figura 9.**

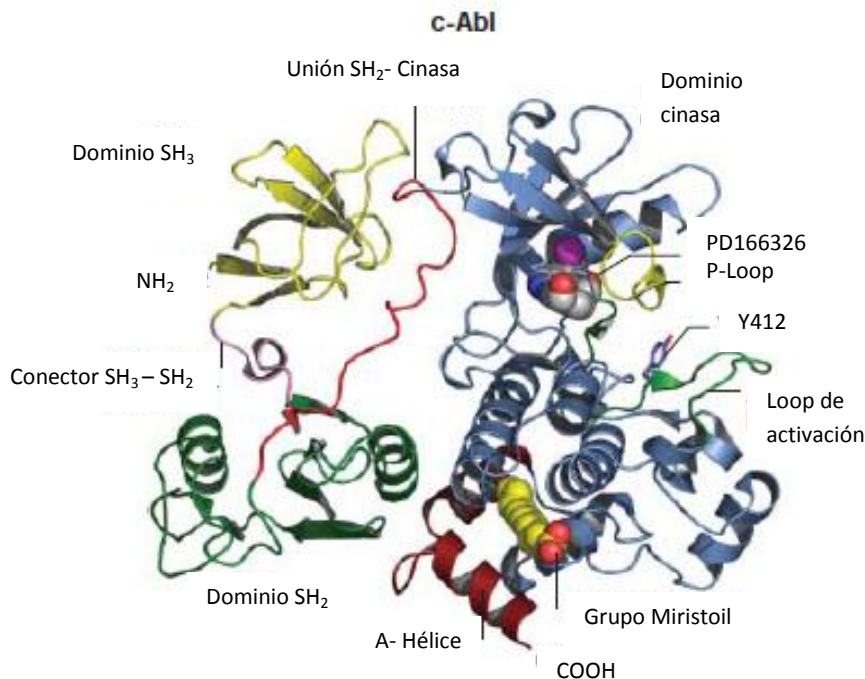


Figura 9. Estructura tridimensional de Abl. Se observa la estructura de la proteína Abl en su isoforma Ib.⁴⁰

La proteína Abl se ha implicado en varios procesos celulares, tales como la regulación de proliferación celular, diferenciación, adhesión y muerte celular. Esta proteína promueve e inhibe el crecimiento celular. En células quiescentes, Abl ayuda a inactivar por unión a proteína Rb (proteína supresora de tumores), también activa otros genes que promueven el crecimiento, sin embargo, en algunos estudios se ha demostrado que la sobre-expresión de Abl induce el bloqueo del ciclo celular en fase G1.

El Abl nuclear (n-Abl) está involucrado en ciclo celular y responde a genotoxicidad, mientras que Abl citoplásmico (c-Abl) se ha implicado en la inducción de apoptosis en daño al DNA, mediante la proteína p53 y p73, bloqueando las células en crecimiento e induciendo apoptosis.⁴¹

Se activa como respuesta al estrés celular, tal como radiación ionizante o estrés oxidativo. La activación por estrés o mitógenos activa la proteína MAPK y a JNK/SAPK, miembros de la familia Jun N- terminal y p38, también tiene un papel en la mediación de inducción de muerte celular. c- Abl es asociada con las fibras de actina, que forman la estructura básica del citoesqueleto y es por tanto involucrada con la motilidad y adhesión celular.

La actividad cinasa de tirosina de Abl normal, es altamente controlada, ya que los residuos del extremo amino, forma una estructura de “capucha” que está presente en ambas variantes del *splicing*. La estructura de capucha inhibe la actividad cinasa de la proteína por unión intra-molecular a SH3 y dominios catalíticos, que conduce a la auto-inhibición.

La modificación de miristoil en la isoforma Ib también tiene un rol en la regulación de la actividad cinasa por unión al dominio catalítico, pero la regulación de la isoforma, aún no está determinada.^{14,18,39}

Los miembros de la familia de las cinasas Abl, junto con las de la familia Src y la familia Tec, tienen un dominio similar de organización. Las proteínas tienen una cinasa de tirosina que está precedida por un Homólogo Src-2 (SH2) y un dominio SH3. Esos tres dominios están conservados, no solo en secuencias terminales de identidad (42% entre c-Abl y c-Src), sino también en términos de esos rearrreglos y espaciamiento. Por el contrario, las regiones que se encuentran río arriba del dominio SH3 y río abajo del dominio cinasa son diversas. El extremo amino de los miembros de la familia Abl, consiste en la región “CAP”, que está presente en diferentes variantes de empalme. La

misma región en cinasas de la familia Src que se denomina la región única (o dominio SH4) y ancla la proteína a través de membranas de miristoilo y /o grupos de palmitoil, no implicados en la inhibición de la cinasa. **Figura 10.**³

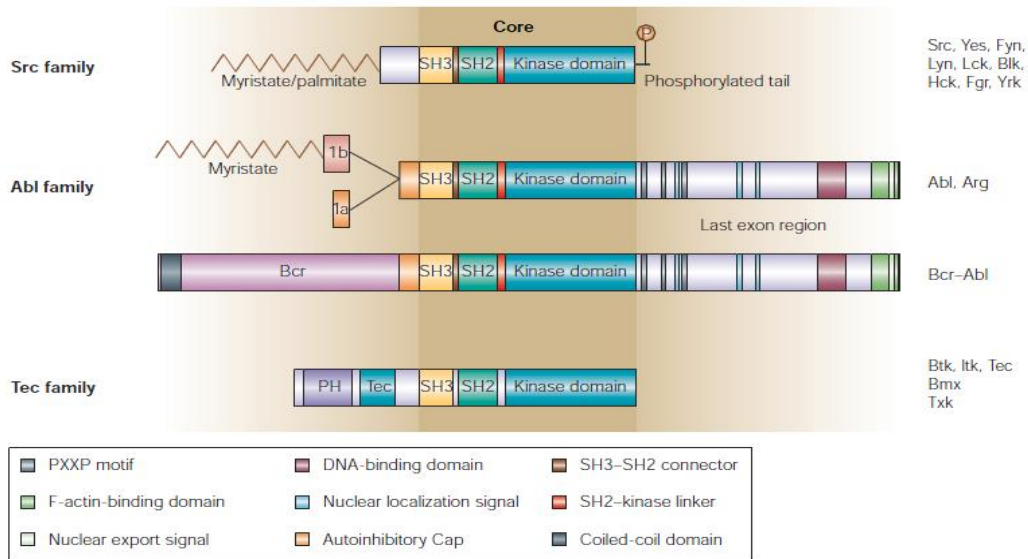


Figura 10. Dominios de Abl y homólogos. Esquema de los distintos dominios de la familia de proteínas Abl y sus homólogas Src y Tec.⁴⁰

Src

Juega un papel importante en la transducción de señales inducida por un número de estímulos extracelulares, incluyendo factores de crecimiento e integrinas. Src regula la activación del crecimiento celular, migración y sobrevivencia, muestra también actividad oncogénica cuando está desregulada. Esto se demostró primeramente con v-Src, una forma viral y activa de la contraparte celular responsable de la actividad oncogénica del *Rous sarcoma- virus* en pollos.⁴¹

c) Gen de fusión *BCR/ABL*

En la t(9;22) dicho rearrreglo involucra la adición de segmentos 3' del gen *ABL* (ubicado en el cromosoma 9q34) a segmentos 5' del gen *BCR* (ubicado en el cromosoma 22q11) creando un gen híbrido *BCR/ABL* que es transcrito a un RNA mensajero quimérico *BCR/ABL* de 8.5 Kb.⁴²

En los 70's y 80's, la investigación de transformación de retrovirus llevó a grandes avances en cuanto a tumores malignos humanos. Estos estudios revelaron que las mutaciones en genes celulares normales podrían ser oncogénicas. Por ejemplo, el virus de la leucemia murina de Abelson, descrita inicialmente en 1970, condujo a la identificación de su gen transformante, v-*ABL* y a la clonación de su homólogo celular normal c-*ABL*. Mediante el mapeo de oncogenes específicos para localizaciones cromosómicas, se reconoció que el c-*ABL*, que normalmente se encuentra en el brazo largo del cromosoma 9, se había translocado al cromosoma 22 en pacientes con LMC. Los puntos de ruptura en el cromosoma 22 están agrupados en una región relativamente pequeña que se extiende por 5.3 Kb fue nombrada BCR (región de ruptura de conglomerados).³

El punto de ruptura de *ABL* puede ocurrir en cualquier sitio a lo largo de un área de 300 Kb en su extremo 5'. En contraste de *BCR* que puede romperse en tres diferentes regiones: el primer sitio se ubica en un área de 5.8 Kb entre los exones 12 y 16 (b3 y b2), referido como región de ruptura mayor (**M-bcr**), la cual codifica a una proteína de 210 kDa (p210^{Bcr-Abl}), característica de los pacientes con LMC y de un tercera parte de los pacientes con LLA. El segundo sitio de ruptura se ubica en el exón 2 (e2) en un área de 54.4 Kb conocida como región de ruptura menor (**m-bcr**) y codifica a una proteína de 190 kDa (p190^{Bcr-Abl}) presente en pacientes con LLA.⁸ Finalmente, el sitio de ruptura conocido como micro (**μ-bcr**), se ubica en el exón 19 de *BCR* y codifica

a una proteína de 230 kDa ($p230^{BCR-ABL}$) característica de la leucemia neutrofílica crónica. **Figura 11.**⁴²

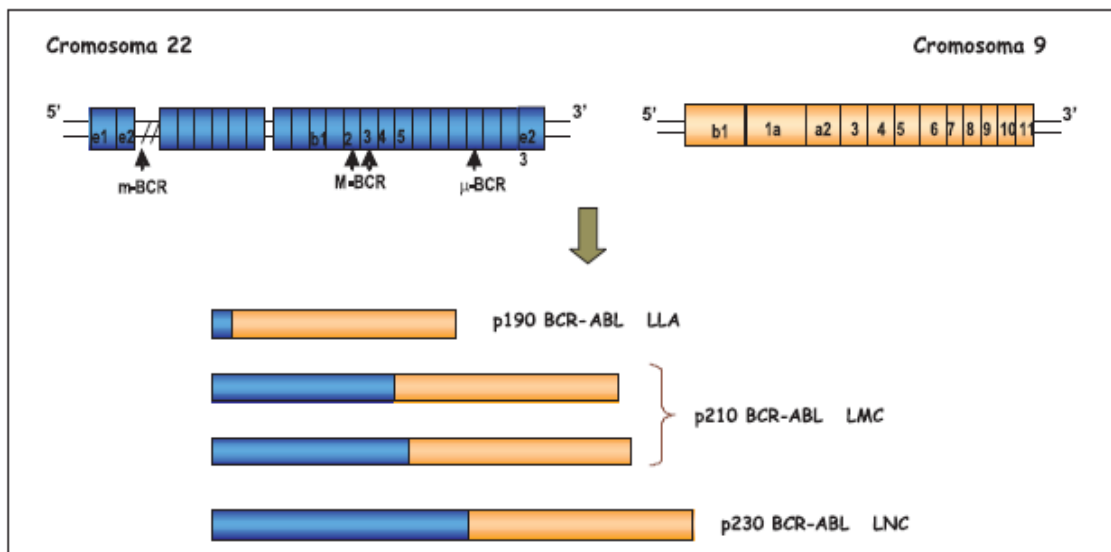


Figura 11. Sitios de Ruptura de BCR. Se muestran los 3 distintos puntos de ruptura de BCR y en la parte inferior se indican las proteínas producto de las translocación de los cromosomas 9 y 22.⁴²

d) Proteína de BCR/ABL.

La proteína p210 es la que se encuentra presente en los pacientes con LMC Ph+, se ubica preferencialmente en el citoplasma, en donde tiene una actividad incrementada y constitutiva de cinasa de tirosina, la cual es esencial para la transformación maligna, ya que es capaz de modificar los mecanismos de proliferación celular, la apoptosis y la adhesión celular, eventos que conducen a un fenotipo leucémico. **Tabla 4.**^{42,43}

En cuanto a las alteraciones en la adhesión celular, se sabe que, cuando las células troncales hematopoyéticas se encuentran unidas al estroma de la médula ósea, se regula negativamente la proliferación celular a través de la participación de integrinas, selectinas e inmunoglobulinas, siendo particularmente importantes las β- integrinas, que al unirse a su receptor son capaces de inhibir la proliferación de células hematopoyéticas normales. No

obstante, en la LMC se detectan anomalías en la expresión de selectinas e integrinas y se ha confirmado que células progenitoras Ph⁺ se unen con menor afinidad al estroma que su contraparte normal e incrementan sus plegamientos en la membrana, aumentando con ello, la movilidad celular, lo que favorece la liberación de células inmaduras y anormales a la circulación sanguínea.⁴²

Otro evento asociado con Bcr/Abl es el incremento en la actividad proliferativa de las células leucémicas. Esta actividad está mediada por múltiples vías de señalización, que involucran la participación de proteínas Ras, Stat y la vía del PI3-cinasa, estas dos últimas también están involucradas en los mecanismos de apoptosis, ya que regulan la inhibición de los genes pro-apoptóticos *BAD* y la inducción del antiapoptótico *Bcl-x_L* respectivamente. Así mismo, Bcr/Abl es capaz de proteger de la apoptosis inducida por estrés mecánico y químico y aunque el mecanismo no está totalmente entendido, se sabe que puede bloquear la liberación de Citocromo-C de la mitocondria e inhibir la activación de caspasas.⁴² **Figura 12.**

En un estudio se encontró que la expresión de C/EBP α , el cual es un miembro de la familia de proteínas CCAAT (potenciadores de proteínas de unión) que tiene una función como potenciador de unión de factores de transcripción, requerido para la diferenciación mieloide, es regulada por *BCR/ABL* dependiendo de la dosis de este. La expresión de C/EBP α puede revertir el proceso de diferenciación inducido por G-CSF en células *BCR/ABL* positivas.²³

También se ha encontrado que el gen *MDM2* se activa por *BCR/ABL* después de la transcripción y funciona como un regulador negativo de p53, lo que desactiva la respuesta de reparación de daño al DNA mediada por p53.²³

La expresión de C/EBP α y *MDM2* es en parte, regulada por p210, por la activación de 2 proteínas de unión a ARN (hnRNP- E2 y La) con un efecto

negativo o positivo en la C-EBP α y traducción de mRNA MDM2, respectivamente.²³

Tabla 4. Características de la Proteína p210.³⁹

Localización del gen codificante	Cromosoma 22q11
Tamaño del gen	<ul style="list-style-type: none"> *Varía de acuerdo del sitio de ruptura. *La ruptura es en la región central de <i>BCR</i>, se sabe es de 5.8 Kb (M-bcr). *Las rupturas pueden ocurrir entre los exones 2 y 3 o 3 y 4 de M-bcr (b2a2 o b3a2). *La ruptura en <i>ABL</i> ocurre solo en el exón 1.
Tamaño de transcrito	8.5 Kb de transcrito BCR-ABL
Localización	Se localiza en estructuras vesiculares de F- actina cortical.
Funciones	<ul style="list-style-type: none"> *Actividad de Tirosina cinasa constitutiva. *Puede unir microfilamentos y actina citoesquelética. *Disminuye la expresión de diferenciación mieloide. *Los sustratos pueden incluir moléculas de transducción de señales relacionadas con Ras. *Formación de complejos con fosfoproteína de tirosina Crkl, una proteína adaptadora SH2/SH3. *Interactúa con p62Dok proteína de acoplamiento. *Puede prevenir la apoptosis. *Relación con la vía Jak/ Stat (especialmente Stat5) *Relación con la vía fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt. *Activan Jun- cinasa. *Interacción y regulación con la proteína XPB. *Transformación de actividad parcialmente mediada a través de la vía Ras. *Puede provocar alteraciones en las propiedades de adhesión. *Regula negativamente la expresión de la proteína Ship.

Otros dos genes regulados por Bcr/Abl en la LMC-CB son *EVI-1* y *HOXA9*, factores de transcripción que pueden cooperar con *BCR/ABL* en el bloqueo de la diferenciación mieloide y aumentar la ventaja proliferativa y la supervivencia de las células que expresan *BCR/ABL*. Tal vez, el efecto acumulativo de *MDM2*, *EVI-1*, *HOXA9*, y otros blancos de *BCR/ABL* implicados en la proliferación, supervivencia y diferenciación, junto con la baja regulación de *C/EBP α* , conduce gradualmente a la detención de diferenciación, apoptosis, reducción de la susceptibilidad y mayor potencial proliferativo de las células leucémicas en CB.²³

La sobreexpresión de *BCR/ABL* puede ser también implicada en la represión transcripcional mediante la promoción de la hipermetilación de regiones reguladoras de genes específicos. Uno de estos genes es en sí *ABL*, que está hipermetilado y se expresa en niveles bajos en LMC-CB. La proteína c-Abl ha sido implicada en la respuesta al daño del DNA y en la apoptosis; por lo tanto, la baja modulación de la expresión de c-Abl podría reducir aún más la susceptibilidad a la apoptosis debida al daño inducido al DNA de células que expresan *BCR/ ABL*, al tiempo que mejora su inestabilidad genómica, dos funciones que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad.²³

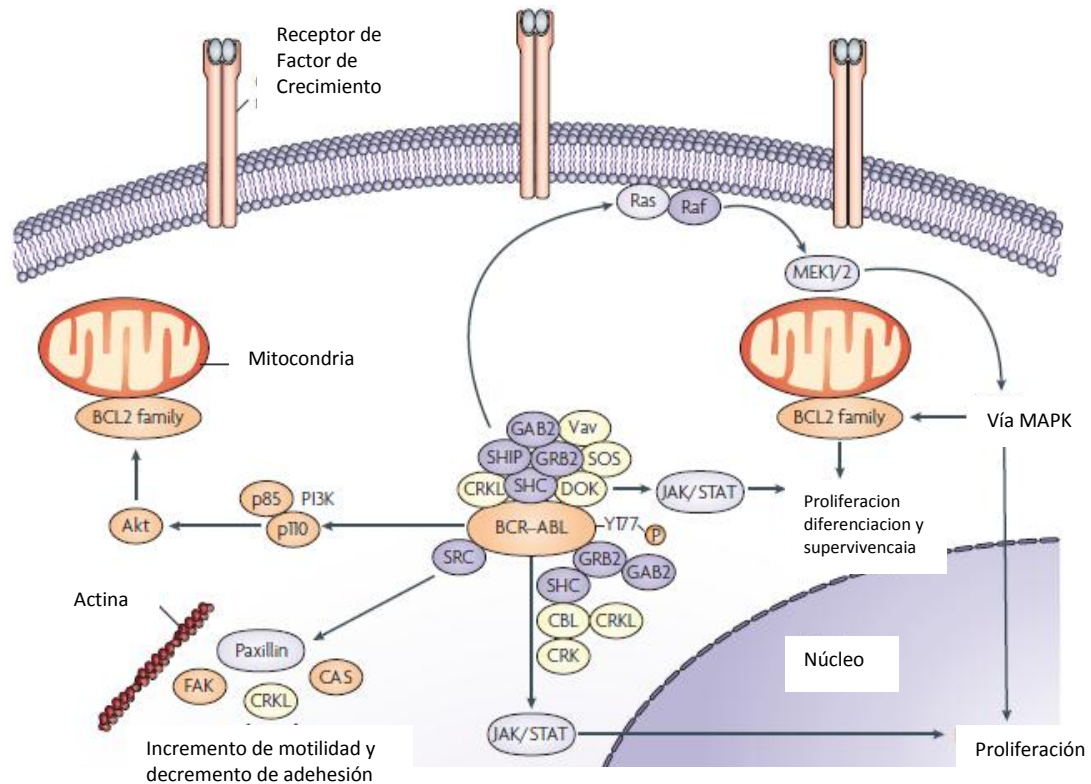


Figura 12. Implicación de *BCR/ABL* en vías de transducción de señales.

e) Monitoreo molecular de pacientes con LMC.

La enfermedad mínima residual (EMR) es definida como el menor número de células leucémicas que pueden ser detectadas por análisis citogenético, morfológico y molecular.⁴⁴ En cuanto al análisis molecular la EMR, puede ser detectada mediante la PCR, ya sea cualitativa RT-PCR o cuantitativa RQ-PCR.

El fundamento de la RT-PCR y la RQ-PCR es idéntico. Se trata de la amplificación de material genético, ya sea RNA o DNA mediante un termociclador y ciclos consecutivos de desnaturalización de DNA, hibridación con cebadores con el gen blanco y la extensión del nuevo producto. La diferencia radica en que, en la RT-PCR el producto amplificado se observa y/o analiza al final de la reacción, mientras que en la RQ-PCR es posible visualizar la dinámica de las curvas de amplificación, mediante la ayuda de fluorocromos

unidos a sondas de hibridación que van uniéndose a la secuencia blanco o medida que va sintetizándose y son detectados y analizados con un programa informático.^{45,46}

Para que se lleve a cabo la reacción, se necesitan de diversos componentes, tal como DNA, oligonucleótidos que también son conocidos como cebadores o sondas, enzima DNA- Polimerasa, nucleótidos trifosfatados (dNTP's). **Figura 13.**

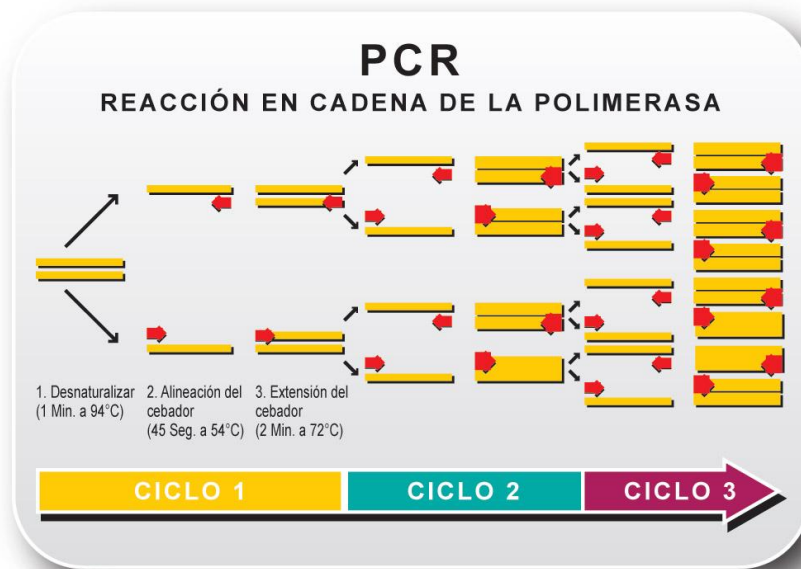


Figura 13. Esquema de la PCR convencional y la formación de productos.

Existen diferentes variantes de PCR, para el monitoreo de la LMC se realiza la RT-PCR en muestras de MO o SP. Para la observación de calidad de síntesis de cDNA a partir de RNA obtenido de la muestra de algún paciente se suele realizar PCR- Multiplex, la cual está basada en el uso de múltiples primers que amplifican múltiples “segmentos de DNA” en una sola reacción, la ventaja de este tipo de PCR es que minimiza el número de reacciones por separado.⁴⁷

Otro de los subtipos es la reacción **anidada**, que ayuda a incrementar la especificidad. Este subtipo de PCR, consta de dos reacciones; la primera para amplificar ciertos fragmentos de interés y el producto de esta, se usa como fuente de cDNA para la segunda reacción donde se usan oligonucleótidos diferentes que reconocen secuencias “*internas*” dentro de los fragmentos ya obtenidos en la primera reacción. Los fragmentos que se requieren obtener en el caso de la LMC, son los diferentes transcritos de *BCR/ABL* (b3a2, b2a3, e1a1).³⁰ Este método detecta solo los transcritos del gen de fusión, se trata de una técnica solamente cualitativa, ya que mediante un gel de agarosa, se observan las bandas correspondientes a los transcritos de *BCR/ABL* y el gen constitutivo.

Actualmente la variante de la PCR más utilizada es la RQ-PCR, se trata de una variante cuantitativa, que detecta los niveles de transcritos. La RQ-PCR es de gran ayuda, ya que se ha establecido una escala internacional (EI) para el monitoreo de la LMC, observando la reducción en los niveles de transcritos.⁴⁸ Esta EI, se expresa en %, donde 100% es la línea basal, 0.1% o 3 log de reducción se refiere a el logro de la Respuesta Molecular Mayor (RMM), y de 1-2 % corresponde al límite en el cual se pueden detectar mediante análisis citogenético el porcentaje necesario para alcanzar la RCgC.⁴⁸⁻⁵⁰

El logro de una RMM, como su nombre lo dice es la mayor respuesta que se puede alcanzar, anteriormente se hablaba de “Respuesta Molecular Completa” o “PCR negativo”, sin embargo, estos términos implican una absoluta falta de medición de la leucemia, es decir que los transcritos han desaparecido, lo cual no es correcto, debido a que en la medición influye la sensibilidad de la técnica, la RT-PCR anidada tiene una sensibilidad de 10^5 , mientras que la RQ-PCR de 10^6 , por lo cual no podemos saber con certeza si los transcritos han desaparecido.^{37,44}

Desde la PCR convencional hasta la PCR tiempo real, el reordenamiento *BCR/ABL* ha sido siempre uno de los puntos de partida para desarrollar y estandarizar nuevas técnicas moleculares. El resultado positivo de una PCR cualitativa es crítico en el diagnóstico de la LMC y proporciona datos para iniciar la terapia con fármacos que tengan como blanco la cinasa de tirosina, tal como el IMI.^{49,51} Hay informes donde la PCR cualitativa reveló, que los pacientes que conseguían negativizar con el tratamiento el reordenamiento *BCR/ABL*, mantenían la enfermedad controlada y en remisión, sin embargo el comportamiento de aquellos que permanecían positivos era variable, y también se sabe que dentro de los “positivos”, el nivel de transcritos es distinto. Actualmente se sabe que los niveles de *BCR/ABL* van a ir paralelos a la respuesta citogenética, así una reducción de más de 2 logaritmos (log) (1%) se correlaciona con la RCgC.³⁶

En el análisis molecular del estudio IRIS, la Respuesta Molecular Mayor, fue definida como la reducción de 3 log en los niveles de *BCR/ABL/BCR* cuando se comparaba la media del nivel antes del tratamiento. El último fue calculado por medición de los niveles de *BCR/ABL/BCR* en 30 pacientes. En otro estudio la proporción de *BCR/ABL/ABL* de 0.045% fue usada para definir la Respuesta Molecular Mayor. Esto está basado en un estudio de pacientes tratados con INF- α (interferón alfa) quienes lograron una RCgC, donde el valor de la media de los niveles de *BCR/ABL/ABL* en pacientes que mantuvieron estable su RCgC fue de 0.045%. Una reducción de 3 log bajo la línea basal es de hecho similar al nivel definido por el estudio de Hochhaus. La ventaja de la definición de la respuesta molecular de acuerdo a la reducción desde una media del nivel antes del tratamiento, es que una vez que un laboratorio ha establecido su media en el nivel de base, los resultados se pueden expresar en una escala común internacionalmente. Otra ventaja es que la respuesta molecular puede ser calculada sin necesidad de saber el nivel actual de la línea basal para un paciente en particular.²¹

La principal meta del monitoreo es detectar la EMR y la recaída temprana. En tales casos, la detección temprana de la recaída puede clínicamente intervenir más pronto tal como la retirada de la inmunosupresión, iniciación de terapias de rescate tal como donación de infusión de linfocitos o un segundo trasplante de células hematopoyéticas.³⁵

2. 7. Tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica.

49

La introducción en los 90's de Interferón- α (INF- α) y de células madre, en principio, permitió a los pacientes lograr respuestas citogenéticas y remisiones prolongadas. Sin embargo, el aumento de la comprensión de la actividad anormal de la proteína Bcr/Abl y su papel en la LMC, llevaron al desarrollo de terapias dirigidas, como los inhibidores de la cinasa de tirosina, por ejemplo el Mesilato de Imatinib (MI).

El tratamiento para la LMC representa un modelo para la terapia contra el cáncer, con la demostración de que los inhibidores ATP- competitivos bloquean la actividad de la cinasa de tirosina Bcr/Abl, particularmente el MI (Gleevec®), que puede inducir respuestas duraderas en la gran mayoría de los pacientes. Sin embargo, la aparición de clones leucémicos resistentes que llevan mutaciones en el dominio cinasa de Bcr/Abl representa un mecanismo importante de resistencia a la enfermedad, que puede ser tratada con el cambio de tratamiento a menudo con otro inhibidor de la cinasa de tirosina, que difiere con respecto a la farmacocinética y propiedades inhibitoras de la cinasa, tales como dasatinib y nilotinib.⁵² El Bosutinib que es un inhibidor de tercera generación, ha demostrado ser eficaz con un buen perfil de seguridad aceptable en un estudio abierto fase 2 de prueba con los de segunda y tercera línea.²¹

a) Antecedentes del tratamiento para pacientes con LMC.

Históricamente, la terapia para los pacientes diagnosticados con LMC, se realizaba empíricamente. La base de la terapia para LMC fue desarrollada por el Dr. Thomas Fowler a mediados de los años 70's. El ingrediente activo de la solución de Fowler fue probablemente arsenato de potasio, recientemente ha existido un resurgimiento en cuanto al interés en el uso de arsénico para el tratamiento de la LMC.³

En los años 1950 y 1960, las quimioterapias se introdujeron para usarse en leucemia y otras neoplasias, incluyendo la LMC. Agentes tales como hidroxiurea y busulfan fueron capaces de controlar los síntomas de la enfermedad, muchos individuos lograron un grado importante de remisión hematológica, sin embargo, estos agentes no lograron retrasar la progresión de la enfermedad y la supervivencia general no se prolongaba.²¹

En la década de 1980, se intentó comprender acerca de la función inmune aumentada y diversos enfoques inmunológicos para el tratamiento del cáncer humano. Se encontró que el Interferón, ya sea solo o en combinación con la quimioterapia convencional, mejoraba el curso clínico y la supervivencia general de muchos pacientes con LMC. Una limitación de la terapia con INF- α fue y ha sido su toxicidad, y en algunos casos, debe interrumpirse a pesar de un efecto positivo sobre la leucemia del paciente.

En paralelo con INF- α , el trasplante de células hematopoyéticas ha entrado en uso para el tratamiento de LMC. Aunque la posibilidad de éxito del trasplante alogénico de células hematopoyéticas, se demostró por primera vez en la década de 1950, tomó varios años, antes de que las reacciones de injerto contra huésped-(GVHR) se controlara suficientemente, para hacer de esto una opción terapéutica viable tanto para los pacientes con LMC y otros tipos de leucemia.⁵³

2.7.1 Interferón α (INF- α).

Los interferones son glicoproteínas con propiedades antiproliferativas, antivirales e inmunoregulatorias, producidos por varios tipos de células en respuesta a infecciones virales. El interferón- α y β son ácidos estables, uniéndose a receptores iguales y son producidos principalmente por leucocitos y fibroblastos, respectivamente.

El interferón estimula las células T citotóxicas, reconociendo específicamente Bcr/Abl o Bcr/Abl dependiente de antígenos. Uno de los Bcr/Abl dependientes de antígenos es la serina proteasa, y la proteinasa-3.⁵⁴

La molécula de INF- α es usada en el tratamiento de la LMC e inicialmente era preparado de leucocitos humanos, en la actualidad es producido esencialmente mediante técnicas de recombinación. Tiene un potencial de control de la progresión en la FC y ha sido el primer medicamento no mielotóxico que mostró una reducción en la positividad del Ph' en algunos pacientes. El uso del INF- α en la LMC fue evaluado, primero por un grupo de Houston en el *M.D Anderson Cancer Center*, hace 20 años. El INF- α leucocítico humano fue usado inicialmente en 51 pacientes en FC tratados con dosis de 3 a 9 millones de unidades internacionales (MIUS) diariamente. El IFN- α resultó en un control satisfactorio de la enfermedad en 36 (71%) de los pacientes, con normalización del conteo y decremento gradual de celularidad en MO y SP.⁵⁵

La terapia de combinación de INF- α y quimioterapia fue usada para lograr la RHC o RCgC en pacientes resistentes. También se supone que una mayor tasa de respuesta citogenética, podría lograrse mediante el aumento de la mielo-supresión con una combinación de fármacos mielotóxicos. Debido a su actividad *in vitro*, el Arabinósido de Citosina (Ara-C) solo se ensayó *in vivo* para el tratamiento de pacientes que tenían LMC-FC. El tratamiento de dos pacientes en la FC con bajas dosis de Ara-C (infusión subcutánea continua) resultó en una reducción significativa de metafases con Ph+. Basándose en

estas observaciones, Ara-C fue probado en combinación con IFN- α , produciendo altos rangos de respuesta positiva.⁵⁵

2.7.2 Inhibidores de la Cinasa de Tirosina.

Hacia 1995, el grupo de Buchdunger y colaboradores, informan la síntesis de compuestos con actividad inhibitoria contra el receptor del factor estimulante de crecimiento de plaquetas y el Abl, entre los que se halla el denominado STI571.⁸

El Estudio IRIS (*International Randomized Study of Interferon vs. STI571*), ensayo que investigó el uso del inhibidor de la Cinasa de Tirosina (Mesilato de Imatinib) vs Interferón, cambió el tratamiento y el pronóstico de la LMC. El seguimiento a largo plazo de los pacientes del estudio IRIS ha definido parámetros de respuesta y los métodos de seguimiento de la enfermedad residual con el análisis citogenético de células de médula ósea y el monitoreo molecular de *BCR/ABL* utilizando RQ-PCR.⁵⁶

Cuando los datos del estudio **IRIS** de los pacientes enrolados, fueron analizados después de 5 años, se estimó un rango de supervivencia total de 5 años en 89% de los pacientes tratados con MI, lo cual confirmó la gran eficiencia de este tipo de inhibidores.^{54,57}

a) Mesilato de Imatinib (MI)

El MI es una pequeña molécula orgánica, sintetizada para el propósito de inhibir la proteína cinasa con un valor de K_i de 85nM. Esta actividad es contra toda las cinasas de tirosina Abl, incluyendo Bcr/Abl, homólogos celulares de la c-Abl v-Abl y ARG. En adición a la cinasa de tirosina de Abl, otras cinasas inhibidas por el MI son PDGFR- α , PDGFR- β y KIT. Dado el papel crítico de la cinasa de tirosina en la regulación del crecimiento celular y la activación conocida en varios tipos de cáncer, tales como Bcr/Abl en LMC y

sobreexpresión de *HER2* en cáncer de mama, se planteó la hipótesis de que los inhibidores específicos de estas proteínas cinasas pueden ser eficaces agentes anti-cancerígenos.⁵⁸

El STI571 es un inhibidor selectivo de Bcr/Abl, induce la respuesta hematológica completa de un 80-90% de los pacientes recién diagnosticados con LMC en FC y una respuesta citogenética completa en un 70 a 80% de los pacientes y en un 40% una RMM. Posee un alto nivel de actividad, baja toxicidad, durabilidad y permanencia.³³

En cuanto a su mecanismo de acción, se sabe que el dominio catalítico de cinasas de serina/treonina y tirosina tiene una estructura biobulada altamente conservada. El lóbulo NH₂ terminal (N-lóbulo) contiene una conformación β-plegada y una α hélice conservada, mientras que el lóbulo C es helicoidal. En la interfase entre los dos lóbulos hay una serie de residuos altamente conservados para la unión de ATP y sitios catalíticos. El estado de activación de cinasas es dependiente de la posición del *Loop* de activación (A-loop), una porción del extremo C que en Abl comprende los residuos de aminoácidos 381-402. En las cinasas activadas, el A-loop está en una conformación “abierta”, porque este hace oscilar el centro catalítico de la cinasa. Los tres residuos amino-terminal del A-loop, contiene un motivo DFG (aspartato- fenilalanina- glicina) estrictamente conservado, que es crucial para la actividad catalítica. El aspartato 381 es capaz de unir Mg², que a su vez coordina los grupos fosfato del ATP. La porción COOH-terminal del A-loop sirve como plataforma del sustrato de unión.

Aunque la conformación del A-loop es altamente conservada en las cinasas cuando están activas, existen diferencias considerables entre la conformación inactiva (cerrada) y la activa. Las cinasas son activadas por fosforilación de los residuos serina/treonina o tirosina dentro del A-loop. En el caso de Abl, la tirosina 393 es fosforilada en los puntos lejanos del centro de la cinasa, permitiendo la unión de sustratos. En el estado inactivo de Abl, la

tirosina 393 está desfosforilada y los puntos hacia el centro de la cinasa imitando al sustrato para formar un puente de hidrógeno con la Asparagina 363. En esta conformación, la hendidura es bloqueada, previniendo la unión con el sustrato.

Se ha encontrado en estudios que la conformación inactiva de Abl, contiene 21 residuos de aminoácidos. Mediante la explotación de la conformación distinta inactiva del A-loop, el MI es capaz de alcanzar su alta especificidad. No se requieren reordenamientos estructurales para que el MI pueda unirse al sitio A-loop. En contraste, existe un mecanismo de ajuste inducido por la unión en el lóbulo N, que normalmente se adapta a los grupos fosfato del ATP y es por lo tanto referido al P-loop. El P-loop es una estructura rica en glicina y altamente flexible, que se pliega sobre la unión de MI, resultando en incremento de la superficie complementaria. Este cambio en posición es establecido por la formación de un nuevo puente de hidrógeno entre la tirosina 253 y la asparagina 322. Una consecuencia del ajuste inducido es la formación de una caja cerrada hidrofóbica que rodea al Imatinib, atrayendo fuerzas de Van der Waals interactuando con residuos de tirosina 253, leucina 370 y fenilalanina 382. Por otra parte el Imatinib forma un número de puentes de hidrógeno con el dominio cinasa involucrando otros aminoácidos. **Figura 14.**⁴³

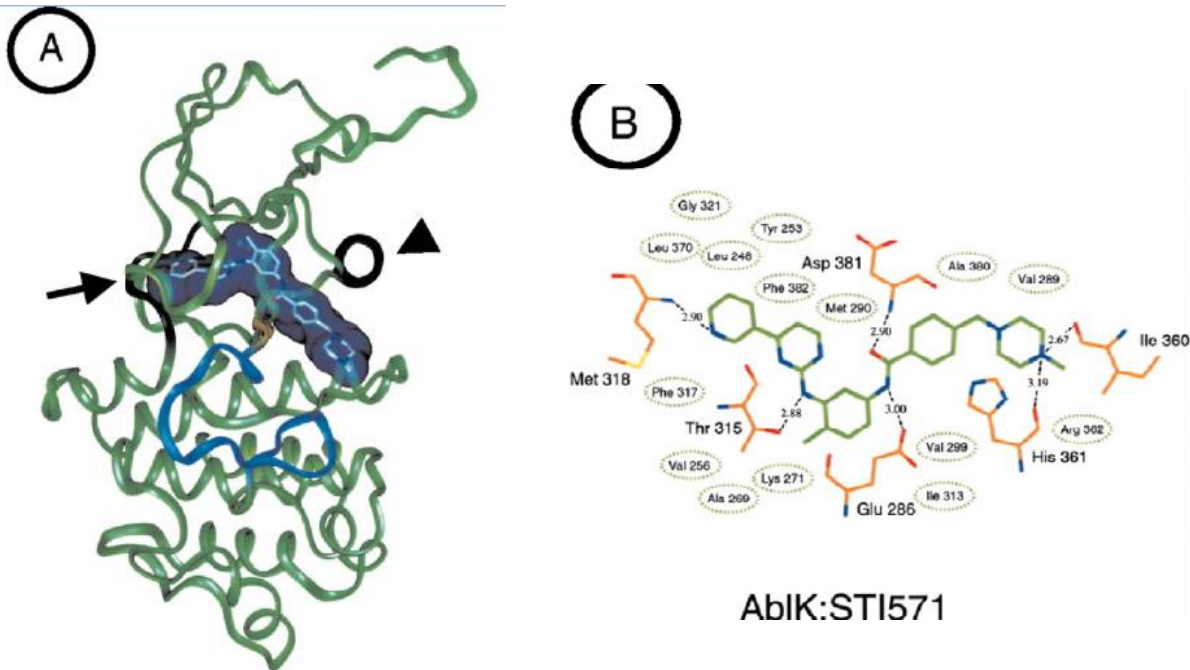


Figura 14. Estructura de Abl e Imatinib. A. Estructura de la cinasa Abl, en azul el sitio A-loop y en dorado el motivo conservado GDF. **B.** Estructura del Imatinib y los aminoácidos importantes que contiene.⁴³

La respuesta terapéutica de los pacientes con LMC-CB al MI, puede ser explicada por la supresión de los efectos dosis dependientes de *BCR/ABL*, que puedan coexistir con los efectos de las anomalías cromosómicas y moleculares. No se espera que la inhibición de la actividad de Bcr/Abl revierta los efectos de las anomalías cromosómicas y moleculares de las células de paciente con LMC-CB, mientras que las consecuencias de los efectos de *BCR/ABL* dependientes de la dosis en la expresión génica, se invierte, por lo menos hasta la aparición de sub-poblaciones celulares con mutantes de *BCR/ABL*, un proceso que puede ser también favorecido por sobreexpresión.²³

El seguimiento anual secuencial del grupo del estudio IRIS originalmente elegidos al azar demostró que con Imatinib, la RCgC se predice con mejor resultado a largo plazo. Por ejemplo, el 72% de los pacientes que lograron RCgP después de los primeros 3 meses de tratamiento se mantuvieron

estables a partir de la RCgC en comparación con solo el 63% de los pacientes que alcanzaron ese nivel de respuesta a los 6 meses.⁵⁶

b) Resistencia a Imatinib

Los mecanismos subrayados de la resistencia a Imatinib pueden diferir de acuerdo a si se trata de resistencia primaria o secundaria. La resistencia secundaria puede ser clasificada de acuerdo a la actividad de la onco-proteína Bcr/Abl si es o no restablecida.³³

Resistencia Primaria: Una porción pequeña de pacientes recién diagnosticados en FC, nunca logran una RHC y/o nunca una respuesta citogenética duradera cuando son tratados con Imatinib incluso después de que se aumenta la dosis.⁵⁹ Esto puede ser debido a mecanismos indefinidos que disponen la heterogeneidad intrínseca de la leucemia o las variaciones farmacocinéticas individuales. Por ejemplo la recepción celular del MI es un proceso activo mediado por el transportador orgánico- catiónico humano (hOCT1), los niveles de los cuales varían en gran medida en los distintos pacientes. Sin embargo el MI es un sustrato de la Glicoproteína P, el gen *MDR1*, y los altos niveles de glicoproteína P pueden incrementar el flujo del fármaco y por lo tanto hacer la resistencia constitucional de la célula a MI, esto ha sido demostrado en una línea celular conocida y en células de pacientes con LMC-CB.³³

Resistencia Secundaria: o también llamada resistencia adquirida. Una importante minoría de pacientes quienes inician el tratamiento con MI en la FC, logran inicialmente una respuesta citogenética o la RMM y después pierden esa respuesta.⁵⁹ Esta secuencia de eventos es muy común en pacientes quienes comienzan el tratamiento en fases avanzadas de la enfermedad. Lo que implica que incluso pacientes en transformación blástica usualmente tienen una enfermedad que aun es parcialmente dependiente de los mecanismos relacionados con *BCR/ABL*. En algunos casos la resistencia secundaria es relacionada con la sobreexpresión de la proteína Bcr/Abl.³³

Otra de las razones por las cuales una persona presenta resistencia, son las mutaciones en distintos residuos de aminoácidos, existen diferentes mutaciones y han sido identificadas aproximadamente 50 diferentes mutaciones, las más comunes son los que afectan a los residuos Gly250, Tyr253, Glu255, Thr315, Met351 y Phe359.

c) Mutaciones implicadas en la resistencia a MI.

En la mayoría de los casos la resistencia es causada por reactivación de la actividad cinasa de Bcr/Abl. Se ha hecho evidente que las mutaciones en el dominio cinasa son el mecanismo que predomina en el origen de la resistencia adquirida a medicamentos, aunque en algunos pacientes *BCR/ABL* siga amplificando. Las mutaciones se han observado en aproximadamente 17 aminoácidos diferentes en todo el dominio cinasa de *ABL*.⁴³

A nivel molecular las mutaciones en *BCR/ABL* reducen la unión del MI a la proteína por mecanismos indirectos o directos. En el caso de los mecanismos directos, las mutaciones se agrupan alrededor del sitio de unión del Imatinib que se solapan parcialmente con el ATP y la reducción de la unión del Imatinib resulta en un cambio en las cadenas de aminoácidos, contribuyendo favorablemente al contacto lipofílico o interacciones de puentes de hidrógeno, lo que da como resultado cambios topológicos y estéricos que dificultan la unión del Imatinib, ejemplos de estas mutaciones son Thr315 y Phe317.

Las mutaciones que inhiben la unión del Imatinib por mecanismos indirectos explotan la forma en que se unen el fármaco a la proteína blanco. El Imatinib se une a la conformación catalítica inactiva del dominio cinasa de Abl, conocido como “*DFG- out*”. Las mutaciones puntuales que desestabilizan la conformación inactiva de P-loop y el motivo DFG con respecto a la conformación catalítica activa, incrementan la energía sobre del complejo

Imatinib- Abl, y esto reduce la afinidad de unión del Imatinib, ejemplos de mutaciones que desestabilizan la conformación inactiva de Abl son en los residuos de Glu 255, Tyr 253 y Gly250 en el P-loop.⁴⁶

2.7.3 Inhibidores de la Cinasa de Tirosina de Segunda Generación.

Las mutaciones descritas que confieren altos niveles de resistencia a Imatinib incluyen Y253F/H, E255K/V, T315I O H396P7R. El Dasatinib y el Nilotinib son algunos de los fármacos nuevos que funcionan como antagonistas de esas mutaciones, pero la mutación en el aminoácido de la posición 315, es un problema, porque ninguno de estos fármacos logra contrarrestar los efectos de esta mutación.⁶⁰

Dasatinib

Está disponible de forma oral, es un inhibidor de la cinasa Abl que difiere del Imatinib en que se puede unir en la conformación activa o inactiva del dominio cinasa de Abl y también inhibe la familia de las cinasas Src incluyendo Src y Lyn. Por eso se dice que es un inhibidor dual.^{46,61} Es aproximadamente 300 veces más activo que el Imatinib, *in vitro* es activo contra la mayoría de las subclonas mutantes resistentes a Imatinib, con la notable excepción de la clona mutante T315I y probablemente también de F317T. Este fármaco es usado principalmente para pacientes con LMC resistentes o intolerantes a Imatinib. Tiene eventos adversos tales como neutropenia, trombocitopenia, diarrea vómito, náusea, hemorragia gastrointestinal, erupciones y edema.³³ Otra ventaja clínica, es que el dasatinib tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica por lo que es ideal cuando hay probabilidad de infiltración a SNC como en el caso de la LLA Ph´.

Nilotinib

Es un derivado de la aminopirimidina que se asemeja al MI en cuanto a su efecto antiproliferativo en lugar de destructivo, pero ha sido modificado incrementando la afinidad de unión al “hueco” de ATP de la oncoproteína Bcr/Abl.⁶¹ Tiene de 20 a 50 veces la actividad inhibitoria del MI en líneas celulares sensibles a MI y es agonista activo de todas las líneas celulares resistentes a MI con excepción de T315I.^{33,46}

Busutinib

Este es un 4- anilino-3 quinolinocarbonitrilo que inhibe a Abl y Scr y puede así también ser clasificado como un inhibidor dual de las cinasas, con actividad anti-tumoral, sin actividad contra los receptores cinasas de tirosina para el factor de crecimiento derivado de plaquetas, entre otros. Se cree que la inhibición con la que cuenta es para la retención de líquidos observada en otros inhibidores de la cinasa de tirosina.⁶¹ Es mucho más activo que el Imatinib contra líneas celulares de LMC y líneas murinas transfectadas con *BCR/ABL*.
Figura 15.³³

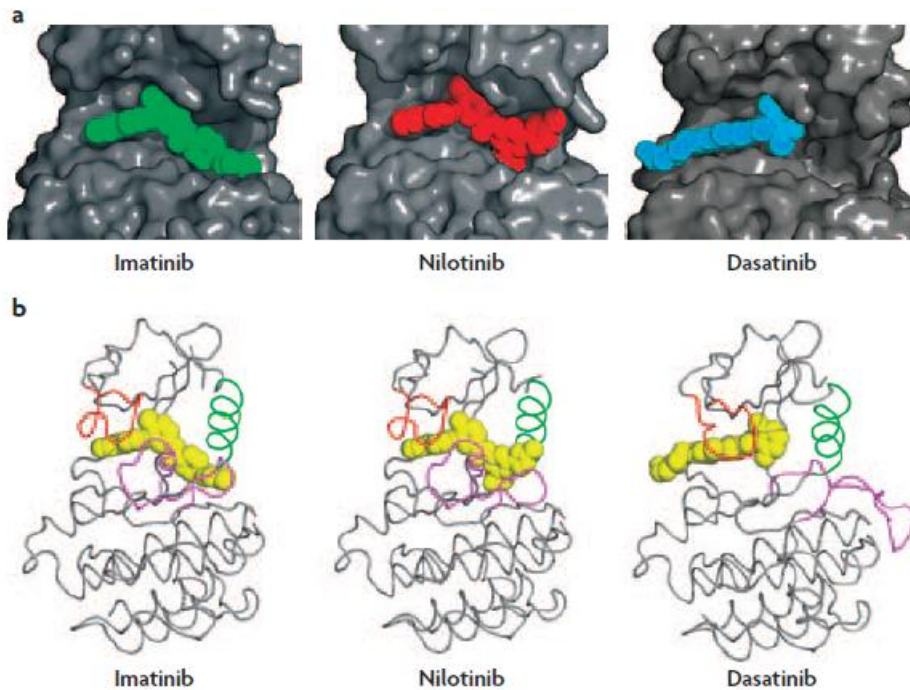


Figura 15. Estructura cristalina de Abl- ICT. **A.** Muestra la estructura cristalina de la cinasa Abl en complejo con los distintos inhibidores de la cinasa de tirosina. **B.** Muestra las distintas conformaciones que adquieren el P-loop y A-loop, de acuerdo a si la cinasa se encuentra activa o inactiva.⁴⁶

2.7.4 Trasplante alogénico de células hematopoyéticas.

El trasplante alogénico de células hematopoyéticas, es la terapia recomendada para pacientes jóvenes con un donador idéntico en HLA, resultando en RHC y RCgC en la mayoría de los pacientes. Más de la mitad de los pacientes sobreviven por 5-10 años post-trasplante. Sin embargo, la terapia de trasplante es limitada por la disponibilidad de donadores, restricción de la edad por el alto riesgo que con lleva el trasplante en adultos. Sin embargo reduce dramáticamente la carga leucémica en pacientes con LMC.³⁵

En la década de 1990, el trasplante de células hematopoyéticas para la LMC se “mejoró” significativamente, pues se desarrollaron técnicas para la generación de poblaciones de células madre hematopoyéticas de la médula

ósea y sangre periférica para trasplantes alogénicos, y también para el aislamiento de células madre autólogas purificadas libres de células Ph⁺, desde el propio sistema hematopoyético del paciente. En ambas circunstancias, el paciente se somete a dosis masivas de quimioterapia, en un intento de eliminar las células leucémicas antes del trasplante, y esto limita hasta cierto grado.⁵³

Hasta ahora el trasplante alogénico de células hematopoyéticas es la única terapia curativa probada, pero se asocia con una morbilidad y mortalidad significativa, relacionada con el procedimiento y sus complicaciones.^{3,59}

2.7.5 Quimioterapia oral (Busulfan e Hidroxiurea)

Existen tratamientos que se les da a los pacientes inmediatamente después de que se diagnostica la LMC, estos medicamentos son principalmente para reducir la carga tumoral, los más conocidos son el busulfan y la hidroxiurea.

El busulfan es un agente alquilante bifuncional, actúa en cualquiera de las fases del ciclo celular, en ácidos nucleicos y proteínas citoplasmáticas, tiene un mayor efecto sobre los precursores de la serie mieloide, linfocitos y células del epitelio gastrointestinal, entre sus efectos secundarios, tiene un efecto mielosupresor acumulativo: el *nadir* se obtiene entre 14 y 28 días, su mayor efecto es sobre la serie granulocítica y plaquetas.⁶²

La hidroxiurea o simplemente hidrea, actúa como un antimetabolito, inhibe la ribonucleótido reductasa, la cual es una enzima que cataliza la conversión de ribonucleótidos a desoxiribonucleotidos y por tanto inhibe la síntesis de DNA. Deprime la médula ósea, el *nadir* sobre los glóbulos blancos se obtiene al quinto u octavo día.⁶³

3. Objetivos

Evaluar el tiempo en que se logra una remisión citogenética completa y la desaparición de transcritos *BCR/ABL* en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica, tratados con Inhibidores de la Cinasa de Tirosina, mediante análisis citogenético y molecular.

4. Justificación

El monitoreo de la EMR para pacientes diagnosticados con LMC y que son tratados con inhibidores de la cinasa de tirosina, es importante debido a que la desaparición de las clonas Ph+ mediante análisis citogenético y la de los transcritos de *BCR/ABL*, por análisis molecular por RT-PCR, interrelacionado con el tiempo en que se logra la desaparición o reducción, está estrechamente relacionado con un buen pronóstico en cuanto a la progresión de la enfermedad y la supervivencia del paciente. Está descrita que la RCgC y la desaparición de transcritos en este tipo de pacientes se logra en un tiempo promedio de 6 meses.

5. Metodología

Para la realización de este trabajo, se requirió de muestras de MO y/o SP (solo para RT-PCR), de pacientes diagnosticados con LMC en tratamiento con inhibidores de la cinasa de tirosina, para realizar el procesamiento adecuado mediante técnicas citogenéticas y/o moleculares. Además de la revisión de la base de datos para seleccionar a los pacientes que tenían seguimientos anteriores.

5.1 Selección de casos

De la base de datos de Pacientes con LMC, estudiados en el Laboratorio de Análisis de Oncohematología, se seleccionaron aquellos casos de pacientes en cualquier fase de la enfermedad, los cuales tenían registro de estudios anteriores y a los cuales se les realizó seguimiento. Los casos se agruparon en dos categorías, una de casos que tenían solo seguimiento molecular (RT-PCR) y otro de casos de pacientes a los cuales se les realizó seguimiento molecular y citogenético (cariotipo).

5.2. Técnicas citogenéticas

En cuanto a la citogenética, solo se procesaron las muestras de MO, mediante técnica directa si es que la muestra se había tomado el mismo día de recepción y por cultivo celular a 72 h. a todas las muestras. La técnica directa, aprovecha la proliferación celular natural de las células contenidas en la muestra de MO, arrestando células en metafase con ayuda de una solución de colchicina, la cual impide la formación de huso mitótico y solución hipotónica, por lo cual se logran obtener células en metafase para ser analizadas.

En cuanto al cultivo celular, se hace uso de un medio de cultivo enriquecido con suero fetal bovino, para obtener una mayor cantidad de células que puedan ser analizadas. Al igual que en la técnica directa se hace uso de colchicina y solución hipotónica para la lisis celular y posteriormente se realizan

los lavados con fijador de Carnoy, se gotean en portaobjetos y finalmente se realiza el bandeo GTG, que pone en manifiesto el patrón de bandeo característico de cada cromosoma, pudiendo así observar alguna anomalía cromosómica, en este caso, la translocación recíproca del cromosoma 9 y 22.

Diagrama 1. Se reporta de acuerdo a la nomenclatura internacional de citogenética y se presenta el cariotipo conjuntamente con la metafase si así se requiere, **Figura 16.**



Diagrama 1. Resumen de proceso para análisis citogenética.

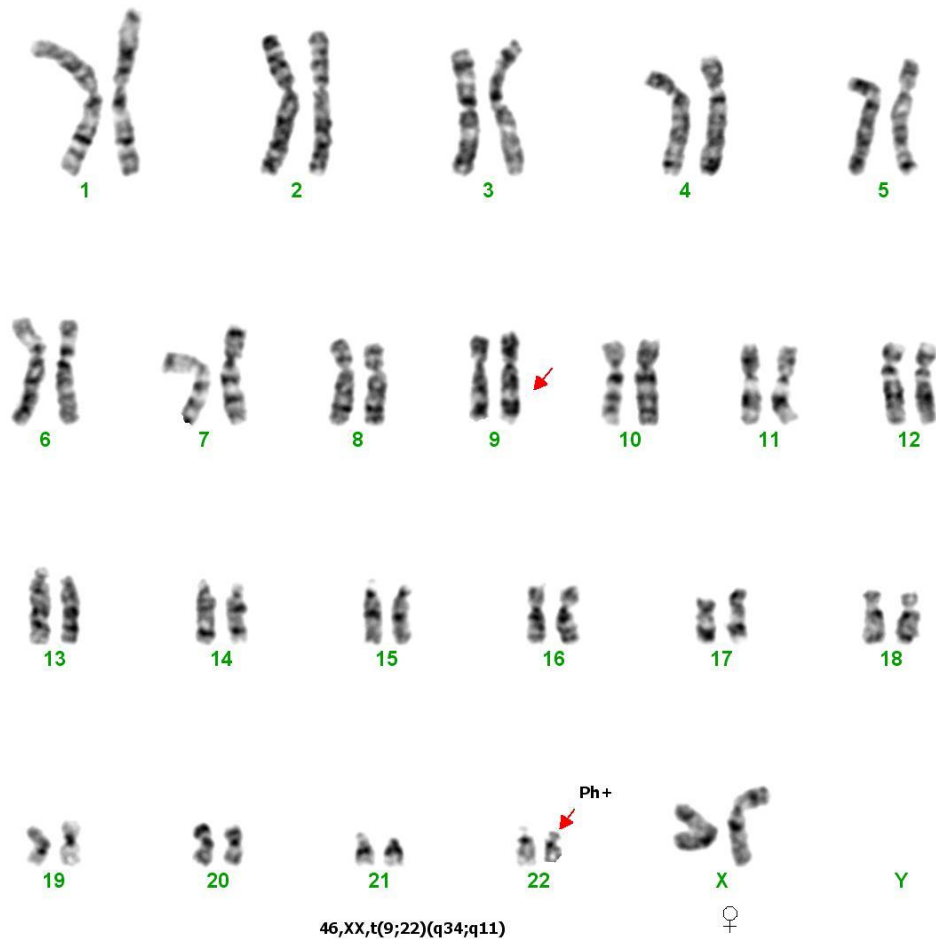


Figura 16. Cariotipo representativo, Se observa la t(9;22) (q34;q11), donde el cromosoma 22 se observa acortado y el alargamiento del cromosoma 9.

5.3 Técnicas moleculares

Se realiza la extracción de RNA, y su posterior transformación a cDNA; la extracción de RNA, se realizó por dos métodos: la extracción orgánica con Trizol y la automatizada, la primera es con fenol/cloroformo, por separación de la fase acuosa que contiene al RNA y posterior precipitación con Etanol absoluto, eluyendo finalmente en un volumen de agua estéril adecuado. Mientras que la extracción automatizada está basada en la extracción con sales, mediante el uso de columnas de unión selectivas en membrana de sílica; en un equipo robótico automatizado.

La evaluación de la calidad del RNA obtenido, se puede realizar cualitativamente, mediante la visualización de bandas en gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE y teñido con bromuro de etidio. En el gel se llega a observar dos bandas que corresponden al rRNA 28S y 18S y en ocasiones la degradación completa del RNA. Cuantitativamente se mide la calidad del RNA, realizando la medición de la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm, posteriormente se obtiene una relación entre esas dos absorbancias (A_{260} / A_{280}), un valor de entre 1.7 y 1.9 indica un alto nivel de pureza.

Para la cuantificación de RNA de la muestra, esta se realiza, tomando en cuenta, que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 44 μg de RNA, además de considerar el factor de dilución.

$$\frac{A_m}{A_{std}} \times FD \times [Std] = \mu\text{g} / \text{mL de RNA}$$

A_m = Absorbancia de la muestra

A_{std} = 1 (H_2O)

FD = 20 (factor de dilución)

[Std] = 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Después de la extracción de RNA, se procede a realizar la síntesis de cDNA, para esto se necesita una muestra de RNA, un cebador, que en este caso son los Random Primers (cebadores aleatorios) son cortos de aproximadamente 10 Kb, los cuales son oligodesoxirribonucleótidos (en su mayoría hexameros) utilizados para preparar sondas de DNA marcadas a partir de plantillas de hibridación en filtro o la hibridación *in situ* de mRNA primos con o sin poli A para la síntesis de cDNA⁶⁴. Además se hace uso de la Transcriptasa reversa, enzima que es capaz de formar una nueva hebra de DNA, a partir de RNA.³⁰

La técnica más adecuada para la evaluación de síntesis de cDNA se realiza mediante la amplificación por PCR simple de un gen constitutivo normal; en este caso los genes *BCR* y/o *ABL*. Se utilizan oligos o cebadores específicos, tales como: C5e⁻, B2B y BCRC. Los resultados son interpretados como positivos o negativos al visualizar las bandas de amplificación en un gel de agarosa al 1.5% y comparando con los controles respectivos: control positivo, negativo y de agua. Si no hay banda de amplificación de *ABL* o *BCR* se debe verificar la calidad del ARN y cDNA para corroborar que se haya llevado adecuadamente la reacción de síntesis. **Figura 17.**

La PCR consiste en una serie de ciclos de 3 reacciones sucesivas: Desnaturalización, que se ajusta a una temperatura de 93 a 95°C para el DNA genómico humano; Alineamiento o alineación del cebador oligonucleótido o sonda, a temperaturas casi siempre de 50 a 60 °C de acuerdo con la temperatura de fusión del dúplex esperado; Síntesis de DNA, de manera característica alrededor de 70 a 75°. La polimerasa de DNA empleada es termoestable, cuando se tiene a la DNA- polimerasa y a los nucleótidos, se inicia la síntesis de nuevas cadenas de DNA que son complementarias a las cadenas de DNA individuales del segmento de DNA blanco. La orientación de los cebadores se elige de modo deliberado de tal manera que la dirección de la síntesis de la nueva cadena ocurra a partir de un cebador y se dirija hacia el sitio de unión del otro cebador, como resultado, las cadenas recién sintetizadas pueden servir a su vez como plantillas para la síntesis del nuevo DNA, lo que da lugar a una reacción en cadena con un incremento exponencial del producto.³⁰

También se puede realizar un RT-PCR multiplex, **Figura 18** donde se logra observar la amplificación del gen constitutivo y los dos transcritos de p210, esta técnica tiene la ventaja de amplificar “múltiples” segmentos en una misma reacción, se suele utilizar para evaluar la calidad del cDNA. Los oligos que se usan en este tipo de reacción, son Ca3⁻, C5e⁻, B2B y BCRC.

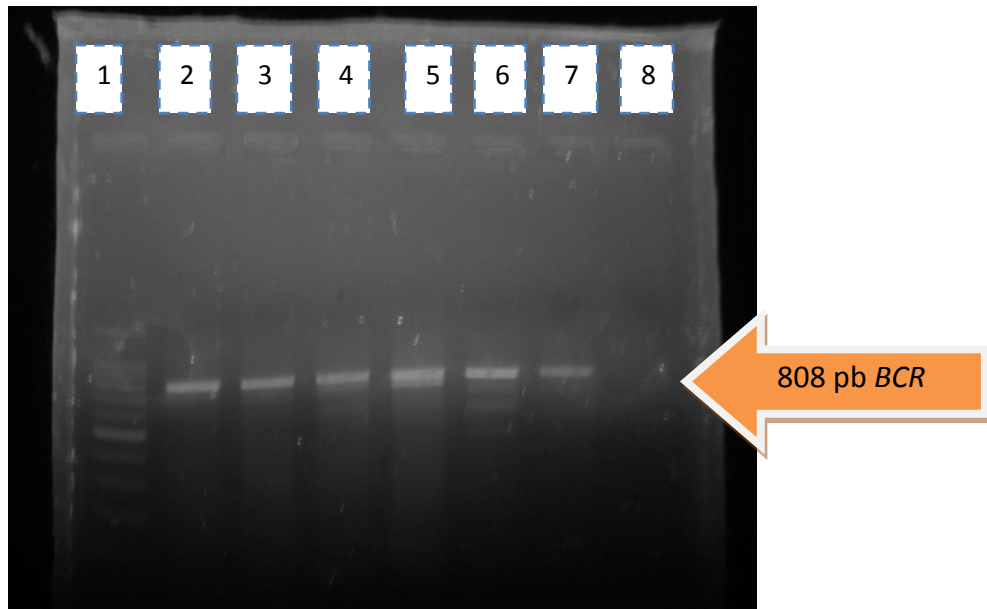


Figura 17. Gel de agarosa en electroforesis de una reacción PCR-simple. Se observan las bandas correspondientes al gen constitutivo amplificado en este caso *BCR* de 808 pb. En el carril 1, se observa la escalera del marcador de peso molecular y en el 8, el agua como control negativo.

a) RT- PCR para amplificación de transcritos de *BCR-ABL*.

Se realiza la amplificación de transcritos, mediante una RT-PCR anidada, al igual que en el RT-PCR multiplex se utilizan cebadores específicos para la amplificación del gen constitutivo y los dos tipos de transcritos que dan origen a la proteína p210, los cuales son B2+, Ca3⁻, ABL3⁻ y B1+. **Figura 19.** Este subtipo de PCR, consta de dos reacciones y la interpretación de los resultados, se realiza mediante la visualización bajo luz UV de las respectivas bandas en un gel de agarosa al 1.5%, corrido mediante electroforesis. Las bandas que se pueden observar son: las del gen constitutivo utilizado como control que es *BCR*, y los transcritos ya sean b3a2 y/o b2a2, que tiene un peso de 808, 453 y 383 pb, respectivamente.

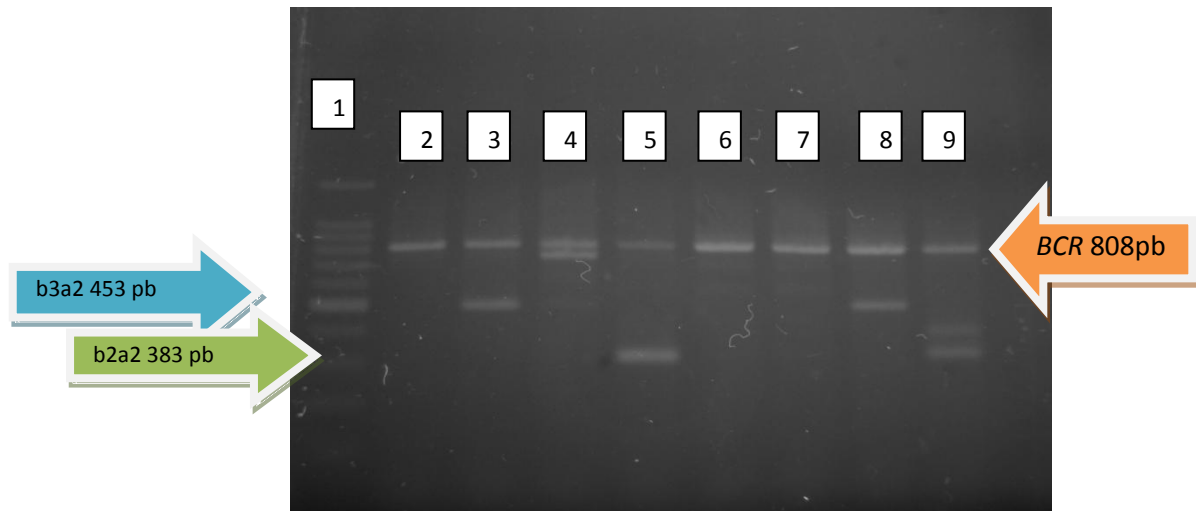


Figura 18. Gel de agarosa. Reacción multiplex para p210. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso, en el carril 2, 6 y 7 se observa únicamente el gen constitutivo BCR. Carril 3 y 8 se observa la banda correspondiente a los transcritos b3a2 y en los carriles 5 y 9 b2a2 con excepción de carril 9 donde se observa una banda inespecífica, debido a la sensibilidad y al tipo de PCR realizada.

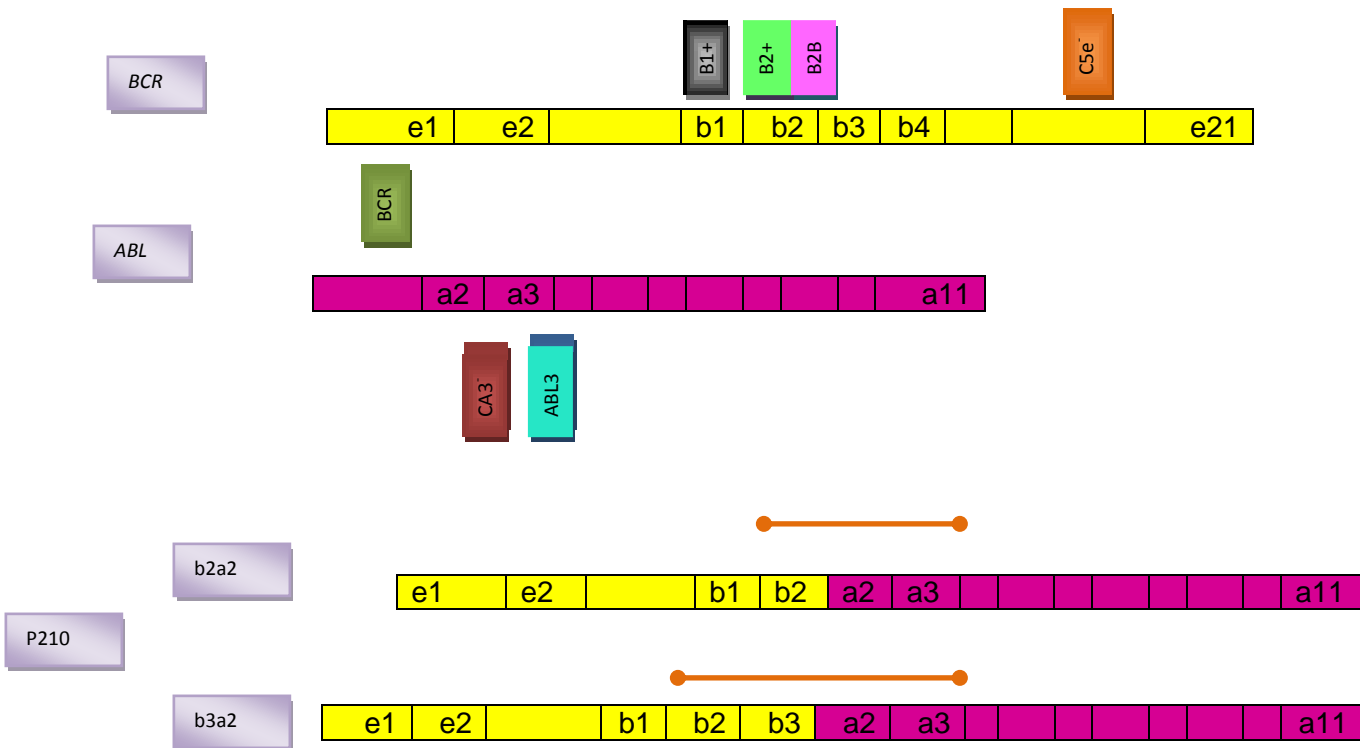


Figura 19. Sitios de Reconocimiento de oligonucleótidos. Se muestran los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos utilizados en la PCR multiplex y anidada.

6. Resultados

Se incluyeron 51 pacientes con LMC, a los que se les realizó seguimiento molecular y/o citogenético, en muestras de médula ósea y/o sangre periférica; el 54.9% (28 casos) fueron muestras de SP, 35.2% (18 casos) de MO y el restante 9.8% ambas muestras (casos 21,22,36,42,44,45). En 19/51 casos (37.3%) tuvieron únicamente monitoreo molecular **Tabla 5** y los restantes 32 (62.7%) (Casos 20 a 51) ambos estudios **Tabla 6**, por el tipo de muestras recibidas.

La distribución por sexo fue 62.7% mujeres y 37.3% hombres; con edad promedio de 44.8 y 39.4 años, respectivamente y el promedio general de 42.1

años para la población en estudio. Se excluyeron los pacientes 33 y 40, el primero porque no se tuvo registro de su edad y el 40 debido a que tenía 4 años, para que no se dispersaran los datos.

En 14 casos en el cariotipo basal se observó Ph+, en diversas combinaciones: como única anormalidad cinco (casos 20,22,24-26); dos líneas celulares N/Ph+ en seis (casos 21, 23, 27-29 y 43) y con alteraciones adicionales al Ph' en tres (casos 29-31). Entre las alteraciones adicionales al Ph' se observaron cariotipos hiperdiploides con más de 50 cromosomas con doble Ph' y trisomias 14 y 18

En el monitoreo citogenético y molecular no se tuvo una uniformidad en los tiempos a los cuales se realizó el mismo, algunos pacientes fue cada mes otros cada tres a seis meses, e incluso algunos cada año. En general algún tipo de respuesta citogenética se observó desde los 4 meses, sin embargo únicamente en 7 del total; una RCgC se observó en cuatro (23,25,26 y 31) 7.9% a los 6 meses en promedio, destacando que de estos el 26 fue el único que de igual manera logró un nivel no detectable de transcritos a los 4 meses y; RCgP en el caso 20 a los 7 meses, manteniendo nivel detectable de b2a2, la RCgM, fue observada en el caso 41 con 65% de metafases Ph+, pasados 5 meses la clona no fue observada, pero si los transcritos, en cuanto a estos, hubo un cambio de b3a2 a b2a2. Mientras que en el 42 se tuvieron dos únicos registros, en uno de los cuales, su cariotipo estuvo compuesto de metafases normales y Ph+ obteniendo una RCgM con un 45% de Ph+, transcurridos 9 meses, la clona Filadelfia siguió siendo detectada por los métodos moleculares y citogenéticos. El 39, a los 5 meses logró de igual manera que los anteriores una RCgM, este caso paso a ser de niveles detectables de transcritos, a negativo en 17 meses, sin embargo a los 23 meses se observó b3a2. El monitoreo molecular más sensible que la citogenética detectó los transcritos *BCR/ABL* en todos los casos y en algunos hasta los 28 meses de seguimiento, indicando la persistencia de la clona Ph+.

En 9 pacientes (casos 20,34, 44-48, 50 y 51) el primer cariotipo realizado fue normal, sin embargo el estudio molecular ya sea b3a2 o b2a2 fue positivo. De estos, en el 34, la muestra basal fue SP, esto influye en el resultado del cariotipo, el cual puede ser normal; sin embargo no podemos descartar que se trate de casos con Ph⁺ “enmascarado” que no es evidente por las técnicas convencionales empleadas. O bien que tenga un cariotipo complejo, con más de tres cromosomas implicados lo que hace difícil su detección. Recordemos que no conocemos los detalles clínicos del paciente y tampoco podemos descartar que ya haya tenido tratamiento que suprima la clona Ph⁺.

En el estudio molecular de la fusión *BCR/ABL*, se detectaron los dos principales tipos de transcritos b2a2 y b3a2, y 45/52 de los casos estudiados fueron positivos en el estudio basal. Se encontró, que el transcrito más frecuente es b3a2 con un 47.0% (casos 1-4,14,15, 21-32,36,42-46 y 51), el b2a2 se observó en 35.3% (5-9,16,18,20,34,37-40,47,48 y 50), y en 5.9% se observó un “doblete” o sea, ambos tipos de transcritos. Los siguientes casos 10,11,19, 33,41 y 49, fueron negativos, representando un 13.5%, sin embargo en 11, 33 y 49, la respuesta molecular pudo haber sido transitoria, ya que posteriormente se detectó algún tipo de transcrito. El caso 11 fue negativo, 20 meses después se detectó b3a2 y el 50 es un caso similar solo que a este último, se le realizó seguimiento citogenético y molecular, en cuanto a la citogenética no se logró observar la presencia del Ph⁺, pero después de 13 meses los transcritos volvieron a ser detectados, lo que nos indicaría una recaída.

El caso 19 fue el único que se trató de un paciente con post- trasplante, el cual desde el primer estudio obtuvo la negativización y hasta los 18 meses siguió con el mismo resultado, no se tienen más datos de algún estudio posterior.

Un caso especial es el 9, el cual en el primer estudio se observó b2a2 y 13 meses después b3a2, finalmente a los 23 meses de tratamiento paso a ser *BCR/ABL* “negativo”. El caso 17 se observó en primera instancia un “doblete” y posteriormente solo fue detectado b3a2.

El tiempo de negativización de transcritos *BCR/ABL* fue en promedio de 12.3 meses. Los siguientes casos: 1,2,15,16,22,26,45 y 46 obtuvieron la negativización entre los 4 y 9 meses. El caso 51 alcanzó la negativización a los 24 meses, sin embargo a los 29 meses b3a2 fue evidente, indicando que también se trata de una respuesta transitoria.

Tabla 5. Monitoreo Molecular de Pacientes con LMC.

Paciente	Edad/ Género	Diagnóstico	Molecular BCR/ABL (basal)	Tiempo de Evolución (meses)			
				6- 18 m	19-24 m	25-30 m	>31m
1	60/M	LMC b	b3a2+ [sp]	Negativo (4m)			
2	63/F	LMC b	b3a2+ [sp]	Negativo (6 m)			
3	48/F	LMC s	b3a2+ [sp]	b3a2+ (7m)			
4	46/F	Pb.LMC b / LAM M3 s	b3a2+ [sp]	Negativo (16m)			
5	19/M	LMC	b2a2+ [sp]	b2a2+ (5m)			
6	24/F	LMC b	b2a2+ [sp]	b2a2+ (6m)			
7	55/F	LMC b	b2a2+ [sp]	b2a2+ (10m) b2a2+ (14m)			
8	24/F	LMC b	b2a2+ [sp]	b2a2+ (10m) b2a2+ (13m)			
9	50/F	LMC b	b2a2+ [sp]	b3a2+ (13m)	Negativo (23m)		
10	37/M	LMC b	Negativo [sp]	b3a2+ (8m)			
11	67/F	LMC s	Negativo [sp]	Negativo (9m)	b3a2+ (20m)		
12	20/M	LMC		b3a2+ /b3a2+ (4m) [mo]			
13	18/M	LMC fb		b3a2+ / b3a2+ (4m)			
14	47/F	LMC s		b3a2+ [sp] b3a2+ (9m)			
15	39/F	LMC s		b3a2+ [sp] Negativo (7m)			
16	49/F	LMC s		b2a2+ [sp] Negativo (7m)			
17	36/M	LMC s		b3a2+/b2a2+ (12m) [sp] b3a2+ (18m)	b3a2+ (24m)		
18	56/M	LMC s		b2a2+ (12m) [sp]	b2a2+ (19m)/ b2a2+ (23m)	b2a2+ (27m)	
19	47/M	LMC post-tmo		Negativo (b) Negativo (10m) Negativo (18m)			

Tabla 6. Pacientes con Monitoreo Molecular y Citogenético.

Paciente	Edad/ Genero	Dx.	Cariotipo/ Molecular (BCR/ABL) basal	Tiempo de Evolución Cariotipo y BCR/ABL (meses)			
				6-18m	19-24 m	24- 30 m	>31m
20	31/F	LMC	46,XX, Ph+ [20/mo]/ b2a2+	46,XX,Ph+[5]/46,XX[25]/ b2a2+ (7m)			
21	63/M	LMC b	46,XY,Ph+[5]/46,XY[15mo] / b3a2+[sp]	NV/ b3a2+ (2m)		*46,XY[22/mo]/ b2a2+ (33m)/	*NO/b2a2+ (45m))
22	27/M	LMC b	46,XY,Ph [20/mo]/ b3a2+ [sp]	NO/ Negativo (9m) [sp]			
23	45/M	LMC b	46,XY/46,XY,Ph+ / b3a2+ [mo]	46, XY [30/mo]/ b3a2+ (5m)			
24	31/M	SxMPC vs LMC b	46,XY,Ph+[20/mo]/ b3a2+ [sp]	46,XY[22/mo]/ b3a2+ (5m)			
25	28/M	LMC b	46,XY,Ph+ [20/mo]/ b3a2+	46,xy[30/mo]/ b3a2+ (10m) [mo/sp]			
26	62/F	LMC b	46,XX,Ph+[18/mo]/ b3a2+ [mo]	46,XX[24/mo]/ Negativo (4m)			
27	52/F	LMC	46,XX/46,XX,Ph+ / b3a2+ [sp]	NO/ b3a2+ (11m) [sp]			
28	35/F	LMC b	46,XX,Ph+ [4]/46,XX[18]/ b3a2+ [mo]	NO/ b3a2+ (7m) [sp]			
29	67/F	LMC b	46,XX/46,XX,Ph+>50 c/Ph+ / b3a2+ [mo]	NO/ Negativo (13m) [sp]			
30	25/F	LMC FA	46,XX,Ph+>50 c/2Ph+ [10/8/mo]/ b3a2+		NV/ Negativo		
31	60/F	LMC b	46,XX,Ph+[8]/Hiperdiploidia(>50 cromosomas, Ph+)[8]/46,XX[6]/ b3a2+ [mo]	46,XX[22/mo]/ b3a2+ (5m)			
32	42/F	LMC b	46,XX [26] /Hiperdiploidia (>50 cromosomas) [4]/ b3a2+ [mo]	46,XX[30/mo]/ b3a2+ (5m)			
33	?/M	LMC b	46,XY[20/mo]/ Negativo [mo]	46,XY[20/mo]/ b3a2+ (2m)			
34	21/F	LMC b	46,XX[25]/ b2a2+ [sp]	NO/ b3a2+ (7m) [sp]			
35	40/M	LMC	NO/ b2a2+ [mo]				
36	62/F	LMC b	NV/ b3a2+ [sp/mo]	46,XX,Ph+[6]/46,XX[18]/ b3a2+ (5m) *mo			
37	59/F	LMC b	NO/ b2a2+ [sp]	46,XX/46,XX,Ph+ / b3a2+ (1m) [mo]			
38	38/F	LMC fa	NO/ b2a2+ [sp]	*46,XX,Ph+ [8]/46, XX/ b2a2+ (5m) [mo/sp] *NO/ Negativo (17m)	NO/b3a2+ (23m)		
39	52/M	LMC b	NO/ b2a2+[sp]	46,XY,Ph+[3]/46,XY[27]/ b2a2+ (12m)[mo/sp]			

Notas: Ph+= t(9;22)(q34;q11.2). **NV**= no valorable. **NO**= no se realizó cariotipo.

Tabla 6 cont. Pacientes con Monitoreo Molecular y Citogenético.

Paciente	Edad/ Género	Dx	Cariotipo/ Molecular9 (BCR/ABL basal)	Tiempo de Evolución Cariotipo y BCR/ABL (meses)			
				6-18 m	19-24 m	25- 30 m	>31m
40	4/F	LMC		*NO/ b2a2+ [mo] *46,XX[28/mo]/ b2a2+ (12m)			
41	27/F	LMC		*NO/ Negativo [sp] *40-46,XXPh+ [13]/46,XX[7]/b3a2+ (1m) NO/ b3a2+/b2a2+ (5m)			
42	50/M	LMC s		*46,XY,Ph+[10]/46,XY[12]/ b3a2+ [sp/mo] *46,XY,Ph+/46,XY/ b3a2+ (9m)			
43	60/M	LMC s		*46,XY/48,XY,+14,+18,Ph+/ b3a2+ [mo] *46,XY/46,XY,Ph+/ b3a2+ (11m) [mo]			
44	21/M	LMC s		*46,xy[30]/ b3a2+ [sp/mo] *NO/ b3a2+ (12m) [sp] 46,XY[20]/ b2a2+ (14m)			
45	56/F	LMC s		*46,XX/ b3a2+ [sp/mo] *NO/ Negativo (7m) [sp]			
46	38/F	LMC		*46,XX [40]/ b3a2+ [sp] *46,XY/ Negativo (7m) NO/ Negativo (14m)	NO/ Negativo (20m)		NO/ Negativo (45m)
47	42/F	LMC s		*46,XX[25]/ b2a2+ [sp/mo] *NO/ b2a2+ (10m)			
48	53/F	LMC fc		*46,XX/ b2a2+ [mo]			*46,XX[20/sp]/ Negativo (35m)
49	54/F	LMC s		*46,XX[30]/ Negativo [sp/mo] *NO/ b3a2+ (13m)			
50	57/F	LMC s		*46,XX[22]/ b2a2+ [mo] *46,XX[23mo]/ b3a2+ (2m)			
51	41/F	LMC		46,XX/ b3a2+ [sp/mo]	*NO/ Negativo (24m) *46,XX [27/mo]/ b3a2+ (29m)		*46,XX[20/mo]/ b3a2+ (40 m) *NO/ b3a2+ (42m) *NO/ b3a2+ (50m)

Notas: Ph+= t(9;22)(q34;q11.2). NV= no valorable. NO= no se realizó cariotipo.

7. Discusión

Se evidenció al dividir los casos en dos categorías, que lo más recomendable es realizar estudios citogenéticos y moleculares, puesto que son complementarios, las respuestas se interrelacionan y son indicadores para el pronóstico del paciente. Sin embargo, para estudios citogenéticos, se requiere de una muestra de MO, y el procedimiento para la obtención de esta es invasivo, incomodo y doloroso para el paciente, por lo cual, en ocasiones el médico decide tomar solo muestra de SP para la realización de RT-PCR o RQ-PCR según se requiera, debido al valor de sensibilidad del método y a que la toma de muestra es mucho más sencilla. En ocasiones, se toman los dos tipos de muestra para asegurarse de que sea suficiente, ya que en los aspirados de MO se suele obtener poco volumen, debido a factores tales como: el estado de la médula y las condiciones en que se toma la muestra. Otros clínicos prefieren que de la muestra del aspirado se realicen los dos estudios y evitar “invadir” doblemente al paciente.

En este estudio la mayoría de las muestras son de mujeres, sin embargo en estudios estadísticos realizados por Ries y colaboradores en el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, se reportó una incidencia del 60% de pacientes con LMC en hombres,⁶⁵ lo cual no concuerda con lo obtenido. Para el análisis de este resultado, se debe tomar en cuenta el tipo de población, las costumbres e ideologías de cada país y zona geográfica del mismo, puesto que influyen en el tipo, en este caso género, de pacientes que llegan a la consulta en los hospitales y clínicas.

El promedio de edad obtenido fue mayor en las mujeres que en los hombres, el promedio general se encuentra en el rango reportado en un artículo publicado por Goldman, el cual oscila entre 40 y 60 años,⁶⁶ es importante recordar que el riesgo de presentar la enfermedad aumenta con la edad. Se debe considerar que, dentro del grupo de estudio, hay pacientes muy

jóvenes con edades de entre los 18-28 años. Uno de los pacientes fue diagnosticado a los 4 años de edad, este paciente se encuentra completamente fuera del rango sugerido, aun así se han reportado que 10% de los casos de LMC, son de niños, lo que los hace raros.⁶⁷

De los casos con seguimiento citogenético, se observaron alteraciones secundarias en algunos, consecuencia de los transcritos de *BCR/ABL*, es sabido que la proteína Bcr/Abl está implicada en diversas vías de señalización y también podría estar implicada en otras rutas de las que aun no se conoce perfectamente su efecto. Una alteración relevante es el doble Ph', se ha sugerido que su efecto es la potenciación de la actividad cinasa de tirosina, sin embargo no ha sido comprobada. El paciente que presentó esta anomalía, logró la desaparición de los transcritos, no se analizó posteriormente por citogenética, por lo cual no podemos saber si presentaron anomalías cromosómicas diferentes a la del Ph'.

La RCgC y la RCgM se logró observar en distinta proporción de pacientes, el análisis conjunto de estos resultados con los resultados moleculares son importantes, debido a que, aunque se logren respuestas citogenéticas, los transcritos siguen estando presentes en algunos casos, implicando que la enfermedad siga su curso. Como se ha mencionado la sensibilidad de los métodos es diferente, siendo mayor la de RT-PCR, comparada con la de la citogenética convencional, por lo cual los transcritos se hacen evidentes, aunque no se observen metafases Ph+.

El tipo de muestra, también da variabilidad a los resultados, si bien para los estudios moleculares una muestra de SP es adecuada y el cariotipo se puede realizar con la misma, no es lo más adecuado y tampoco da un resultado confiable, debido que al ser una leucemia mieloide, la serie hematopoyética más afectada es la línea mieloide, que se encuentra localizada en la médula ósea. El tiempo es un factor importante en la progresión de la

LMC, porque aunque se presente una RCgM, si el tiempo es prolongado, indica una pobre respuesta al tratamiento debido a diversos factores.

El transcrito b3a2 se presentó en mayor proporción, sin embargo no se ha reportado que alguno de ellos produzca mayores efectos que el otro y en cuanto al caso que presentó doblete, posteriormente solo fueron detectados b3a2, posiblemente siga habiendo células con este tipo transcrito, pero en mucho menor cantidad o simplemente hayan desaparecido. Se registraron a dos pacientes, los cuales tuvieron un tipo de transcrito en el primer análisis y en el siguiente hubo un cambio de un tipo a otro, lo que pudo haber ocurrido es que los niveles de los respectivos transcritos en el primer análisis eran muy bajos, por lo cual no se pudieron detectar. No se ha registrado que la enfermedad se agrave debido a la presencia de los dos tipos de transcritos y tampoco que tenga alguna implicación, esto debido a que ambos dan origen a la proteína p210.

Se observaron casos que en un principio, tuvieron niveles no detectables de *BCR/ABL*, o “negativo”, este término no es absoluto, debido a que no se puede estar seguro que el individuo ya no tenga ninguna clona Ph+, pues la sensibilidad de los métodos no nos permite asegurar al 100% la inexistencia de los transcritos, por lo cual no es tan adecuado usarlo.

En algunos pacientes que presentaron niveles no detectables, después de algún tiempo, se observaron los transcritos positivos dependiendo del paciente el tipo, esto nos indica que pudo tratarse de una respuesta molecular transitoria, bajos niveles que no son detectables debido a la sensibilidad de la técnica. O bien, no se puede descartar una recaída, la cual puede ser debida a distintos factores, tales como adquisición de anormalidades cromosómicas secundarias, que aunque no se sepa con certeza, se ha supuesto que los genes localizados en las regiones que sufren alteraciones están implicados en vías celulares, las cuales tienen que ver con la progresión de la enfermedad o

recaída. No se pudo observar, ni se ha correlacionado fuertemente si estas anormalidades tenían relación con las recaídas, pues no siempre se realiza el estudio citogenético, este hecho nos resalta la importancia de los estudios citogenéticos para una mejor relación de la progresión y efectos de la misma.

Las recaídas suelen agravar la situación médica del paciente y llevar a una fase avanzada de la enfermedad. En uno de los casos, se hizo evidente que la desaparición de las clonas *BCR/ABL* positivas fue más lenta, al ser monitoreado durante 50 meses y seguir siendo positivo, considerando una recaída debido a resistencia a Imatinib y que al paciente se le haya cambiado de inhibidor, el tiempo de seguimiento indica quizás resistencia debido a alguna mutación, para la cual no exista tratamiento que ayude a contrarrestar los efectos de las cinasas, tal mutación podría ser T315I, este aspecto no se evaluó en este trabajo, sin embargo es importante considerarlo. Las recaídas pueden deberse a distintos factores ya sea suspensión de tratamiento; debido a que el paciente presentó reacciones adversas, que lo llevaron a dejar de tomar el inhibidor de la cinasa de tirosina que se encontrara tomando, u otra razón, es que algunos pacientes deciden suspender el tratamiento al observar una mejoría. Algo importante es que después de una recaída, alcanzar la desaparición de transcritos es más lenta. Otra de las probabilidades es que el paciente haya adquirido una resistencia secundaria al MI, por lo cual el medicamento dejó de ejercer su efecto inhibitorio y por consiguiente la desregulación celular, conllevando a que las clonas leucémicas proliferaran. En estos casos, se realiza el cambio necesario y adecuado del ICT de segunda generación ya sea dasatinib o nilotinib.

El tiempo de negativización de transcritos fue en promedio de 12.3 meses, lo cual no concuerda con lo supuesto de 6 meses,^{68,69} esto en relación a estudios de RT-PCR, pues nuevamente la sensibilidad del método está implicada, si se comparara con resultados de RQ-PCR, la “negativización” sería después de los seis meses. En algunos estudios reportados, se menciona un

tiempo de 12 meses si se trata de resultados de RQ-PCR o bien en su caso RT-PCR,⁴⁹ sin embargo en la variación de los resultados está implícito, la manera en que cada individuo responde al tratamiento, dependiendo de su genética e incluso la calidad y forma de vida de mismo, además en el promedio de tiempo de negativización influye la desviación de los datos, pues uno de los pacientes obtuvo la negativización hasta los 23 meses desde el seguimiento, lo cual dispersa los datos

Todos los pacientes son tratados con ICT, aunque no se tiene registro de cual de los que existen es el que está tomando cada uno de ellos, se sabe que el Mesilato de Imatinib es el medicamento de primera línea, teniendo conocimiento de esto, se puede observar que existe una variación inter-paciente en cuanto a la respuesta al tratamiento, debido a diferencias farmacocinéticas, las cuales estar relacionadas con diferencias genéticas de cada persona, y que pueden influenciar en el efecto que llegue a tener el inhibidor.

Existen algoritmos para el seguimiento de pacientes con LMC en tratamiento, se recomienda que la medición de los transcritos sea cada 3 meses y el cariotipo cada 6 y 12 meses después de la iniciación del tratamiento y si el paciente no ha logrado una RCgC un nuevo cariotipo a los 18 meses. Si el paciente logra un RCgC los niveles de transcritos se miden cada 3 meses y cariotipo a los 12 meses. Como se pudo observar esto no se lleva a cabo del todo, debido a diversos factores, comenzando por el costo de los estudios, los pacientes dejan de ir a revisiones médicas si se llega a presentar una mejoría, o no se lleva un registro adecuado del primer estudio y posteriores.

El trasplante de células madre hematopoyéticas es parte de los tratamientos, principalmente para pacientes jóvenes. A los pacientes que hayan sido trasplantados, se les realiza seguimiento de rutina, en este estudio solo tiene registro de monitoreo molecular, debido a que suponemos que la carga

leucémica sea mínima y por consiguiente difícil de detectar a nivel citogenético. Los resultados de niveles no detectables de transcritos, es esperado, pues se espera que las células sanas trasplantadas incrementen su población y con ello los mecanismos celulares afectados por la proteína de fusión se regularicen, conllevando a esperar un buen pronóstico. Del total de casos en estudio cabe resalta que solo uno fue trasplantado, debido a que un trasplante es riesgoso y los requerimientos para que se lleve a cabo son bastantes, desde que el paciente debe ser joven y si se trata de un trasplante alogénico se requiere de un HLA compatible, además las probabilidades de éxito no son altas y después del procedimiento se requiere de cuidados y vigilancia médica especiales y cuidadosos

8. Conclusiones

Se logró observar la progresión y negativización t(9;22) y *BCR/ABL* en algunos pacientes, mediante citogenética convencional y RT-PCR, donde la técnica de preferencia, es la molecular, debido al grado de sensibilidad del método, aunado a esto el tipo de muestra requerido es SP y la obtención de esta, es menos invasiva que un aspirado de medula ósea, por lo cual se prefiere.

Los datos que se obtienen en el laboratorio son escasos; no se posee la historia clínica de cada paciente, datos del tipo de ICT que toma cada paciente y tiempo de tratamiento, o si se ha cambiado de inhibidor y las razones. Es importante tener los datos para un mejor análisis y comprensión del curso clínico que sigue cada uno de los pacientes. Una sugerencia, sería que, se mandaran los datos del paciente al laboratorio, y se tuviera un mejor manejo de datos entre médico y laboratorio.

Los tiempos de desaparición de transcritos, rebasaron el promedio reportado en la literatura, sin embargo se deben tomar en cuenta diferentes factores que influyen en los resultados para un mejor análisis de los datos. En cuanto al logro de la RCgC, el tiempo fue aproximado a lo supuesto, sin embargo solo 5 pacientes la lograron, este número de pacientes es pequeño, aunque la técnica citogenética es menos sensible, es de gran importancia, pues se pueden detectar otro tipo de anomalías que pudiesen estar interviniendo en la progresión de la enfermedad. Por este hecho sugeriría que de igual manera los seguimientos se realizaran por medio de las dos técnicas para que el monitoreo fuese más eficiente.

Finalmente pudimos observar que cada pacientes evoluciona y responde de diferente manera tanto a los efectos de la enfermedad, como al tratamiento, por lo cual es indispensable un monitoreo frecuente, siguiendo las indicaciones

de los documentos oficiales, además de que al tratarse de una enfermedad “incurable” el monitoreo se hace indispensable, para observar la progresión y en su caso tomar las medidas necesarias para alargar y mejorar la calidad de vida de cada persona.

9. Referencias

- 1 Brain, J. B. *Leukaemia Diagnosis*. 3th edition edn, Vol. Cap. 1 1 (2003).
- 2 Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature reviews. Cancer* **5**, 172-183, doi:10.1038/nrc1567 (2005).
- 3 Druker, B. J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* **112**, 4808-4817, doi:10.1182/blood-2008-07-077958 (2008).
- 4 J.W. Vandiman, J. V. M., M. Bacarani, J. Thiele. in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (ed Elias Campo Steven H. Swerdlow, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Haral Stein, Jurgen Thiele, James W. Vandiman.) (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008).
- 5 Ahmed., I. H. Analysis of variant translocation t(4;9;22) by fluorescence in situ hybridization (FISH) in a case of chronic myelocytic leukemia. *Case Study Case Rep.* **2**, 46-52 (2012).
- 6 M., R. Leucemia mieloide crónica en crisis blástica: bases moleculares y diagnóstico (Parte I). *RevColombCancerol*, 257-266. (2007).
- 7 Cortes, J. & O'Dwyer, M. E. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America* **18**, 671-684, x, doi:10.1016/j.hoc.2004.03.012 (2004).
- 8 Santiago Javier Monzón, C. M. T., Juan Marcelo Reyes. Dra. Graciela Vallejos. . Mesilato de Imatinib como alternativa terapéutica en la Fase Crónica de la Leucemia Mieloide Crónica. . *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* **166** 15-24 (2007).
- 9 Huntly, B. J. & Gilliland, D. G. Blasts from the past: new lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia. *Cancer cell* **6**, 199-201, doi:10.1016/j.ccr.2004.09.005 (2004).
- 10 Pavón Morán V, H. R. P., Martínez Antuña G, Agramonte Llanes O, Jaime Fagundo JC, Bravo Regueiro J. . Leucemia mieloide crónica. Actualización en citogenética y biología molecular. . *Instituto de Hematología e Inmunología* (2005).
- 11 Tomasz Sacha, K. F. a. A. B. S. in *Molecular Aspects of Hematologic Malignancies* Vol. Chapter 6 (ed Malgorzata Dawidowska Michal Witt, Tomasz Szczepanski) Ch. 6, 103-115 (Springer Berlin Heidelberg, 20012).
- 12 Frazer, R., Irvine, A. E. & McMullin, M. F. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *The Ulster medical journal* **76**, 8-17 (2007).
- 13 Redaelli, A. *et al.* Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert review of anticancer therapy* **4**, 85-96, doi:10.1586/14737140.4.1.85 (2004).
- 14 Lundán, T. *Novel prognostic factors in chronic myeloid leukemia*. (2008).
- 15 McKenzie, S. B. *Hematología Clínica*. 2th. edition edn, Vol. Capitulo 15 Transtornos mieloproliferativos 376-385 (2000).
- 16 M., R. Leucemia mieloide crónica en crisis blástica: bases moleculares y diagnóstico (Parte I). *RevColombCancerol*, 257-266. (2007).
- 17 Goldman, J. M. Chronic myeloid leukaemia--the XXI century. *Leukemia & lymphoma* **11 Suppl 1**, 7-9, doi:10.3109/10428199309047855 (1993).
- 18 Zheng, X., Guller, S., Beisert, T., Puccetti, E. & Ruthardt, M. BCR and its mutants, the reciprocal t(9;22)-associated ABL/BCR fusion proteins, differentially regulate the cytoskeleton and cell motility. *BMC cancer* **6**, 262, doi:10.1186/1471-2407-6-262 (2006).
- 19 Hunter, T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2036-2043, doi:10.1172/JCI31691 (2007).

- 20 Hon Fong L. Mark , R. A. S., Yvonne Mark . Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR/ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML). *Experimental and Molecular Pathology* 1–7 (2006).
- 21 Ferdinand, R., Mitchell, S. A., Batson, S. & Tumor, I. Treatments for chronic myeloid leukemia: a qualitative systematic review. *Journal of blood medicine* **3**, 51-76, doi:10.2147/JBM.S33380 (2012).
- 22 Lu, C. M., Wang, E. & Lawrence, H. J. Simultaneous presence of major secondary chromosomal abnormalities in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics* **172**, 174-175, doi:10.1016/j.cancergencyto.2006.08.009 (2007).
- 23 Calabretta, B. & Perrotti, D. The biology of CML blast crisis. *Blood* **103**, 4010-4022, doi:10.1182/blood-2003-12-4111 (2004).
- 24 Sawyers, C. L., Callahan, W. & Witte, O. N. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* **70**, 901-910 (1992).
- 25 Schutte, J. *et al.* Analysis of the p53 gene in patients with isochromosome 17q and Ph1-positive or -negative myeloid leukemia. *Leukemia research* **17**, 533-539 (1993).
- 26 Helen Jennings Lawce, M. G. B. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3th. edn, 10-31 (1997).
- 27 W., B. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 1-7, doi:10.1038/npg.els.0001160 (2001).
- 28 P.A. Benn, U. T. in *Human Cytogenetics: constitutional analysis* (ed D.E Rooney) Ch. 4, 99-113 (2001).
- 29 Moore M. Charleen, R. G. B. Chromosome Preparation and Banding. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 1-7, doi:10.1038/npg.els.0001444 (2001).
- 30 Strachan, T., Read P.Andrew. *Genética Humana*. 3th. edition edn, 48, 123-128 (McGraw Hill, 2006).
- 31 Spurbeck, J. L., Adams, S. A., Stupca, P. J. & Dewald, G. W. Primer on medical genomics. Part XI: Visualizing human chromosomes. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* **79**, 58-75, doi:10.4065/79.1.58 (2004).
- 32 Gozzetti, A. & Le Beau, M. M. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Seminars in hematology* **37**, 320-333 (2000).
- 33 Goldman, J. M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood* **110**, 2828-2837, doi:10.1182/blood-2007-04-038943 (2007).
- 34 Lee DS, L. Y., Yun YS, Kim YR, Jeong SS, Lee YK, She CJ, Yoon SS, Shin HR, Kim Y, Cho HI. A study on the incidence of ABL gene deletion on derivative chromosome 9 in chronic myelogenous leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization and its association with disease progression. *Genes Chromosomes Cancer*. **37(3)**, 291-299. (2003).
- 35 Wang, Y. L., Bagg, A., Pear, W., Nowell, P. C. & Hess, J. L. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes, chromosomes & cancer* **32**, 97-111 (2001).
- 36 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, doi:10.1182/blood-2007-09-110189 (2008).
- 37 Melo, J. V., Hughes, T. P. & Apperley, J. F. Chronic myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 132-152 (2003).

- 38 Arana Trejo Rosa María , D. C. A., Juan Julio Kassack, Dr. Gregorio Ignacio Ibarra. Recomendaciones para la revisión de cariotipos en el monitoreo citogenético de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) tratados con mesilato de imatinib (MI) para incrementar el nivel de detección de anormalidades cromosómicas

PACAL MEDLAB **3(2)**, 17-20 (2011).

- 39 Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H. & Kurzrock, R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer research* **61**, 2343-2355 (2001).
- 40 Hantschel, O. & Superti-Furga, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 33-44, doi:10.1038/nrm1280 (2004).
- 41 Sirvent, A., Boureux, A., Simon, V., Leroy, C. & Roche, S. The tyrosine kinase Abl is required for Src-transforming activity in mouse fibroblasts and human breast cancer cells. *Oncogene* **26**, 7313-7323, doi:10.1038/sj.onc.1210543 (2007).
- 42 Chavez González María Antonieta, A. S. M., Mayani Héctor. La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de Investigación Clínica* **61**, 221-232 (2009).
- 43 Deininger, M. W. & Druker, B. J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacological reviews* **55**, 401-423, doi:10.1124/pr.55.3.4 (2003).
- 44 Branford S., H. T. P. a. Z. R. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *British Journal of Hematology*, 587-599 (1999).
- 45 Jiménez Velasco A., J. R. G., et-al. PCR en tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas. *Revista Hematológica, Edición Española* **91**, 27-34 (2006).
- 46 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. *Nature reviews. Cancer* **7**, 345-356, doi:10.1038/nrc2126 (2007).
- 47 Rao, J. R., Fleming, C. C. & Moore, J. E. *Molecular Diagnostics: Current Technology And Applications*. (Horizon Bioscience, 2006).
- 48 Susan Branford, L. F., Nicholas C.P. Cross. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood reviews* **112**, 3330-3338, doi:10.1182/blood-2008-04-150680 (2008).
- 49 Baccarani, M., Pane, F. & Saglio, G. Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **93**, 161-169, doi:10.3324/haematol.12588 (2008).
- 50 Cross, N. C. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best practice & research. Clinical haematology* **22**, 355-365, doi:10.1016/j.beha.2009.04.001 (2009).
- 51 Ou, J., Vergilio, J. A. & Bagg, A. Molecular diagnosis and monitoring in the clinical management of patients with chronic myelogenous leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *American journal of hematology* **83**, 296-302, doi:10.1002/ajh.21096 (2008).
- 52 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. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **11**, 4-11, doi:10.2353/jmoldx.2009.080095 (2009).

- 53 Nowell, P. C. Progress with chronic myelogenous leukemia: a personal perspective over four decades. *Annual review of medicine* **53**, 1-13, doi:10.1146/annurev.med.53.082901.103519 (2002).
- 54 Burchert, A. *et al.* Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 1429-1435, doi:10.1200/JCO.2009.25.5075 (2010).
- 55 Guilhot, F., Roy, L., Guilhot, J. & Millot, F. Interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America* **18**, 585-603, viii, doi:10.1016/j.hoc.2004.03.002 (2004).
- 56 Vigil, C. E., Griffiths, E. A., Wang, E. S. & Wetzler, M. Interpretation of cytogenetic and molecular results in patients treated for CML. *Blood reviews* **25**, 139-146, doi:10.1016/j.blre.2011.02.001 (2011).
- 57 Hochhaus, A. *et al.* Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. *Blood* **111**, 1039-1043, doi:10.1182/blood-2007-07-103523 (2008).
- 58 Sherbenou, D. W. & Druker, B. J. Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2067-2074, doi:10.1172/JCI31988 (2007).
- 59 (!!! INVALID CITATION !!!).
- 60 Preuner, S., Denk, D., Frommlet, F., Nesslerboeck, M. & Lion, T. Quantitative monitoring of cell clones carrying point mutations in the BCR-ABL tyrosine kinase domain by ligation-dependent polymerase chain reaction (LD-PCR). *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **22**, 1956-1961, doi:10.1038/leu.2008.97 (2008).
- 61 Apperley, J. F. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *The lancet oncology* **8**, 1116-1128, doi:10.1016/S1470-2045(07)70379-0 (2007).
- 62 http://www.bancodedrogasbadan.com/phpnuke/modules/vademecum2007/drogas_antineoplasticas/busulfan.html. (22.03.13).
- 63 http://www.bancodedrogasbadan.com/phpnuke/modules/vademecum2007/drogas_antineoplasticas/hidroxiurea.html. 22.03.13).
- 64 http://www.bioscripts.net/col/Apuntes/Metodologia_y_Experimentacion_Bioquimica/Cuestiones_exp_bioq.pdf, 2013).
- 65 LAG Ries, E. M., Kosary CL, et-al. SEER. *Cancer Statics Review* (2002).
- 66 Goldman, J. ABC of clinical haematology. Chronic myeloid leukaemia. *BMJ* **314**, 657-660 (1997).
- 67 JT Rector, V. D., Schumacher HR. The chronic leukemias myeloid origin. *Med Lab Observer* **30**, 28 (1998).
- 68 Hughes, T. P. *et al.* Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **349**, 1423-1432, doi:10.1056/NEJMoa030513 (2003).
- 69 Timothy P. Hughes, A. H., Susan Brandford, Martin C. Muller, Jaspal S. Kaeda, et-al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly

diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the international randomized study of interferon and STI571 (IRIS). *Blood* **116**, 3758-3765, doi:10.1182/blood-2010-03-273979 (2012).

