

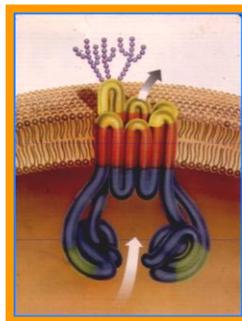


UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
INFIBIOC
LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
HOSPITAL DE CLÍNICAS JOSÉ DE SAN MARTÍN

**ROL DEL POLIMORFISMO DEL GEN MDR-1 DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A DROGAS EN LA
EVOLUCION Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE TIROSINA KINASA EN
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA EN ARGENTINA**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA HEMATOLOGIA**

TESISTA: Bioquímica Especialista Marta Mabel Lardo



DIRECTOR DE TESIS

Prof. Dr. Alberto J. Lazarowski

ROL DEL POLIMORFISMO DEL GEN MDR-1 DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A DROGAS EN LA EVOLUCION Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ITK EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA EN ARGENTINA

RESUMEN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad ocasionada por un daño en las células stem hematopoyética, caracterizado por una translocación recíproca entre dos cromosomas t(9;22), y formación del gen quimérico BCR-AB1, que codifica la proteína BCR-ABL con actividad tirosina kinasa (TK) que origina dicha neoplasia. El tratamiento con inhibidores de la TK (ITKs) bloquea la unión del ATP al sitio catalítico de la TK impidiendo la fosforilación de sus blancos moleculares. A pesar de la alta efectividad alcanzada con los ITKs, un 20% de los pacientes desarrolla resistencia a dichas drogas. Varios mecanismos explican este fenotipo, como la amplificación del gen BCR-ABL1, mutaciones en el sitio de unión de dichas drogas, o la sobreexpresión de los transportadores de multidroga P-gp y/o BCRP (productos de los genes ABCB1/MDR-1 y ABCG2 respectivamente). Nos propusimos estudiar la FARMACORRESISTENCIA al Imatinib mediada por P-gp y/o BCRP en cultivos de células K562 representativas de dicha enfermedad. Se evaluó la expresión de P-gp y BCRP por inmunohistoquímica y su actividad funcional por expulsión de Rho-123, por citometría de flujo, la inhibición del crecimiento celular por Imatinib, con o sin CyA (inhibidor de P-gp), como inhibidor de P-gp. Se analizaron los SNPs C1236T, G2677T/A y C3435T del gen MDR1, en pacientes con LMC y su asociación con respuestas clínico-terapéuticas, y comparados con sujetos sanos. Las células K562, sobre-expresaron BCR-ABL, P-gp y BCRP, y mostraron alta resistencia al Imatinib que fue revertida en un 81% con altas dosis de Imatinib + CyA. Los pacientes fueron diagnosticados y tratados con ITKs, acorde a normas internacionales. Se evaluaron 24 pacientes (13 varones y 11 mujeres), 22 en Fase Crónica y 2 en Crisis Blástica. El 75% recibió Imatinib, Nilotinibo o Dasatinib como única terapia, y 25% recibió Nilotinibo o Dasatinib después del fracaso con Imatinib. Las respuestas citogenéticas fueron evaluadas a los 3 y 6 meses, y las moleculares a los 6, 12 y 18 meses. En FC, los genotipos de los exones 12, 21 y 26 resultaron: wt en 36,4% en c/u, T-variantes heterocigota en 40,9%; 50% y 40,9% respectivamente, y homocigotas-TT en 22,7% 13,6% y 22,7% respectivamente. Los 2 casos en CB resultaron heterocigotas en los

exones 12 y 26; uno resultaron homocigotas-TT para el exón 26 en uno, para el exón 21 el otro. Se halló un total de 17 haplotipos diferentes, de los cuales 6 estaban expresados exclusivamente en pacientes, y otros 7 exclusivamente en controles. Las variantes-T fueron observadas en 100% de los controles y en 75% de los pacientes. El haplotipo-wt (CC/GG/CC) se halló exclusivamente en el 25% restante de pacientes., El 93,75% de casos en FC con SNPs alterado tuvo respuesta molecular Mayor o Completa a 12 meses, mientras dicha respuesta sólo se alcanzó en el 50% de los casos con genotipo wt ($p < 0,001$). Nuestra investigación indica que la expresión del gen MDR-1, impacta negativamente en la respuesta al tratamiento con Imatinib en LMC. El hallazgo exclusivo del haplotipo wt-CC/GG/CC en pacientes con LMC y la baja respuesta terapéutica observada en dichos casos, sugiere que dicho haplotipo podría ser un marcador de riesgo de desarrollo de la enfermedad y/o de mal pronóstico tanto en la evolución clínica, como en la respuesta terapéutica.

Palabras Claves: Línea K562; Leucemia Mieloide Crónica; BCR-ABL; ITKs, ABCB1; SNPs.

AGRADECIMIENTOS

A mi Padre por heredar la voluntad ferrea de perseguir mis sueños y superar mis logros.

A mi Madre por comprender lo que significaba mi trabajo, aún cuando le quitaba tiempo para compartir con ella.

Al Prof Dr. Alberto J Lazarowski por darme la posibilidad de llevar adelante mi pasión por la Hematología

A la Dra. Irene Larripa por brindarme la posibilidad de realizar los ensayos biológicos y por la disponibilidad física de sus laboratorios para llevar a cabo una parte importante de este proyecto.

A La Dra. Graciela Lucero por su colaboración y su permanente apoyo.

A Marcelo Castro por demostrarme que con las herramientas que me brindaba podía salir adelante en mi investigación

A los Médicos Hematólogos por la confianza y la participación en este Trabajo Dras Francisca Rojas y Beatriz Moiraghi

A La Lic Nora Castiglia por su asesoramiento científico

A Mis compañeros del Departamento de Bioquímica Clínica y en especial del Laboratorio de Hematología por estimularme para seguir adelante a pesar de las dificultades

INDICE	<u>Página</u>
INDICE	4
ABREVIATURAS	12
DIFUSION DE LOS RESULTADOS	14
PUBLICACIONES	14
CONGRESOS NACIOANLES E INTERNACIONALES	14
PREMIOS	14
SUBSIDIOS OTORGADOS	15
CAPITULO 1: INTRODUCCION	16
1.1 CONSIDERACIONES PRELIMINARES	16
1.1.1 MARCO TEÓRICO DE LA HIPÓTESIS	18
1.1.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
1.2 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	.23
1.2.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD, ETIOLOGÍA MOLECULAR	24
1.2.2 EL ROL DEL CROMOSOMA PHI EN LA NCOGENICIDAD	24
1.2.3 MUTACIÓN DE LOS GENES ABL1 Y BCR	26
1.2.4 ROL DEL ONCOGÉN BCR-ABL1 Y MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN	28
1.2.5 MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN	29
1.2.6 MODELOS DE LÍNEAS CELULARES MIELOIDES Y NEOPLASIAMIELOIDE	33
1. 2.6.1 MODELOS DE CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES (IN VITRO) DE LMC	31
1. 3 TRATAMIENTO DE LA LMC	32
1.3.1 INHIBIDORES DE TIROSINA KINASA	36
1.3.2 MARCADORES BIOLÓGICOS EVALUADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO	41

1.4 EL GEN MDR-1 DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A DROGA	47
1.4.1 GEN MDR-1, ESTRUCTURA Y REGULACIÓN	47
1.4.2 P-gP: DEL GEN A LA PROTEÍNA. SU ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN	49
1.4.3 P-gP FUNCIÓN; REGULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	50
1.4.4 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1	52
CAPITULO 2: OBJETIVOS	57
OBJETIVOS GENERALES	57
OBJETIVOS ESPECIFICO	57
CAPITULO 3: MATERIALES y MÉTODOS	59
PARTE I: ESTUDIO <i>IN VITRO</i>: CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR K562	59
3. 1.1 CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA K562	59
3.1.2 AMPLIFICACIÓN DE BCR-ABL 1 POR HIBRIDACIÓN IN SITU (FISH)	61
3.1.3 RT-PCR PARA EL GEN BCR-ABL1	62
3.1.4 qRT- PCR EN TIEMPO REAL PARA EL GEN BCR-ABL1	64
3.1.5 CITOMETRIA DE FLUJO	68
3.1.6 CARACTERIZACION DE LAS MUTACIONES EN LA PROTEINA BCR-ABL	69
3.1.7 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P-GP Y BCRP	69
3.1.8 RT-PCR PARA EL GEN MDR-1...(AMPLIFICACION DEL GEN MDR-1)	71
3.1.9 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1	71
CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS	74
PARTE II: ENSAYO FUNCIONAL EN LA LÍNEA K562	74
3.2.1 PRUEBA DE ACTIVIDAD FUNCIONAL CON RODAMINA 123 (Rho-123)	74
3.2.2 ENSAYO DE APOPTOSIS CELULAR	75

3.2.3. ENSAYO DE INIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB	76
3. 2.4 ENSAYO DE INIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB MAS UN INHIBIDOR DE P-gp	77
CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS	78
PARTE III: ESTUDIO EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (BCR-ABL1 POSITIVO)	78
3.3.1RT-PCR PARA EL GEN BCR-ABL1 (ESTUDIO SEMICUANTITATIVO)	78
3.3.2 BREVE DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO qRT-PCR PARA BCR-ABL-1 (CUANTIF. EN TIEMPO REAL)	79
3.3.3POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1	80
CONTROLES NORMALES	80
ALMACENAMIENTO Y PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO	81
CAPITULO 4. RESULTADOS	82
PARTE I ESTUDIO IN VITRO DE LMC EN LÍNEA CELULAR	82
4.1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA LÍNEA K562	82
4. 1.2 FISH	83
4.1.3 MUTACIONES EN LA PROTEÍNA TK (BCR-ABL)	84
4.1.4 CITOMETRÍA DE FLUJO	84
4.1.5 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS P-gP Y BCRP	86
4.1.6 RT-PCR PARA LOS GENES BCR-ABL1 Y MDR-1	88
4.1.7 q RT-PCR PARA EL GEN MDR-1 EN LA LÍNEA K562	89
4.1.8 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1	89
CAPITULO 4: RESULTADOS, PARTE II:	91
ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR EN LA LÍNEA K562	91
4.2.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA P-gP EN LA LÍNEA K562, PRUEBA FUNCIONAL CON Rho123	91
4.2.2 ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB	93
4.2.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB + CYA	94
PARTE III: ESTUDIO EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (BCR-ABL1 POSITIVO)	97
4.3.1 RT-PCR PARA BCR-ABL1	97
4.3.2 DISTRIBUCIÓN ETARIA Y DE GÉNERO	97

4.3.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN TRATAMIENTO, RIESGO SOKAL Y TIPO DE RESPUESTA	98
4.3.4 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1	105
PARTE IV: ESTUDIO EN SUJETOS SANOS	113
4.4.1 POLIMORFISMO DEL GEN MDR-1 EN SUJETOS SANOS	113
4.4.2 COMPARACION DE AMBAS POBLACIONES: SANOS VS LMC	115
CAPITULO 5. DISCUSIÓN	117
CONSIDERACIONES DE LOS ESTUDIOS IN VITRO EN LA LÍNEA CELULAR K562	117
CONSIDERACIONES DE LOS ESTUDIOS CLÍNICOS	123
CRISIS BLÁSTICA	132
CAPITULO 6	135
CONCLUSIONES ESPECIFICAS	135
CONCLUSION FINAL	136
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXO I	160
CROMATOGRAMAS DE LOS SUJETOS SANOS	

A) FIGURAS

Página

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CROMOSOMA PHI	24
FIGURA 2. IMAGEN DE UN CROMOSOMA PHI	25
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA AB y BCR a y b	26
FIGURA 4. LOCALIZACIÓN DE LOS PUNTOS DE RUPTURA SOBRE BCR-ABL1	27
FIGURA 5. EFECTOS MOLECULARES DE LA TRANSLOCACIÓN DEL Phi	28
FIGURA 6. CAMINOS DE SEÑALIZACIÓN EN CÉLULAS BCR-ABL1+	29
FIGURA 7. ETAPAS DE TRANSFORMACIÓN DE LA LMC	30
FIGURA 8. PORCENTAJE DE FRECUENCIA DE LOS SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA LMC	33

FIGURA 9 MECANISMO DE ACCIÓN DE UN ITK	37
FIGURA 10 CAMINOS DE FOSFORILACIÓN A PARTIR DE LA PTOTÉINA BCR-ABL DOWNSTREM	38
FIGURA 11 SELECCIÓN NATURAL DE CLONES RESISTENTES A ITK	41
FIGURA 12 NÚMERO DE CÉLULAS LEUCÉMICAS VS EL RADIO BCR-ABL1	43
FIGURA 13 MUTACIONES EN LOS DOMINIOS DE LA TK	46
FIGURA 14 ESQUEMA DEL PROMOTOR DEL GEN MDR-1	48
FIGURA 15 FACTORES REGUALDORES DEL GEN MDR 1	48
FIGURA 16 REPRESENTACIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA- P (P-gp)	49
FIGURA 17 REPRESENATCIÓN GENÉRICA DE UN SNP DE ALELO ÚNICO	53
FIGURA 18 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1	54
FIGURA 19 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO C3435T	54
MATERIALES Y METODOS	60
FIGURA M&M-I 20 CÉLULAS K562 EN CULTIVO	60
FIGURA M&M-I 21 MICRIFOTOGRAFÍA DE UNA IMAGEN DE FLUORESCENCIA BCR-ABL1 (+)	61
FIGURA M&M-I 22 ESTRUCTURA DEL ARNm DEL GEN DE FUSIÓN BCR-ABL1	63
FIGURA M&M-I 23 GRAFICAS DE qRT-PCR DE BCR-ABL1	65
RESULTADOS PARTE I	
FIGURA R-I 24 MICROFOTOGRAFÍA DE CITOPREPARADOS DE LA LÍNEA K562	82
FIGURA R-I 25: FOTOGRAFIA DE FISH EN LA LÍNEA K562 PARA BCR-ABL1	83
FIGURA R-I 26 MARCACIÓN CON GLYA POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN K562	85
FIGURA R-I 27 DISTRIBUCIÓN DEL PANEL MIELOIDE POR CITOMETRÍA DE FLUJO/K562	86
FIGURA R-I 28 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA P-gP CON ANTICUERPO C494 EN K562	87
FIGURA R-I 29 EXPRESIÓN DE P-gP POR AC C494 EN RIÑÓN	87

FIGURA R-I 30 PCR DEL GEN MDR-1, BCR-ABL1 EN K562 WT Y K562/VIN	88
FIGURA R-I 31 CURVAS DE MELTING (T°) DEL GEN MDR-1 EN LÍNEA K562	89
FIGURA R-I 32 PCR ALELO ESPECÍFICA PARA EL EXÓN 12 EN K562	90
RESULTADOS PARTE II	
FIGURA R-II 33 HISTOGRAMAS DE FLUORESCENCIA DE Rho-123	92
FIGURA R-II 34 PRUEBA FUNCIONAL DE Rho-123 EN K562	93
FIGURA R-II 35 PORCENTAJE DE APOPTOSIS EN K562 CON DIFERENTES TRATAMIENTOS A 24 Hs	95
FIGURA R-II 36 PORCENTAJE DE APOPTOSIS EN K562, CON DIFERENTES TRATAMIENTOS A 24 Y 72Hs	95
FIGURA R-II 37 PORCENTAJE DE APOPTOSIS EN K562, CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE STI y CyA. TRATAMIENTOS A 24 Y 72 hs	96
RESULTADOS PARTE III	
FIGURA R-III 38 FRECUENCIA DE RIESGO SEGÚN MODELO SOKAL	100
FIGURA R-III 39 qRT-PCR DEL CASO N° 18	102
Figura R-III 40 SNP DEL EXON 21, GENOTIPO G>T EN EL CASO 3(A PROPOSITO DE UN PACIENTE)	105
FIGURA R-III 41 DISTRIBUCIÓN DE LOS HAPLOTIPOS ENCONTRADOS EN LMC	106
FIGURA R-III 42 DISTRIBUCIÓN DE LOS HAPLOTIPOS SEGÚN TRATAMIENTO Y RESPUESTA	109
FIGURA R-III 43 DISTRIBUCION DE SNPs SEGÚN LA RESPUESTA CITOGÉNICA	110
FIGURA R-III 44 DISTRIBUCIÓN DE LOS SNPs SEGÚN LA RESPUESTA MOLECULAR	111
FIGURA R-III 45 FRECUENCIA DE ALELOS T EN RESPONDEDORES Y NO RESPONDEDORES	111
FIGURA R-III 46 PROBABILIDAD BAYESIANA DE ALCANZAR RESPUESTA CITOGEN. Y MOLECULAR	112
RESULTADOS PARTE IV	
FIGURA R-IV 47 DISTRIBUCION DE LOS GENOTIPOS ESTUDIADOS EN SUJETOS SANOS	114
FIGURA R-IV 48 DISTRIBUCION DE HAPLOTIPOS EN SUJETOS SANOS Y EN PACIENTES CON LMC	115
FIGURA R-IV 49 FRECUENCIA DE ALELOS T SEGÚN EXÓN EN LMC Y SUJETOS SANOS	116

B) TABLAS**INTRODUCCION**

TABLA 1 GENES IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN DE LA LMC	31
TABLA 2. CRITERIOS DE LA WHO PARA FASE ACELERADA DE UNA LMC	34
TABLA 3 CRITERIOS DE LA WHO PARA CRISIS BLASTICA DE UNA LMC	34
TABLA 4. GRUPOS DE RIESGO RELATIVO SOKAL	36
TABLA 5 DEFINICIÓN DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO SEGÚN ENL2013	45
TABLA 6. DISTRIBUCIÓN DE P-GP EN TEJIDOS NORMALES	51
TABLA 7 FRECUENCIA DE GENOTIPOS DE MDR1 EN DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS	56
RESULTADOS PARTE I	
TABLA R-I 8 PORCENTAJE DE AC MONOCLONALES DE LA LINEA K562	84
RESULTADOS PARTE II	
TABLA R-II 9 MEDIDA DE LA IFM DE RHO-123 EN K562 SEGÚN TRATAMIENTOS	92
TABLA R-II 10 APOPTOSIS EN K562 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INHIBIDOR DE TK	94
TABLA R-II 11 PORCENTAJE DE APOPTOSIS EN K562 CON DIFERENTES TRATAMIENTOS A 24 Hs	94
RESULTADOS PARTE III	
TABLA R-III 12 DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN CON LMC SEGÚN EDAD Y SEXO	97
TABLA R-III 13 DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LOS TRATAMIENTOS INDICADOS	98
TABLA R-III 14 TIEMPO PROMEDIO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS	98
TABLA R-III 15 PACIENTES SEGÚN EDAD, SEXO, TRATAMIENTO, DOSIS Y DURACIÓN	99
TABLA R-III 16 CRITERIOS INTERNACIONALES DE RESPUESTA MOLECULAR	101
TABLA R-III 17 RESPUESTA MOLECULAR A 6; 12 Y 18 MESES	103
TABLA R-III 18 : distribución por sexo y edad, las fases de la enfermedad, etc	104
TABLA R-III 19 FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS HALLADOS EN FASE CRONICA	106
TABLA R-III 20 FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS HALLADOS EN CRISIS BLASTICA	107

TABLA R-III 21 Idem Tabla 20 aplicando Distribución de Hardy-Weinberg	107
TABLA R-III 22 GENOTIPOS ENCONTRADOS EN LOS CASOS TRATADOS SOLO CON IMATINIB	108
TABLA R-III 23 GENOTIPOS ENCONTRADOS EN LOS CASOS TRATADOS CON IMATINIB + OTRO ITK	108
TABLA R-IV 24 GENOTIPOS DE LOS CASOS TRATADOS CON UN ITK DE 2DA GENERACION	108
RESULTADOS PARTE IV	
TABLA R-IV 25 FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS HALLADOS EN SUJETOS SANOS	113
TABLA R-IV 26 GENOTIPOS EN SUJETOS SANOS	114

ABREVIATURAS

ABC	ATP binding cassette
BCRP	Proteína de resistencia del Cáncer de mama
CB	Crisis Blástica
CRK	Proteína Asociada a la Organización del Citoesqueleto
CyA	Ciclosporina A
EMR	Enfermedad Mínima Residual
FA	Fase acelerada
FC	Fase crónica
GLYA	Glicoforina A
HSC	Célula Madre Hematopoyética ó Stem cells
K562	Linea celular de Crisis blastica de LMC (BCR-ABL positiva)
K562/VINC	Linea K562 resistentes al tratamiento con vincristina
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDR-1	Resistencia multidroga-1
M BCR-ABL	Major Breakpoint Cluster
PCR	Polimerasa Chain reaction
PKC	Proteina kinasa C
PST	Proteina supresora de tumor
PTP1B	Proteína Tirosina fosfatasa 1B

P-gp	Glicoproteína- P
PBS	Solución buffer de fosfatos
q RT-PCR	Retrotranscripción y posterior PCR cuantitativa
RHC	Respuesta Hematológica Completa
RCC	Respuesta Citogenética Completa
RCP	Respuesta Citogenética Parcial
RCN	Respuesta Citogenética Nula
RMC	Respuesta Molecular Completa
RMM	Respuesta Molecular Mayor
RMMe	Respuesta Molecular Menor
RMMi	Respuesta Molecular Minima
RMN	Respuesta Molecular Nula
RB	Retinoblastoma
Rho-123	Rhodamina-123
RT-PCR	Retrotranscripción y posterior PCR
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Simple
Src	Protooncogen c-Src que fosforila tirosinas de la región c-terminal

DIFUSION DE LOS RESULTADOS

Parte de los resultados de la presente Tesis Doctoral, fueron obtenidos en colaboración con el LABORATORIO DE CITOGENÉTICA de la ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA y se hallan incluidos en los siguientes artículos y/o presentaciones en congresos Nacionales o Internacionales:

PUBLICACIONES

1-Lardo M, Gargallo P, Bianchini M, Lucero G, Koziner B, Larripa I, Lazarowski A. **MDR-1 Gene and BCRP are involved in the Resistance to imatinib in K-562 Cell Line.** *Blood*, 2006,108(11). (Section: Molecular Pharmacology, Drug Resistance)

2-Lardo M; Lazarowski A; Cuello M. T; Gargallo P; Bianchini M; Larripa I. **Gen MDR1 y resistencia al Imatinib en Células K562.** *Hematología Argentina*, 2007;11(1): 14-19. *

3-Lardo M, Cuello María T, Cargall, P, Bianchini M, Camarero S, Lucero G, Koziner B, Larripa I, Lazarowski A. **Importancia del estudio farmacogenómico del gen MDR-1 en la resistencia múltiple a drogas en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.** *ACTA BIOQUIMICA CLINICA LATINOAMERICANA*. 2010; 44 (3) 424. ISSN: 0325-2957.

4- Lardo MM, Castro M, Moiraghi B; Rojas F; Borda N; Rey JA, Lazarowski A. MDR-1/ABCB1 gene polymorphisms in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood Research* (in press; September 2015)

PREMIOS

El trabajo fue distinguido con:

***Premio al Mejor Trabajo en Hematología Básica:** Gen MDR1 y Resistencia al Imatinib en Células K562.

XVII Congreso Argentino de Hematología. 2005

CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Título: “Gen MDR1 y resistencia al Imatinib en Células K562.Lardo M y col.XVII Congreso Argentino de Hematología.III Congreso Internacional de Citometría de Flujo.VIII Jornadas del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo. Del 2 al 5 de Noviembre de 2005. Córdoba –Pcia de Bs. As. Argentina.

Título“Co-expresión de las proteínas de resistencia múltiple a drogas BCRP y P-gp en células K562 BCR/ABL positivas resistentes al imatinib”. Lardo M y col. **XI Cong Intern Med Interna Hospital de Clínicas 25/8/2006.** *Medicina* 2006; 66 Supl 1, 40#123.

Título: “MDR-1 Gene and BCRP are involved in the Resistance to imatinib in K-562 Cell Line”. Lardo M y col.**Congreso ASH** (American Society Hematology) 48th Annual Meeting and Exposition.Dec 9-12, 2006. Orlando, Florida. (Abstract nro 4391)

Título: “Estudio Preliminar de los polimorfismos del gen MDR-1 de resistencia a drogas en LMC en Argentina”. Lardo M y col. **XII Congreso Uruguayo de Hematología**. XII Jornada de Enfermería en Hemato-Oncología. Simposio Latinoamericano en Actualización en Citometría de Flujo en Hematología. Jornadas de Laboratorio en Hematología. VI Jornadas de Hematología del Interior. Del 8 al 10 de Noviembre del 2012. Punta del Este. Uruguay.

Título: “ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN ABCB-1 (RESISTENCIA A DROGAS): C1236T G2677T/A Y C3435T ASOCIADOS A LA RESPUESTA EN EL TRATAMIENTO DE LA LMC”. Lardo M y col. **15º Congreso Internacional de Medicina Interna Del Hospital de Clínicas**. Del 19 al 22 de agosto del 2014. Bs As. Argentina. Presentación oral.

SUBSIDIOS OTORGADOS

Subsidio para Investigación Médica- Básica -Fundación Roemmers 2005-2006.

“Estudio in Vitro del uso de rapamicina como nuevo agente terapéutico para el tratamiento de las Leucemias BCR/ABL positivas”. Director de Proyecto: Dra. Irene Larripa- Investigador Principal del CONICET.

Subsidio para Investigación Médica- Básica -Fundación Roemmers 2007-2008.

“ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN IN-VITRO y EX-VIVO DE LA EXPRESIÓN BCR/ABL EN CELULAS RESISTENTES AL IMATINIB”. Director de Proyecto: Dra. Irene Larripa-Investigador Principal del CONICET

Subsidio: Proyecto de Investigación Clínica. Programación Científica- Para Grupo en Formación UBACyT 2011-2014 Código B04 .Universidad de Buenos Aires, Resolución (CS) N°674/2010. “Estudio del Polimorfismo del Gen MDR-1 en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica” Director del proyecto: Bioquímica Mabel Lardo. CoDirección. Prof. Alberto Lazarowski

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

FARMACORRESISTENCIA EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)

La leucemia mieloide crónica (LMC) representa un modelo de enfermedad neoplásica con una anomalía genética bien caracterizada: *la translocación recíproca (9;22)(q34;q11)*, que yuxtapone una porción del oncogén c-ABL1 (gen ABL-1) presente en el cromosoma 9, con un fragmento de la región del punto de ruptura del gen BCR (Break Cluster Region) en el cromosoma 22. Esta translocación genera el oncogén de fusión BCR-ABL1, también conocido como cromosoma Filadelfia, con alta actividad tirosina kinasa (TK) espontánea (Nowell PC. et al, 1960; Rowley JD., 1973).

Aunque con el advenimiento de los inhibidores de la tirosina kinasa (ITK) la enfermedad está bien controlada en la mayoría de los pacientes, la resistencia al tratamiento con estos medicamentos ITK, puede desarrollarse en un porcentaje menor de ellos (Hochhaus A. et al, 2002; Roche-Lestienne C. et al, 2002). La persistencia de una masa residual de células madre leucémicas resistentes a ITK, constituye una "bomba de tiempo" que contribuye a la recaída de la enfermedad (Ross DM et al, 2011; Skorski T et al, 2011). Si bien diferentes mecanismos moleculares que se discutirán en el presente trabajo, pueden dar origen a este clon de células resistentes a ITK, el desafío es establecer si existen marcadores predictivos de dicho comportamiento farmacorresistente y/o de mal pronóstico de evolución de la enfermedad.

1. 1. CONSIDERACIONES PRELIMINARES

En las últimas décadas, los tratamientos para la Leucemia han resultado cada vez más efectivos en lograr la remisión de la enfermedad. Estos adelantos son en parte consecuencia del descubrimiento de diversos marcadores biológicos, que han permitido

identificar nuevos blancos terapéuticos, diseñar fármacos específicos, monitorear su evolución y en ciertos casos hasta establecer el pronóstico de la enfermedad.

Los mecanismos que controlan el crecimiento celular normal, pueden verse afectados por noxas, que dañan el ADN y/o su maquinaria de reparación, pero que lejos de desencadenar el mecanismo apoptótico de dicha célula “dañada”, inician un proceso de comportamiento anormal de la misma, el cual puede deberse a la expresión y/o activación de oncogenes, o bien a la desrepresión y/o activación de mecanismos de estimulación de la proliferación celular, muchas veces ligados a la actividad de distintas Tirosina Kinasas (TK).

Una de las patologías neoplásicas más estudiadas en referencia a la activación de este tipo de sistemas dependientes de TK, es la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), originada en la ya mencionada translocación cromosómica (9;22)(q34;q11) a nivel de la célula madre hematopoyética ó *Stem Cell*. La LMC se caracteriza por la presencia de un “nuevo” y pequeño cromosoma en el grupo G, conocido con el nombre de Cromosoma Filadelfia (Ph+, Philadelphia en inglés), el cual genera la síntesis de una proteína quimérica oncogénica (BCR-ABL1) con actividad TK intrínseca. A partir de allí nuevos hallazgos moleculares permitieron establecer una relación directa entre el oncogén de fusión BCR-ABL1 que da origen a dicha proteína y la leucemogénesis principalmente en la LMC. (Melo JV, 2007; Deininger M et al 2001)

En los últimos años, el tratamiento clásico de la LMC, con agentes citotóxicos genéricos y/o moduladores biológicos como Interferón- α (INF- α), ha sido reemplazado por una nueva generación de drogas inhibitoras específicas de la actividad TK del BCR-ABL1, como el Imatinib, el cual se une al sitio de anclaje específico de las moléculas de ATP sobre la TK, bloqueando su acción catalítica.

En la actualidad, este tratamiento se utiliza como primer esquema terapéutico con excelentes resultados en la mayoría de los casos. Sin embargo algunos pacientes no logran alcanzar los criterios internacionales de “*respuesta eficaz*” a dicho tratamiento, es decir, no pueden obtener una remisión completa de la enfermedad, la cual recaerá en una crisis blástica con desenlace fatal (Baccarani M et al, 2006; Faderls M et al ,1999).

Este comportamiento diferencial, es observado en ciertos individuos que a pesar de presentar la misma enfermedad y ser tratados con el mismo fármaco que aquellos con

excelente evolución, terminan desarrollando un fenómeno de farmacorresistencia desde el inicio del tratamiento, o bien luego de una aparente respuesta óptima al mismo, lo que genera la necesidad de identificar posibles marcadores predictivos de dicho fenotipo refractario.

1.1.1 MARCO TEÓRICO DE LA HIPÓTESIS

Glicoproteína P (P-gp)

Uno de los mecanismos más extensamente investigado en la farmacorresistencia del cáncer, originalmente descrito por Juliano & Link (1976) (Juliano RL, Ling VA 1976), es el mediado por la denominada “Glicoproteína P” (P-gp) de 170 Kd. Esta glicoproteína de expresión en las membranas celulares, pertenece a la familia de los llamados “transportadores ABC” (Schlaifer D et al, 1990; Grandjean –Forestier F et al, 2009; Vossebeld PJ et al, 1999; Zalcborg J, et al, 1994), los cuales son responsables de la expulsión de diferentes compuestos desde el interior hacia el exterior celular, mediante un mecanismo dependiente Ca^{2+} y de la hidrólisis del ATP, formando parte de los complejos procesos de detoxificación del organismo.

La P-gp ha sido identificada como un transportador de eflujo altamente eficaz e inespecífico, dado el amplio espectro de productos naturales y sustancias químicas de muy disimiles estructuras que es capaz de transportar.

Numerosos trabajos han demostrado la interacción de la P-gp con las drogas utilizadas en el tratamiento de diferentes tipos de leucemias y sus consecuencias clínicas en el desarrollo de la fármacorresistencia (Valera ET et al, 2004, Rothemberg ML et al, 1989; Van Sonneveld P et al, 2000; Zhou SF et al , 2008; Raub TJ , 2005; Ho et al , 2008; Van den Henvel-Eibrink M et al , 2007).

Es interesante destacar, que en condiciones normales, existe una expresión transitoria de dos transportadores-ABC como P-gp y BCRP (Breast Cancer Resistant Protein), durante las etapas tempranas de la maduración de las células progenitoras hematopoyéticas, particularmente las células CD34+ (Suárez L et al, 2004. Zhou S , 2001;

Drach D et al, 1993; Raaijmakers Marc et al, 2005; Azzariti A et al, 2010; Craiz F & Foon K, 2008; Figueiredo-Pontes L et al, 2008).

Leucemia Mieloide Crónica

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa clonal, originada por un daño en el *stem cell* hematopoyético (SCH), y se desarrolla a partir de la actividad oncogénica de una proteína de 210 Kd (p-210) con alta actividad de TK, producto del gen quimérico BCR-ABL1 antes mencionado (Deininger M et al, 2000; Melo J et al, 2000; Goldman JM & Melo J, 2003; Skorski T et al, 1995).

El tratamiento de la LMC con 2-fenilamino-pirimidina, conocido como STI-571 (Signal Transducción Inhibidor) ó Imatinib, permite bloquear la actividad de la proteína quimérica p-210 y así eliminar el clon leucémico en un 80-85% de los casos (Pavlovsky C et al; 2011).

Este compuesto (Imatinib) impide la actividad TK del BCR-ABL1 y con ello la fosforilación de un importante número de proteínas substratos de la misma que intervienen en la proliferación celular. (Schindler T et al, 2000; Nagar B et al, 2002; Deininger M et al, 2005).

A pesar de ser un tratamiento altamente selectivo como inhibidor de esta tirosina kinasa, su eficacia terapéutica se ve limitada entre un 15-20% de pacientes, quienes desarrollan refractariedad desde el comienzo del tratamiento, ó bien luego de cierto período de respuesta aparentemente adecuada, evolucionando hacia una fase de aceleración (de alta proliferación celular) y que culmina en una crisis blástica (Druker B et al, 2006; Hochhaus A et al, 2002; Deininger M & Druker BJ, 2004).

Dentro de los mecanismos que producen la falta de respuesta a este fármaco, encontramos:

- a- Amplificación del gen BCR-ABL1 y sobreexpresión de su producto, la proteína p-210
- b- Mutaciones del gen BCR-ABL1 en el sitio catalítico que no reprimen ni su expresión ni su función, pero sí impiden la unión del Imatinib a la proteína, evitando su acción inhibitoria

- c- Insuficiente concentración de droga (Imatinib) intracelular, debido al transporte activo por expulsión de la misma mediado por P-gp y/o BCRP (Mahon FX et al, 2008; Branford S et al, 2009; Shukla S et al, 2008).

Este último mecanismo de eflujo, puede a su vez estar sobreexpresado a nivel del tracto gastrointestinal, generando cambios farmacocinéticos y disminuir los niveles sanguíneos de la droga, que es administrada por vía oral. Este hecho puede ser un factor que modifique significativamente la relación Dosis-Respuesta con altas diferencias interindividuales.

Consecuentemente, debemos considerar que todos y cada uno de estos mecanismos pueden estar presentes incluso simultáneamente como parte del fenómeno de resistencia a drogas observado en los casos de LMC con fenotipo refractario. Como consecuencia de este fenómeno, la resistencia al tratamiento con Imatinib, puede ser sospechada en aquellos casos en que el tratamiento no logra eliminar definitivamente el clon leucémico, y mantienen la detección persistente del gen BCR-ABL1 por métodos citogenéticos ó por cuantificación de sus transcritos por técnicas moleculares más sensibles, con valores positivos >0.1% a los 12 meses (Baccarini M et al ,2006; [Iacobucci I et al ,2006](#)).

Los paciente en los cuales los mecanimsos de resistencia se deban a lo descrito en los puntos a-b, hoy son abordados por un incremento de la dosis de Imatinib o la rotación hacia nuevos ITK de última generación que no son afectados por las mutaciones mencionadas. Sin embargo estos casos no explican el total de pacientes con fenotipo refractario. En cambio, los mecanismos relacionados a la expresión de los genes de resistencia múltiple a drogas, no solo pueden guardar directa relación con la farmacorresistencia, sino que además sus polimorfismos genéticos pueden tener un valor predictivo de dicha respuesta, como así también de la predisposición al empeoramiento en la evolución de la enfermedad por el desarrollo de la crisis blástica, o la aparición de fallo medular u otras complicaciones clínica malignas.

La identificación de polimorfismos de un nucleótido (SNPs) en la secuencia completa de los 28 exones que componen el gen MDR-1 humano ya ha sido determinada. La presencia de un cambio de base en la posición 3435 (C3435T), del exón 26 ha sido relacionada a la diferente capacidad de expresión de la glicoproteína P-gp, que podría impactar en los nieles sanguíneos de las drogas terapéurticas (Hoffmeyer S et al, 2000). Este reporte permitió asociar una variante del gen MDR-1 con un cambio en la función y

expresión de la proteína a nivel del duodeno, uno de los órganos donde naturalmente se expresa la P-gp y, donde puede jugar un rol clave en la limitación de la absorción intestinal del fármaco. A su vez, dicho polimorfismo podría asociarse a un incremento de expresión en otros sitios excretores de fármacos (canalículo biliar, riñón, etc), aumentando su capacidad de eliminación, como así también en las mismas células neoplásicas, limitando la penetración del fármaco a través de la presencia de P-gp en dichas células, y evitando alcanzar concentraciones críticas (letales) intracelulares de la misma.

Si bien actualmente se han encontrado más de 216 SNPs de este gen, sólo 16 de ellos se encuentran en regiones codificantes (Jamroziak K, 2004). Los estudios poblacionales indican que existen significativas variaciones interétnicas (Marzolini C et al ,2004; R L Roberts et al, 2002) en la frecuencia de los polimorfismos de este gen. Sin embargo en el grupo étnico de origen Caucásico, hay al menos dos polimorfismos: G2677T/A y C3435T, con los correspondientes haplotipos que podrían correlacionar con los niveles de expresión de la P-gp y su función de transporte, siendo el genotipo TT de ambos polimorfismos mencionados los que resultarían más beneficioso en la respuesta al tratamiento (Green H et al ,2006).

Por lo tanto, ciertos polimorfismos del gen MDR-1 podrían resultar marcadores biológicos predictivos de respuesta terapéutica, pero también, indicadores de riesgo y/o de evolución de la enfermedad.

El estudio de tres SNPs del gen MDR-1: C1236T, C3435T y G2677T/A. en tumores sólidos, leucemias linfoblásticas en edad pediátrica y leucemias agudas de origen mieloide, demostró el impacto que estos polimorfismos tienen en la expresión y actividad de transporte de la P-gp y su relación con la farmacorresistencia a las drogas antineoplásicas.

Diversas investigaciones en líneas celulares y modelos experimentales de tumores humanos, han demostrado el rol de las variantes del gen MDR-1 en el mecanismo de farmacorresistencia a diferentes drogas (Mickley LA, 1998). En este sentido, la línea celular K562 (crisis blástica de LMC humana), es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la efectividad del tratamiento con Imatinib y otros ITK. (Lee, YL, 2013; Arunasree KM et al, 2008). Adicionalmente, otros autores han descripto que el SNP C1236T en el exón 12, podría también estar relacionado con una más alta frecuencia de

respuesta molecular mayor en pacientes con LMC tratados con IMATINIB. (Dulucq S, 2008).

Es por ellos, que poder demostrar la sobreexpresión funcional de los transportadores de multidroga como P-gp y/o BCRP en esta línea celular, permitiría evidenciar el potencial rol que los mismos tienen en el desarrollo de la farmacorresistencia a los ITK.

La caracterización de los polimorfismos antes descritos presentes en la línea celular, podría ser un marcador de alto riesgo tanto del desarrollo de farmacorresistencia como de la crisis blástica terminal.

A su vez, la posible asociación de los diferentes genotipos de los exones 12, 21 y 26 del gen MDR-1, podría constituirse en un biomarcador genéticos (haplotipo) con valor predictivo tanto de evolución como de respuesta terapéutica a los ITKs en pacientes con LMC (Maffioli et al, 2011; Angelini et al, 2013)

1.1.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Como se mencionó previamente, la resistencia celular a drogas antineoplásicas en LMC podría estar asociada entre otros factores, a la sobreexpresión y actividad de las proteínas de transporte tales como P-gp y BCRP. Así mismo, las variaciones polimórficas del gen MDR-1 podrían modificar la función de la P-gp y tener un rol en el desarrollo de falta de respuesta al fármaco. De manera que los polimorfismos de este gen en un grupo de pacientes con LMC de nuestro medio, podrían representar un factor pronóstico de evolución clínico-terapéutico de la enfermedad.

En primer lugar, nos proponemos realizar estudios a nivel experimental, para establecer el grado de farmacorresistencia al Imatinib ejercido por la expresión de P-gp y BCRP en la Línea Celular K562 (BCR-ABL1+).

En segundo lugar, nos proponemos correlacionar el grado de respuestas farmacológicas óptimas o su contraparte, como ser la presencia de recaídas (celular, citogenética o molecular) en pacientes con LMC tratados con inhibidores de TK (Imatinib, Dasatinib o Nilotinib), con las variantes polimórficas del gen MDR-1 encontradas en cada caso, como así también establecer si alguna de dichas variantes polimórficas puede estar vinculada a la aparición de complicaciones en la evolución de la enfermedad.

1.2 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

1.2.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD Y ETIOLOGÍA MOLECULAR

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad de las células hematopoyéticas pluripotenciales, que se produce a partir de una mutación somática. Esta enfermedad se caracteriza por anemia, granulocitosis masiva con inmadurez granulocítica, basofilia, a menudo trombocitosis y esplenomegalia.

En 1960 Nowell y Hungerford, relacionaron a la LMC con el hallazgo de una anomalía en el cromosoma 22, caracterizada por la pérdida de parte del brazo largo de dicho cromosoma, generando un cromosoma 22 más corto y que se lo denominó como “Cromosoma Filadelfia (Phi) (Nowell PC, 1960).

De acuerdo a la Clasificación Internacional de Enfermedades Hematológicas establecida por la Organización Mundial de la Salud en 2008 y 2010, esta enfermedad, ha sido considerada como una neoplasia mieloproliferativa crónica, con un marcador molecular específico, el gen BCR-ABL1 derivado de la formación del cromosoma Phi+, por lo que también se la denominada “Leucemia Mieloide Crónica BCR-ABL1 positiva” (Vardiman J, 2010). La presencia de esta anomalía cromosómica, como causante del desarrollo de la hiperproliferación celular clonal y su posterior transformación blástica, es considerada actualmente como en un paradigma o modelo de enfermedad neoplásica (Melo J; 2007).

1.2.2 EL ROL DEL CROMOSOMA PHI EN LA ONCOGENICIDAD

La LMC se desarrolla a partir de un evento génico único y sin que medie ningún estímulo patológico aparente. La translocación recíproca balanceada entre los cromosomas 9 y 22, compromete los locus donde mapean el protooncogén constitutivo c-ABL en el cromosoma 9 y el gen BCR (Break Cluster Region) en el cromosoma 22, que corresponde a una secuencia de 5,8kb, y contiene tres posibles puntos de ruptura bien caracterizados (Deininger MW; 2000).

El gen c-ABL deriva su nombre del oncogén del virus de Abelson (v-ABL), que induce leucemia en ratones susceptibles, y tiene una importante función en la regulación normal del ciclo celular y en la respuesta al estrés producido por genotoxicidad (Yuan ZM. et al, 1999; Lewis JM. et al 1998). El nuevo gen quimérico de fusión surgido de la mencionada translocación, adquiere actividad Tirocina Kinasa (TK) espontánea, asociada a la hiperproliferación celular (Faderl et al, 1999, Marshall A,2007) (Figuras 1 y 2).

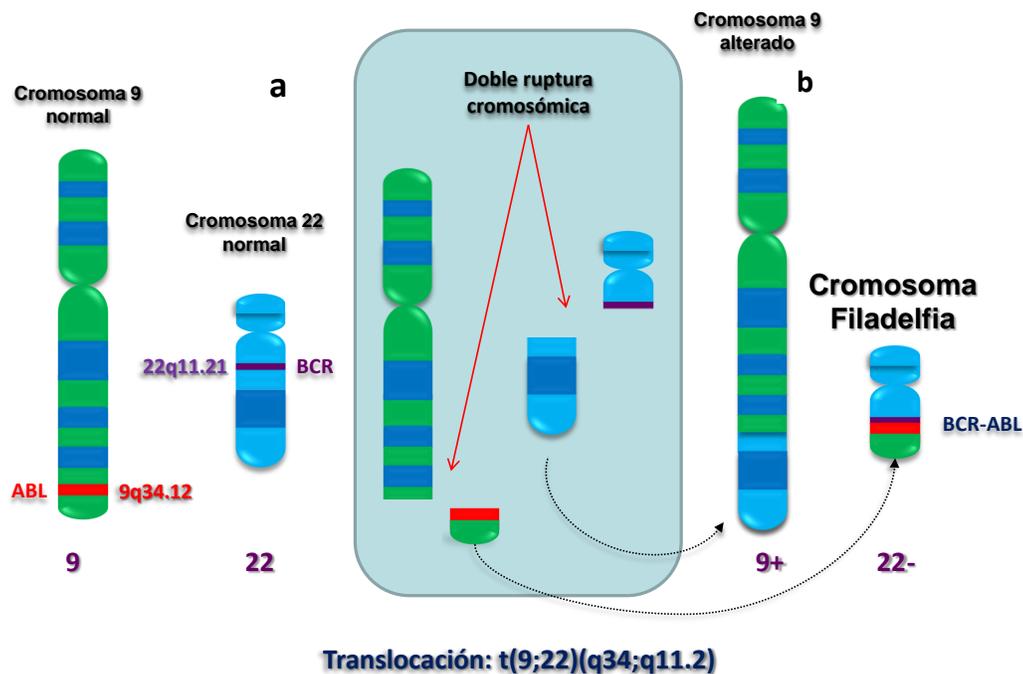


Figura 1: a. Representación esquemática de un cromosoma 9 normal que muestra el gen ABL y el cromosoma 22 normal que tiene el gen BCR. **b.** Los sitios de ruptura y la nueva formación de un cromosoma 22 alterado (cromosoma Filadelfia) (Reproducido de Winslow T, 2007).

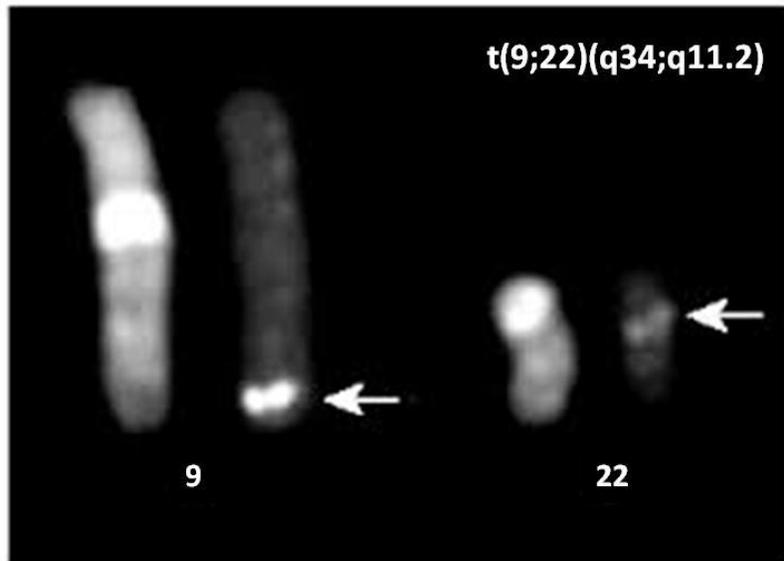


Figura 2: Cariotipo parcial, imagen mostrando una $t(9;22)(q34;q11.2)$ por bandeo citogenético usando quinacrina y giemsa en una LMC. Las flechas muestran un cromosoma 9 más largo y un cromosoma 22 más pequeño (Reproducido de Secker- Walker LM).

Esta translocación ocurre en el 95% de los pacientes adultos con LMC clásica, entre un 25-30% de las Leucemias Linfoides Agudas (LLA) de adultos y aproximadamente en un 5% de las LLA pediátricas (Melo J et al, 1996). Durante la etapa de transformación blástica de la LMC, pueden ocurrir otras anomalías citogenéticas complejas que involucran: la duplicación del cromosoma Phi (38%), o de otros cromosomas como el “**isocromosoma i(17q)**” (20%), la “**trisomía del cromosoma 8**” (34%), o la “**trisomía del cromosoma 19**” (Mitelman Fet al,1993; Sillaber C et al, 2003, Marshall A, 2007; Quintas-Cardama et al, 2009), sin abolir el cromosoma Phi original. La detección del cromosoma Phi se realiza habitualmente para diagnóstico de la LMC por técnicas citogenéticas convencionales. Sin embargo, el gen BCR-ABL1 también puede ser investigado mediante la técnica de fluorescencia por hibridización *in situ* (FISH) con sondas locus-específicas, o por el desarrollo de métodos de PCR, que incrementan significativamente la sensibilidad, y actualmente permiten cuantificar los transcritos del gen BCR-ABL1 presentes, lo cual representa un marcador de gran valor en el seguimiento de la evolución terapéutica de la enfermedad, conocido como detección de la **enfermedad mínima residual** (EMR) (Lundán T et al; 2008). En conjunto, mediante estas metodologías no solo se pueden diagnosticar, sino también se puede determinar y categorizar el grado de respuesta terapéutica al tratamiento con ITKs.

1.2.3 MUTACIONES DE LOS GENES ABL1 Y BCR

En células normales, el protooncogén ABL1 codifica una tirosina Kinasa de 145Kd, que solo se traduce en muy bajas cantidades (trazas). La proteína ABL contiene varios sitios de autofosforilación, pero también tiene capacidad de fosforilar otros componentes intracelulares tales como PKC y CRK (Figura 3 a y b).

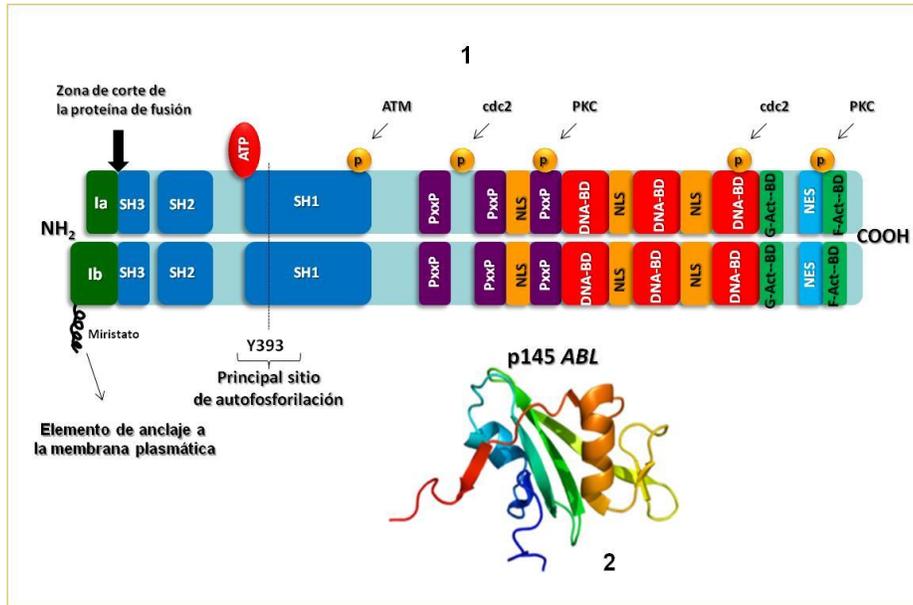


Figura 3: a-1 Estructura de la proteína ABL. Se puede observar los principales sitios de autofosforilación y los puntos de ruptura en la proteína de fusión BCR-ABL1. La flecha próxima al grupo NH₂ terminal, indica el sitio de ruptura sobre el gen ABL y, de unión con el gen BCR a-2 Estructura de la proteína ABL de 145 Kd. (Deininger M et al,2000)

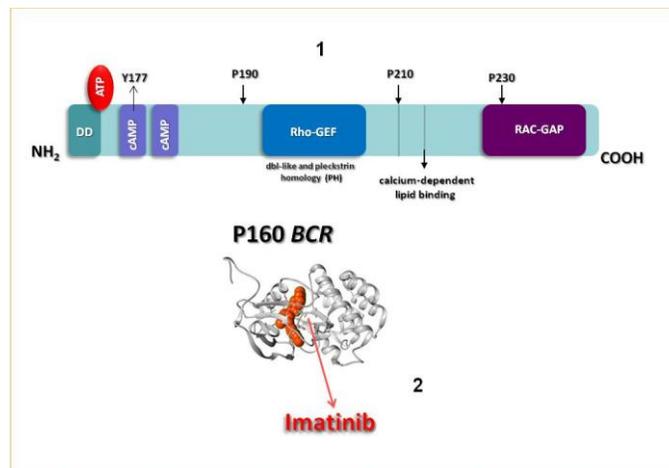


Figura 3: b-1Estructura de la proteína BCR. Se puede observar el principal sitio de autofosforilación y los puntos de ruptura en la proteína de fusión BCR-ABL1. La flecha próxima al grupo NH₂ terminal, indica el sitio de ruptura sobre el gen BCR y, de unión con el gen ABL. **b-2** .Estructura de la proteína BCR de 160 Kd y lugar de unión con un ITK

En el oncogen BCR pueden producirse dos diferentes cortes que al unirse con el gen ABL1 determinan la formación de dos genes de fusión distintos en su información genética, pero con idéntico PM de 210kD. Ambos tienen igual actividad TK aumentada y son capaces de dar lugar al desarrollo de la LMC. Habitualmente, la ruptura sobre el gen ABL1 ocurre en un área de ~300kb, presente en el extremo 5', de la región del primer exón (1b) ó del exón alternativo (1a) (Fig. 4). En cambio los puntos de ruptura sobre el gen BCR, ocurren en un área más corta, de ~5-6 kb que constituye un área susceptible de ruptura. Dentro de ella, se han caracterizado tres regiones de alta frecuencia de cortes conocidas como: menor (m-bcr); mayor (M-bcr) y micro (μ -bcr) (Deininger M et al, 2000; Marshall A et al, 2007) (Figura 4 y 5). La mayor frecuencia de rupturas en el gen BCR observada en los pacientes con LMC, ocurre en la región M-bcr (5,8Kb). En este sitio se pueden producir dos "splicing alternativos" diferentes, que incluirán respectivamente los exones 13 (b2) ó 14(b3) en el gen BCR. Estos puntos de corte, se unirán alternativamente, a los dos primeros exones del gen c-abl (a2), generando los fragmentos de fusión denominados b2a2 o b3a2. Cualquiera de estas nuevas posibles uniones, genera un incremento de la actividad tirosina kinasa del gen c-abl, y se constituye en la "variante oncogénica" del gen BCR-ABL1 (Fig.4). Ocasionalmente, pueden ocurrir otros puntos de ruptura y fusión, pero que igualmente mantienen su actividad TK exacerbada. Estas variantes generan los transcritos conocidos como: e1a3, e6a2, e2a2 y e2a1 (Melo JV; et al 1997; Byrne J.L et al, 1997) (Fig.4).

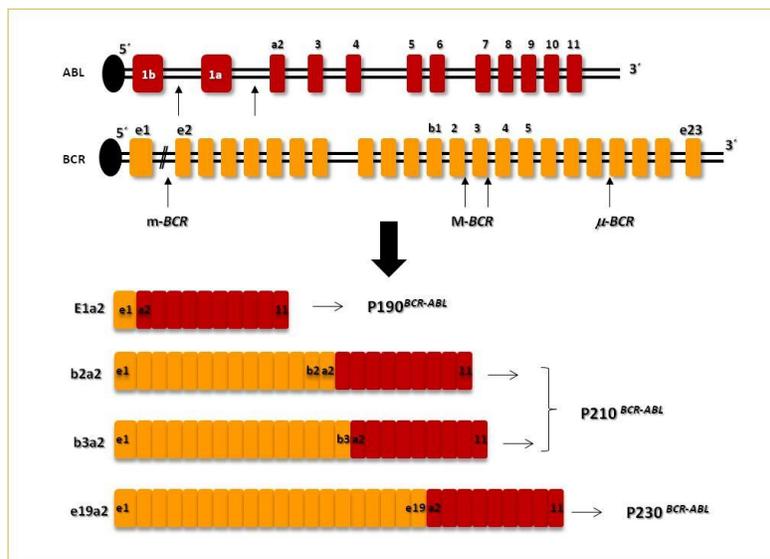


Figura 4: Localización de los sitios de ruptura de los genes ABL y BCR y estructura de los diferentes ARN m quiméricos (Deininger M et al, 2000)

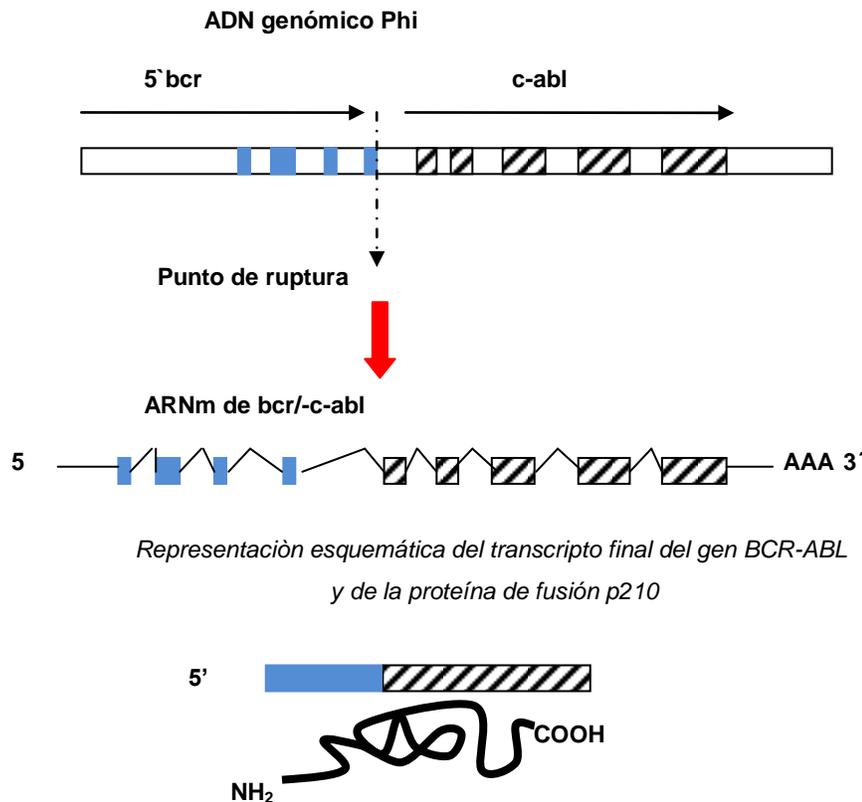


Figura 5: Cambios moleculares en la translocación del cromosoma Phi $t(9;22)(q34;q11)$. La representación superior corresponde a la unión de las regiones 5'BCR y ABL3'; los exones están representados por boxes sólidos para BCR y rayados para el gen ABL. Finalmente se observa la representación del mensajero y la proteína de fusión derivada (Modificado de Marshall A, 2007).

1.2.4 ROL DEL ONCOGÉN BCR-ABL1 Y MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN

Muchos procesos celulares inductores de la diferenciación y proliferación celular, han sido estudiados en esta enfermedad. La proteína p-210 (BCR-ABL) tiene un rol fundamental en la transformación leucémica de las células, a través de diferentes mecanismos que involucran la activación de diversas señales de transcripción nuclear. La fosforilación inducida por la TK se producirá sobre un amplio espectro de targets proteicos en residuos de Tirosina (Ty) y particularmente generará una autofosforilación de la proteína BCR-ABL en el residuo Tirosina Y177. (Deininger et al; 2000).

A su vez, otras proteínas fosforiladas por la actividad TK del BCR-ABL, tales como PI3K, AKT o STAT-1 y 5, intervienen en la vía de activación de la transcripción, y juegan un rol clave en la estimulación de la proliferación celular (Gesbert F et al, 2000; Kharas G et al, 2005). Otras proteínas fosforiladas por este mecanismo como ERK y MEK, se asocian a la activación aberrante de mecanismos mitogénicos mediados por MAPK,

(Faderl S et al, 1999) que acelera la proliferación celular. A su vez, diferentes proteínas del citoesqueleto como las integrinas, paxilinas, selectinas, etc, pueden modificar la interacción con el microambiente medular y facilitar una mayor “liberación” celular desde la MO hacia la circulación. Además, los procesos que intervienen en la activación de la apoptosis se encuentran reprimidos por un aumento en la regulación de las proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 ó BCL-X_L. En esta última vía, también ocurren cambios en la activación de BAD, debidas a la fosforilación mediada por la vía PI3K/AKT (Jonuleit T et al, 2000; Deininger et al, 2000; Tefferi A et al, 2007) (Figura 6).

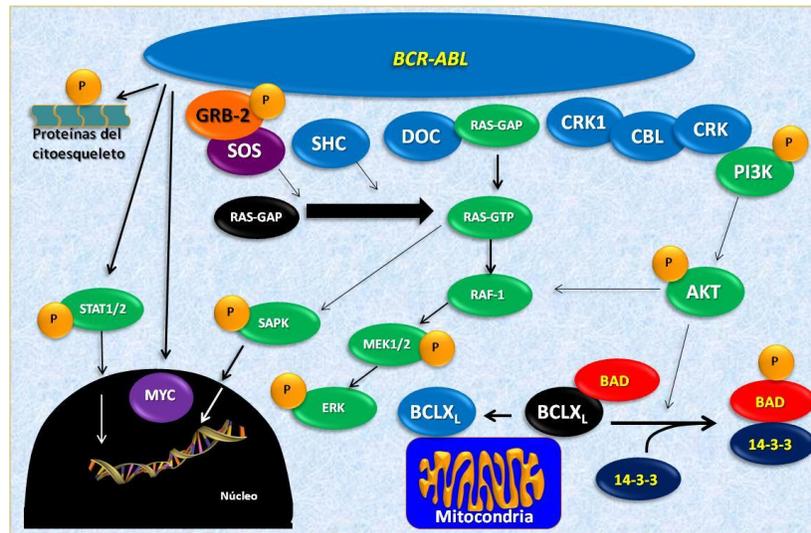


Figura 6 Camino de señalización activado en células BCR-ABL positivas (Deininger M et al, 2000)

1.2.5 MECANISMO DE TRANSFORMACIÓN

La LMC es una neoplasia caracterizada por distintas etapas clínicas. La mayoría de los pacientes inicia su enfermedad por la denominada fase crónica (FC), donde el diagnóstico se realiza por un criterio morfológico de inicio, seguido de su caracterización cromosómica (Phi) y molecular (BCR-ABL1). Los hallazgos morfológicos de la sangre periférica y Médula Osea, muestran un gran incremento en el número de progenitores mieloides diferenciados. Todo proceso de transformación neoplásica, ocurre a través de más de una injuria celular. Si bien la LMC aún en su fase crónica es una neoplasia, su transformación en crisis blástica requerirá de nuevos eventos oncogénicos, para que evolucione hacia dicha fase de leucemia aguda. No hay aún evidencias claras de cuales

son dichos eventos pero los mecanismos postulados por distintos investigadores incluye un número importante de genes implicados en el arresto en la diferenciación celular, alteraciones de la integridad genómica, acortamiento de telómeros, pérdida de la función de genes supresores de tumor como p16, p53, RB, y probablemente varios otros genes más cuya función aún se desconoce (Melo J et al, 2007) (Figura 7). En la Tabla 1, podemos ver todos los genes, que podrían estar relacionados con muchos de los procesos de progresión de la LMC hacia la crisis blástica

Si bien la progresión de la enfermedad encierra mecanismos complejos aún no develados, resulta de gran interés actual, saber cuales son los eventos moleculares que inducen y/o favorecen la transformación blástica de la LMC, convirtiéndola en LA.

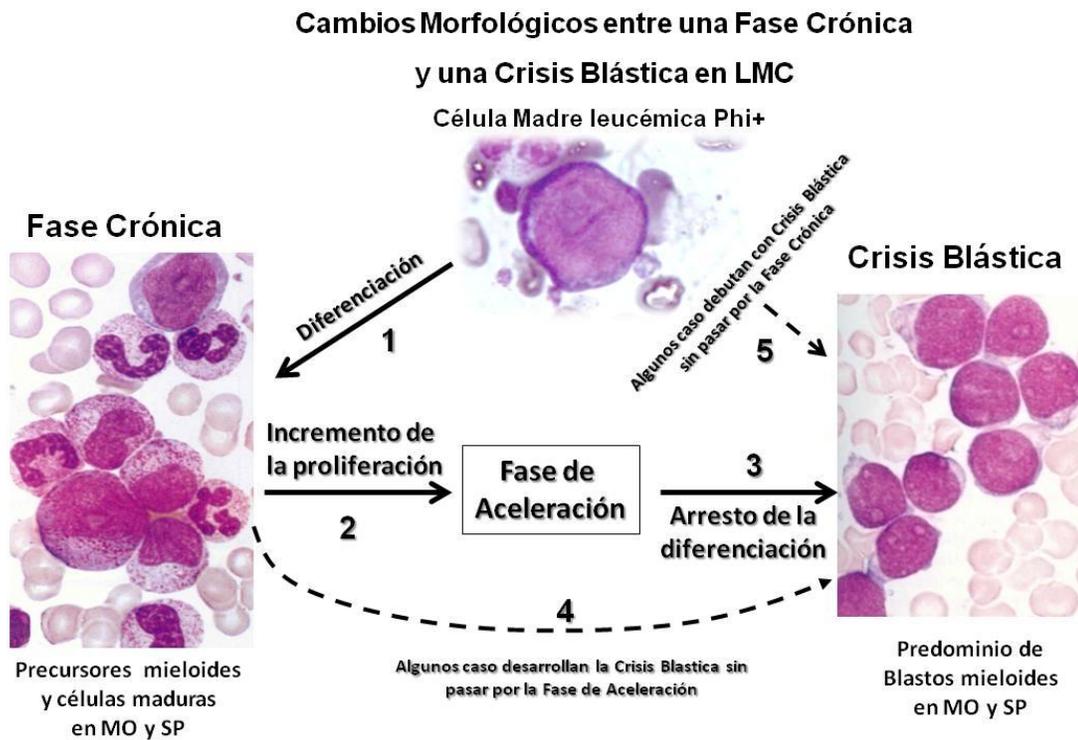


Figura 7 Características morfológicas de las etapas de transformación de la LMC, de una fase crónica a una fase blástica. En la fase crónica hay una excesiva producción de precusores mieloides, mientras que en etapas más avanzadas ocurren nuevos fenómenos, donde las células pierden la capacidad de diferenciarse, y se produce un aumento del número de blastos o Fase blástica

Factores de evolución de la enfermedad	Genes implicados
<i>Arresto de la diferenciación</i>	CEBP HNRNPE2 NUP98–HOXA9 AML1–EVI1
<i>Fallas en la sobrevida genómica</i>	ATR BRCA1
<i>Deficiencia en la reparación del ADN</i>	DNA-PKcs RAD51 FANCD2 WRN XPB
<i>Alteración en el fenotipo</i>	POLB (DNA polimerasa β) MLH1, PMS2
<i>Acortamiento de Telómeros</i>	TERT
<i>Pérdida de la función supresora</i>	PP2A TP53 CDKN2A INK4A ARF RB1

Tabla1: Genes implicados en el proceso de evolución de la LMC a una fase más agresiva (Modificado de Melo JV, and Barnes David J, 2007)

1.2.6 MODELOS DE LÍNEAS CELULARES MIELOIDES Y DE NEOPLASIA MIELOIDE.

Hasta el presente, no existen líneas celulares bien establecidas para el estudio en la fase crónica de la LMC. Las líneas celulares establecidas a partir de blastos leucémicos humanos, ofrecen un muy buen modelo experimental de estudio por ser poblaciones celulares homogéneas, con un estadio madurativo ó fenotipo celular bien determinado. Si bien adolecen de ser en todos los casos, cultivos celulares de Blastos, y no de células con maduración intermedia, como las que se encuentran altamente expandidas en la LMC durante la fase crónica, tienen la propiedad de ser células BCR-ABLpositivas, y por lo tanto representativas de la enfermedad.

Así, varias líneas celulares mieloides obtenidas de pacientes con crisis blástica de LMC como la línea K562, son células con arresto de la diferenciación, y son a su vez, las más utilizadas *in vitro* para el estudio biológico y farmacológico de esta patología. Particularmente la línea K562 BCR-ABL positiva representa un clon neoplásico con cierto grado de diferenciación mielo-eritroblástica (Lozzio CB et al, 1975, Lübbert M et al, 1991), por lo tanto representa un excelente modelo de la fase "Blastica" o transformación aguda de la LMC.

1.2.6.1 MODELOS DE CULTIVOS EN LÍNEAS CELULARES DE LMC

Diferentes modelos experimentales obtenidos a partir de líneas celulares humanas ó de ratón, pueden ser usados en las investigaciones para el estudio de la LMC (Mahon F. et al, 2003). Se han logrado realizar investigaciones en fibroblastos, en la línea celular BV173, Baf/3, 32D y línea celular de ratón M07. A pesar de sus diferencias, todas estas líneas celulares presentan el gen de fusión BCR-ABL1, lo que permite su utilización en estudios de mecanismos de transducción de señales, y ensayos farmacológicos de distinto tipo para la LMC (Topaly J et al, 2001; Gambacorti-Passerini Carlo et al, 2008; Enrique J. Andreu et al, 2005).

La sola presencia del gen BCR-ABL1, permite la activación de los mecanismos relacionados a la proliferación celular espontánea con el aporte de los nutrientes necesarios. Ese hecho, pone de manifiesto el rol central que cumple este gen en la estimulación de la proliferación celular.

Como confirmación de este fenómeno, se ha logrado que células *stem* embrionarias BCR-ABL1 positivas trasplantadas en ratones irradiados, puedan diferenciarse en células hematopoyéticas con todas las características de la LMC (Peters DG et al, 1999).

1.3 TRATAMIENTO DE LA LMC

La LMC representa aproximadamente el 15% de todos los casos de Leucemia. La gran mayoría de los pacientes con LMC, corresponden a personas de mediana edad, y sólo un 10% de los casos se encuentran en un rango etario entre 5 a 20 años. La incidencia en EEUU es de 1-2 casos x 10⁵ habitantes/año.

El 70% de los pacientes sintomáticos al momento del diagnóstico, presentan molestias abdominales, anorexia, pérdida de peso y sudoración excesiva. La exploración física muestra palidez y esplenomegalia (Figura 8). Sin embargo en una proporción importante de pacientes, la enfermedad se descubre casualmente, por la presencia de un elevado recuento de leucocitos obtenido en un examen de laboratorio de rutina

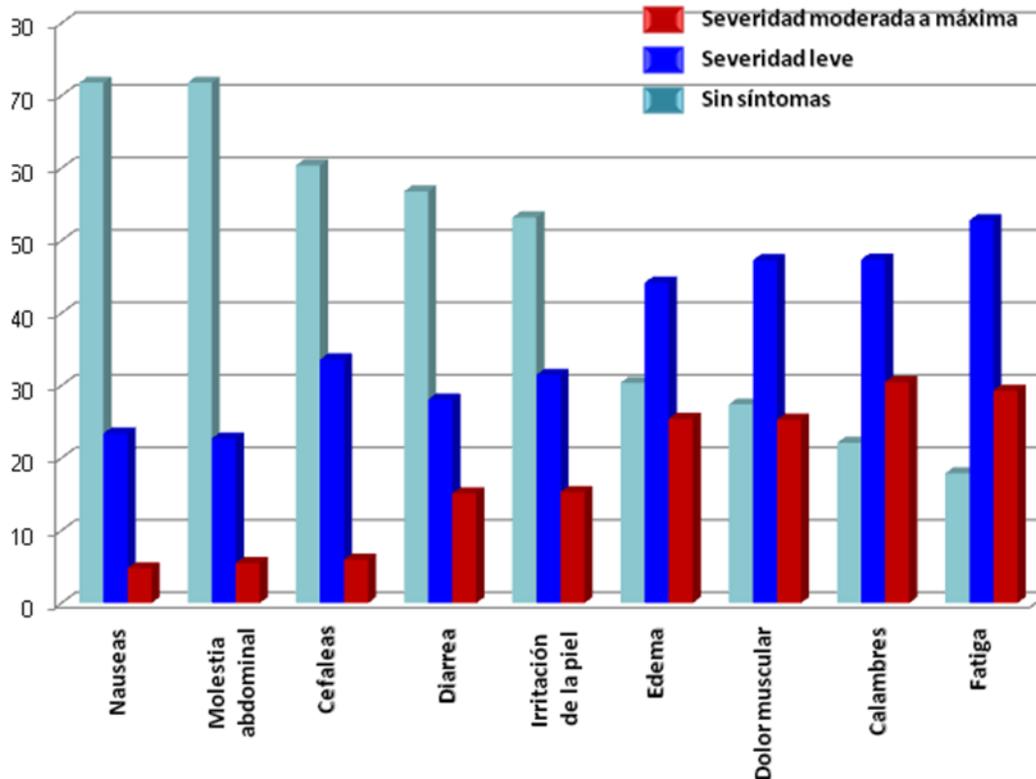


Figura 8 Porcentaje de pacientes con LMC que presentaron síntomas, clasificados por niveles de severidad. (Modificado de Richard Larson, 2011).

El recuento de leucocitos de la fase crónica de la LMC, se encuentra por encima de 25×10^9 cel/L, y más frecuentemente supera los 100×10^9 cel/L y estas cifras son indicativas de que el paciente requiere tratamiento inmediato, para evitar que aumente progresivamente el recuento leucocitario y avance hacia la fase de aceleración y luego inicie a fase blástica. El cuadro morfológico de sangre periférica en FC es bastante característico, debido a la alta cantidad de precursores mieloides presentes, elevado recuento de basófilos, pero un número no mayor al 5% de blastos.

La Organización Mundial de la Salud (WHO) ha establecido criterios morfológicos bien definidos para identificar tanto la fase acelerada (FA) como la crisis blástica (CB) (Tablas 2 y 3).

Criterio para la Fase Acelerada en LMC(WHO) Si 1 ó más de los siguientes criterios están presentes
Blastos: 10 a 19 % en SP o MO
Basófilos en SP: $\geq 20\%$
Trombocitopenia persistente ($< 100 \times 10^9 /L$) *
ó trombocitosis persistente ($> 1000 \times 10^9 /L$) *
Aumento del bazo o de los leucocitos (sin respuesta al tratamiento)
Evidencia citogenética de evolución clonal
Proliferación megacariocítica en clusters asociados a fibrosis colágena o reticulínica

Tabla 2: Criterios de la Organización Mundial de la Salud para definir una Fase acelerada (Jaffe SE, 2001)
(* Esto parámetros son excluyentes entre sí)

Criterio para la fase blástica en LMC (WHO)
Blastos $\geq 20\%$ SP o MO
Proliferación blástica extramedular
Grandes clusters de blastos en biopsia de MO

Tabla 3: Criterios de la Organización Mundial de la Salud para definir una Fase blástica (Jaffe, SE, 2001)

Hay varios sistemas de puntuación, que permiten establecer el riesgo relativo para progresión y muerte durante la fase crónica temprana cuando han transcurrido menos de doce meses desde el diagnóstico, y no ha recibido tratamiento (excepto Hidroxiurea), en base a hallazgos clínicos y de laboratorio al momento del diagnóstico (Kantarjean HM, 1990; Hasford J, 1998). Uno de los más frecuentemente usados y recomendados ha sido

hasta ahora, el propuesto por Sokal en 1984, y discrimina tres grupos pronósticos acordes al tratamiento utilizado al momento de su descripción, con las siguientes variables:

- sexo
- tamaño esplénico (cm)
- % de blastos en sp
- hematocrito
- recuento de plaquetas.

Cada uno de estos parámetros se combina en una ecuación que determina el valor final de puntaje de riesgo según se detalla a continuación ó también se puede estimar ingresando al sitio www.roc.sec.se/Sokal.asp.

Fórmula: Riesgo relativo Sokal

$$R = (0.0255 \times \text{tamaño esplénico} - 8.14) + (0.0324 \times \% \text{ blastos} - 2.22) + \\ (0.1025 \times \text{plaq}/700 - 0.627) - (0.0173 \times \text{Hto} - 34.2) - (0.2682 \times \text{puntuación sexo} - 1.4)$$

Con esta puntuación se pueden distinguir tres grupos de riesgo, y que junto a los marcadores moleculares, contribuyen a tomar decisiones terapéuticas (Tabla 4). Según las últimas modificaciones realizadas por el Grupo Europeo en el estudio de la LMC, propuesto por Baccarini M. y colaboradores (Baccarini M, 2009) -conocido como Score EURO, no se toma en cuenta el sexo como una variable de pronóstico, y se incluye en la puntuación, el porcentaje (%) x 10 del recuento de eosinófilos y basófilos en sangre (http://w.w.w.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/cml_score/index_eng.html). Mientras que el Score EUTOS propone el tamaño del Bazo y el recuento de basófilos (http://w.w.w.leukemia-net.org/content/leukemias/cml/eutos_score/index_eng.html) (Hasford et al, 1998 y 2011). En nuestro estudio nos hemos basado en el core de Sokal original.

RIESGO RELATIVO	GRUPO DE RIESGO	MEDIANA DE SUPERVIVENCIA (MESES)
< 0,8	Bajo	67
0,8-1,2	Intermedio	52
>1,2	Alto	35

Tabla 4 Grupos de riesgo relativo según Sokal, 1984

1.3.1 INHIBIDOR DE TIROSINA KINASA

En 1953, el busulfán es introducido en la práctica clínica como un citorreductor. Esta sustancia fue rápidamente elegida como reemplazo del tratamiento con radiación para los pacientes con LMC, sin embargo debido a los efectos adversos, fue posteriormente sustituido por Hidroxiurea (HO-Ur), un inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa (Hehlmann et al,2003; Grupo colaborativo en el estudio de la LMC, 1994).

La HO-Ur puede ser utilizada desde el momento mismo del diagnóstico, y si bien tiene menos efectos tóxicos que el anterior, el nivel de refractariedad a este agente siguió siendo elevado. Una estrategia alternativa, fue el agregado del interferon-alfa (INF- α), introducido en los protocolos terapéuticos durante la década del 80, y con este tratamiento se obtenía la remisión citogenética completa en más del 26% de los casos. Posteriormente los tratamientos combinados con citarabina, aumentaron esta eficacia con disminución significativa de los efectos no deseados (Guilhot et al ,1997; Kantarjian et al, 1999).

En 1996 Druker B, describe la actividad *in vitro* de un inhibidor de TK (Imatinib) para la proteína BCR-ABL. Este descubrimiento revolucionó el concepto actual de la farmacología no solo de la LMC, sino también de un amplio espectro de tumores cuyo crecimiento son dependientes de diferentes TK.

Si bien en la mayoría de los casos con LMC, se encuentra el reordenamiento molecular BCR-ABL1 (b3a2 ó b2a2), esta nueva molécula permite inhibir el sitio activo de la TK, sobre el 100% de las distintas isoformas wilde-type (no mutadas) del BCR-ABL.

El Imatinib es un derivado de la 2-fenilaminopirimidina ($C_{29}H_{31}N_7O.CH_4SO_3$), conocido como Signal Transduction Inhibitor (STI-571; Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland).

Este nuevo compuesto también tiene actividad sobre otras Tirocinas Kinasas además de ABL, como PDGFR α y β , c-Kit, ARG (Abl-Related Gene) (Capdeville R et al, 2002; Böhmer FD et al, 2003). El Imatinib compite con el ATP por el sitio catalítico de la proteína BCR-ABL, estabilizando la configuración inactiva de la enzima TK, lo que impide la fosforilación de los substratos intracelulares de la TK que intervienen en la proliferación celular (Figura 9 y 10).

La inhibición de la actividad TK de BCR-ABL, por acción de este compuesto modula la transcripción de varios genes relacionados con el control del ciclo celular, la adhesión y la organización del citoesqueleto, promoviendo la muerte celular programada de la célula Phi+.

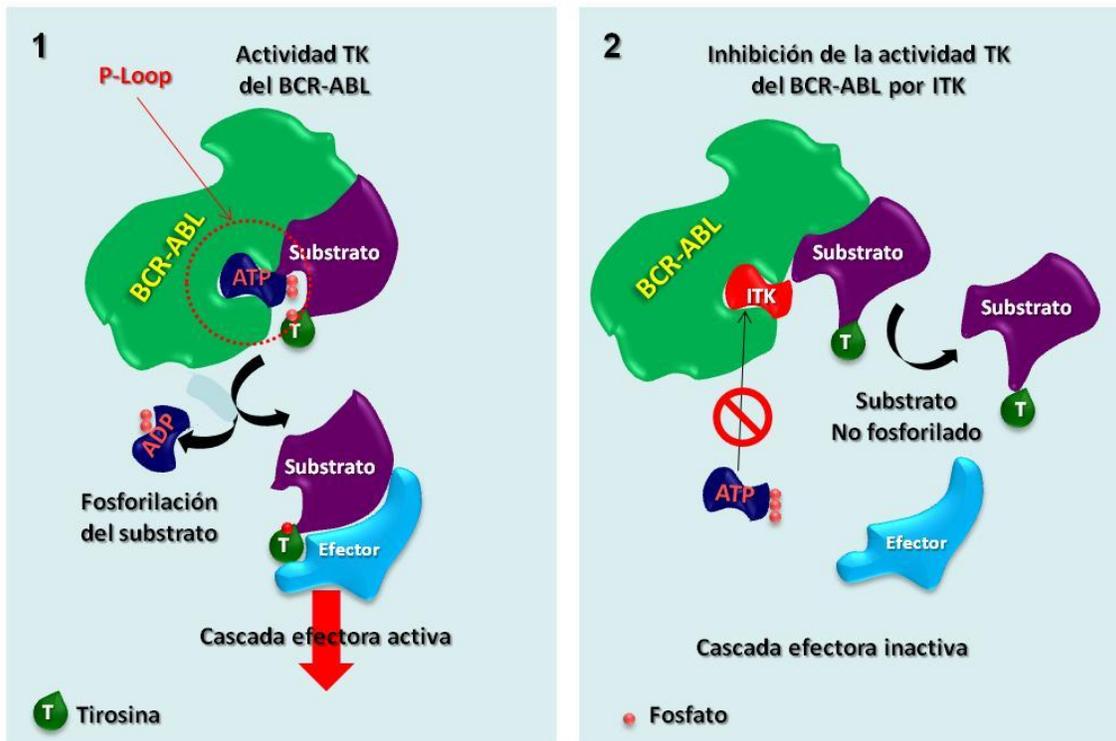


Figura 9: 1 Sitio de unión del ATP. 2: Mecanismo de interacción del inhibidor de Tirocina Kinasa, con la proteína oncogénica p210. (Modificado de Deininger M W, 2000)

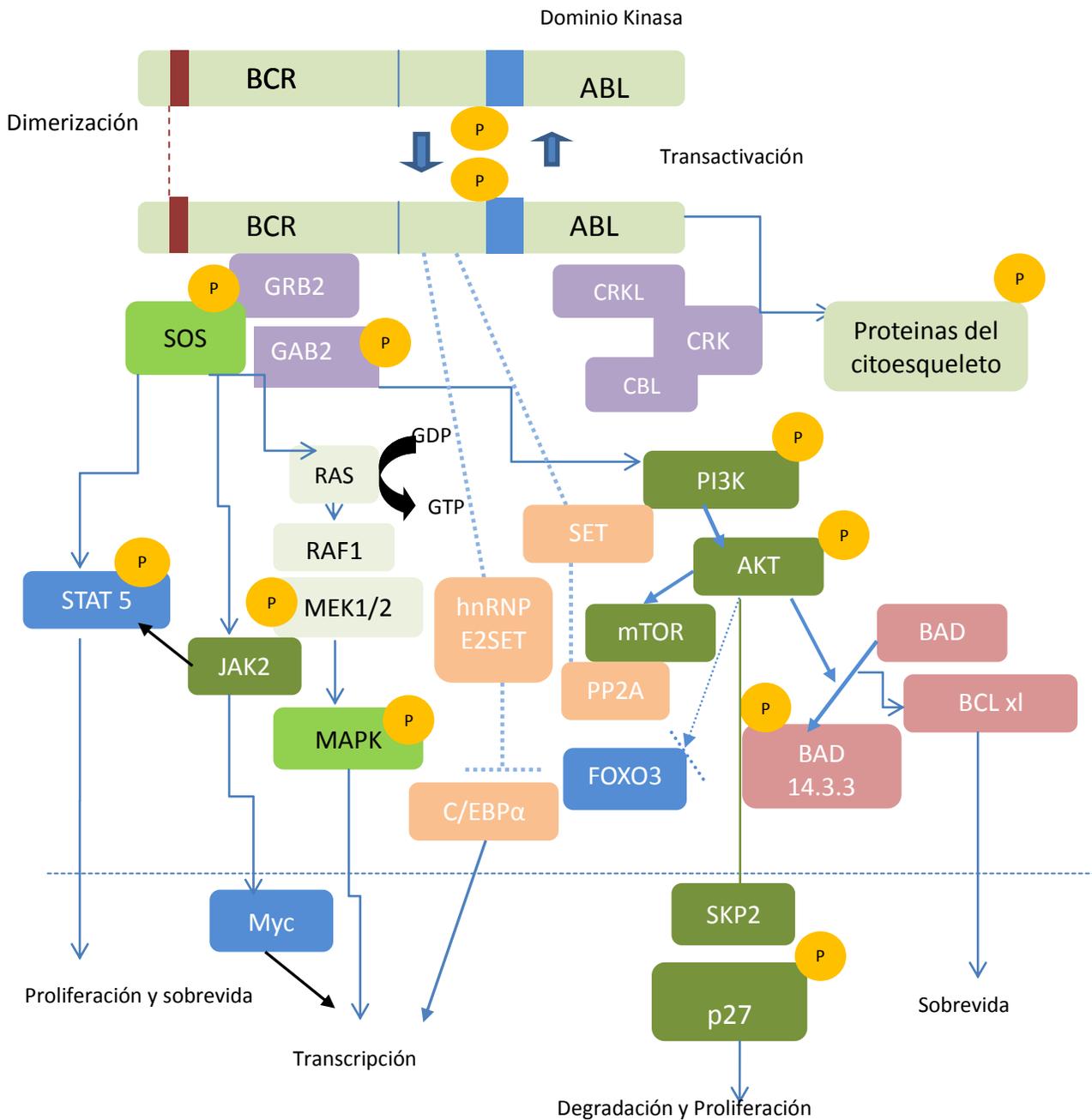


Figura 10: El imatinib actúa inhibiendo la autofosforilación de BCR-ABL y a partir de allí se produce la inhibición de la fosforilación de todas las proteínas que actúan en la transcripción. (Modificado de Druker, 2011)

Los trabajos de Deininger y col. (Deininger et al, 2005) demostraron mediante estudios *in vitro*, que el Imatinib inhibía selectivamente el crecimiento de células progenitoras mieloides BCR-ABL positivas, con poco efecto sobre el crecimiento *in vivo* de las células hematopoyéticas normales.

Esto permitió avanzar sobre las estrategias terapéuticas usadas hasta el momento, logrando mejorar la morbi-mortalidad de los pacientes con LMC en la fase crónica de la enfermedad. El tratamiento con Imatinib demostró reducir significativamente el número de copias de ARN mensajero del transcritpo BCR-ABL1, respecto del nivel del mismo al inicio del tratamiento (Druker B et al, 2006).

En el protocolo de estudio denominado "IRIS" ("*Estudio Internacional randomizado INF+ citarabina vs ST1571*"), se demostró que los pacientes tratados con Imatinib, lograron una reducción (≥ 3 log) en la carga de mensajeros del BCR-ABL, con una probabilidad de recaída de solo el 3% a los 54 meses del tratamiento (Druker BJ et al, 2006). Actualmente el uso combinado de imatinib+INF- α , resulta en una más rápida respuesta citogenética observada a los 6 meses. Sin embargo esta terapéutica combinada no aumenta la eficacia a largo plazo (48 meses) respecto de imatinib solo. (Palandri Fet al, 2010). Según los últimos protocolos de estudio, el 79 % de los pacientes que inician su tratamiento con imatinib, obtiene una *Respuesta Molecular Mayor* (RMM), caracterizada por la detección de menos del 0,1% de células BCR-ABL+ respecto al valor encontrado al inicio del tratamiento. Si estos valores son obtenidos en el control a los 36 meses de la terapia, son indicativos de sobrevida libre de eventos para al menos los 12 meses siguientes (Pavlovsky C et al, 2011).

Entre el 15-20% de los pacientes que recibe Imatinib en la fase temprana de la enfermedad, no alcanza la remisión molecular, y esto se debe a diferentes mecanismos de resistencia o refractariedad al tratamiento. Así la evidencia molecular de persistencia de la enfermedad llevó a desarrollar nuevas estrategias farmacológicas que eviten el recurso de un trasplante de M.O. Para los pacientes que fallan a la terapia con la dosis estándar diaria de Imatinib, se puede utilizar dosis escalonadas de 600-800 mg/d como segunda línea de opción, pero estas altas dosis no son las recomendadas para pacientes con intolerancia al fármaco. Una segunda alternativa es el uso de otros inhibidores de TK, tales como el Dasatinib y el Nilotinib (Henkes et al, 2008), y son habitualmente utilizados en pacientes que presentan una mutaciones en la TK que los hace resistentes al Imatinib.

El Dasatinib es recomendado luego que fracasa el tratamiento con imatinib, sin mutaciones presentes ó debido a mutaciones en la proteína BCR-ABL. Los pacientes que presentan las mutaciones (L248, Y253, E255K/V, V299L, F317L, F359, y H396) muestran un grado de sensibilidad intermedia al fármaco, mientras que aquellos que presentan la mutación T315I son resistente al tratamiento con Dasatinib (Cortes J, 2009). El Dasatinib inhibe la actividad tanto del BCR-ABL como de otras kinasas oncogénicas incluyendo c-KIT, Efrin (EPH, en inglés) kinasas, y el receptor PDGF β (Jabbour E et al, 2011). Y se ha demostrado que las EPH kinasas juegan un rol importante en diversos procesos biológicos como la migración, adhesión y angiogénesis (Halvor H et al, 2008).

El Nilotinib fue aprobado en los EE.UU. en 2007 para el tratamiento de pacientes adultos en fase crónica y acelerada de LMC con resistencia o intolerancia a terapias previas (Jabbour E et al, 2009). Además el Nilotinib inhibe igual que el Dasatinib otras kinasas como PDGFR y receptor c-Kit. Sin embargo a pesar de su alta efectividad en los pacientes resistentes, no tiene acción sobre la proteína BCR-ABL mutada-T315I y E255V (Weisberg E et al, 2005; Cortes J, 2009), la cual no puede ser inhibida por Imatinib (descripto más adelante).

El grupo de investigación encabezado por Jerald P. Radich (Radich P, 2010) muestra un modelo muy simplificado de la historia natural de LMC (Figura 11) donde se explican las diferentes etapas de progresión de acuerdo a la sensibilidad ó pérdida de la misma a los diferentes ITK

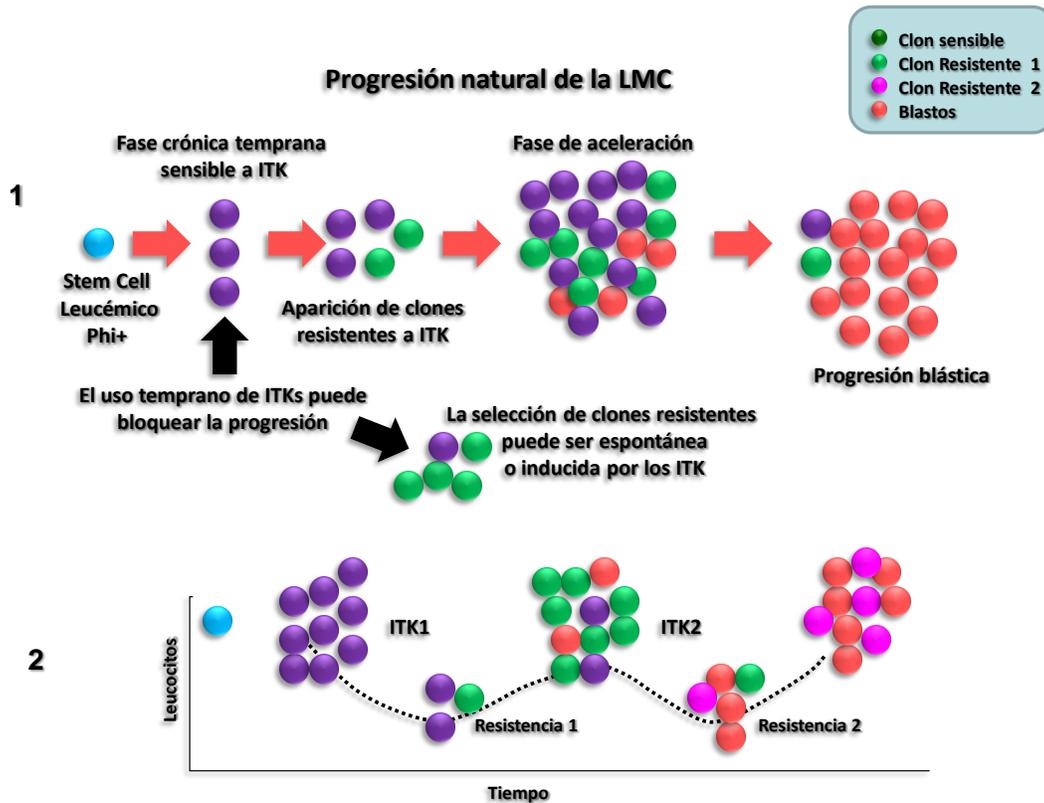


Figura 11 En **A** Las células stem de la LMC se regeneran en una etapa temprana a progenitores presumiblemente sensible a ITK. Con el tiempo surgen mutaciones en la TK, y/o modificaciones genéticas que inducen la progresión a crisis blástica. **(B)** Si se inició tempranamente el uso de un TKI, puede evitarse la resistencia y progresión. **(C)** la inestabilidad genética crea nuevos clones más propensos a la resistencia y la progresión y es necesario cambiar el esquema de ITK, aquí, la probabilidad de la eventual resistencia al segundo ITK es alta. (Modificado por Jerald P. Radich, 2010, ASH).

1.3.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Las recomendaciones internacionales han precisado distintos parámetros para evaluar la respuesta al tratamiento en la LMC, que permiten establecer el pronóstico y las recomendaciones terapéuticas, basadas en estimaciones de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de eventos (SLE), considerando “eventos” a la pérdida de respuesta, la progresión a FA o a Crisis Blástica (CB). Las definiciones tales como Respuesta Hematológica (RH), Respuestas Citogenéticas (RC) y Respuestas Moleculares (RM) son

los marcadores biológicos utilizados según las siguientes categorías: (Baccarani M et al, 2009).

I) RESPUESTA HEMATOLÓGICA

I-1 Completa (RHC)

a) Normalización del hemograma con:

- leucocitos $< 10 \times 10^9 /L$
- plaquetas $< 450 \times 10^9 /L$

b) Sin elementos inmaduros en sangre periférica, sin bazo palpable y asintomático

I-2 Parcial (RHP), cuando no alcanza la RHC a los 3-6 meses

I-3 Nula (RHN) cuando no alcanza la RHC después de los 6 meses

II) RESPUESTAS CITOGENÉTICAS

- | | |
|-------------------|---------------------------------|
| a) Completa (RCC) | Ausencia de metafases Ph+ |
| b) Parcial (RCP) | Hasta un 35% de metafases Ph+ |
| c) Menor: (RCm) | Entre 36 - 65% de metafases Ph+ |
| d) Mínima (RCmin) | Entre 66 a 95% metafases Ph+ |
| e) Sin RC o Nula: | >95% metafases Ph+ |

III) RESPUESTAS MOLECULARES

- a) Completa (RMC): Transcritos BCR-ABL1 indetectables por qRT-PCR y/o PCR anidada, en dos muestras consecutivas de sangre periférica (sensibilidad $> 10^4$)
- b) Mayor (RMM): Proporción de BCR-ABL1/ABL (u otros genes de ref.) $\leq 0,1-0,01\%$ en la escala internacional (EI).
- c) Menor (RMMe): Reducción de 1-2 Log en los niveles de transcritos BCR-ABL1
- d) Mínima (RMMin) : Reducción de > 1 Log en los niveles de transcritos BCR-ABL1
- e) Nula (RMN): reducción de < 1 Log en los niveles de transcritos BCR-ABL1

Estos criterios introducen la metodología adecuada para el estudio de los diferentes tipos de respuestas que son esperables durante el transcurso de la enfermedad (Hughes Tet al, 2008). El fenotipo respondedor vs no respondedor será el resultado de una eficacia terapéutica vs ineffectividad ó toxicidad. Para ello el paciente es monitoreado a los 3, 6, 12 y 18 meses, en sus tres niveles de respuesta: hematológica, citogenética y molecular, y que pueden categorizarse como: *óptima*, *subóptima* ó *fallo*. La *respuesta óptima* significa que no existen evidencias para realizar un cambio terapéutico, en cambio en las *respuestas subóptimas* o *fallo*, existen advertencias clínicas y biológicas (biomarcadores), que indican la necesidad de realizar controles más estrictos y/o cambios de estrategias terapéuticas. En la Figura 12 se puede observar el nivel de sensibilidad en la detección de células leucémicas, de cada metodología de estudio y para cada nivel de respuesta, dando lugar al concepto de marcadores de Enfermedad Mínima Residual.

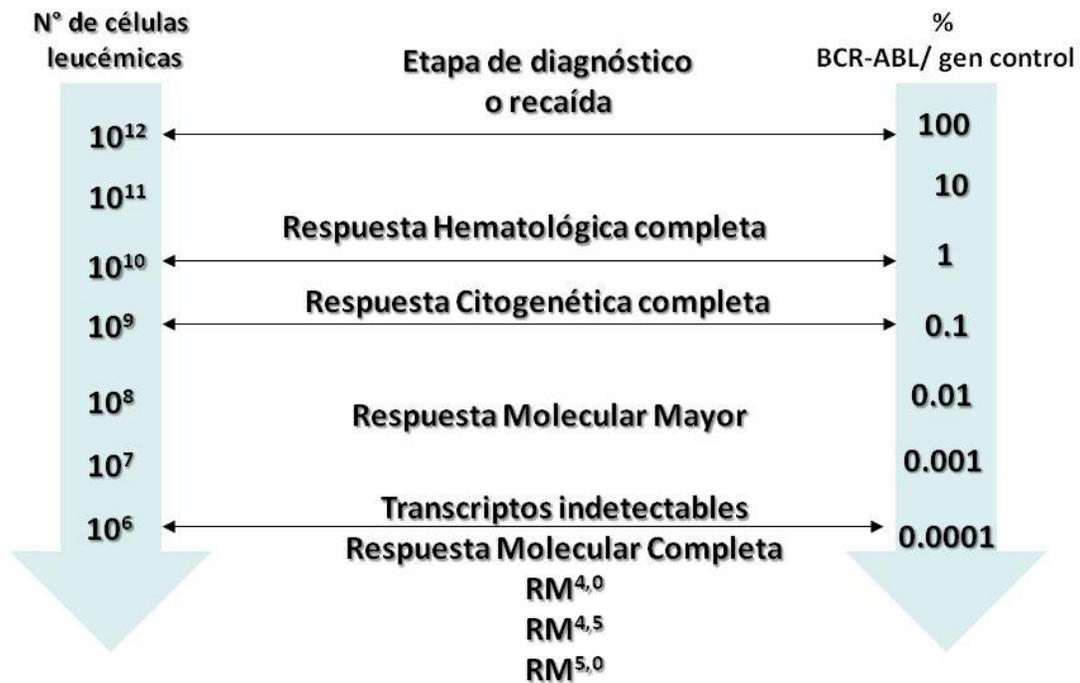


Figura 12 Relación entre número de células leucémicas, grado de repuesta y número de transcritos BCR-ABL1 en relación al gen control en la sangre periférica de los pacientes con LMC, (Modificado segun Nikolas von Bubnoff, Justus Duyster, 2010).

A pesar de estos avances metodológicos que incrementan la sensibilidad de detección de la EMR, estos marcadores sólo evalúan la respuesta terapéutica de un tratamiento ya instalado.

Por eso nuestro objetivo (explicado más adelante) es determinar a priori si existe algún marcador molecular que pueda predecir la respuesta terapéutica y/o la evolución clínica de la enfermedad, aún antes de iniciar cualquier tratamiento e independiente del mismo.

DEFINICIÓN DE RESPUESTA SUBÓPTIMA

La Respuesta subóptima se define según cuando:

- El paciente no alcanza una RHC a los 3 meses, es decir que no presenta “ausencia” de células indiferenciadas.
- El paciente no alcanza la RCP a los 6 meses, es decir que se encuentran más de 35% de metafases Phi+
- El paciente no alcanza la RCC a los 12 meses
- El paciente no alcanza RMM, es decir una reducción de al menos 3 log en el nivel de transcriptos de BCR-ABL1 a los 18 meses.
- El paciente presenta alteraciones cromosómicas adicionales al cromosoma Phi
- El paciente presenta pérdida de la RMM ó presencia de mutaciones en cualquier momento.

DEFINICIÓN DE FALTA DE RESPUESTA, FALLO DE RESPUESTA O RESPUESTA NULA:

La falta de Respuesta se define cuando el paciente:

- No alcanza la RH a los 3 meses
- No alcanza la RHC o sin respuesta citogenética a los 6 meses (>95% Phi+).
- No alcanza la RCP a los 12 meses, ó no alcanza la RCC a los 18 meses.
- Presenta pérdida de RHC, RCC o mutaciones en cualquier momento. (Baccarini et al, 2009)

Según los últimos consensos de la European leukemia Net, Baccarani y col, 2013 la definición de respuesta al tratamiento en primera línea de cualquier inhibidor se puede resumir en Tabla 5.

	Óptima	Alerta	Falla
Al inicio	No corresponde	ACC/Phi+ (ruta mayor)*	No corresponde
3 meses	Phi + ≤35% y/o BCR- ABL1≤10%	Phi+ 36-95% y/o BCR- ABL1 ≥10%	Falta de RHC y/o Phi+>95%
6 meses	Phi+0% y/o BCR- ABL1<1%	Phi+ 1-35% y/o BCR- ABL11-10%	Phi+>35% y/o BCR- ABL1>10%
12 meses	BCR-ABL1 ≤0,1%	BCR-ABL1>0,1-1%	Phi+≥20% y/o BCR- ABL1>1%
En cualquier Momento	BCR-ABL1≤0,1%	ACC/Phi- (-7 o 7q-)	Pérdida de RMC Pérdida de RCC Pérdida de RMM Mutaciones ACC/Phi+

Tabla 5 Definición de respuesta al tratamiento en primera línea con cualquier ITK (Baccarani, 2013).
ACC: Alteraciones cromosómica Clonales. -7: Monosomía del 7; 7q- deleción del cromosoma 7. *Ruta Mayor: anomalías cromosómicas que incluyen trisomía 8, Phi (1der(22)t(9;22)(q34;q11), isocromosoma 17 (i(17)(q10), trisomía 19, ider(22)(q10)t(9;22)(q34;q11)

Dentro de los mecanismos de falla en la respuesta a la droga, y relacionados a la proliferación celular se encuentran:

- Amplificación ó sobrepresión del gen BCR-ABL1 (Hochhaus A et al,2002, Deininger M and Druker B, 2004, Mahon FX et al; 2008)
- Mutación en el dominio Kinasa del BCR-ABL (Branford S et al ,2009), que impide la unión del Imatinib, y representan aproximadamente 40% de los fallos de terapéuticos.

Una de las mutaciones más frecuentes es la que se produce debido a un cambio de Tirosina por Isoleucina en el nucleótido 315 (*T315I*) conocida como mutación genómica (C68721T), que provoca una disrupción en la interacción entre los puentes de hidrógeno.

Esta mutación representa el 15 % de las mutaciones encontradas en gen BCR-ABL siguiendo en frecuencia las mutaciones G250E, E255K/V (Bengio R et al, 2011). Generalmente la mayor frecuencia de mutaciones ocurre entre los residuos 244-255 en la región denominada P-loop (Phosphate binding loop) del dominio kinasa del BCR-ABL (Cardama et al, 2009). Actualmente ya han sido descritas más de 90 mutaciones en pacientes resistentes al tratamiento con imatinib (Soverini S et al, 2011) (Figura 13 A y B).

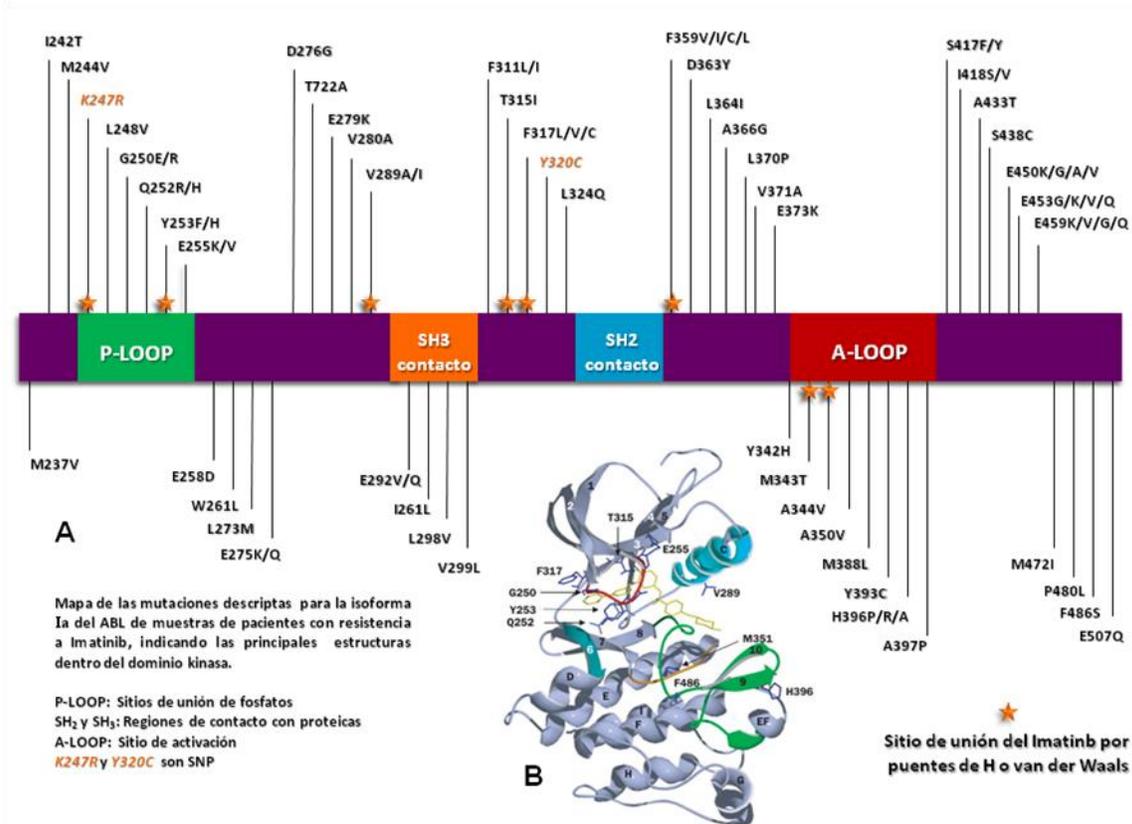


Figura 13 Se muestra el mapa de la sustitución de aa en el dominio TK del BCR-ABL identificados en pacientes resistentes al tratamiento según reportes. Se indica las ----regiones sobre los dominios donde ocurren las mayores mutaciones: P loop: loop de unión al fosfato; contacto con las regiones SH₂ y SH₃, y A loop (activation loop). Las señales indican las posiciones del aminoácido que se une formando puentes de Hidrogeno con imatinib. La letras cursivas indican los polimorfismos de nucleótidos simples. Se recopilaron datos de 27 estudios publicados entre 2001 y 2009. Modificado de Soverini S; 2011 y Representación de los sitios de mutación en el dominio kinasa BCR-ABL. Mostrando las áreas de activación, catalítica y, de unión a fosfatos. American Society Hematology ASH, 2004

Otro componente importante de falta de respuesta al tratamiento, resulta de una inadecuada biodistribución y concentración de droga intracelular, debido a mecanismos de expulsión mediado por transportadores de membrana de la familia ABC tales como P-gp (MDR-1) y BCRP, ó inactivación de la droga por metabolización mediada por Citocromo p450 (CYP-450); o bien mediado por una fuerte unión del Imatinib a la alfa-1-glicoproteína ácida plasmática (Gambacorti-Passerini, 2003).

1.4. EL GEN MDR-1 DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A DROGAS

1.4.1 GEN MDR-1, ESTRUCTURA Y REGULACIÓN

El gen MDR-1, ahora denominado ABCB1, se localiza en el cromosoma 7q21.12 con una extensión de 120 kb, y contiene 28 exones (Chen CJ et al, 1990). Su expresión es normalmente constitutiva y polarizada en células de órganos excretores. Sin embargo puede ser inducida, tanto para incrementar su expresión en dichos tejidos, como para generar su expresión de novo en células previamente negativas. En cáncer, su expresión en las células neoplásicas está estrechamente emparentada con el fenotipo de resistencia a múltiples drogas que desarrollan dichas células, tanto en forma constitutiva (acorde al tejido de origen), como luego de ser enfrentadas a dosis subletales de cualquier fármaco citostático y/o inductor de dicho gen (Grandjean – Forestier, F et al, 2009) (Figura 14).

La regulación de este gen es compleja y puede responder a estímulos independientes de diversos factores transcripcionales y co-reguladores con áreas de consenso en la región promotora del gen (Figura 15), tales como: p53, c-myc, c-jun, HIF-1 (factor inducible por hipoxia-1), NF-kB, o CtBP1 (C-terminal binding protein 1) entre otros. Este gen puede ser regulado por diferentes procesos fisiológicos, o bien inducible por la exposición a muchos compuestos entre ellos el ácido retinoico (factor de diferenciación celular), hormonas esteroides, etc, o como consecuencia de situaciones de estrés que involucren citoquinas inflamatorias, cambios osmóticos, térmicos, de pH, etc. (Emma K. Baker and Assam El-Osta, 2003; Grandjean – Forestier, F et al, 2009)

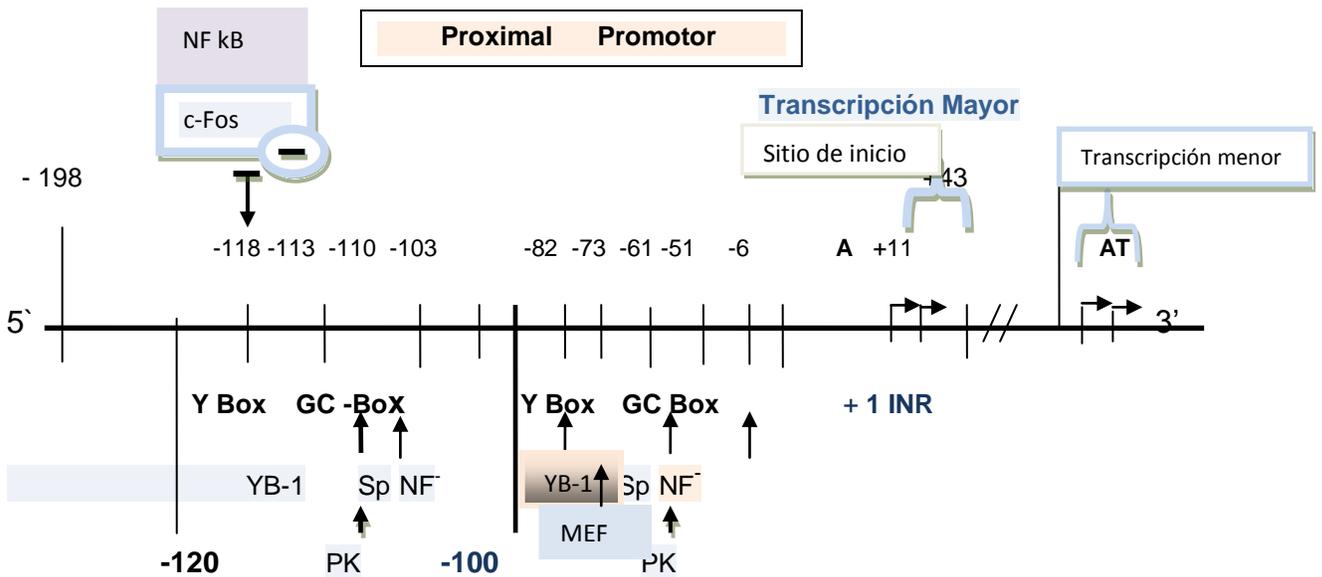


Figura 14: Esquema del promotor del gen MDR-1 humano. YB-1 (factor de transcripción positivo), y MEF 1 (factor activador del sitio promotor del gen MDR-1), unidos a elementos Y - box (o cajas CCAAT símil). NF- kB/c – Fos (reguladores negativos) NF-Yy Sp1 son activadores de la transcripción, dependientes de AMPC (PKC) (Modificado de Grandjean – Forestier, F, 2009)

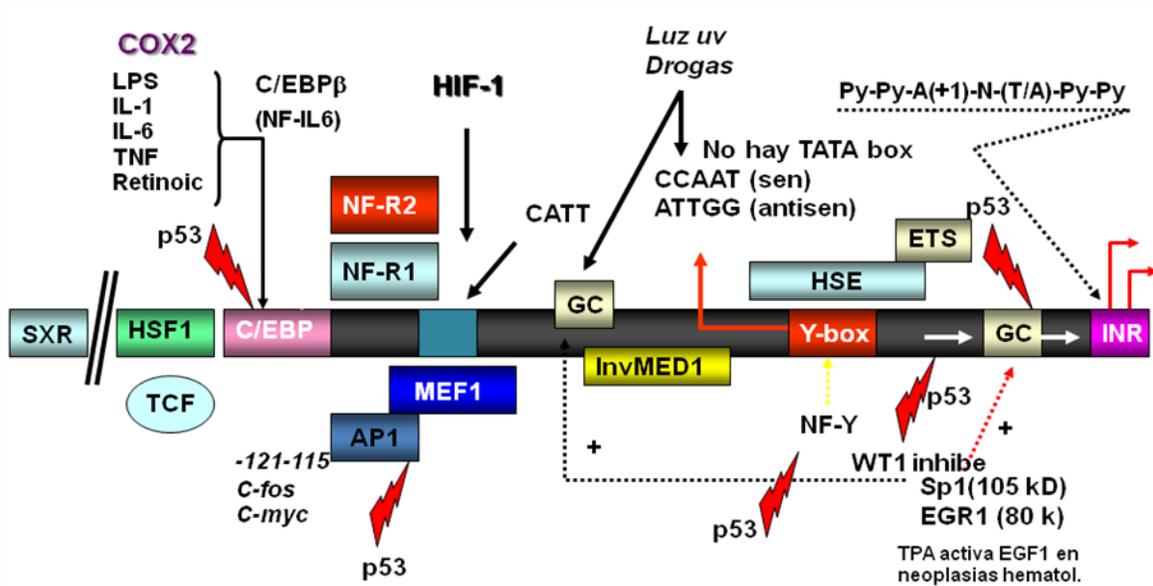


Figura 15 Factores reguladores de la transcripción del gen MDR-1. (Modificado de Labialle S et al; 2002)

1.4.2 P-GP: DEL GEN A LA PROTEÍNA. SU ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

La P-gp pertenece a una superfamilia de transportadores-ABC encontrados en diferentes especies, desde procariotes hasta eucariotes. P-gp fue descrita por primera vez, por Juliano R y Ling, en 1976 en células neoplásicas resistentes al tratamiento simultáneo con una amplia variedad de drogas citotóxicas. Su nombre *glicoproteína P*, proviene de su función íntimamente relacionada con la hipotética pérdida de *permeabilidad* celular a dichas drogas, y posteriormente se determinó su capacidad de exportar fuera de las células, tanto los fármacos administrados como así también un amplio espectro de compuestos orgánicos neutros y/o catiónicos con estructuras muy diferentes entre sí (Dassa E et al, 2001; Szakács G et al ,2006).

La P-gp posee doce dominios transmembrana (TMD) altamente hidrofóbicos, que constituyen un “poro” a través del cual las drogas atraviesan la membrana hacia el exterior, y dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBD) para la hidrólisis de ATP que producen la energía requerida para el transporte mencionado, por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} y temperatura, (Thomas J. Raub ,2005) (Figura16)

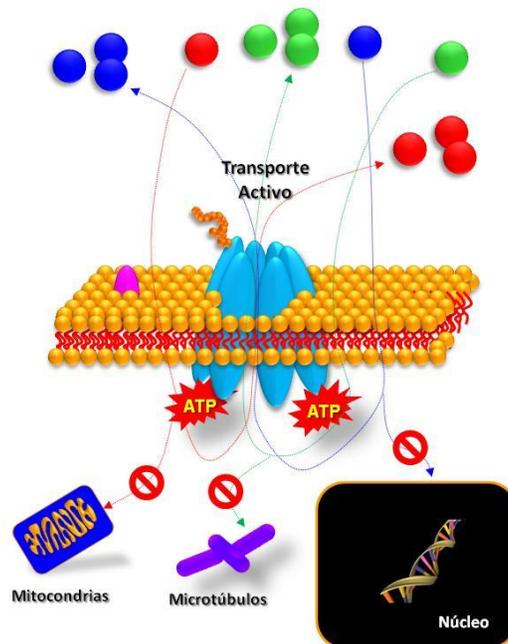


Figura 16. Una representación idealizada de la glicoproteína-P y sus 12 dominios transmembrana (TMDs) dentro de la bicapa lipídica. (Modificado de Thomas J. Raub, 2005)

La glicoproteína-P (P-gp) presenta un PM de 170kDa y es el transportador más estudiado, dado su impacto clínico-terapéutico en prácticamente toda la farmacología. En la médula ósea normal, P-gp y BCRP (ambos ABC-transporters), se expresan en forma transitoria en los progenitores hematopoyéticos tempranos SCH ("*Stem cells*" hematopoyéticas), y P-gp particularmente también se encuentra expresada en la poblaciones linfoides T maduras (CD4+, CD8+) y en células natural killer (CD56+) (Drach D, 1993).

Estudios por microarray de ARNm, confirmaron la expresión transitoria de los mensajeros de P-gp y BCRP, en subpoblaciones menos diferenciadas de células *Stem* en la MO, incluyendo estadios CD34-negativos (Bunting, 2002; Bunting et al, 2003). Habitualmente estas células no expresan otros marcadores de diferenciación de linaje, tales como el cluster de diferenciación mieloide CD38, por los que se los denomina Lin^{neg} (Larochelle et al, 1996; Civin et al, 1996). Esta expresión transitoria de los transportadores en la célula progenitora CD34-/CD34+, estaría relacionada a su protección frente a un potencial microambiente nocivo (Zhou S, 2001).

1. 4.3 P-GP, FUNCIÓN, REGULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Se considera que la expresión de P-gp en las células tumorales representa un mecanismo de protección detoxificador de sustancias citotóxicas, como los alcaloides de la vinca, antraciclinas, colchicina, etopósidos, actinomicina D, y otras importantes drogas usadas en la terapia del cáncer (Chung-Pu Wu, et al, 2008; Cheol-Hee Choi;2005). Esta propiedad, le permite a la célula neoplásica, "resistir" al tratamiento con diferentes fármacos dirigidos a distintos blancos terapéuticos, aún administrados en forma conjunta.

Si bien habitualmente P-gp (y BCRP) se localiza en la membrana plasmática de las células K562 que la expresan (Lardo et al, 2007), también se ha descrito su localización en las membranas mitocondriales de las células K562 resistentes a doxorubicina (Monteanu E et al, 2006), o bien como consecuencia de su transfección génica como en las células PN1A-NIH/3T3 (Solazzo M et al, 2006).

La P-gp puede interactuar con dos tipos de componentes: un primer grupo es el de sustratos hidrofóbicos o compuestos neutros, y el otro formado por compuestos orgánicos con carga eléctrica positiva (cationes orgánicos).

Se han descrito tres modelos principales de acción de la P-gp en el transporte de drogas: un transporte clásico a través de los 12 dominios transmembrana que generan un poro por el que saldrán las drogas bombeadas a expensas del ATP hidrólizado por los NBD citoplasmáticos; otro de los mecanismos se debe al aspirado ó “*vacumm cleaner*” de compuestos que lograron solubilizarse en la membrana, pero son captados por la P-gp sin alcanzar el citoplasma, y finalmente un mecanismo de translocación denominado “*flippase*”, que modifica la composición de los fosfolípidos de la membrana celular. Este último mecanismo puede estar vinculado a cambios de potencial de acción de la membrana, por lo cual el coeficiente de partición de una droga en la capa bilipídica se modifica de manera tal de necesitar 2-4 log más de concentración de drogas para lograr su solubilización e ingreso a las células (Witkins et al, 1997; Roepe PD, 2000).

La P-gp funciona en cuatro niveles principales de acuerdo a su localización en el organismo (Bendayan R, 2006) (Tabla 6):

- 1-Limitando el ingreso de compuestos desde la absorción intestinal, debido a su expresión en la membrana apical de los enterocitos.
- 2-Promoviendo la eliminación ya sea hepatobiliar o por vía renal, a través de su expresión en la membrana de los canalículos de los hepatocitos y en la membrana luminal de las células del túbulo proximal del riñón respectivamente.
- 3-Impidiendo la entrada de distintos compuestos “peligrosos” (incluyendo fármacos) en diferentes tejidos protegidos por barreras biológicas altamente especializadas como la BHE (barrera hematoencefálica), placenta, testículos, etc.
- 4- A nivel celular, impidiendo el ingreso de fármacos en células neoplásicas MDR+.

Intestino	Membrana Apical
Riñón	Membrana apical de las células del epitelio, el túbulo Proximal
Higado	Membrana canalicular del Hepatocito
Barrera Hematoencefálica	Membrana luminal de las células del endotelio
Placenta	Trofoblastos
Testículo	Membrana de las células del endotelio capilar

Tabla 6 Distribución de la P-gp en los tejidos normales. (Modificado de Cheol-Hee Choi, 2005)

Diferentes sustancias citotóxicas suelen ser sustratos de esta bomba de expulsión, pueden también ser inhibidores de su función, y en algunos casos comparten ambas propiedades, dependiendo de las concentraciones aplicadas.

Ha sido demostrado que el Imatinib es sustrato de la P-gp, y esta glicoproteína expulsa al Imatinib en aquellas células que la expresan (Hegedus Tama's et al, 2002).

Existen compuestos capaces de revertir la multirresistencia a fármacos en células MDR+ y que se denominan quimiosensibilizadores. Muchos de ellos no son tóxicos por sí mismos y compiten con los fármacos antitumorales por la unión a la P-gp, aumentando así la concentración intracelular de fármaco citotóxico. En 1981 Tsuruo y col, descubren que el verapamil, un agente bloqueante de los canales de calcio, es capaz de resensibilizar las células de la línea leucémica P388-MDR+ resistentes a vincristina (Tsuruo Tet al, 1982). Años más tarde se reportó que la ciclosporina A (CyA), también puede modular la función de la P-gp inhibiendo su actividad (Twentyman PR et al, 1987). Más recientemente se demostró que la CyA también puede bloquear la otra proteína de transporte BCRP (*ABCG2*) (Gupta A et al, 2006).

1.4.4 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1

Las variaciones inter-individuales en la efectividad de un tratamiento pueden estar sujetas a diferentes causas. Una de ellas es la falta de adherencia del paciente al tratamiento indicado. El Imatinib se administra por vía oral, por lo cual el cumplimiento con el tratamiento es totalmente dependiente del propio paciente. En los casos con completa adherencia se logra una RCC del 90% (Marín et al, 2009).

Por otro lado se deben tener en cuenta factores farmacocinéticos, que modifican las concentraciones plasmáticas de las drogas. Estos cambios pueden estar relacionados con diferentes niveles de expresión y/o función de las enzimas relacionadas al metabolismo (fase I y Fase II) como de las proteínas de transporte de las drogas, relacionadas a la eliminación de los fármacos o sus metabolitos del organismo. En conjunto y/o en forma individual, estos factores pueden alterar la absorción y biodistribución del Imatinib.

Se han descrito polimorfismos de una sola base ó nucleótidos simples (SNPs) en el gen MDR-1, que están asociados a cambios de expresión en tejidos normales, con

impacto en la absorción y nivel plasmático de distintas drogas (Hoffmayer et al, 2000).

Cada una de las formas variantes polimórficas (SNPs) de un gen, puede expresarse en un solo alelo (forma heterocigota), o en dos alelos (forma homocigota) (Benitez Ortiz J et al, 2002) (Figura 17).

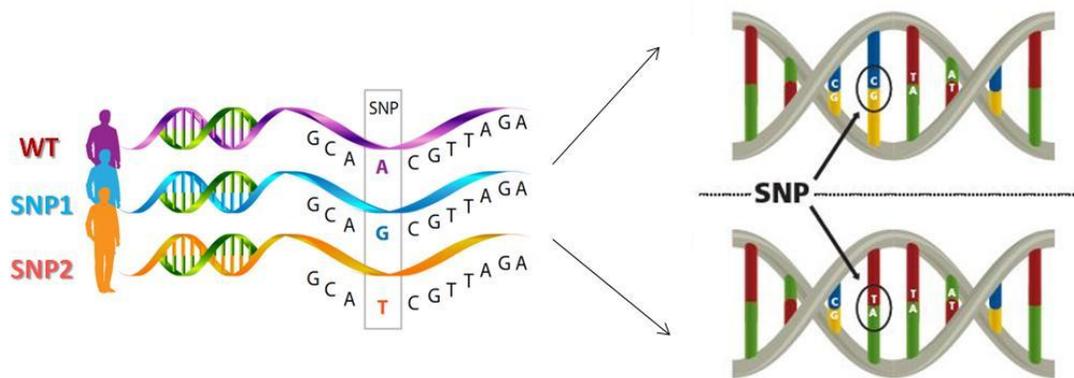


Figura 17. Representación genérica de un polimorfismo de alelo único. Muestra el cambio de CG por TA. La cadena de ADN en 1 difiere de la del ADN en 2 en un sólo par de bases. Gibson & Muse, 2004.

Los SNPs están presentes en el genoma humano con una frecuencia de uno por cada 1.200 pares de bases.

Aproximadamente el 80% de los polimorfismos reside en regiones no codificantes del genoma, es decir, en regiones no relacionadas con secuencias que contienen la información esencial para la expresión y/o función de un gen. Sin embargo, el 20% restante se encuentran en regiones codificantes.

Precisamente, el estudio de Hoffmayer identificó 15 polimorfismos en el gen MDR-1, ubicados en regiones codificantes (Figura 18).

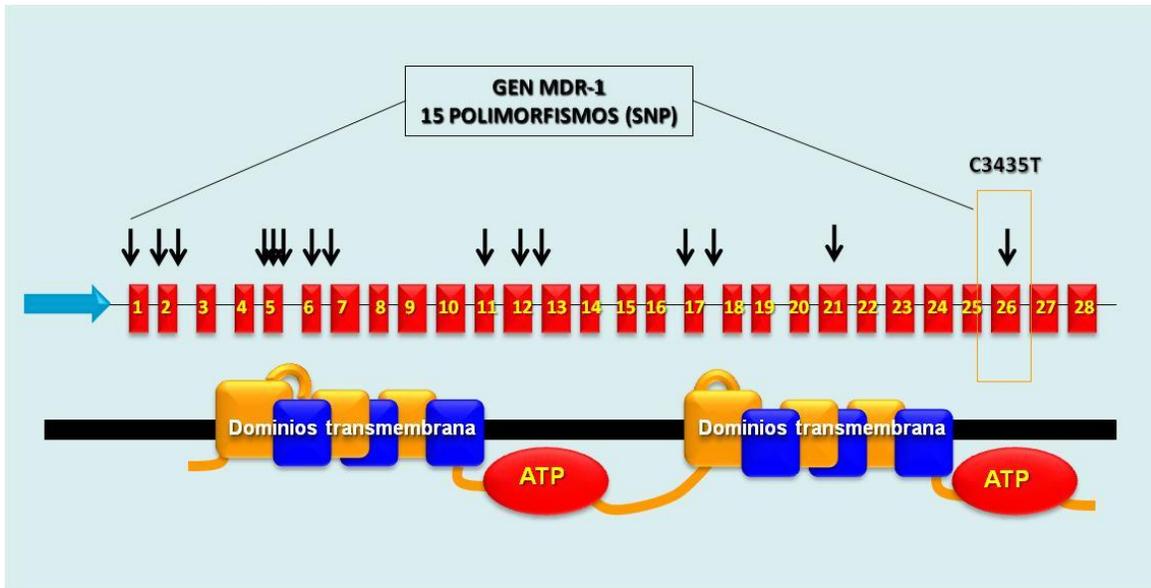


Figura 18: Polimorfismos en el gen MDR-1. Las flechas indican la ubicación en las regiones exónicas, e intron-exón de los diferentes polimorfismos y los correspondientes dominios en la proteína P-gp. Modificado de Hoffmayer, 2000

Sus investigaciones realizadas en voluntarios caucásicos, permitieron asociar el polimorfismo en el exón 26 (C3435T), con diferente nivel de expresión de la proteína a nivel intestinal, y su repercusión en los niveles plasmáticos de drogas substratos de la P-gp. Dicho estudio mostró la existencia de individuos homocigotas CC, homocigotas TT y heterocigotas CT en dicho polimorfismo. Los individuos CC con mayor expresión proteica duodenal, presentaban menores niveles de digoxina plasmática a igual dosis administrada que los CT y TT respectivamente (Figura 19).

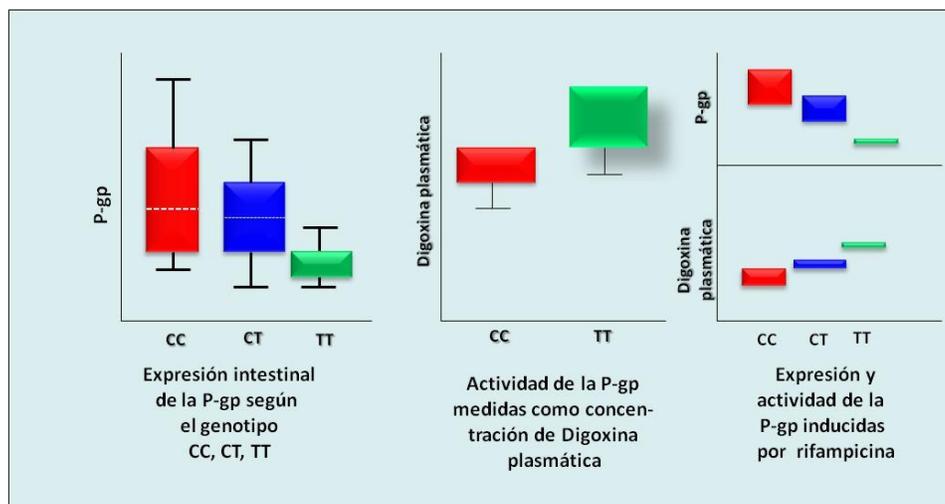


Figura 19: Estudio del polimorfismo C3435T: su relación con la expresión de P-gp; según el genotipo de MDR-1 directa e inducida con Rifampicina, y la concentración plasmática de Digoxina. (Modificado de Hoffmayer, 2000)

Este polimorfismo podría afectar la absorción intestinal de las drogas administradas por vía oral incluyendo el Imatinib (y otros ITKs) y por ende sus niveles en plasma (J Thomas et al, 2004).

Estudios posteriores sobre los polimorfismos del gen MDR-1 realizados en líneas celulares de Cáncer de Mamma: MCF-7; epidermoide: KB-3-1; neuroblastoma: SH-SY5Y y LA-N-1; de C6lon HCT-116, SW 620 y otros han demostrado un patr6n de expresi6n alelo espec6fica (Mickley, A et al, 1998).

Otros trabajos, (Zheng H et al, 2002) aportaron luego el posible impacto cl6nico en un nuevo sitio polim6rfico detectado en el ex6n 21 (G2677T/A) del mismo gen y en asociaci6n con el SNP del ex6n 26 anteriormente citado.

A la fecha ya se han reportado m6s de 216 SNPs en el gen MDR-1, de los cuales s6lo 3 se encuentran en regiones del promotor, 39 en zonas lim6trofes ex6n/intron, y 16 en las regiones ex6nicas seg6n los registros de SNPper (SNPper bioinformatic tool <http://snpper.chip.org>) (Riva A. and Kohane I.S, 2002; Jamroziak and T.Robak, 2004).

A su vez, se han descrito diferencias 6tnicas en la expresi6n funcional de estos polimorfismos, de modo tal que id6nticos genotipos pueden resultar en funcionalidades fenot6picas opuestas. Tal es el caso de la etnia japonesa, en quienes el polimorfismo CC (3435) resulta en individuos con baja expresi6n de la P-gp duodenal y los portadores del genotipo TT (3435) tienen alta expresi6n proteica (Mizuho Tanabe et al, 2001), exactamente a la inversa de lo descrito por Hoffmayer en cauc6sicos.

Tambi6n se ha podido comprobar la existencia de una amplia variabilidad de frecuencias en el genotipo, para las variantes ABCB1 1236 C>T (ex6n 12, rs 1128503); 2677 G>T (ex6n 21, rs 2032582) y 3435 C>T (ex6n 26, rs 1045642) en relaci6n a los diferentes grupos 6tnicos, seg6n varios autores (Barlam et al,2003;Sebahat et al, 2006; Cascorbi et al, 2001 y 2011; Maja Milojkovic et al, 2011; Chava Kimchi-Sarfaty;et al 2007)(Tabla 7)

Genotipo	Chinos	Malayos	Hindues	Turcos	Caucásicos	Servios	Judios Ashkenazi	Ref
3435 C/C	24*	25*	18 *	20#		19 ^{##}	30,7"	Balram et al,2006* #Turgut Sebahat et al, 2006
C/T	44*	46 *	39*	53#	53,9°	54 ^{##}	38,6"	
T/T	32*	28*	43 *	27#	28,6°	27 ^{##}	30,7"	
2677 G/G	-	-	-	-	-	26 ^{##}	35,6"	Cascorbi et al,2001;2011° Maja Milojkovic et al, 2011 ^{##} Chava Kimchi-Sarfaty; 2007"
G/T					56,4°	15 ^{##}	47,5"	
T/T					41,6°	15 ^{##}	16,8"	
G/A					1,9°	3 ^{##}		
T/A						0,6 ^{##}		

Tabla 7 Frecuencias de genotipos en diferentes grupos étnicos Balram et al, 2003*; Turgut Sebahat et al, 2006#; Cascorbi et al, 2001 y 2011°; Maja Milojkovic et al, 2011^{##}; Chava Kimchi-Sarfaty; et al 2007"

CAPITULO 2

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

A) OBJETIVOS GENERALES

Estudiar el fenómeno de FARMACORRESISTENCIA mediado por proteínas de transporte (ABC-transporters), en el tratamiento con Imatinib en LMC, con el objeto de identificar:

- a) Posibles nuevas estrategias terapéuticas, con inhibidores de las proteínas de transporte.
- b) Posibles variantes alélicas en el gen MDR-1, que puedan explicar las diferencias individuales en el tratamiento con inhibidores de TK, y el riesgo de fracaso terapéutico.
- c) Si dichas variantes alélicas podrían predecir un mal pronóstico de la enfermedad.

B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para evaluar la importancia del mecanismo de resistencia a un inhibidor de TK en la LMC, este trabajo consta de un **área experimental *in vitro*** y, un **área clínica**.

B-1: OBJETIVOS EN EL ÁREA EXPERIMENTAL:

Caracterizar la farmacorresistencia al Imatinib mediada por P-gp, de la Línea K562, desde el punto de vista funcional y genético:

Para este objetivo, la línea celular utilizada fue previamente caracterizada por la presencia de amplificación del gen BCR-ABL1 y, la ausencia de mutaciones en el dominio kinasa de la proteína BCR-ABL.

i. Estudio funcional del Fenotipo de “resistencia a Imatinib”, mediado por P-gp.

i.a: Para este objetivo se establecerá si existe alguna asociación entre la expresión proteica de P-gp y la sensibilidad o resistencia al tratamiento con dosis crecientes de Imatinib, medido como tasa de muerte celular.

i.b: Verificar si la administración de CyA, como inhibidor de la función de este transportador, mejora la sensibilidad al tratamiento con Imatinib en dichas células.

i.c: Monitorear la inhibición de P-gp, mediante pruebas funcionales de transporte de Rho-123.

ii. Caracterización de los polimorfismos del gen MDR-1 de impacto clínico antes mencionados en dicha línea celular.

Para este objetivo se utilizarán estudios de secuenciación directa de los fragmentos exónicos correspondientes a cada uno de los siguientes polimorfismos: C1236T, C3435T y G2677T/A.

B-2: OBJETIVOS EN EL ÁREA CLÍNICA SE PROPONE:

i- Estudio de los Polimorfismos del gen MDR-1 en pacientes con LMC

Estudiar los polimorfismos C1236T, C3435T y G2677T/A (para los exones 12, 21 y 26 respectivamente) del gen MDR-1 en pacientes BCR-ABL1 positivos, y evaluar su posible relación con la respuesta terapéutica y el desarrollo de la crisis blástica, acorde a los protocolos de tratamiento y seguimiento de la enfermedad en nuestro medio.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE I

ENSAYOS BIOLÓGICOS EN LÍNEA CELULAR (*IN VITRO*)

3.1.1 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES BCR/ABL1+.

CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR K562 *WT* (PARENTALES) BCR/ABL+

Se usaron células de la Línea K562 BCR/ABL1 positivas, obtenidas de la colección de Biología Celular Americana ATCC (American Type Culture Collection, N° de catalogo CCL-243™), obtenidas originalmente a partir de líquido pleural de un paciente de 53 años con LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA en estadio terminal de CRISIS BLASTICA (Lozzio ,1975). Esta población celular se caracteriza por ser pluripotente pero ligeramente diferenciada hacia estirpe mieloertróide. La Línea K562 permite aislar y mantener en forma persistente, la expresión del cromosoma Phi a lo largo de sucesivos pasajes de cultivos *in vitro*.

A nivel molecular, dichas células expresan el rearreglo BCR-ABL1 con la amplificación del reordenamiento de tipo b3a2 antes descrito.

Las células parentales con fenotipo resistente, fueron mantenidas según procedimientos convencionales (Assef Y et al, 2005), con el agregado de gentamicina y L-glutamina. Las células K562 tuvieron entre 3 a 10 repiques, antes de ser usadas para los ensayos experimentales.

Se trabajó con una cantidad $\geq 10^6$ cel/ml por experimento. Las mismas se mantuvieron en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C en medio RPMI-1640, complementado con suero fetal bovino al 10% inactivado por calor (30 min, 65°C).

PROCEDIMIENTO: Los cultivos celulares se realizaron tomando 3 ml de células criopreservadas a las que se les añadió:

- a- 1 ml de suero fetal bovino (Invitrogen, Paisley, UK)
- b- 6 ml de RPMI-1640 (Invitrogen, Paisley, UK)
- c- 60 μ l de gentamicina ($25\mu\text{g ml}^{-1}$)(Invitrogen, Paisley, UK)
- d- 70 μ l de L-glutamina (2mmol L^{-1})(Invitrogen, Paisley, UK).

Los repiques fueron hechos cada tres días y las células fueron evaluadas periódicamente con un microscopio de luz invertida, hasta obtener una calidad y cantidad acordes a las especificaciones del “Protocol for K562 Cells [ATCC] DCV-1008” (Figura 20).

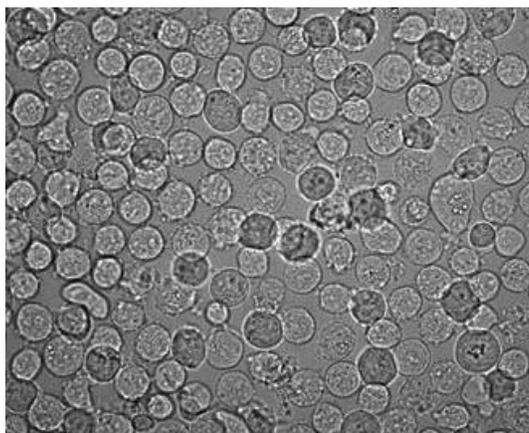


Figura M&M-I 20: Observación de la calidad de las células en cultivo, a través de un microscopio de luz invertida. Modificado de “Optimized Protocol for K562 Cells [ATCC] DCV-1008 Vs. 03-2003”

CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR K562-BCR-ABL1+, RESISTENTES A VINCRISTINA (K562/vinc)

Esta Línea celular fue gentilmente provista por el Laboratorio de Neurofisiología del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, (UBA- CONICET, Argentina), gracias a la autorización del Investigador Dr. Basilio Kotsias, ante quién se le presentó un compromiso de no utilización de la Línea para otros fines que no estuvieran relacionados con el motivo de la presente investigación. Las células K562 parentales fueron acondicionadas por sucesivos pasajes de subcultivos con concentraciones crecientes de vincristina (Provistas por Dr Lehne G. University of Oslo, Norway), las que tuvieron un crecimiento continuo aún en presencia de sulfato de vincristina 150 nM (Filaxis, Argentina),

generando la sublínea K562/vinc (Assef Y et al, 2009). Esta sublínea celular se caracteriza por presentar un fenotipo de resistencia múltiple a drogas. La sublínea K562/vinc expresa la glicoproteína P-gp, por lo que se la considera MDR-1+. Una vez obtenida la suspensión celular, se extrajo ARN para los ensayos semicuantitativos de RT-PCR para el gen MDR-1.

3.1.2 HIBRIDACIÓN *IN SITU* POR FLUORESCENCIA (FISH)

Las células fueron caracterizadas respecto a la amplificación del gen BCR-ABL, por el servicio de Citogenética de la ANM, aplicando técnicas de FISH acorde a procedimientos previamente reportados. Brevemente, el estudio de amplificación de BCR-ABL1, se realizó mediante la técnica de FISH utilizando una sonda dual color extra señal (ES) para el gen de fusión BCR-ABL (LSI ES BCR/ABL, Vysis, Downer Grove) (Belli C et al, 2011). Dicho procedimiento tiene mayor sensibilidad que la técnica de citogenética convencional (0,5-1%), dado el alto número de núcleos en interfase que se evalúan (Pinkel D et al, 1986; Naumman S et al, 2001, Bianchini M et al; 2008), en la Figura M&M-I 21 las imágenes fluorescentes de los núcleos en interfase de las células de LMC cuando son visualizadas en un microscopio epifluorescente. Los núcleos que presentan señal fluorescentes en un mismo punto de color verde/rojo y/o amarilla, son interpretados como positivos para la translocación BCR-ABL1. Las señales únicas verdes o rojas (independientes) corresponden a los genes originales no translocados.

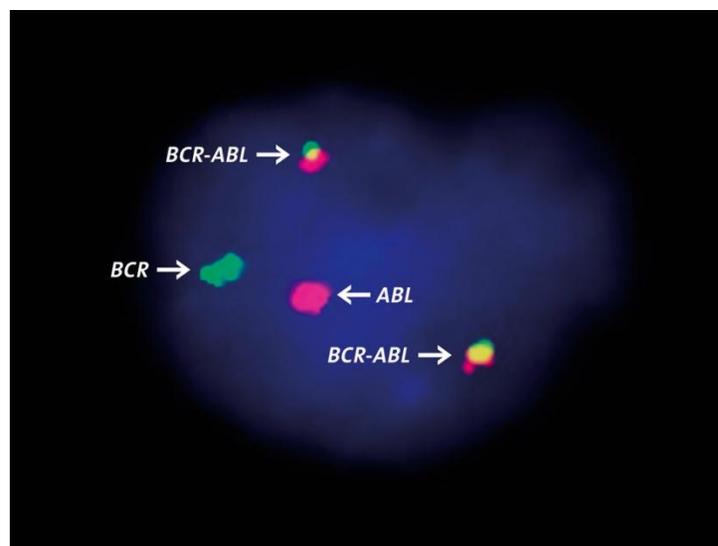


Figura M&M-I 21. Microfotografía (izq) y representación esquemática (der), de una imagen de fluorescencia BCR-ABL1 (+). Se observa un núcleo en interfase BCR-ABL 1 positivo en A para el punto de ruptura M-BCR, y en B para m-BCR, con el método LSI BCR/ABL. (Modificado de D Primo, 2003).

3.1.3 RT-PCR PARA BCR-ABL1

AISLAMIENTO DE ARN MENSAJERO DE LAS CÉLULAS K562

El ARNm fue extraído a partir de una suspensión con $>10^7$ cel/ml, con isotiocianato de guanidina (Trizol® Invitrogen Life Technology Inc., Rockville, MD, USA), usando un método convencional descrito por (Choczynski P et al, 1987).

La calidad del ARNm aislado fue evaluada en una alícuota de 3 μ l, por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X preparado con agua-DEPC (0,04 M Tris-acetato, 0,002M EDTA), y coloreado con 2 μ l de bromuro de etidio 10mg/ml, conforme al procedimiento de rutina (Sambrook et al, 1989). El ARN extraído fue cuantificado por espectrofotometría por métodos convencionales.

Para medir la concentración y la integridad del ARN obtenido, se tomo una alícuota de la preparación final, en Buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8]). Se midieron las DO a dos longitudes de onda: 260/280, nm en un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Deutschland GmbH). La calidad y cantidad del ARN obtenido fue considerada óptima cuando la relación DO 260/280 se encontaron en el rango 1.8 - 2.1.

RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN A ADNc (ADN-COMPLEMENTARIO)

La técnica de RT-PCR permite la transcripción del ARN a su correspondiente ADNc. En nuestro experimento se utilizaron oligonucleótidos iniciadores (*primers oligo-dt*) que reconocen las colas poli-A presentes en los ARNm. El ADNc obtenido es posteriormente amplificado en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en una etapa. Para la reacción de Transcriptasa Reversa (RT), se utilizaron 2,5 μ g de ARN total como templado. La mezcla de reacción fue preparada con:

- a. Buffer de Reacción 1X (Buffer de Reacción M-MLV 5X; conteniendo Cl_2Mg 15 mM y DTT), (Promega)
- b. Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) 1mM (Promega, Biotech, Madison, WI; Cat U1330)
- c. Transcriptasa reversa SuperScript II (SuperScript™ II Reverse Transcriptase Invitrogen) Catálogo N°18064-022 (200U μ l) (Kotewicz, M.L, 1985)
- d. Oligonucleótidos (oligo-dT; 50pmoles (Pharmacia, Stockholm, Sweden).

Para un volumen final de 20 μ l.

Se incubó a 42°C durante 1 hora, y luego a 70°C durante 15 minutos para eliminar la actividad de la retrotranscriptasa residual.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE FUSIÓN BCR-ABL1

El diseño de los cebadores, para la detección de transcritos de genes de fusión, depende de la presencia ó ausencia de más de un punto de ruptura en uno de los dos genes. Se amplificó el ADN complementario para analizar el gen BCR-ABL1, según el método previamente descrito (Kawasaki et al, 1988), con algunas modificaciones. Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 0,5ul de ADNc, Buffer Taq (1x), Cl₂ Mg (1,5 mM), dNTPs (0,2mM)
- Cebador F (Foward): 5´**GGA GCT GCA CAT GAT GAC CAA C** 3´ 0,5 µM
- Cebador R (Reverse): 5'**TCA GAC CCT GAG GCT CAA AGT C** 3' 0,5 µM
- Taq polimerasa 2,5 U (Thermus aquaticus, Taq polymerase) (Promega, Madison, WI; Cat. M3001); agua csp volumen final de 50ul (Figura M&M-I 22)



Figura M&M-I 22 Estructura del ARN mensajero y localización de los oligonucleótidos, para diagnóstico. A y B representan los cebadores utilizados para dos secuencias de unión conocidas para BCR-ABL1 en LMC y C es un cebador específico para el exón 3 en el gen BCR y para el exón II en el ABL (b3a2), la flecha indica la unión entre BCR y ABL (Kawasaki, 1988)

La amplificación consistió en una desnaturalización a 95°C (5 min), seguido de 35 ciclos a 95°C (20 seg), pegado de los cebadores a 55°C (15 seg), y extensión final a 72°C (1min) mediante el uso de un Ciclador Modelo (Perkin Elmer/Cetus). El producto de amplificación del gen BCR-ABL1 tuvo un tamaño de 200pb. La corrida electroforética en agarosa se visualizó en un transiluminador UV (Vilber Lourmat). Como control interno de la calidad del ARN obtenido, se seleccionó el gen constitutivo (*housekeeping*), el gen *gliceraldehido-3-fosfatodeshidrogenasa (GAPDH)*. Para la detección de transcritos del gen *GAPDH* se realizó la siguiente mezcla: ADNc (5 µl); Buffer de reacción Taq (1x);

Cl₂Mg, (1.5mM); dNTPs (0,4 mM); cebadores 5' y 3' (0.5 μM) y Taq polimerasa (1.5U). Los cebadores fueron:

Cebador F (Forward): F5' CAT CTC TGC CCC CTC TGC TG -3'

Cebador R (Reverse): R5' CCC TCC GAG GCC TGC TTC AC-3'

Para esta reacción, se realizó el siguiente programa de amplificación: un ciclo a 95°C (5 min), 29 ciclos a tres temperaturas diferentes: 95°C (60 seg), 57°C (60 seg), 72 °C (60 seg), y finalmente un ciclo de extensión a 72°C (10 min). El producto del gen control tuvo un tamaño de 450 pb acorde a lo esperado.

3.1.4 qRT-PCR (PCR EN TIEMPO REAL) DE BCR-ABL1

La PCR en tiempo real o qRT-PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar útil para la cuantificación de ADN o de ARN mensajero de una muestra. Utilizando cebadores específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN.

Cuando la PCR en tiempo real se combina con una reacción de retrotranscripción o RT (RT-PCR), puede determinarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa, la cual compara la cantidad o relación del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo tomado como control endógeno. A su vez esta forma de cuantificación, se utiliza para realizar el seguimiento de la evolución de la enfermedad y/o su respuesta al tratamiento.

Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicones producidos. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de modo tal que a medida que se incrementa el producto se emitirá mayor fluorescencia. La denominada técnica FRET (fluorescence resonance energy transfer) se basa en el uso de dos diferentes sondas marcadas con dos fluorocromos, uno de elevada energía (Reporter), y el otro de baja energía (Quencher), ampliamente utilizada para este tipo de cuantificaciones (Gutierrez M et al,2005)

La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el

amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores (Figura M&M-I 23). Para cuantificar los transcritos de ARNm del gen BCR-ABL1, se parte de un volumen de 10ml de la suspensión de células en cultivo (K562) (Ver 1.3).

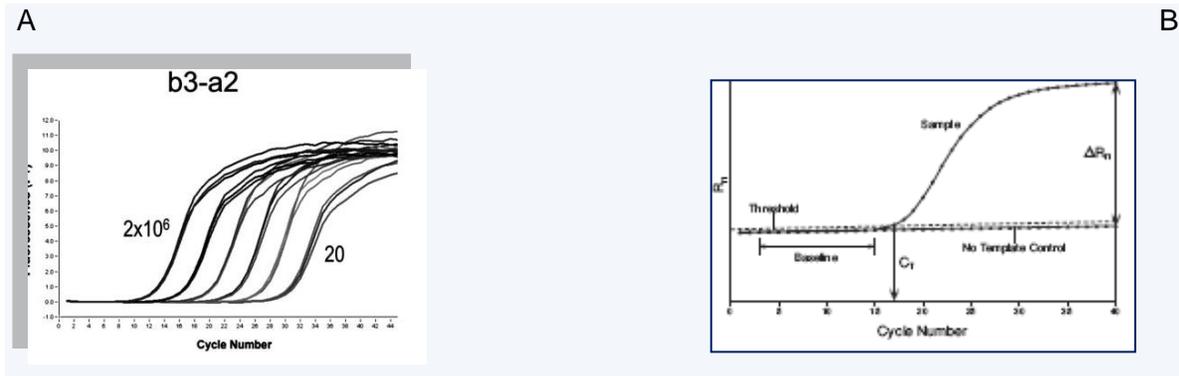


Figura M&M-I 23 La gráfica A, muestra una curva estándar de cuantificación de transcritos BCR-ABL (b3a2), usando una serie de diluciones de plásmido. En la gráfica B, observamos las diferentes áreas de una amplificación de PCR a tiempo real. El eje -vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos. La línea base (Baseline) se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y solo se detecta la fluorescencia basal. Threshold es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, y el corte entre el threshold y la curva de amplificación determina el Ct -o ciclo umbral que se emplea para la cuantificación. El cálculo del Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la curva (Modificado de Gutiérrez M, 2005)

ADN COMPLEMENTARIO DE LA LÍNEA K562 (CONTROL POSITIVO Y CURVAS)

La preparación del ADNc para PCR en tiempo real de la Línea K562, se realizó utilizando el siguiente esquema:

Buffer (M-MLV)5X	5,00 μ l
Cebadores de ocho nucleótidos (Random Primers) dilución 1:4 (0,5 μ g/ μ l)	1,00 μ l
DNTPs (10 mM)	1,25 μ l
Transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia virus) (200U/ μ l)	1,00 μ l
H ₂ O (RNase free) csp volumen final	25,00 μ l

ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE RT-PCR

Se siguieron las condiciones de retrotranscripción convencionales: desnaturalización del ARN 5 min a 65°C, seguida de 5 minutos a 4°C, se realizó una centrifugación a 10.900 rpm durante 1 minuto, y se hibridizó 60 minutos a 37°C, luego se inactivó la enzima durante 10 minutos a 70°C, seguido de 5 minutos a 4°C. Se centrifugó a 10.900 rpm (1 min), y se conservó a -20°C hasta el momento de su posterior cuantificación.

CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva estándar se obtuvo a partir de diluciones 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000, de ADNc de la Línea celular K562.

PREPARACIÓN DE LOS CEBADORES

Los cebadores fueron diseñados para la unión b3a2 del gen BCR-ABL1. Se preparó una dilución 10µM de cada cebador (F y R) para el gen BCR-ABL1 y ABL 1 a partir de una solución madre de 200 µM. Las secuencias de los cebadores fueron descritas en el punto 1.4.

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE PCR

La cuantificación se realizó en un instrumento Lightcycler, con un fluorógeno SYBR Green I. Se usaron los reactivos del kit FastStart DNA master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Germany). Este método usa un fluoróforo luz azul LED del equipo (470 nm) que excita al fluorógeno Syber green (520nm) y que se unen a la doble cadena de ADN en forma inespecífica, produciendo fluorescencia.

Para preparar la mezcla (MIX) se siguieron las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones: Taq DNA polimerasa, Cl₂Mg 10 mM; buffer y SYBER GREEN I Dye y dNTP mix.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE qRT-PCR

Preparación de la Mezcla BCR-ABL1; ABL1:Cl₂Mg (3,5 mM) 1µl; oligonucleótidos Forward y Reverse (10µM) 0,25 µl; H₂O (RNase free) para un volumen final de 10 µl.

ESTANDARIZACIÓN DE LA qRT-PCR PARA BCR-ABL1

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C (10 minutos), seguido de 50 ciclos a 95°C (5 segundos) para la desnaturalización, hibridación a 64°C (3 segundos), una extensión a 72 °C (10 segundos), y una extensión final a 80°C (20seg), finalmente 30 segundos a 37°C.

Se realizaron tres ensayos independientes, para asegurar la reproducibilidad del experimento. Se incluyeron en cada ensayo un control positivo apropiado (gen ABL1), y uno negativo (ausencia de ADNc). Si bien puede ocurrir una sobreestimación del número de transcritos cuando se usa como control interno el gen ABL1, dado que los primers usados no solo detectan el ABL1 *wt* sino también el ABL del gen de fusión (Y. Lynn Wang et al, 2006), actualmente se acepta el uso de este y otros genes controles siguiendo los protocolos estandarizados y validados por European Against cáncer (Gabert et al, 2003).

SECUENCIA DE CEBADORES PARA EL CONTROL +/-GEN ABL1:

Secuencia 5'3'		
Gen	F TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGTGA	Tamaño
ABL1(NM_005157)	R GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA	125pb

Un análisis de la emisión de fluorescencia permitió seguir la cinética en tiempo real, de la amplificación del ADN. La especificidad del producto amplificado, fué dado por las curvas de fusión (*melting*), ya que cada amplicón tiene una T⁰ de fusión diferente. El número total de copias de BCR-ABL1 detectado se informa como valor relativo al número de copias del gen control (ABL1) expresado en porcentaje [(BCR-ABL1/ABL1) x 100].

3.1.5 CITOMETRÍA DE FLUJO

El inmunofenotipo permite evaluar en una suspensión celular, la presencia de antígenos (fenotipo) en las células en forma individual, La Línea K562, fue estudiada en una suspensión en PBS, mediante un instrumento Coulter Epics XL (Coulter Corporation), Software System II. El panel de anticuerpos seleccionados para asignar linaje a la Línea K562, responde a las Recomendaciones del Consenso Internacional para el Estudio de Neoplasias Hematológicas, según del Grupo de Estudios de Bethesda, 2006 (Wood BL et al, 2007).

Se realizaron marcaciones múltiples utilizando un amplio panel de anticuerpos monoclonales, para estudiar los linajes: mieloides, linfoides B y T, eritroide y megacariocítico (Fiona E. Craig et al, 2008). Los mismos fueron marcados con dos fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la Fluorescencia-1 (FL-1), que emite a una longitud de onda de 514nm; y ficoeritrina (PE) en la Fluorescencia-2 (FL2), que emite a 578nm. Para analizar el fenotipo se usó el siguiente panel de anticuerpos:

Panel Mieloide:

- *HLADR-FITC/CD13-PE (Becton Dickinson Immunocytometry System, San José, CA; BD)*
- *CD33-FITC/CD56-PE*
- *CD15-FITC/CD117-PE(BD)*
- *CD7-FITC/CD14-PE.(BD)*

Panel linfoide T:

- *CD3-FITC/CD45-PE*
- *CD4-FITC/CD8-PE*

Panel linfoide B:

- *CD10-FITC/CD19-PE*

Línea eritroide:

- *GLYA-FITC/CD2-PE (glicoforina A; Immunotech, IT)*

Línea monocítica:

- *CD16-FITC/CD11c-PE.*

Línea megacariocítica:

- *CD61-FITC/CD34-PE*

Para la detección de fluorescencia basal (inespecífica) se usó los isotipos de inmunoglobulinas, IgG1-FITC/IgG1-PE. Los resultados fueron expresados en porcentaje, sobre un total de más de 10.000 células analizadas.

3.1.6 CARACTERIZACION DE LAS MUTACIONES EN LA PROTEÍNA BCR-ABL

El estudio para la búsqueda de mutaciones en los dominios de la enzima TK, en la Línea celular K562, fue realizado previamente por el Laboratorio de Genética Molecular de la ANM, y se realizó mediante una extracción de ARN y amplificación de los exones 4 al 7 del gen ABL-1 (Bengió R et al, 2011).

3.1.7 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P-GP Y BCRP.

Para evaluar la expresión de las proteínas P-gp y BCRP, se usó un método inmunohistoquímico de coloración con anticuerpos monoclonales específicos (Boenish T, 2001).

Las células en cultivo, fueron lavadas con PBS. Se centrifugaron y se tomaron 10 µl del pellet de células, a las cuales se les añadió igual volumen de azul tripán, para medir viabilidad celular. Se consideró una buena viabilidad a un porcentaje superior al 98% de células vivas. Los citopreparados fueron obtenidos a partir de 100 µl de células en cultivo (10^6 cel/ml), centrifugadas a 700 rpm por 10 minutos, en una citocentrífuga Shandon III (Labsystem).

Los preparados fueron secados durante 24 horas a TA y conservados a -70°C hasta el momento de su uso. Uno de ellos se coloreó con MGG (May Grunwal-Giemsa), a fin de evaluar la morfología y la distribución celular en la monocapa. Para los ensayos de inmunohistoquímica, se requirió el uso de portaobjetos sin carga positiva, para lo cual se les hizo un tratamiento previo, con 3-aminopropil-trietoxysilane, al 2% en acetona.

DETECCIÓN DE P-gp.

Se realizó la detección de la P-gp por método inmunocitoquímico con dos diferentes anticuerpos monoclonales específicos dirigidos a distintos epitopes. El clon C219 de ratón dirigido contra el epítipo interno de secuencia aminoacídica altamente conservada en el fragmento N-Terminal (VQEALD) (Van den Elsen et al ,1999) y el clon C494 de ratón dirigido contra el epítipo interno localizado sobre el fragmento C-Terminal (Volk H et al ,2005).

Para el anticuerpo C219 (Signet) los citopreparados de las células fueron fijados en una mezcla formol/acetona, luego se lavaron con una solución de TRIS-CIH 1M pH 7,8 y se incubaron overnight a 4°C con el anticuerpo primario (dilución 1/25) previo tratamiento con H₂O₂ al 3%. Para su detección se desarrolló el método de estreptavidina-biotina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (LSAB-Dako K 0675).

Para el anticuerpo anti-P-gp clon C494 (DAKO M3522) los citopreparados fueron fijados en acetona durante 10 minutos a TA, luego se realizó una incubación overnight a 4°C con el anticuerpo primario (dilución 1:40) previo tratamiento con H₂O₂ al 3% (Solución Stock: H₂O₂ de 30 volúmenes en PBS) Como amplificador de la reacción, se utilizó el método de polímero de un paso (Sistemas DAKO EPOS™).

Ambos anticuerpos fueron revelados con DAB (diamino bencidina) y se usó hematoxilina de Harris como contracolor. Luego los preparados se deshidrataron, y montaron en medio bálsamo.

Como controles de la expresión de P-gp, se utilizaron cortes de riñón humano de la zona apical y túbulo renales (control positivo), y región baso lateral (control negativo). A su vez, los controles negativos de la reacción fueron obtenidos por omisión del anticuerpo primario, de esta manera se pudo desestimar el pegado inespecífico del anticuerpo secundario y/o la reacción de peróxidos endógenos no deseados.

DETECCIÓN DE BCRP

Para determinar la presencia de la proteína BCRP se usó el anticuerpo monoclonal específico BCRP clon BXP-21 (1:50), (Kamya Biomedical Company, Seattle, WA, USA) (Suvannasankha A et al, 2004). Los preparados fueron fijados a temperatura ambiente 10 minutos en acetona, e incubados con el anticuerpo primario overnight a 4°C. El BXP-21 fue revelado con el método de polímeros (DAKO EPOS™). Todas las

reacciones fueron coloreadas con DAB y Hematoxilina de Mayer's. Como control positivo de la proteína BCRP se utilizó un citopreparado de células de endotelio vascular de la barrera hemato-encefálica y se siguió el mismo criterio mencionado antes (punto 1.7) para la preparación del control negativo.

3.1.8 RT-PCR PARA EL GEN MDR-1

AMPLIFICACIÓN DEL GEN MDR-1

Para amplificar los transcritos del gen MDR-1 se siguió el método sugerido por (Wang et al, 1997), con algunas modificaciones. Se preparó la siguiente mezcla de reacción: ADNc 2 μ l, Buffer Taq (1X), CL_2 Mg (1,5 mM), dNTPs (0,5mM), cebadores (0,5 pM de cada uno), Taq polimerasa 1U (Genbiotech), en un volumen final de 25 μ l. Se utilizaron los siguientes cebadores según (GeneCard for protein-coding ABCB1; GC07M086970)

- ABCB1- Forward (secuencia ARNm NM 000927; nucleótido 1147+):
5' ATT TGG CAA AGC TGG AGA GA 3'
- ABCB1 Reverse (secuencia ARNm NM 000927; nucleotido1148-):
5'TTA CAG CAA GCC TGG AAC CT 3'

La amplificación consistió en: 95°C (10 minutos), seguido de 40 ciclos a 95°C (30 segundos), 55°C (30 segundos), 72°C (30 segundos) y una extensión final a 72°C (3 minutos). Con estos cebadores se obtiene un producto de amplificación de 200pb.

El gen gliceraldehido-3-fosfatodeshidrogenasa (GAPDH) fue usado como control de calidad interno con un tamaño de 450pb. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 2,0 % en buffer TAE 1X, con 5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) y visualizados en un transiluminador UV.

3.1.9 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1

OBTENCIÓN DE ADN

Se obtuvo ADN de una suspensión de células en cultivo, K562 (5×10^5 /ml), por el método de Boom modificado (Beld Marcel et al, 1990). Las células fueron lavadas con 1 ml de buffer de lisis (Wash Buffer 1; 5 mol/l GuSCN), homogeneizadas y centrifugadas a 10.900 rpm durante 5 minutos. Luego se procedió a guardarlas a 4°C hasta la extracción del ADN. La misma consistió en añadir 50 μ l de Sílice SC, ó partículas de sílice (60 g de dióxido de silica, SiO_2 ; Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, en cantidad apropiada de H_2O desmineralizada). Se homogeneizó en vortex por medio de 5 agitaciones de 2 minutos

c/u. Se centrifugó a 10.900 rpm (1-2 minutos), y se añadieron 500 µl de buffer de lavado, conteniendo tiocianato de guanidina (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland; catálogo N° 50990) (Boom et al, 1996).

Se realizaron 2 lavados con el buffer mencionado. Posteriormente, se lavó el material 2 veces con 900µl de etanol al 70%, y se restituyó volumen con 900 µl de acetona. Luego de una nueva centrifugación y descarte del sobrenadante, el pellet se dejó secar en baño a 56°C (15 minutos). Se agregó 100µl de buffer de elución (GuSCN). Se homogeneizó y dejó a 56°C (10-15 minutos), repitiendo estos 2 últimos pasos cada dos minutos (5 veces). Finalmente se extrajo el sobrenadante rico en ADN, en un tubo eppendorf que se conservó a -20°C hasta su procesamiento.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA EL POLIMORFISMO DEL EXÓN 12 (C1236T):

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos de acuerdo a trabajos previos con algunas modificaciones (Ling-Na Ni et al, 2011) y acordes a la Base de datos: <http://www.genatlas.org/> y gnl/dbSNP/rs [1128503]:

	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto amplificado(pb)
1236C/T	F GTCACCTTCAGTTACCCATCTCG	236
	R C CTGCACCTTCAGGTTCTGG	236
	R T CTGCACCTTCAGGTTCTGGA	

El programa de amplificación tanto para la PCR y la PCR-anidada consistió en 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 95°C (30 segundos), 55°C (30 segundos), 72°C (60 segundos) y extensión final a 72°C 5 minutos (GeneAmp PCR System 2400-Roche Diagnostic Systems).

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LOS POLIMORFISMOS G2677T/A Y C3435T (EXONES 21 Y 26 RESPECTIVAMENTE)

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos de acuerdo a trabajos previos con modificaciones (Illmer Thomas et al, 2002).

	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto amplificado(pb)
2677G/A (rs: 2032582)	F-1 GTT TTG CAG GCT ATA GGT TCC F-2 TAT GGT TGG CAA CTA ACA CT R CAT GAA AAA GAT TGC TTT GA	204 (347/263)
3435 C/T (rs:1045642)	F-1 GAT CTG TGA ACT CTT GTT TTC A R GAA GAG AGA CTT ACA TTA GGC	207

Se analizaron los polimorfismos de los exones: 12 (C1236T) por PCR anidada y alelo-especifica, 21 (G2677T/A) por PCR anidada, y el polimorfismo del exón 26(C3435T) por PCR directa a partir de la extracción de ADN y posterior secuenciación directa. La PCR consistió en la preparación previa de la siguiente mezcla:

- 5µl de Buffer Taq 10X (cc. final 1X)
 - 5µl de DNTPs 2mM (cc. final 0,2nM)
 - 1,5µl de Cl₂Mg 50mM (cc. final 2,5mM)
 - 0,25 µl oligonucleótidos Forward y Reverse 20µM (cc. final 200nM)
 - 0,25µl Taq polimerasa 50U/µ (Invitrogen)(cc. final 0,025U)
 - csp H₂O (DPC, para PCR), para un volumen final de 40µl.
- El volumen final de la reacción fue de 50µl, completados con 10µl de ADN puro de la

Línea K562 (muestra en estudio) o 10 µl de H₂O para el control negativo. Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

- a- 95°C 5 minutos
- b- 35 ciclos a 95°C 45 segundos
- c- 55°C 45 segundos para exones 21 y 26, y 58°C para el exón 12
- d- 72°C 60 segundos y a 72°C 5 minutos para la extensión final (GeneAmp PCR System 2400-Roche Diagnostic Systems).

Los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, con 5µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizaron en un transiluminador UV (Modelo Viber. Lourmat). Los productos de las PCR, fueron purificados y secuenciados en un Secuenciador ABI3730XL, automático de ADN (Macrogen, Inc., Korea).

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

PARTE II

ENSAYO FUNCIONAL EN LA LÍNEA K562

3. 2.1 PRUEBA DE ACTIVIDAD FUNCIONAL CON RODAMINA 123 (RHO- 123)

La funcionalidad de la proteína P-gp puede medirse por la capacidad de eliminación de ciertos substratos de la bomba. En la Línea K562, evaluamos dicha capacidad mediante la expulsión de un compuesto fluorescente, la rodamina-123 (Rho-123), (2-[6-amino-3 imino-3H-xantina 9-yL] ácido benzoico-metil ester)[62669-70-9]EC N° 263-687-8, Sigma-Aldrich, R-8004, Vienna, Austria), la cual no se acumula intracelularmente, en la medida que la bomba se encuentre expresada y activa.

Mediante el uso de un citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA) se midió la capacidad de las células P-gp positivas, de expulsar el contenido intracitoplasmático de la Rho-123 (pérdida de la fluorescencia), ó su acumulación secundaria al uso de Ciclosporina A (CyA), un conocido bloqueante cálcico que es a su vez inhibidor de P-gp. Para ello se utilizó el método recomendado por Preet y Col (Preet M et al, 1991) con algunas modificaciones. Se incubaron 1×10^6 células en cultivo con 150 ng mL^{-1} de Rho-123 por 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Después de dos lavados con PBS frío, las células fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 y suero fetal bovino al 10% por 3 horas. Se tomaron tres alícuotas y se las incubó de la siguiente manera:

- 1- a 37°C (control positivo)
- 2- a 4°C (control negativo / inhibición por frío)
- 3- a 37°C con CyA ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Control negativo / inhibición farmacológica).

Por último las células fueron incubadas con $4 \mu\text{l}$ de 7-amino-actinomicina-D (7-AAD) por 30 minutos a 4°C , para evaluar cantidad de células muertas. Las células fueron

analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA) a 520-534 nm [EM] para Rho-123, y 630-650 nm [EM] para 7-AAD. Se usaron células sin tratar con Rho-123 como control basal de posible autofluorescencia espontánea de las células K562. Todas las mediciones, fueron realizadas al mismo tiempo "0" de incubación, y evaluadas como intensidad de fluorescencia media de cada alícuota (IFM). La IFM con Rho-123 fue calculada de acuerdo a la siguiente Fórmula (Consoli U et al, 2002):

$$\text{IFM con CyA} - \text{IFM sin CyA} / \text{IFM con CyA} \times 100$$

3.2.2 ENSAYOS DE APOPTOSIS CELULAR EN K562

La viabilidad celular y la apoptosis fueron medidas por fluorescencia, haciendo una tinción con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio, en un medio buffer de sales de fosfatos. Se tomaron 1 μl de la mezcla colorante (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de naranja de acridina y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de bromuro de etidio en PBS), con 25 μl de la suspensión celular (1×10^6), en un tubo eppendorf, y se homogeneizaron suavemente. Se colocaron 10 μl de la mezcla sobre un portaobjeto de vidrio y se examinaron al menos 200 células con un objetivo seco de 40X, usando una combinación apropiada de filtros. Se evaluó por microscopia de fluorescencia la pérdida de estructura nuclear ó la fragmentación de los núcleos mediante el índice celular apoptótico, a través de dos operadores diferentes, y se realizaron al menos cinco ensayos independientes. Las células fueron clasificadas de acuerdo a criterios morfológicos descriptos previamente (Mishell et al, 1980), y categorizadas según se detalla:

- a) Células viables con núcleos normales (cromatina verde brillante, estructura organizada)
- b) Células viables con núcleos apoptóticos (cromatina verde brillante, altamente condensados ó fragmentados)
- c) Células no viables con núcleos apoptóticos (cromatina verde brillante, condensados ó fragmentados)
- d) Células no viables con núcleos normales (cromatina naranja brillante, con estructura organizada).

Este patrón de caracterización celular (viables y no viables) fue utilizado para establecer la eficacia del tratamiento de las células con Imatinib, o con Imatinib + ciclosporina, a concentraciones de CyA iguales a las que inhibieron la funcionalidad de la P-gp, medidas por la prueba de Rho-123, descrito en el punto 2.1.

Se midió en primer término la tasa de inicio de apoptosis espontánea (libre de cualquier tratamiento). Se consideró el porcentaje (%) de células viables con núcleos apoptóticos (grupo b), como el índice indicador del “*inicio reciente de la muerte programada*”, y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Índice apoptótico} = \frac{\text{Número total de células viables con núcleo apoptótico}}{\text{Número total de células (a+b+c+d)}}$$

El número total de células no viables fue calculado como: c+d.

3.2.3 ENSAYO DE INIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB

Para los ensayos de inducción de apoptosis se tomaron 1×10^6 cel/ml de la línea celular cultivadas por 24 horas a 37°C en estufa gaseada con CO₂ al 5%, con los siguientes tratamientos:

- a) Solución Buffer (control)
- b) IMATINIB a las siguientes dosis.

*b1- Imatinib 2μM**

b2- Imatinib 20μM .

b3- Imatinib 100μM

b4- Imatinib 200μM

* *Esta dosis produce el IC50, medida por ensayos de MTT (Vellón L et al, 2005).*

Al cabo de las 24 horas, las células fueron lavadas con PBS, e incubadas en volúmenes iguales con azul tripan, para medir la viabilidad celular de cada ensayo. Se tomaron 20μl de cada suspensión y se agregó 10 μl de mezcla de bromuro de etidio, naranja de acridina como fue previamente descrito en el ítem 2.2.

3.2.4 ENSAYO DE INIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB MÁS UN INHIBIDOR DE P-GP (CICLOSPORINA A)

Repitiendo las condiciones generales (ítem 3), 1×10^6 cel/ml fueron cultivadas con los siguientes tratamientos:

a-CyA sola (3 ug ml^{-1}) acorde a protocolos previamente descriptos (Loofer et al, 2002; FU Jianxin et al, 2000).

b- Imatinib + CyA (3 ug ml^{-1}): se incubaron por 24 y 72 horas.

La dosis de inhibidor de TK, se obtuvieron de la siguiente manera: a partir de una dosis comercial de mono droga de 400 mg, se preparó una solución Stock de 1 mM de Imatinib.

Para los experimentos realizados con la dosis de CyA de 3 ug ml^{-1} , se preparó una solución stock de CyA a partir de una ampolla de cc 50 mg/ml de ciclosporina A de uso comercial, y diluída 1/100 con H_2O estéril.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE III

ESTUDIO EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (BCR-ABL1 +)

La serie de pacientes estudiados, está conformado por individuos de población caucásica, residentes en nuestro país, que asisten tanto al Centro de referencia en el Diagnóstico y tratamiento de la LMC del Hospital General de Agudos Ramos Mejía, como del Hospital de Clínicas José de San Martín. Todos los pacientes firmaron un Consentimiento Informado, según la última versión de la Declaración de Helsinki (Helsinki, 1964 AMM). Durante el desarrollo de este protocolo se consideraron los lineamientos generales de la ética de la investigación en concordancia con el documento de 1982 *Proposed International Guidelines for Biomedical Research involving Human Subjects* (Propuesta de Pautas Internacionales para la investigación Biomédica en seres Humanos), y las *International Ethical Guidelines for Biomedical Research involving Human Subjects* (Pautas éticas internacionales para la investigación Biomédica en seres Humanos)(OMS) (CIOMS,1993).

3.3.1 RT-PCR PARA BCR-AB1L (ESTUDIO SEMICUANTITATIVO)

La cuantificación de los transcritos de BCR-ABL, fueron realizados acorde a criterios de las normas internacionales y a las Normas de Diagnóstico y Tratamiento para LMC, recomendadas por la Sociedad Argentina de Hematología (Riveros D ,2011) y siguiendo la misma metodología antes descripta. Dichos estudios, forman parte del protocolo habitual de diagnóstico y tratamiento de la LMC en dichos centros. Sus resultados fueron debidamente incorporados a las historias clínicas de cada paciente, e incluidos en el presente trabajo como datos de control y clasificación de la respuesta terapéutica, para su correlación con los haplotipos en estudio.

3.3.2 BREVE DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO qRT-PCR PARA BCR-ABL-1 (CUANTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL)

La cuantificación de los transcritos BCR-ABL1 en SP y MO se realizaron por la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando la metodología según el Laboratorio a donde se derivó el estudio de acuerdo al protocolo. La expresión del gen BCR-ABL1 en cada paciente se normalizo con respecto al nivel del *housekeeping* (ABL1), seleccionado como gen control y se expreso como porcentaje del mismo. Con la finalidad de unificar los métodos de la PCR cuantitativa con la metodología usada en diferentes países, el Grupo Latinoamericano de estandarización de qRT-PCR (LATAM QRT-PCR Group), estableció un factor de conversión a través del aporte de diferentes centros de referencia que permite comparar los resultados.

Los valores obtenidos en distintos momentos de la evolución clinico-terapéutica se clasifican según el siguiente esquema:

CLASIFICACIÓN CUANTITATIVA SEGÚN CARGA DE BCR-ABL1

Cuantificación de BCR-ABL1 en la respuesta terapéutica de PACIENTES CON LMC

<i>BCR-ABL1 / ABL1 (%)</i>	<i>Reducción de la carga de transcritos post tratamiento</i>	<i>Significado clínico</i>
$\leq 0,01 \%$	$\longrightarrow \geq 4 \text{ Log}$	Respuesta Molecular Completa RMC
0,01 - 0,1 %	$\longrightarrow > 3 \text{ Log}$	Respuesta Molecular Mayor RMMa
0,1 - 1%	$\longrightarrow \geq 2 \text{ Log}$	Respuesta Molecular Mínima RMMin
1 - 10%	$\longrightarrow > 1 \text{ Log}$	Respuesta Molecular Nula RMN
> 10	$\longleftarrow < 1 \text{ Log}$	

Cuadro 1 Cuantificación Log de transcritos de BCR-ABL1 en pacientes con LMC, según respuesta Molecular (Modificado de Baccarani, 2009)

Debido a que actualmente se considera que aún en una RMC se pueden detectar transcritos del gen BCR-ABL1 dependiendo del método empleado, se aconseja agregar el grado de concentración de los transcritos detectados (como profundidad de la sensibilidad alcanzada), y utilizar la denominación “*respuesta molecular*”, estableciendo los límites en Escala Internacional (**EI**). Así, en la EI se establecen nuevos niveles de reducción de transcritos de BCR-ABL1 y que corresponden a RMMayor denominada (Cross et al, 2012).

- I. RM^{4.0}, con una reducción $\geq 4,0$ logaritmos
- II. RM^{4.5} con una reducción $\geq 4,5$ log
- III. RM^{5.0} con una reducción ≥ 5.0 log

3.3.3 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1

La extracción de ADN, se realizó a partir de sangre entera recogida sobre EDTA, siguiendo el protocolo descrito en (Cap. 1). Para los polimorfismos del exón 12, 21 y 26 se siguió el protocolo descrito en Cap.1; 1.9. Los productos de amplificación fueron observados mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 2,0% en buffer TAE 1X, con 1,5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) y visualizados en un transiluminador UV. Las PCR alelo específicas que se realizaron para el exón 12, fueron validadas por secuenciación. Los productos de las PCR, fueron purificados y secuenciados en un Secuenciador: ABI3730XL, automático de ADN (Macrogen, Inc., Korea).

CONTROLES NORMALES

Se realizó el estudio de polimorfismos del gen MDR-1 en 25 sujetos sanos, donantes del Banco de Sangre del Hospital de Clínicas Jose de San Martin, con un rango de edad entre 22 y 54 años y de sexo Masculino. Todos prestaron su consentimiento informado por escrito. El ofrecimiento a participar en el presente estudio fue al azar de manera que se presume que los controles utilizados son representativos de la población de donantes habituales. Dichos consentimientos e Información para el Paciente fueron aprobados ante el Comité de Etica de cada INSTITUCIÓN y ante el Comité de Etica de la

FACULTAD de FARMACIA Y BIOQUIMICA, para ser utilizados en la presente investigación (Res-Expte 707848/07 y Res-Expte 07331900/2010, Cudap nro 731900/10.

ALMACENAMIENTO Y PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados fueron volcados en una base de datos (Microsoft Excel 97) y luego fueron analizados empleando el paquete estadístico (Medcalc 11.5 y VCCstat 2.0). Para todas las variables se estableció su distribución de frecuencias y/o porcentajes en relación con el total de casos. Para aquellas medidas en escala ordinal o superior, se computaron las siguientes estadísticas: número de casos, valor mínimo hallado, valor máximo hallado, mediana, media aritmética, desvío típico y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC95). Cuando fue necesario se realizaron como pruebas de significación (Test de Mann Whitney, Test de Fisher, Chi cuadrado) y se estimó la probabilidad Bayesiana de los eventos relacionados con la respuesta citogenética y molecular. El nivel de significación se estableció en alfa 0.05. Los Test de sobrevivencia libre de eventos de Menten-Kaplow no se aplicaron, se analizaron los tiempos de respuestas obtenidas bajo los diferentes tratamientos de acuerdo a los Protocolos Internacionales entre los 3 meses y los 18 meses de seguimiento. Se uso el Modelo predictor de Homocigosis sobre la base de la Distribución Hardy-Weinberg. Se calculo el Odds ratio a partir de los datos de frecuencia para cada genotipo y el Riesgo relativo (RR) de desarrollo de enfermedad a partir de los genotipos obtenidos de los sujetos sanos y enfermos (SPSS).

CAPITULO 4
RESULTADOS
PARTE I

ESTUDIO IN VITRO DE LA LÍNEA CELULAR K562

4.1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA LÍNEA CELULAR K562

Las características morfológicas que presentan las células K562, en cultivo, muestra que las mismas tienen una moderada y variable relación núcleo/citoplasma, tal como se describe en las células hematopoyéticas poco diferenciadas. Esta Línea celular además presenta una importante vacuolización y basofilia citoplasmática (Figura R- I 24).

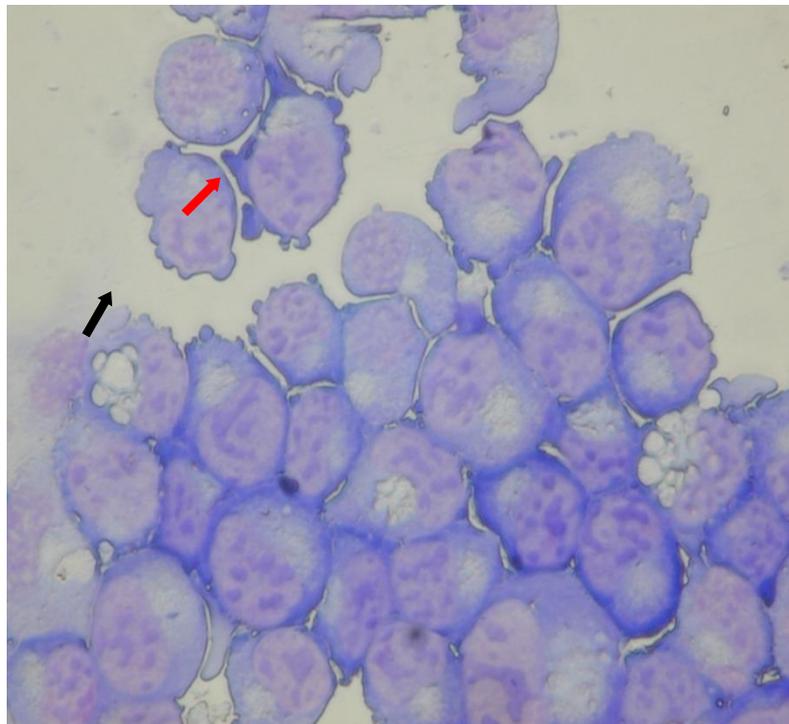
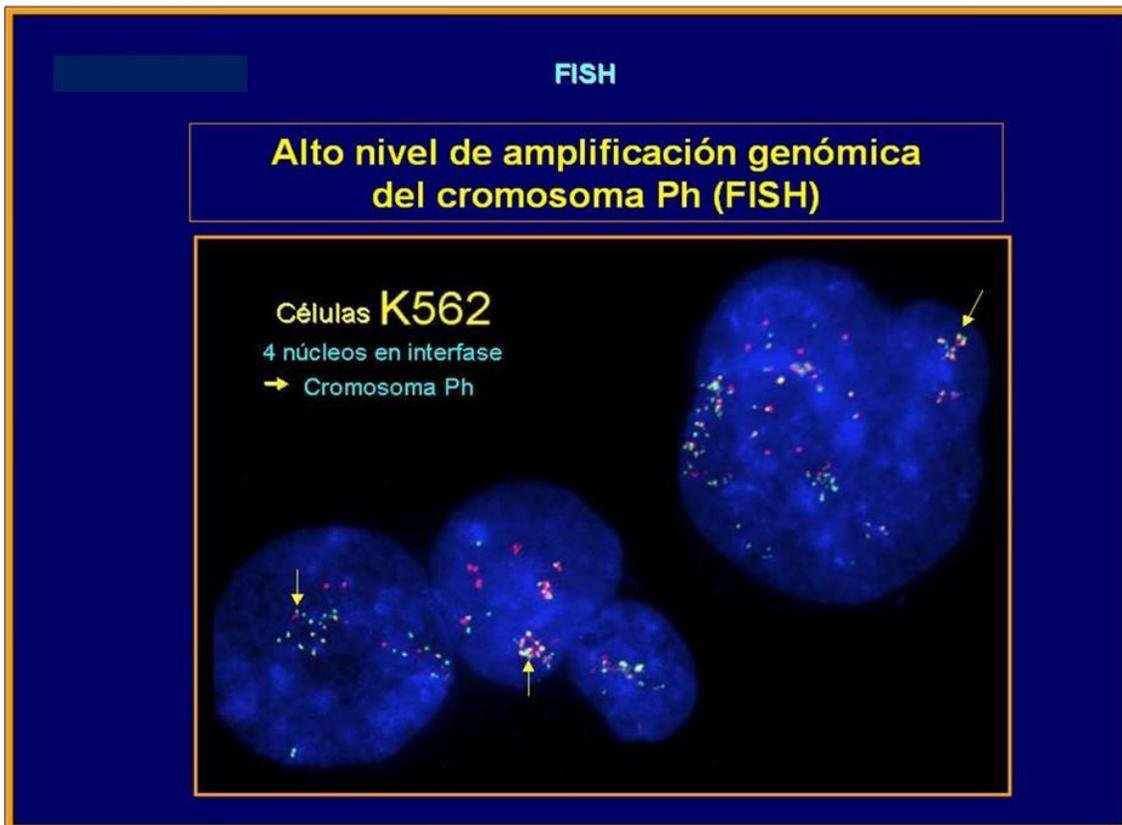


Figura R-I 24: Microfotografía de citopreparados de la Línea K562, teñidas con MGG, (Magnificación 40X; → vacuolización; → basofilia)

4.1.2 FISH

El análisis de FISH de la línea celular mostró una amplificación del gen BCR-ABL1, donde se observaron entre 15 a 20 señales de fusión en el 95% de los núcleos en interfase observados (Figura R- I 25).



FiguraR-I 25: Micrografía de FISH. Muestra 4 (cuatro) núcleos en interfase de las células K562. En cada uno de ellos se puede observar el alto nivel de amplificación del gen BCR-ABL1, cuyas señales están indicadas por las flechas amarillas.

4.1.3 MUTACIONES EN LA PROTEÍNA BCR-ABL

La línea celular K562, no presentó las mutaciones más comunes de la TK en los exones estudiados (4 al 7), por lo cual el mecanismo de farmacorresistencia al Imatinib observado en estas células, no sería imputable a este tipo de cambios farmacodinámicos. Si bien existen otras mutaciones no analizadas en este trabajo, las mismas se encuentran en un porcentaje muy bajo de casos.

4.1.4 CITOMETRÍA DE FLUJO

La caracterización del Fenotipo de la Línea celular se realizó sobre un total de 76% de células en cultivo correspondiente a las células viables. Se obtuvieron los siguientes resultados para los diferentes paneles de anticuerpos monoclonales empleados (ver Tabla R-I 8). En las (Figuras R-I 26 y 27) se muestran los histogramas de la citometría de flujo para la población marcada con GLYA y la distribución del panel mieloide (Ver archivo digital adjunto: Carpeta "Citometría") (ANEXO I)

Linaje Mieloide (%)	Linaje Linfoide T (%)	Linaje Linfoide B (%)	Diferenciación Eritroide (%)
CD45 ⁺⁺ (94,9%).	CD3 ⁻ (2,54%);	CD2 ⁻ (0,65%).	GlyA ⁺⁺ (93,9%);
HLA-DR ⁻ (7,55%)	CD4 ⁻ (0,93%)	CD10 ⁺ (60,9%);	CD11c ^{-/+} (34,9%);
CD34 ^{low/-} (0,49%)	CD8 ⁻ (3,20%).	CD19 ⁻ (0,73%),	CD16 ⁻ (6,59%).
CD117 ^{-/+} (17,2%)			
CD7 ⁻ (7,95%)			
CD56 ⁻ (1,63%)			
CD15 ^{-/+} (39,1%)			
CD14 ⁻ (7,95%)			
CD61 ⁺ (39,4%)			

Tabla R-I 8 Porcentaje de células positivas, acorde a cada Linaje estudiado con los correspondientes anticuerpos monoclonales en la Línea K562

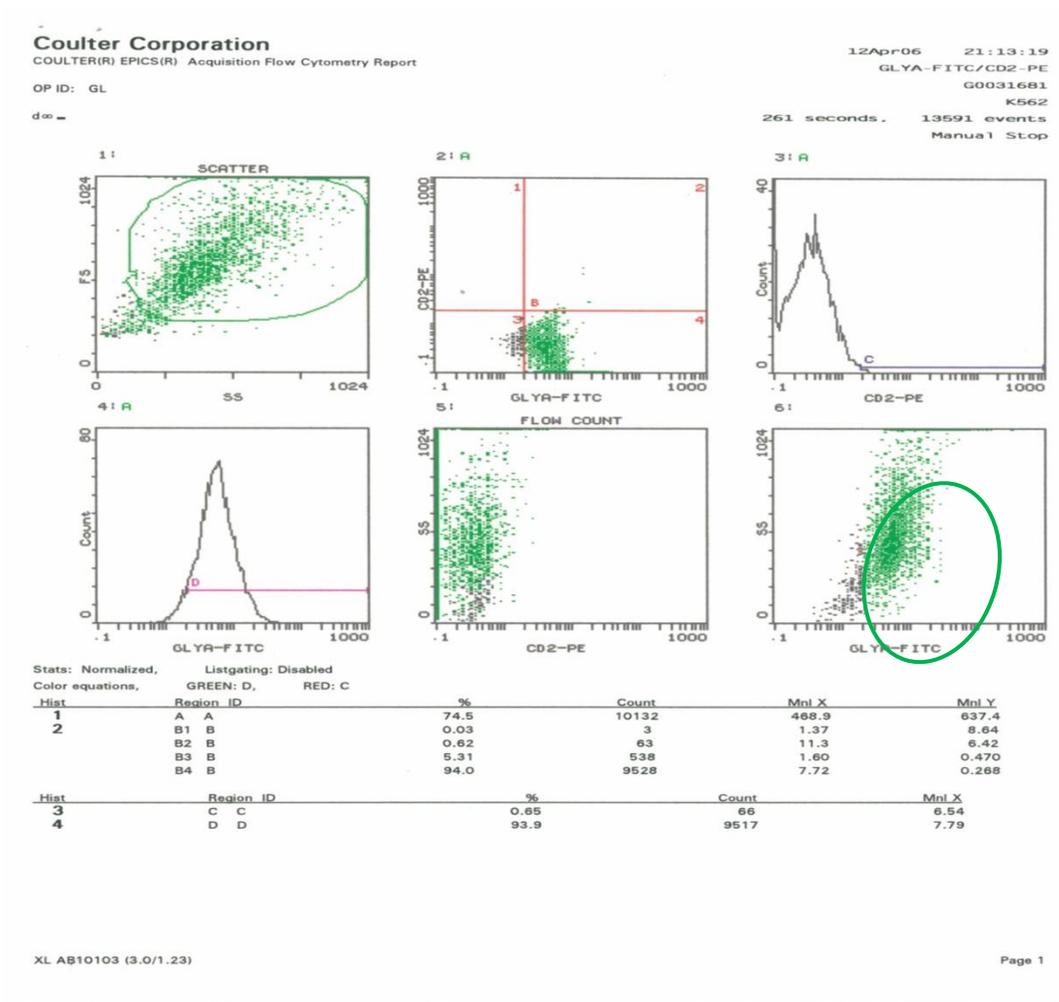


Figura R-I 26: Los Histogramas de fluorescencia de la citometría de flujo muestran positividad para GLYA de fuerte intensidad, indicando un linje de diferenciación eritroide en esta línea celular

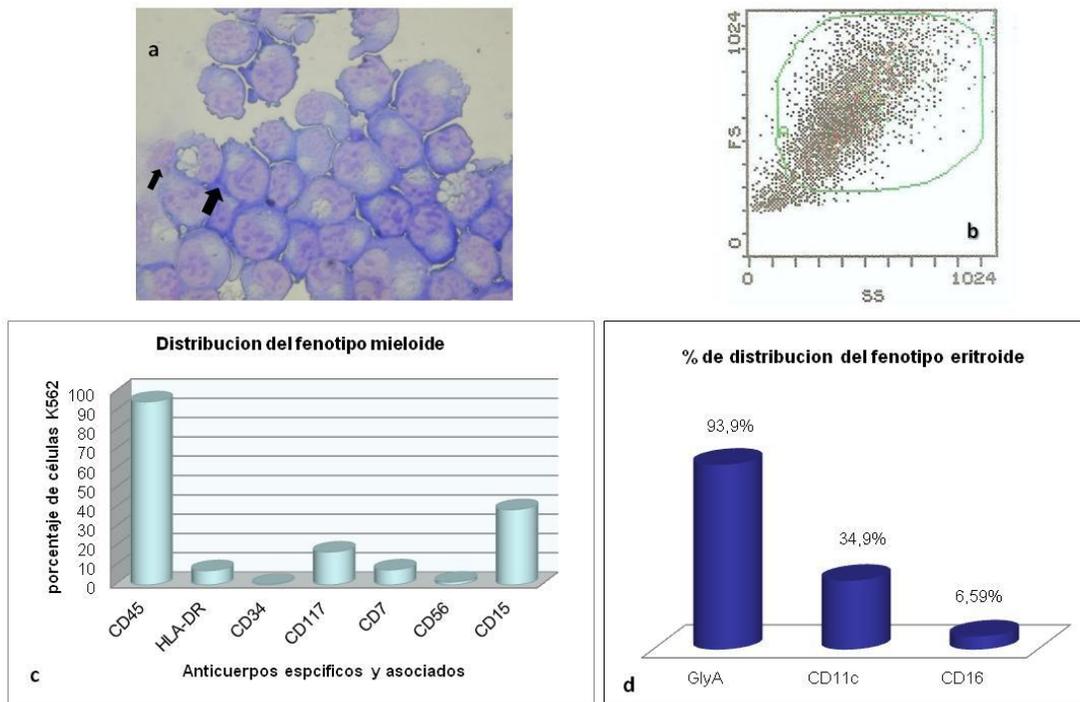


Figura R-I 27: a) Coloración (MGG) de un preparado por citospin de células K562 en cultivo; b) Ventana de células viables seleccionadas para el análisis del inmunofenotipo celular, c) distribución del panel mioide según porcentajes y d) % de IFM para el panel de anticuerpos eritroides

4.1.5 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P-gp Y BCRP POR INMUNOHISTOQUÍMICA

El estudio realizado para demostrar la presencia de la glicoproteína P-gp en la línea celular mostró, una fuerte expresión con el anticuerpo monoclonal C494, tanto en el área de la membrana plasmática como en el interior citoplasmático (Figura R-I 28). Los controles positivos (cortes de tejido de riñón) revelaron para este anticuerpo una fuerte localización de la P-gp en las zonas apical y de los túbulos renales (Figura R-I 29). Sin embargo con el anticuerpo C219 la expresión en la Línea celular fue notoriamente más débil en la membrana plasmática, comparado con el resultado mostrado con el anticuerpo C494 (dato no mostrado).

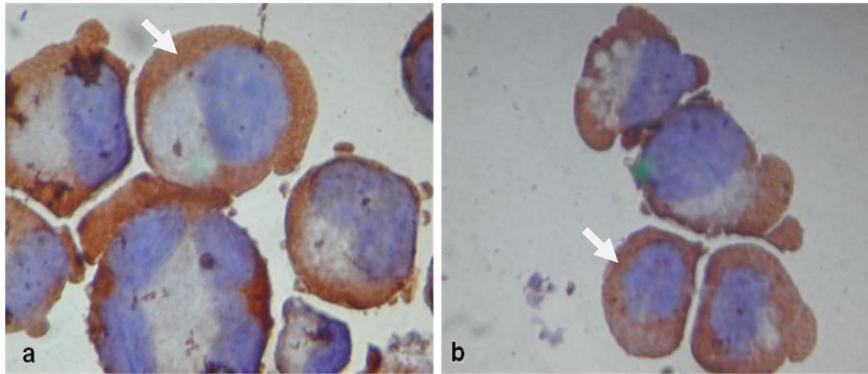


Figura R-I 28. Reacción inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal C494, para la proteína P-gp, en la Línea K562. a: Magnificación 100X; b: Magnificación 40X.

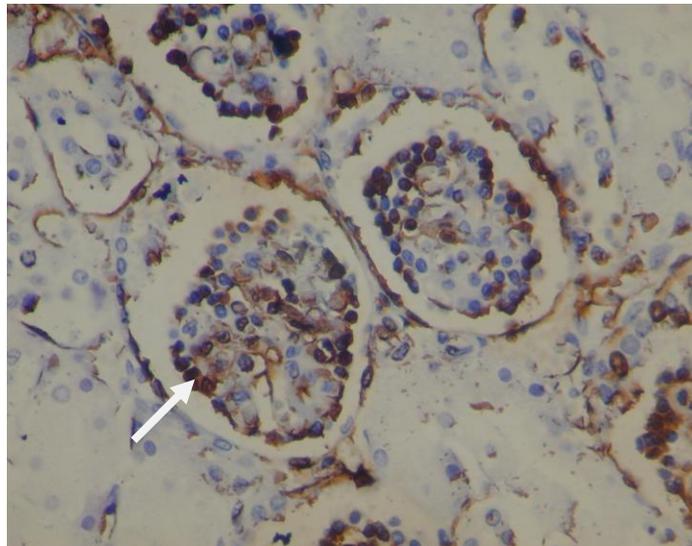


Figura R-I 29. Reacción inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal C494, para la proteína P-gp, en un corte de tejido de Riñón. Se puede observar la positividad en las zonas apical y en los túbulos. (Magnificación 40X)

Para la expresión de la proteína BCRP, el anticuerpo BXP-21 mostró una débil expresión sobre la membrana plasmática, en un bajo porcentaje de las células K562 (dato no mostrado).

4.1.6 RT- PCR DE LOS GENES MDR-1 Y BCR-ABL1 EN K562

Cuando se realizó la RT-PCR de los genes MDR-1 y BCR-ABL1, se pudo observar dos bandas, ambas con un PM de 200pb. La banda que correspondió al gen BCR-ABL1 fue mucho más intensa que la observada para el gen MDR-1 (Figura R-I 30).

RT-PCR DEL GEN MDR-1 EN LA LÍNEA K562/VIN:

La expresión del gen MDR-1, fue evaluada en las células K562 (wt) y K562/vinc, observándose una banda de 200pb, de mayor intensidad en las células K562/vinc (Figura R-I 30b) que en las K562 (wt) (Figura R-I 30a). Ambas corridas fueron realizadas en iguales condiciones. Obsérvese las bandas correspondientes a BCR-ABL1 y al gen de control GAPDH (Figura R-I 30a).

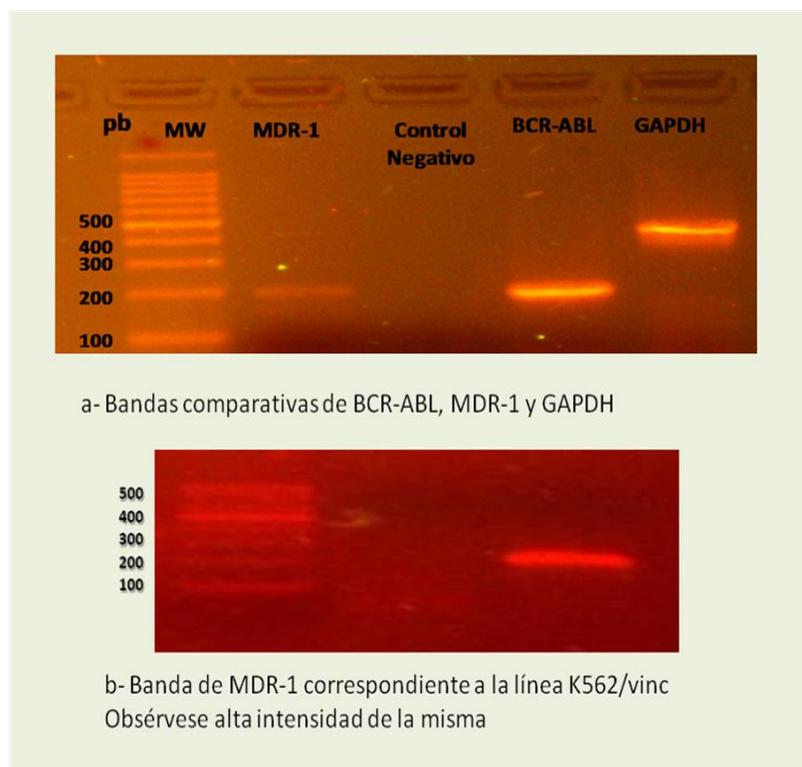


Figura R-I 30. Resultados de la amplificación del gen MDR-1 y BCR-ABL1 en la Línea K562.. El producto de ambos genes es de 200pb. Se usó como control interno el gen GAPDH, de 450pb. Las figuras a y b muestran la diferente expresión del gen MDR-1 en la líne K562 wt y la línea K562/vinc. Si bien los gels son independientes, las condiciones de su desarrollo fueron idénticas y simultáneas.

4.1.7 qRT-PCR PARA EL GEN MDR-1 EN K562

La Línea K562 (wt) estudiada, presentó una carga de transcritos del gen MDR-1 del orden de 14,7 copias/ng ARN (variabilidad intra-ensayo de 10^{-6}), con una T° de melting específica de 85,43°C (Figura R-I 31). Lo cual difiere a lo previamente descrito para la carga de transcritos del gen BCR-ABL1 (para 2,5 ng de ARN) que fue de 123,96 copias/ng ARN (sensibilidad intra-ensayo 10^{-5} , con una T° de melting de 85,6°C)(Gutierrez M et al, 2005).

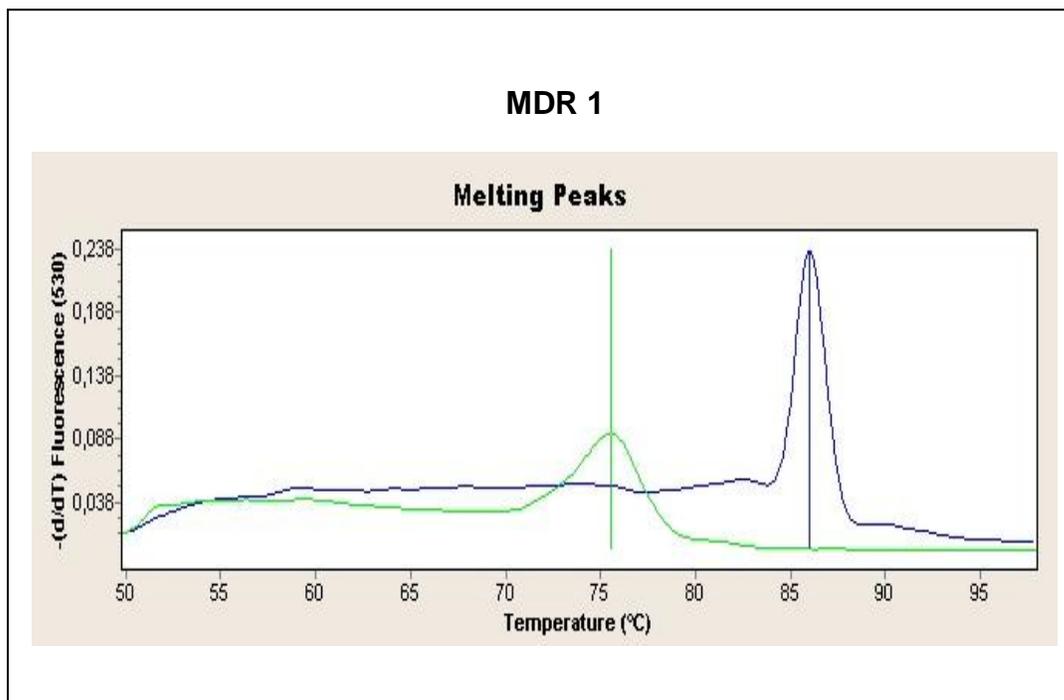


Figura R-I 31 Curvas de Melting (T°) del gen MDR-1 en línea K562, 85,4°C

4.1.8 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1

POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1 CORRESPONDIENTES A LOS EXONES 12(C1236T), 21(G2677T/A) Y 26(C3435T)

Un primer estudio por PCR, mostró que el polimorfismo en el exón 12 dio como resultado la expresión de un solo alelo C, indicando una variante *wild type* homocigota CC (C1236C) (Figura R-I 32). Dicho resultado fue validado por técnica de secuenciación

directa. Para los exones 21 y 26, se procedió al estudio de secuenciación directa. En los mismos se detectó un genotipo variante homocigota GG (G2677G) para el exón 21, y para el exón 26, una variante homocigota TT (T3435T) mutada. Teniendo en cuenta todos estos datos juntos, el haplotipo de la línea celular correspondiente a los exones "12/21/26" resultó: "CC/GG/TT" (Ver archivo digital de secuenciación adjunto).

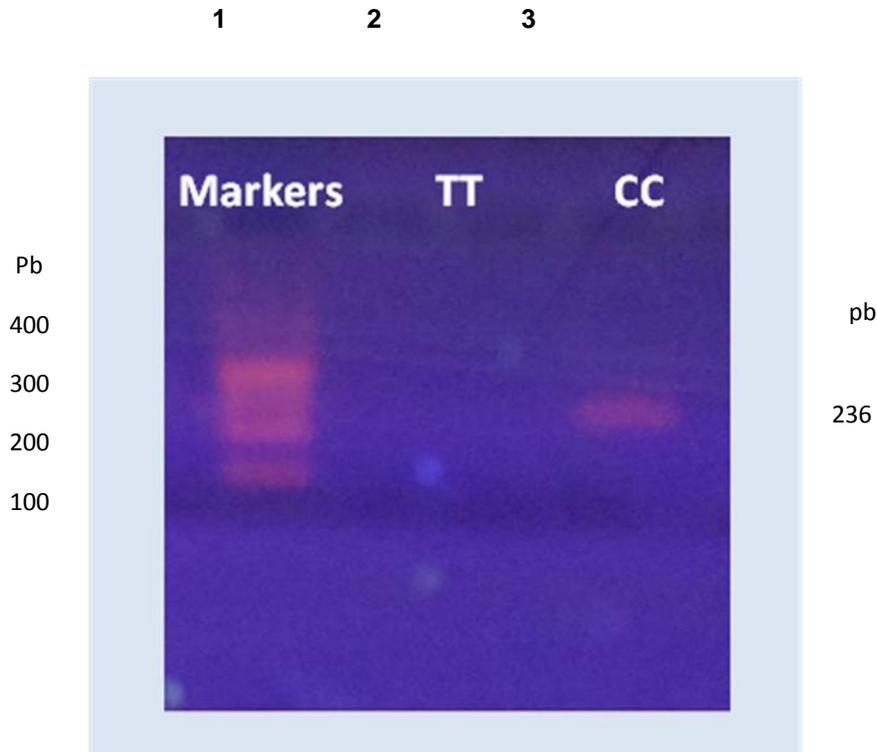


Figura R-I 32 Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se observaron las PCR alelo específicas para los genotipos C y T del Exon 12 en la línea celular K562. Calle 1 marcador de peso molecular de 100pb; calle 2 negativo para T calle 3 positivo para C, la presencia de una única banda corresponde al alelo CC.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

PARTE II

ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR EN LA LÍNEA K562

4.2.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA P-GP EN LA LÍNEA K562

PRUEBA FUNCIONAL CON Rho- 123

En un Citometro de flujo se seleccionó un área de mayor intensidad de células K562 viables (R1) (Figura R-II 33.a) y se analizaron al menos 15.000 eventos (Figura R-II 33.b). La intensidad de fluorescencia media (IFM) en las células K562 a 37°C fue de $\bar{x} = 386$ (Control positivo de actividad de P-gp) y en las células tratadas con CyA ($3\mu\text{g ml}^{-1}$) a 37°C fue de $\bar{x} = 583$. Cuando las células fueron incubadas a 4°C sin CyA, la IFM fue $\bar{x} = 638$ (control negativo ó de P-gp inhibida) (Tabla R-II 9) (Figura R-II 34). Se aplicó un test de t para muestras no apareadas (**t-test**, Mann-Withney), en todos los experimentos realizados con los distintos tratamientos obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,008$) entre las muestras no inhibidas respecto a las tratadas con CyA o Frio. El análisis fue realizado usando un software *Prism* (Graph Pad, San Diego, CA, USA; se consideró estadísticamente significativo con una $p < 0,05$).

Teniendo en cuenta los valores de Intensidad de Fluorescencias Medias (IFM) obtenidos en las tres condiciones, podemos hacer el cálculo de capacidad inhibitoria de la CyA:

IFM (4°C)- IFM (37°C) = 252 corresponde al 100% de inhibición

IFM (CyA)- IFM (37°C)= 197 corresponde al 78% de inhibición

Tratamientos	IFM
K562 sin Tratamiento	386
K562 con CyA a 37°C	583 ^{p<0,008}
K562 sin CyA a 4°C	638 ^{p<0,008}

Tabla R-II 9: Condiciones de tratamiento de las Células K562 e intensidad de fluorescencias detectadas (IFM) de Rho-123.

Estos datos podrían permitir establecer las condiciones farmacológicas de inhibición de la bomba, aumentar las concentraciones intracelulares de Imatinib, incrementar su acción represora del crecimiento celular, y revertir la farmacoresistencia mediada por P-gp.

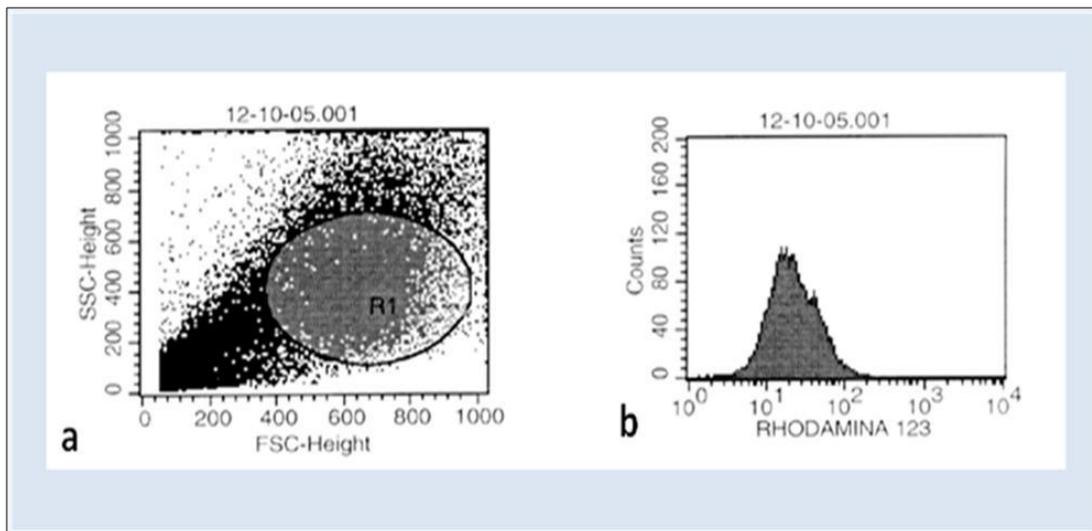


Figura R-II 33: En el gráfico a, se puede observar el área de selección de la población K562 viable, y en b el histograma correspondiente al área de fluorescencia para la Rho-123, de la población celular estudiada. El área a partir de un log 10¹ muestra la intensidad de fluorescencia de Rho 123

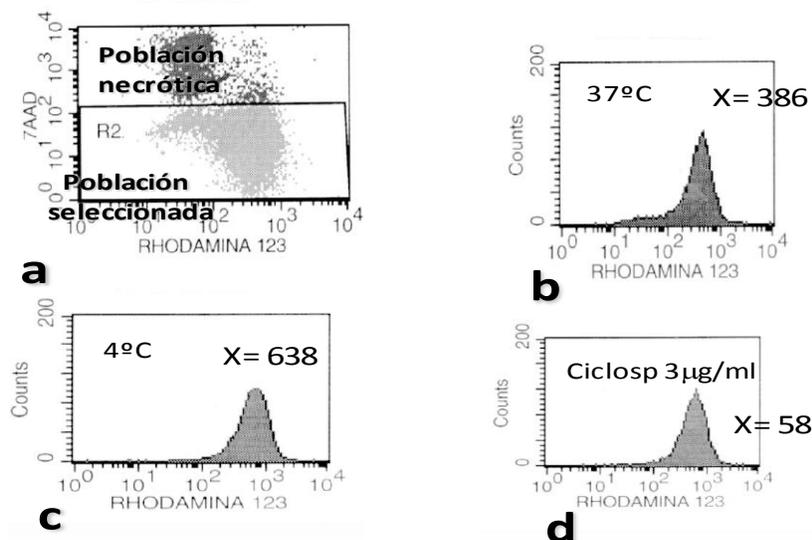


Figura R-II 34: Prueba funcional de la actividad de la P-gp en la Línea celular K562, con Rho-123. **a:** Se observa el área R2 correspondiente a las células viables en estudio; **b:** se muestra el área de intensidad de fluorescencia para la Rho-123 a 37°C y sin CyA; **c:** incubación a 4°C; y **d:** incubación a 37°C con CyA (3 $\mu\text{g ml}^{-1}$)

4.2.2 ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB (STI571)

a) *Imatinib* a concentraciones crecientes en μM : 20, 100 y 200 evaluadas a 24 horas de cultivo con la droga.

El porcentaje de núcleos apoptóticos en los cultivos a 24 hs, con concentraciones crecientes del inhibidor de TK, mostró una diferencia significativa ($p < 0,008^*$) de todas las concentraciones respecto al basal. A su vez, la diferencia fue también significativa entre las concentraciones 20, 100 y 200 μM respecto a la concentración mínima de 2 μM (Tabla R-II 10).

TRATAMIENTO CON UN ITK EN CONCENTRACIONES CRECIENTES	%DE NÚCLEOS APOPTÓTICOS EN 24 HORAS
Basal (sin Tratamiento)	1,7±0,9
STI 571 2µM	7,21±1,9 p<0,008*
STI 571 20µM	21,4±1,29 p<0,008*
STI 571 100µM	18,9±1,62 p<0,008*
STI 571 200µM	20,8±0,42 p<0,008*

Tabla R-II 10 Porcentaje de núcleos apoptóticos en las células K562, tratadas con diferentes concentraciones de Imatinib (STI 571), en cultivo por 24 horas.

4.2.3 ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR CON IMATINIB + CYA COMO INHIBIDOR DE P-gP EVALUADO A 24 HORAS DE CULTIVO

El cultivo por 24 horas de las células K562 tratadas con imatinib (STI 571) a 2µM + CyA (3µg ml⁻¹), mostró un aumento significativo en el porcentaje de células VNA (20,79±1,5%)(*p<0,01), en comparación al cultivo de las células tratadas solamente con imatinib a igual concentración (7,21±1,9 %), ó con CyA (2,40±1,5%) sin Imatinib. Estos dos últimos tratamientos a su vez mostraron diferencia significativa cuando se los comparó entre sí (*p<0,01)(Tabla R-II 11)(Figura R-II 35).

TRATAMIENTO CON UN ITK + CyA EN DOSIS ÚNICAS	%DE NÚCLEOS APOPTÓTICOS EN 24 HORAS
Basal (sin Tratamiento)	1,7±0,9
STI 571 2µM	7,21±1,9 p<0,008*
CyA 3µg ml ⁻¹	2,40±1,5
STI 571 2µM + CyA 3µg ml ⁻¹	21,4±1,29 p<0,008*

Tabla R-II 11 Porcentaje de VNA, en las células K562 con los diferentes tratamientos, en cultivo por 24 horas

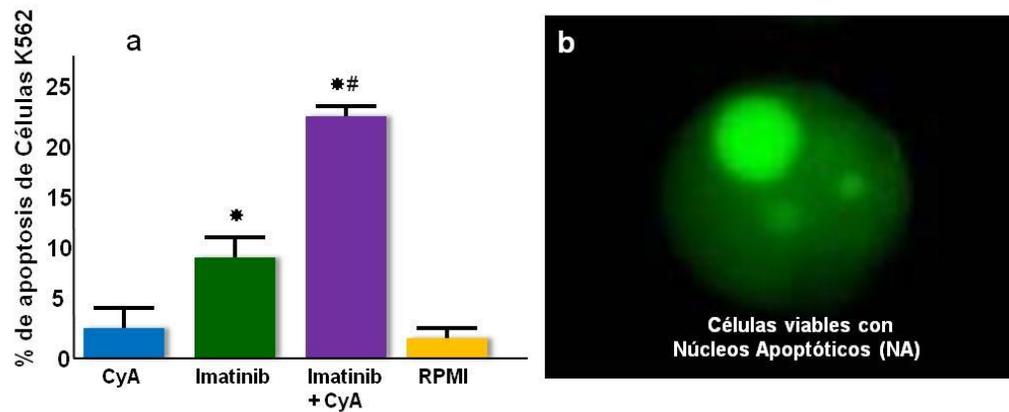


Figura R-II 35: a) Porcentaje de células K562 viables con núcleos apoptóticos (NA), según los diferentes tratamientos por 24 horas. (* $p < 0,008$ vs control con RPMI; # $p < 0,008$ vs CyA o Imatinib) b) se muestra un núcleo apoptótico de una célula viable, con fluorescencia positiva (bromuro de etidio). Magnificado en 40X.

CULTIVOS A 24 Y 72 HORAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS

a) El porcentaje de células K562 viables con núcleos apoptóticos (VNA), fue analizado a 24 ■ y 72 ■ horas de cultivo, y mostró diferencias significativas con los tratamientos según se indica:

a- Imatinib (2 μ M) vs Control (* $p < 0,008$).

b- Imatinib (2 μ M) + CyA (3 μ g ml^{-1}) vs Control (* $p < 0,008$).

c- Imatinib (2 μ M) vs Imatinib (2 μ M) + CyA a (3 μ g ml^{-1}) ($p < 0,008$) (Figura R-II 36)

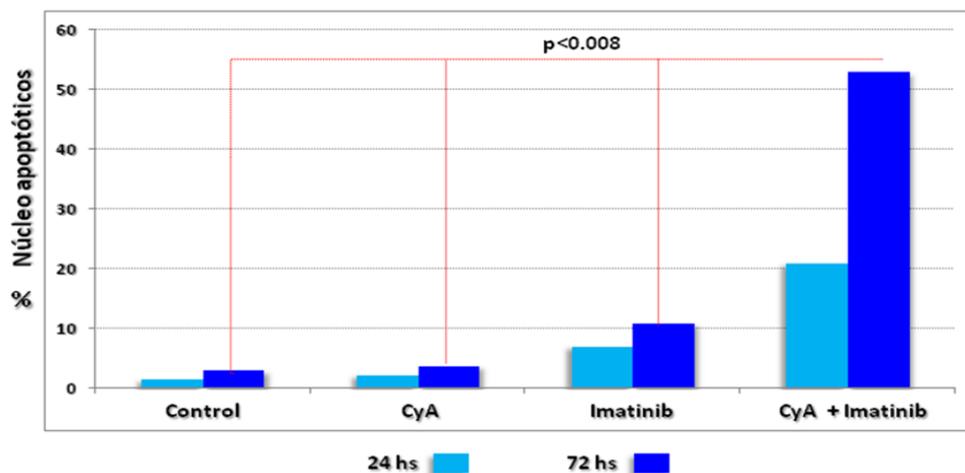


Figura R-II 36 Porcentaje de apoptosis en células K562, cultivadas por 24 y 72 horas con diferentes tratamientos, la significación estadística $p < 0,008$.

b) El porcentaje de células K562 viables con núcleos apoptóticos (VNA), fue analizado a 24 ■ y 72 ■ horas de cultivo, y mostró diferencias significativas (* $p < 0,008$) con los tratamientos según se indica en la Tabla R-II 12 (Figura R-II 37):

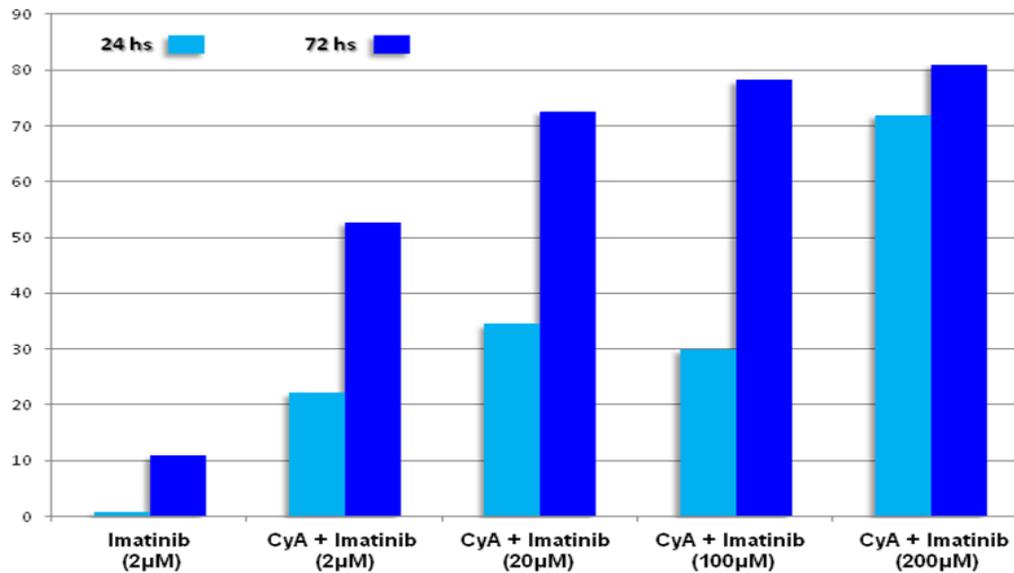


Figura R-II 37: Porcentaje de apoptosis en células K562, cultivadas por 24 y 72 horas en presencia de CyA y concentraciones crecientes de Imatinib, la significación estadística $p < 0.008$.

CAPITULO 4

RESULTADOS

PARTE III- ESTUDIO CLINICO

ESTUDIO EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (BCR-ABL1 POSITIVO)

4.3.1 RT-PCR para BCR-ABL1

Los pacientes incluidos en el presente trabajo, fueron diagnosticados de acuerdo a las Normas de Diagnóstico y Tratamiento para LMC, recomendadas por la Sociedad Argentina de Hematología (Riveros D ,2011), y en todos los casos se contaba con un estudio positivo de RT-PCR para el gen BCR-ABL1.

4.3.2 DISTRIBUCIÓN ETARIA Y DE GÉNERO

Se analizaron los datos de 24 pacientes, 13 varones (54,2%) y 11 mujeres (45,8%), con leucemia mieloide crónica (LMC) diagnosticados según la “*GUIA de DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE LMC, editado por LA SAH*” (Bellgoy L y col, 2013) [sah.org.a/docs/203-2304.s.a.h_GUIA 2013](http://sah.org.a/docs/203-2304.s.a.h_GUIA_2013)) y descrito en el punto 6.1. La mayoría de los casos se encontraba en fase crónica de la enfermedad (91,7%,) y sólo 2 casos en crisis blástica (8,3%). En la (Tabla R-III 12) se describen los promedios de edad según genero, no hallándose diferencias significativas (Mann Whitney (z)=0,81, p=0,4182).

Sexo	M (n=11)	V (n=13)
Edad Promedio	53	48
DE	15	17
Mediana	52	39
Mínimo	25	21
Máximo	76	75

Tabla R-III 12 Distribución de la población con LMC según edad y sexo

4.3.3: DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES CON LMC SEGÚN TRATAMIENTO, RIESGO SOKAL Y TIPO DE RESPUESTA

De los 22 pacientes en fase crónica, 2 (8,3%) habían recibido tratamiento previo con HU y 1 (4,1%) con Interferon- α (INF- α). Los tratamientos con diferentes inhibidores de TK fueron aplicados a distinto número de pacientes según se administrara Imatinib, Dasatinib o Nilotinib como únicos tratamientos de ITK o Dasatinib o Nilotinib como segunda línea post tratamiento con Imatinib. Un total de 17 pacientes recibieron inicialmente Imatinib, de los cuales 6 debieron rotar a ITK de segunda línea (Tabla R-III13) Los tiempos de seguimiento bajo esos esquemas terapéuticos y las dosis se describen en las (Tabla R-III14) y (Tabla R-III15).

Tratamientos actualmente indicados (*)	n	Porcentaje
Imatinib	11	45,6%
Nilotinib (post Imatinib)*	2	8,3%
Nilotinib	6	25,0%
Dasatinib (post Imatinib)*	4	16,7%
Dasatinib	1	4,2%

Tabla R-III 13 Distribución de frecuencias de los tratamientos con Imatinib, Dasatinib o Nilotinob solamente, ó con segundo ITK después del fracaso Imatinib. (*) 2 casos recibieron tratamiento inicial con Imatinib y luego con Nilotinib; 4 casos recibieron tratamiento inicial con Imatinib y luego Dasatinib.

Tiempo (meses)	Imatinib	Nilotinib	Dasatinib
N	17	8	5
Promedio	26	25	10
DE	23	24	15
Mediana	24	16	5
Mínimo	1	3	1
Máximo	76	76	36

Tabla R-III 14: Tiempo promedio bajo los distintos esquemas terapéuticos indicados.

Paciente	Edad	Sexo	Fase	Tratamiento	Dosis (mg/día)	Duración (meses)
1	39	M	FC	Imatinib	400	24
2	53	M	CB	Imatinib/Dasatinib	400/100	1
3	39	F	FC	Imatinib (+HU)	400	12
4	52	F	FC	INF/Imatinib/Dasatinib	400/100	8/12/5
5	34	M	CB	Imatinib/Nilotinib	400/400	6/10
6	38	M	FC	Imatinib	400	24
7	39	M	FC	Imatinib/Dasatinib	400/100	30/2
8	65	M	FC	Imatinib/Dasatinib	400/100/50	3/12
9	36	M	FC	Nilotinib	400	48
10	62	M	FC	Nilotinib	300	42
11	73	M	FC	Imatinib	400	65
12	75	M	FC	Dasatinib	100	36
13	75	F	FC	Imatinib	400	24
14	50	F	FC	Imatinib	800	60
15	48	F	FC	Nilotinib	300	24
16	53	F	FC	Imatinib	800	48
17	48	F	FC	Imatinib	400	14
18	76	F	FC	Imatinib	800	48
19	28	M	FC	Nilotinib	300	24
20	25	F	FC	Imatinib/Nilotinib	400/300	4/14
21	55	M	FC	Nilotinib	300	10
22	81	F	FC	Imatinib (+HU)	400	6
23	21	M	FC	Imatinib	400	12
24	60	F	FC	Nilotinib	300	6

Tabla R-III 15: Características de cada paciente según edad, sexo, tipo, dosis y tiempo de duración de cada tratamiento hasta el momento de cierre del presente trabajo.

RIESGO PRONÓSTICO (MODELO SOKAL)

En la Figura R-III 387 se describen las frecuencias halladas de las categorías pronósticas según el modelo Sokal, resultando de bajo riesgo en 7 casos (29.2%), intermedio en 7 (29.2%), alto en 6 (25%) y no evaluados en 4 (16.6%).

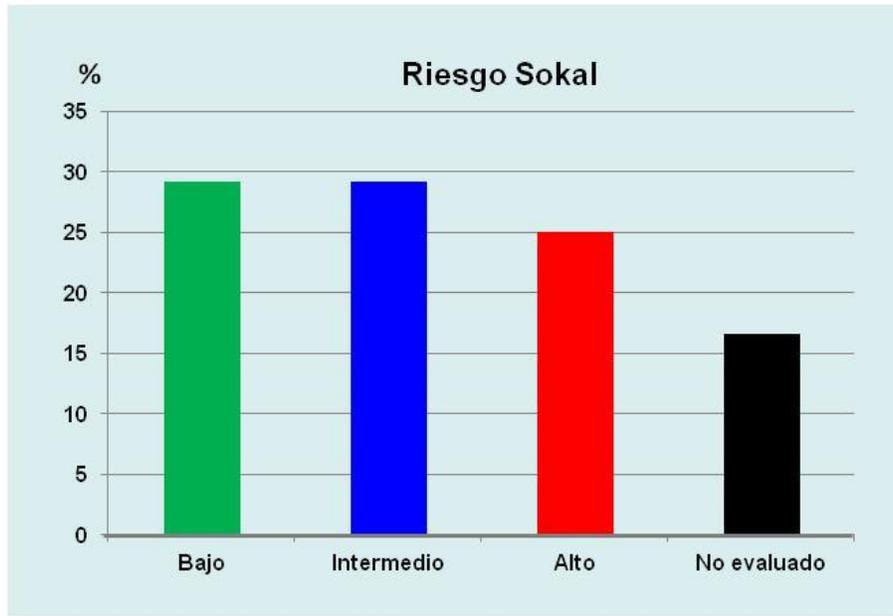


Figura R-III 38. No se observó diferencias en las frecuencias relativas de las categorías pronósticas según Modelo Sokal sobre 20 casos analizados. En 4 pacientes el riesgo sokal no fue evaluado (16,6%).

RESPUESTA HEMATOLÓGICA

En 21/24 casos (87,5%) se encontró respuesta Hematológica satisfactoria (Ausencia de blastos en sangre periférica con normalización del número de leucocitos y plaquetas).

RESPUESTAS CITOGENÉTICA

En 18/24 casos (75%) se encontró respuesta citogenética completa, 2 casos presentaron respuesta citogenética parcial (8,3%), y otros 4 (16,6%) mostraron una respuesta citogenética nula (pacientes 4; 5; 7; 8) (Tabla R-III 17).

De los 22 pacientes en Fase Cónica (FC), uno evolucionó hacia la Aplasia Medular, y otro desarrolló un Cáncer de Mama invasor de tipo tubular. Este último

paciente presentaba una variante citogenética compleja de su leucemia [46XX, t(3q2.5;9q3.4;22q1.1)]. Este tipo de variante se puede observar entre el 2-10% de los casos, y no modifica el valor pronóstico de la enfermedad, siendo similar al de la translocación clásica t (9;22)(q3.4;q1.1)(Steven Richebourg et al, 2008).

RESPUESTA MOLECULAR (qRT-PCR EN TIEMPO REAL PARA BCR-ABL1)

La cuantificación del gen BCR-ABL1 a diferentes tiempos del tratamiento en todos los pacientes, permitió clasificar la respuesta terapéutica medida a nivel molecular. Actualmente las RM se informan según los valores de referencia en Escala Internacional expresados como el cociente (%) BCR-ABL1/ABL, donde ABL es el gen control reconocido internacionalmente. Estos coeficientes son reportados en escala Logarítmica y en valor porcentual. De esta forma, una Respuesta Molecular (RM) puede discriminarse en las diferentes categorías antes descritas, donde una RMMayor corresponderá a valores $\leq 0,1\%$ (% BCR-ABL1/ABL), implicando una reducción \geq a 3 logs. (Cross et al, 2012)(Tabla R-III 16).

% BCR/ABL1	Red Log est	Respuesta Molecular	N° copias gen ABL1
$\leq 0,001\%$ o indetectable	≥ 5.0 log	RM 5.0	≥ 100.000
$\leq 0.0032\%$ o indetectable	≥ 4.5 log	RM 4.5	≥ 32.000
$\leq 0.01\%$ o indetectable	≥ 4.0 log	RM 4.0	≥ 10.000
$\leq 0.1-0.01\%$	≥ 3.0 log	RM Mayor	
$\leq 1-0.1\%$	≥ 2.0 log	RMMenor	
$\leq 10-1\%$	≥ 1.0 log	RMMinima	
$>10\%$	<1.0 log	RMNula	

Tabla R- III 16 Criterios de respuesta Molecular en Escala Internacional

A modo de ejemplo, en la Figura R- III 39 se detalla el seguimiento en número de copias BCR-ABL1 del caso 18.

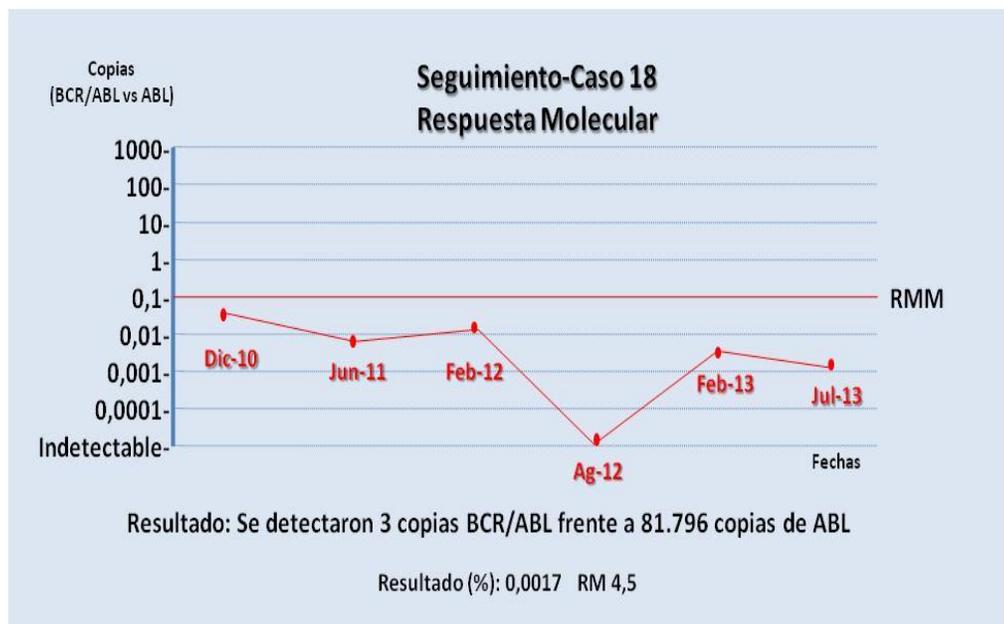


Figura R-III 39 Resultado de la qRT-PCR del caso n°18, donde se muestra el seguimiento de la RM, en el periodo comprendido entre Dic 2010 y julio 2013.

Las RM alcanzadas en todos los pacientes se pueden observar según se detalla en la (Tabla R- III 17). El paciente N° 12, quien ingresó en un protocolo de tratamiento de primera línea con Dasatinib, alcanzó una RCC a los 3 meses, por lo que la RM recién se evaluó a los 12 meses. De los once pacientes tratados con Imatinib o Imatinib + HO-urea, uno desarrolló Aplasia Medular (AM), en tanto que el resto alcanzó RMM a los 6 meses de tratamiento. Todos los casos tratados solamente con Nilotinib (6/6), también logaron una RMM a los 6 meses; un caso tratado únicamente con Dasatinib, obtuvo una RMM precoz a los 3 meses pero que luego retrocedió a una RMMenor a los 12 meses.

En contraposición, los pacientes quienes requirieron combinaciones secuenciales de tratamientos con Imatinib + Dasatinib (n=4) o Imatinib + Nilotinib (n=2), presentaron respuesta citogenética y/o moleculares nulas en 3 casos, o bien lograron RMM recién después de los 12 meses (n=3) (Tabla R-III-17). Las características generales del grupo en estudio se resumen en la Tabla R- III18.

Caso	RM a 6 m	RM a 12 m	RM a 18m
1	RMM	RMM	RMM
2	ND* Falleció al mes	-----	-----
3	RMM	RMM	RMM
4	RMNula	RMNula	RMM
5	RMNula	RMM	RMM
6	RMM	RMM	RMM
7	RMNula	-----	-----
8	Ca de Mama invasor	-----	-----
9	RMM	RMM	RMM
10	RMM	RMM	RMM
11	RMM	RMM	RMC
12	----	RMMe	-----
13	RMM	RMM	RMM
14	RMM	RMM	RMM
15	RMM	RMM	RMM
16	RMM	RMM	RMM
17	RMM	RMC	RMC
18	RMM	RMM	RMM
19	RMM	RMM	RMM
20	RMM	RMM	RMM
21	RMM	RMC	RMC
22	Apl. Medular	-----	-----
23	RMM	RMM	ND
24	RMC	RMM	ND

Tabla R-III 17. Respuesta Molecular a 6, 12, 18 meses de cada paciente.
El caso 24 alcanzó una RMM^{4,0} a 12 meses de tratamiento. (ND: Dato no disponible)

Sexo (promedio \pm DE)	N° casos	Porcentaje (%) sobre n° total de casos
Femenino	11	45,8
Masculino	13	54,2
Fase de la LMC		
FC	22	91,7
FA	0	0,0
CB	2	8,3
**Riesgo Sokal		
Bajo	7	29,0
Intermedio	7	29,0
Alto	6	25,0
No evaluados	4	16,6
Tratamiento con ITK		
Imatinib	11	45,8
Nilotinib	6	25,0
Dasatinib	1	4,16
*Imatinib + Nilotinib	2	8,3
*Imatinib + Dasatinib	4	16,6
Respuesta hematológica		
RHC	21	87,5
RHP/RHN	3	12,5
Respuesta citogenética (23/24[§])		
RCC	18	75,0
RCP	1	4,2
RCN	4	16,6
Respuesta Molecular (23/24[§])		
RMM	14	58,3
RMC	4	16,6
RMMe	2	8,3
RMN	3	12,5
Edad en años (promedio \pm DE)		
Femenino	11	53 \pm 15 r (25-76)
Masculino	13	48 \pm 17 r(21-75)

Tabla R- III 18 Se muestran el número de casos, la distribución por sexo y edad, las fases de la enfermedad, las categorías pronósticas según Modelo Sokal, el porcentaje de RH; RC y RM alcanzadas. a(§)1 caso sin evaluar tanto la RC como la RM por aplasia medular; (*)2 casos recibieron tratamiento Imatinib y Nilotinib; 4 casos recibieron tratamiento Imatinib y Dasatinib ** En 4 casos no se midió el Riesgo Sokal, según lo indicaba el protocolo.

4.3.4 POLIMORFISMOS DEL GEN MDR-1

Los polimorfismos en los exónes 12(1236C>T), 21(2677G>T/A) y 26(3435C>T) se dividieron en los siguientes genotipos:

- a- Genotipos Homocigotas wild type: exón 12 (CC)
exón 21 (GG)
exón 26 (CC)
- b- Genotipo Heterocigota: exón 12 (CT)
exón 21 (GT ó GA)
exón 26 (CT)
- c- Genotipo Homocigoto mutado o alterado (TT) para los tres exones
- d- Genotipo alternativo (AA) para el exón 21 exclusivamente.

En la Figura R-III 40 se puede observar el pico correspondiente a un SNP heterocigota para el exón 21G>T (ver en archivo digital adjunto los croamogramas de las correspondientes secuenciaciones).

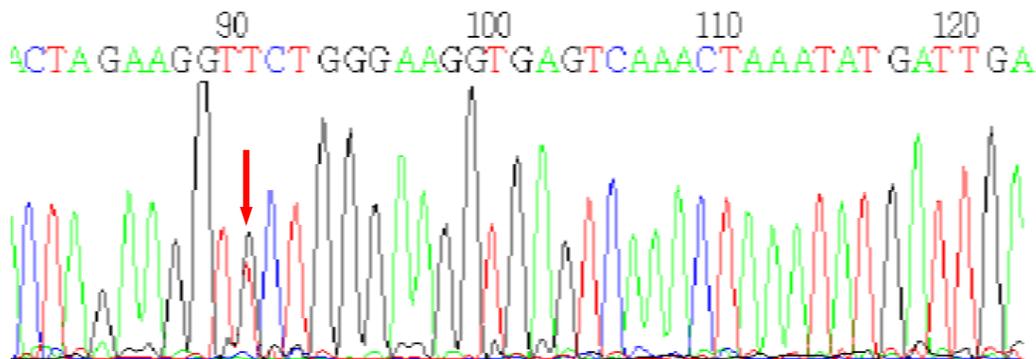


Figura R-III 40: SNP-exón 21: Se observa un genotipo heterocigota G>T (Doble pico →)

En pacientes con LMC, se hallaron 10 haplotipos diferentes que surgen de la combinatoria de los genotipos encontrados en los exones 12, 21 y 26. La distribución se puede ver en la Figura R-III 41.

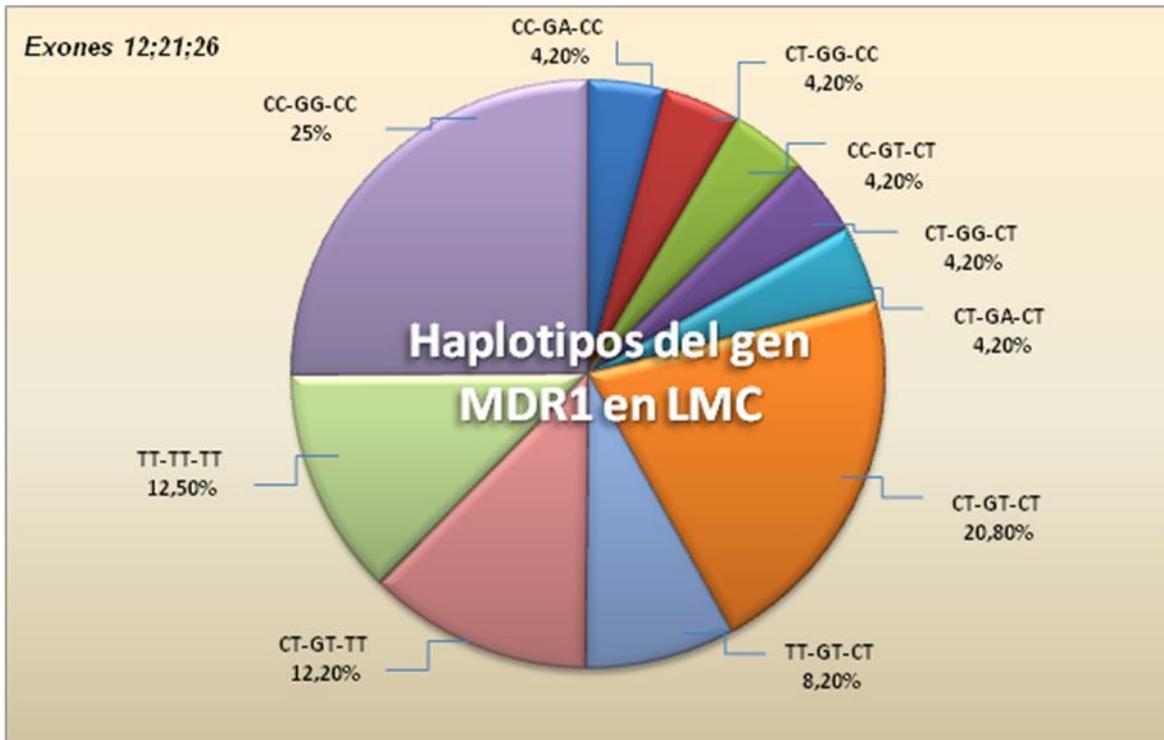


Figura R-III 41. Distribución y frecuencia de los 10 diferentes haplotipos del gen MDR-1 correspondiente a los exones 12,21 y 26 (C1236T; G2677T/A y C3435T respectivamente), encontrados en pacientes con LMC. Nótese que el haplotipo WT-completo (CC-GG-CC) fue el más frecuente.

En la Tabla R-III 19 se puede observar el número de casos y las frecuencias de cada variante según los SNPs estudiados en los pacientes con FC de la enfermedad, y en la Tabla R-III 20 los correspondientes a CB.

Polimorfismo exónico	Exón 12 (n, % IC95)	Exón 21 (n, % IC95)	Exón 26 (n, % IC95)
WT-Homocigota	8 (36,4%; IC95:17,1-59,4%)	8 (36,4%;IC95:17,1- 59,4%)	8 (36,4%;IC95:17,1-59,4%)
Heterocigota	9 (40,9%; IC95:20,6-63,7%)	11 (50%;IC95:28,1-71,8%)	9 (40,9%;IC95:20,6-63,7%)
Mut-Homocigota	5 (22,7%;IC95:7,7- 45,4%)	3 (13,6%;IC95:2,8-35%)	5 (22,7%IC95:7,7-45,4)

Tabla R-III 19 Frecuencias de los polimorfismos exónicos hallados en fase crónica(n=22). WT-Homocigota (variante A), Heterocigota (variante B) y Mutado-Homocigota (variante C)

Polimorfismo exonico	Exon 12 (n, % IC95)	Exon 21 (n, % IC95)	Exon 26 (n, % IC95)
WT-Homocigota	0 (0%;IC95:0-84,1%)	0 (0%;IC95:0-84,1%)	0 (0%;IC95:0-84,1%)
Heterocigota	2 (100%;IC95:15,8-100%)	1 (50%;IC95:1,25-98,7%)	2 (100%;IC95:15,8-100%)
Mut-Homocigota	0 (0%;IC95:0-84,1%)	0 (0%;IC95:0-84,1%)	1 (50%;IC95:1,25-98,7%)

Tabla R-III 20: Frecuencias de los polimorfismos exónicos Homocigota hallados en crisis blástica (n=2) WT-Homocigota (variante A), Heterocigota (variante B) y Mutado-Homocigota (variante C).

Las frecuencias alélicas de cada SNPs para el gen MDR-1 fueron calculadas según la Distribución de Hardy-Weinberg (Tabla R-III 21)

Exon	Frecuencia de Alelos WT homocigotas(p)	Frecuencia de alelos mutados (q)	Frecuencia de genotipo Homocigota mut (q ²)
Exon12(1236)	0,56	0,44	0,19
Exon 21(2677)	0,61	0,39	0,15
Exon 26(3435)	0,56	0,44	0,19

TABLA R-III 21 Frecuencias alélicas de cada SNPS del gen MDR-1 calculado aplicando la Distribución de Hardy-Weinberg $p=(2 \times AA + 1 \times Aa) / 2N$; y $p+q=1$, donde p es la frecuencia de alelos wt, q la frecuencia de alelos mutados y q² es la frecuencia de genotipo homocigota mutado. AA: número de probandos Homocigotas para wt, Aa: número de Heterocigotas, N: tamaño de la muestra = 22 (Correspondiente a casos en Fase Crónica).

Se analizó la RC y RM en cada caso, según la fase de la enfermedad para cada genotipo encontrado sobre los exones 12(C1236T); 21(G2677T/A) y 26(C3435T), y agrupados según el tipo de tratamiento administrado. Los genotipos hallados en los pacientes que recibieron sólo imatinib, imatinib + otro ITK de segunda generación; o solamente un ITK de segunda generación, se describen en las Tablas R-III 22, 23 y 24 respectivamente. En la Figura R-III 42 se puede observar la distribución de los diferentes haplotipos con cada tratamiento y de acuerdo al tipo de evolución.

Caso	Fase	RC y/o RM (n meses de Tto)	Exon 12 C1236T	Exon 21 G2677T/A	Exon 26 C3435T
1	FC	RCC/RMM (18)	TT	TT	TT
3	FC	RCN/RMM (12)	CT	GT	CT
6	FC	RCC/RMM (12)	TT	TT	TT
11	FC	RCC/RMC (42)	TT	TT	TT
13	FC	RCC/RMM (24)	CT	GT	CT
14	FC	RCC/RMM (24)	CT	GG	CC
16	FC	RCC/RMM (24)	CT	GG	CT
17	FC	RCC/RMC (12)	CT	GT	CT
18	FC	RCC/RMM (21)	CT	GT	TT
22	FC	AM (NR)	CC	GG	CC
23	FC	RCC/RMM(6)	CC	GA	CC

Tabla R-III 22: Genotipos encontrados en los n=11 casos tratados solo con Imatinib a dosis de 400 y 800 mg/día (Protocolo TOPS)

Caso	Fase	Respuesta Citogenetica y/o Molecular alcanzada en n meses de tratamiento)	Exon 12 (C1236T)	Exon 21 (G2677T/A)	Exon 26 (C3435T)
2	CB	NR	CT	GA	CT
4	FC	RCP/RMN (6); RMM (18m)	CC	GG	CC
5	CB	RCN/RMN (6), RMM(12)	CT	GT	TT
7	FC	RCN/RMN (7)	CC	GG	CC
8	FC	RCN (6), RM NR	CT	GT	TT
20	FC	RCC/RMM (24)	TT	GT	CT

TablaR –III 23: Genotipos encontrados en los n=6 casos tratados con inicialmente con imatinib y luego con un ITK de 2^{da} generación. (NR: No realizado).

Caso	Fase	Respuesta Citogenetica y/o Molecular (alcanzada en n meses de tratamiento)	Exon 12 (C1236T)	Exon 21 (G2677T/A)	Exon 26 (C3435T)
9	FC	RCC/RMM (36)	CC	GG	CC
10	FC	RCC/RMM (42)	TT	GT	CT
12	FC	RCC/RMMe(12)	CC	GG	CC
15	FC	RCC/RMM (24)	CC	GT	CT
19	FC	RCC/RMM(64); RMMe (78)	CT	GT	CT
21	FC	RCC/RMC (18)	CC	GG	CC
24	FC	RCC/RMC (3)	CT	GT	CT

Tabla R-III 24 Genotipos encontrados en los n=7 casos tratados con un ITK de 2^{da} generación.

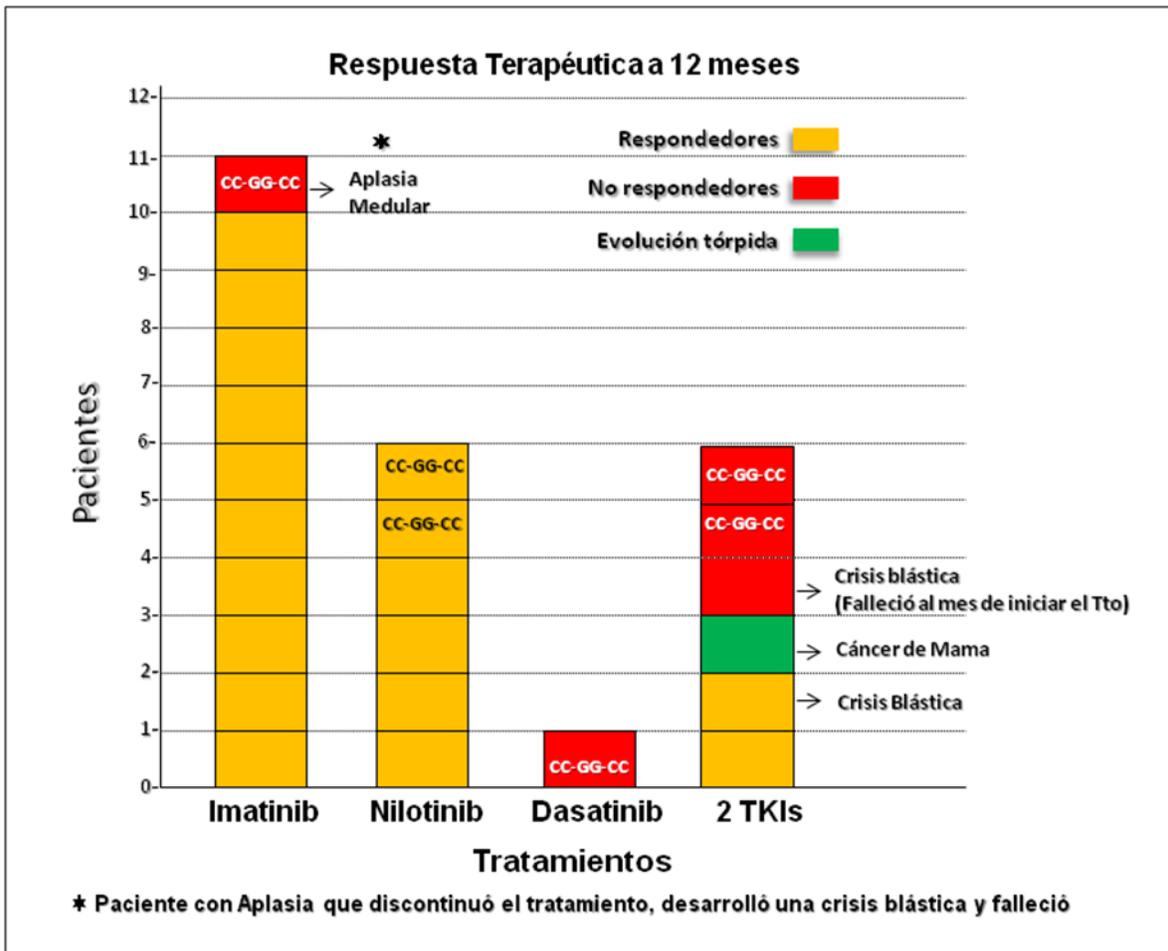


Figura R –III 42: Distribución de los haplotipos WT acorde al tratamiento con 1 o 2 ITK e indicando el tipo de respuesta terapéutica a los 12 meses. Un caso de CB con haplotipo mutado y fenotipo no respondedor (■) falleció dentro del primer mes de iniciado el tratamiento. El paciente con haplotipo wt tratado con Imatinib + HO-Urea, que desarrolló Aplasia Medular, fue considerado como No respondedor (■). Otro caso con haplotipo mutado evolucionó con desarrollo de un Cáncer de Mama y fue considerado como Evolución tórpida (■).

En los 22 pacientes en FC, el genotipo alterado (T) fue detectado en 16 casos, de los cuales 14, mostraron una RCC dentro de los 3-6 meses de tratamiento, en tanto 2 casos presentaron una respuesta citogenética nula. De los 6 pacientes en FC restantes, que presentaron un haplotipo wt (CC/GG/CC), sólo 3 (50%) mostraron una respuesta citogenética completa (RCC) (Figura R-III 43).

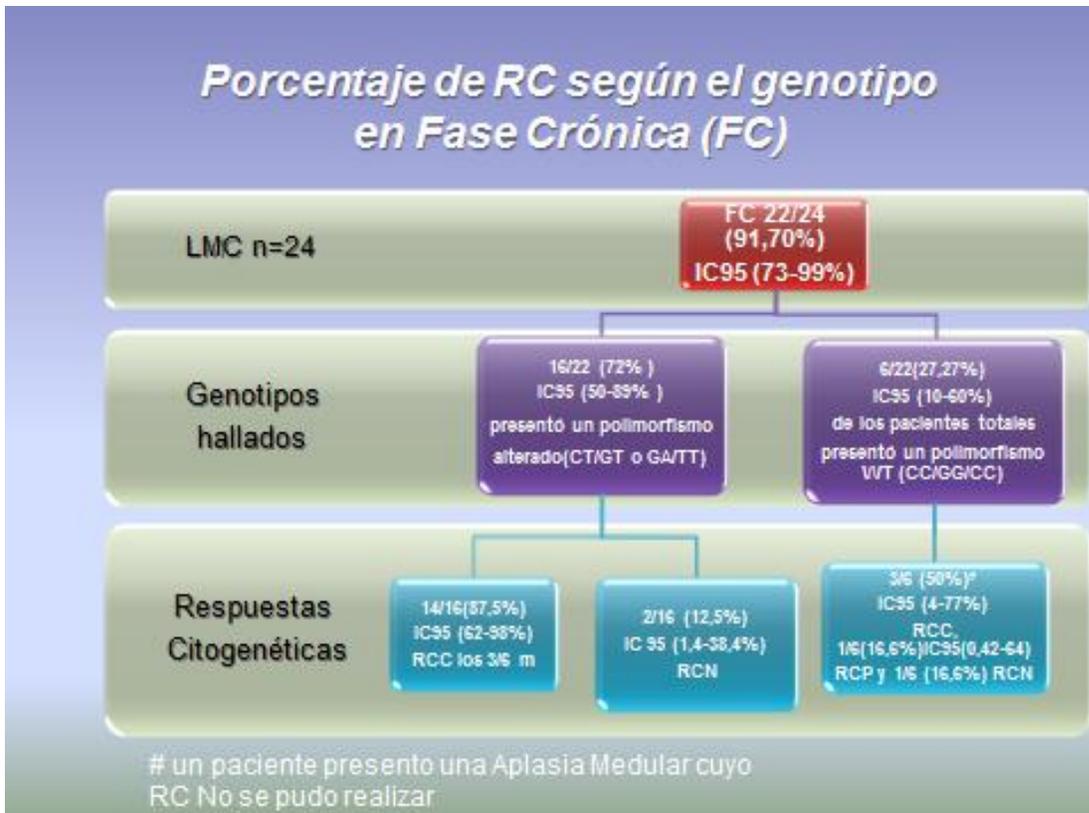


Figura R-III 43: Distribución, % e IC95% de los SNPs encontrados en pacientes en FC según las Respuestas Citogenéticas alcanzadas con el tratamiento (dentro de los 3 y se mantuvo a los 6 meses).

En tanto, a nivel de Respuestas Moleculares alcanzadas dentro de los 6 y 12 meses de tratamiento, de los mencionados 16 casos con un SNP alterado, 12 alcanzaron una RMM, y sólo 3/16, una RMC. En suma, 15/16 (93,75%), obtuvieron una respuesta molecular óptima (indicando ser sensibles al tratamiento). En cambio, en los otros 6 con SNPwt: 2/6 obtuvieron una RMM; 1/6 desarrolló una aplasia medular, 1/6 RMMe, y 2/6 RMN (Figura R-III 44). Si bien uno de los casos obtuvo una respuesta molecular menor, la misma se la considera insuficiente. En suma, el 66,6% de dicho grupo mostró una conducta terapéutica refractaria (no respondedores) (Fig R-III 45).

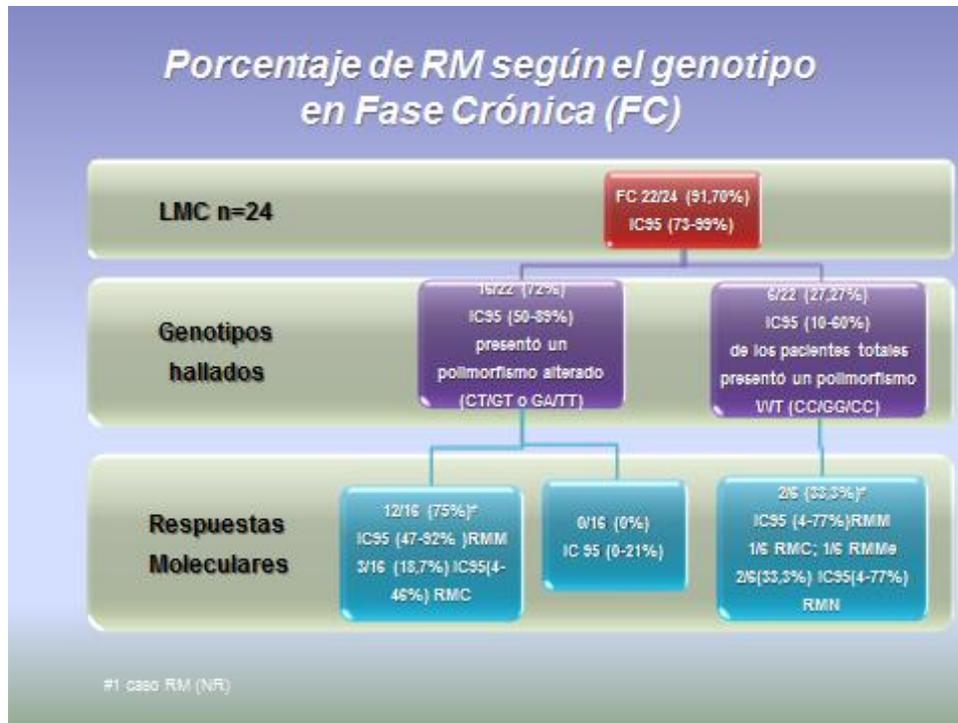


Figura R-III 44 Distribución, % e IC95% de los SNPs encontrados en pacientes en FC según las Respuestas Moleculares alcanzadas con el tratamiento a los 6 meses y 12 meses

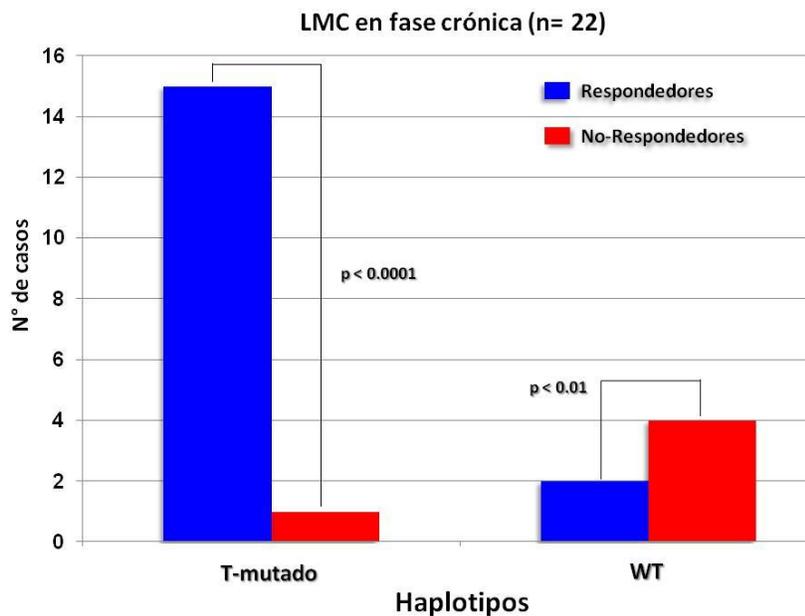


Figura R-III 45. Diferencias (χ^2) entre pacientes respondedores y no respondedores en FC (n= 22), acorde a sus haplotipos T-mutados o wt.

En los pacientes en fase crónica, el 72% (n=16) tenían haplotipos mutados ya sea por un alelo heterocigoto (T o A) o bien por ser homocigota mutado (TT) en al menos uno de sus SNPs. En estos pacientes, la probabilidad (Cálculo de Probabilidad Bayesiana) de desarrollar una RCC a los 3 meses fue del 57% [cálculo: $(0,91 \times 0,72 \times 0,875) \times 100$], y a los 6 meses fue de 65,5% [cálculo: $(0,91 \times 0,72 \times 1) \times 100$]. En cambio en los casos que presentaron un polimorfismo *wild type*, dicha probabilidad a los tres meses fue del 12,6% [cálculo: $(0,91 \times 0,277 \times 0,50) \times 100$], y a los 6 meses del 24,57% [cálculo: $(0,91 \times 0,277 \times 100)$] ($p < 0,01$). Si ahora investigamos el rol de los SNPs en relación con las respuestas moleculares, la probabilidad de alcanzar una respuesta molecular mayor en los pacientes que tuvieron un SNP “alterado o mutado” fue de 49,14% [cálculo: $(0,91 \times 0,72 \times 0,75) \times 100$], a los 6 meses y 65,5% a los 12 meses [Cálculo: $(0,91 \times 0,72 \times 1) \times 100$]. En cambio la probabilidad de alcanzar una RMM en los pacientes con haplotipos *wt* a los 6 meses fue de 8,1% [cálculo: $(0,91 \times 0,27 \times 0,33)$] y 24,5% a los 12 meses [cálculo: $(0,91 \times 0,27 \times 1) \times 100$] ($p < 0,01$) (Chava Kimchi-Sarfaty et al, 2007). Del mismo modo, la probabilidad Bayesiana que tiene un paciente con LMC en FC y un polimorfismo mutado (heterocigota u homocigota), de alcanzar una RMC fue de 12,3% a los 6 meses y del 65,5 % a los 12 meses (Figura R-III 46).

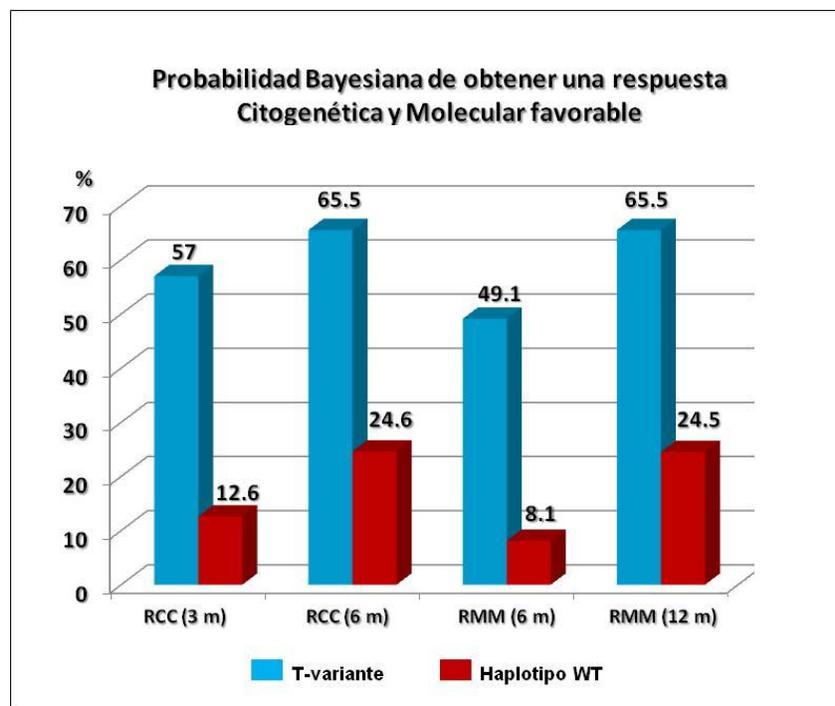


Figura R-III 46: Probabilidad Bayesiana de alcanzar una buena respuesta RCC a 3 y 6 meses o RMM a 6 meses, según tengan haplotipos mutados o haplotipos *wt*. ($p < 0,01$)

Capítulo 4

RESULTADOS

PARTE IV

ESTUDIO DE SNPS PARA EL GEN MDR-1 EN SUJETOS SANOS

4.4.1 POLIMORFISMO DEL GEN MDR-1 EN SUJETOS SANOS

Se analizaron los datos en 25 sujetos sanos (grupo control), todos de género masculino. El promedio de edad en años fue 38 ± 10 (mínimo = 22, mediana = 34, máximo = 54). En la Tabla R-IV-25 y en la Figura R-IV-47 se describen las prevalencias de los diferentes polimorfismos exónicos hallados en este grupo (**Ver Anexo I**). En la Tabla R-IV-26 se muestran los genotipos hallados en cada sujeto sano.

Polimorfismo exónico	Exón 12 (n, % IC95)	Exón 21 (n, % IC95)	Exón 26 (n, % IC95)
WT-Homocigota	6 (31,6%;IC95:12,5-56,6%)	7 (28%;IC95:12-49,4%)	8 (32%;IC95:15-53%)
Heterocigota	6 (31,6%;IC95:12,5-56,6%)	17 (68%;IC95:46,4-85,1%)	15 (60%;IC95:38,6-78,9%)
Mut-Homocigotas	7 (36,8%; IC95:16,2-61,7%)	1 (4,0%;IC95:0,05-20,3%)	2 (8,0%;IC95:0,9-26%)

Tabla R-IV 25. Frecuencias de polimorfismos exónicos WT-Homocigotas (variante A), Heterocigotas (variante B) y Mut-Homocigotas (variante C), en controles sanos.

Controles	Exon 12	Exon 21	Exon 26
1	T-T	G-T	T-T
2	ND	G-T	C-T
3	T-T	G-G	C-T
4	C-T	G-T	C-T
5	ND	G-T	C-T
6	C-T	T-T	C-C
7	C-T	G-T	C-T
8	C-C	G-T	C-C
9	T-T	G-T	C-C
10	T-T	G-T	C-C
11	T-T	G-T	C-T
12	C-C	G-G	C-T
13	C-C	G-T	C-C
14	C-T	G-G	C-T
15	C-T	G-G	C-T
16	ND	G-G	C-T
17	ND	G-G	C-C
18	ND	G-T	C-T
19	C-C	G-T	T-T
20	C-C	G-T	C-C
21	C-C	G-T	C-T
22	C-T	G-T	C-T
23	ND	G-T	C-T
24	TT	G-G	C-T
25	TT	G-T	C-C

Tabla R-IV-26: Genotipos encontrados en sujetos sanos, para los exones 12, 21 y 26.

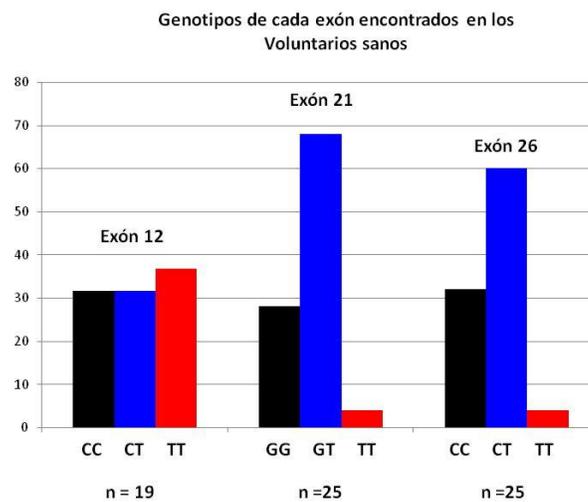


Figura R-IV 47: Distribución de los genotipos para cada exón estudiado en la población de sujetos sanos

4.4.2 Comparación entre ambas poblaciones estudiadas: Sanos vs LMC

De todas las combinaciones de haplotipos posibles encontrados, tanto en los pacientes con LMC como en el grupo control, se halló un total de 17 haplotipos diferentes, de los cuales sólo 4 fueron compartidos por ambos grupos. De esta forma, hubo 6 haplotipos expresados exclusivamente en el grupo leucémico y otros 7 haplotipos expresados exclusivamente en el grupo control. Las variantes-T fueron observadas en todos los controles (100%) y en 75% de los pacientes con LMC, mientras que el haplotipo wt-(CC/GG/CC) fue exclusivamente observado en los pacientes con LMC, siendo el haplotipo más numeroso en dicho grupo (25%) (Figura R IV-48).

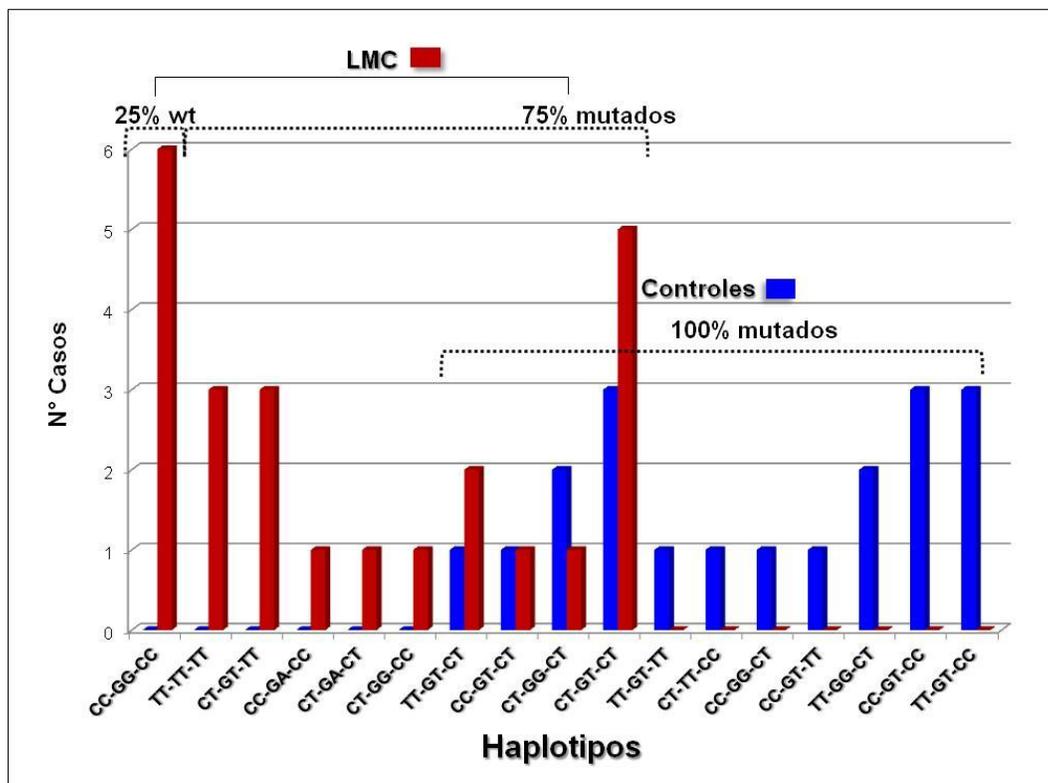


Figura R-IV 48 Distribución de las frecuencias de haplotipos hallados según sean pacientes con LMC o controles sanos. En pacientes con LMC se detectó una distribución del 25% wt y 75% de variante T/A-mutada, en tanto en el grupo control, el 100% de los casos resultaron con haplotipo mutado

La carga neta de los alelos TT (homocigotas mutados) encontrada en cada uno de los exones (12, 21 y 26), mostró una alta distribución de dichos alelos en el exón 12 correspondiente a los controles sanos, en tanto que en los pacientes leucémicos, la mayor distribución de estos alelos TT se observó en el exón 26 (Figura R IV-49).

El alelo homocigota TT del exón 12, predominó en los individuos normales (36,8%) comparado a los pacientes leucémicos (20,8%). En cambio los alelos TT se presentaron

en un 4,0% para el exón 21 y 8,0% para el exón 26 en sujetos sanos, y en los leucémicos dichos alelos se detectaron en el 12,5% y 25,0% respectivamente. La proporción de dicha carga entre Controles Sanos/LMC fue de 1,8 para el Exón 12 y 0,32 para los exones 21 y 26 respectivamente (Figura R-IV-49). De estas distribuciones se desprende que la presencia de variantes TT en el SNP del exón 12 es 1,8 veces más frecuente en individuos sanos que en leucémicos.

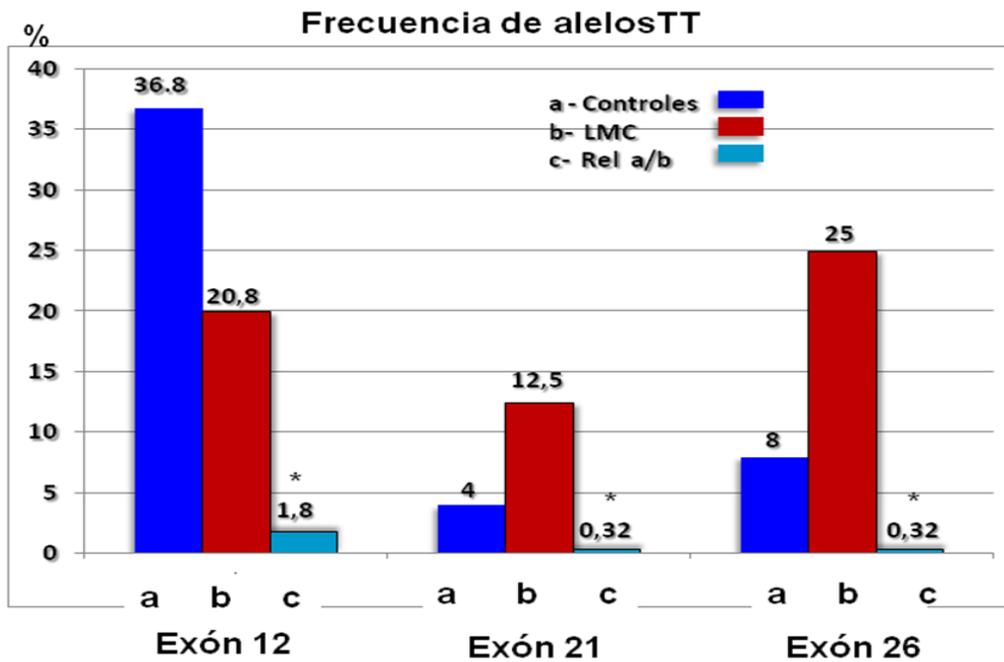


Figura R-IV-49: Frecuencia de alelos Homocigotas TT para los exones estudiados
a) Sujetos Sanos, b) Pacientes leucémico c) Coeficiente a/b (* $p < 0,01$).

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

CONSIDERACIONES DE LOS ESTUDIOS IN VITRO EN LA LÍNEA CELULAR K562

La etiopatogenia de las leucemias Cromosoma “Philadelphia” positivas, radica en la presencia del gen quimérico BCR-ABL1 y su producto proteico (p210^{bcr/abl}, o p190^{bcr/abl}) con actividad Tirosina Kinasa (TK) constitutiva. Por lo tanto el uso de inhibidores de TK como el Imatinib, constituye actualmente el tratamiento de elección de estas patologías. Sin embargo, luego de un periodo de buena respuesta, muchos pacientes desarrollan resistencia a dicho tratamiento, siendo éste el mayor obstáculo y limitante en la utilidad clínica de dicha droga. La resistencia de tipo primaria puede ser atribuida a la amplificación génica con sobreexpresión del transcripto BCR-ABL1, a la presencia de mutaciones constitutivos o adquiridas en el dominio Kinasa de la proteína BCR-ABL, o bien, dicha farmacorresistencia puede deberse a la sobreexpresión trasportadores de mutidrohgas como la P-gp (producto del gen MDR-1) o BCRP, entre otros mecanismos.

Entre las líneas celulares BCR-ABL1 positivas, seleccionamos la línea celular leucémica mielocitroide K562, proveniente de un paciente con LMC en fase de crisis blástica, y caracterizada por un fenotipo de leucemia mielocitroide aguda. Esta línea celular contiene el cromosoma Phi, y es dependiente de la actividad tirosina kinasa del BCR-ABL para su proliferación y supervivencia. Su manipulación y crecimiento en el laboratorio permitió evaluar los diferentes mecanismos antes mencionados, que pueden estar involucrados en la resistencia a la droga.

Una anomalía recurrente durante la progresión de la FC a la CB de la LMC, es la duplicación del cromosoma Phi+, así como la amplificación del gen BCR-ABL1. Ambas anomalías han sido asociadas a la resistencia al Imatinib. El método de FISH aplicado con el uso de cada uno de los dos marcadores positivos (BCR y ABL1), confirmó la amplificación del gen de fusión, como parte de la maquinaria desplegada para generar la

resistencia al ITK. A su vez, este hallazgo resultó similar a lo encontrado por otros investigadores tanto en la misma Línea K562 resistente a Imatinib, como en otras líneas celulares y muestras de pacientes Phi+ (Gribble SM, et al; 2000).

Se ha demostrado que también puede ocurrir pero de manera menos frecuente, una amplificación genómica intracromosomal, durante la evolución de la enfermedad, tanto en la Línea K562, como en algunos pacientes, hecho que permitió comprobar que la estructura del cromosoma Phi es muy poco estable durante la progresión de la LMC (Virgili Anna et al, 2010). Sin embargo no es un hallazgo encontrado en nuestra Línea celular. Dado que en la literatura este mecanismo de resistencia por amplificación génica fue reportado en un bajo porcentaje de pacientes (Hochhaus A et al, 2002), no hemos investigado este tipo de anomalía en los dos pacientes de nuestra serie que presentaron una CB. Para algunos investigadores, como Gambacorti-Passerini y col, la frecuencia de esta anomalía es del 18% en las leucemias Phi+ resistentes al imatinib (Gambacorti-Passerini C, 2003). Esto indica que otros mecanismos deben estar activos para generar la mencionada resistencia. Acorde a esta información, nosotros encontramos que la Línea K562 estudiada en el presente trabajo, resultó ser resistente al Imatinib, y presentó una alta carga de transcritos del gen MDR-1/ABCB1 del orden de 14,7 copias/ng ARN, acorde a lo descrito más recientemente (Kim TM et al, 2011). Esta sobreexpresión de transcritos, fue a su vez confirmada por las pruebas de inmunohistoquímica, a las que se sumó de expresión de la proteína BCRP.

Por otra parte, y desde el punto de vista madurativo, las células *stem* hematopoyéticas normales, suelen expresar el fenotipo CD34⁺/CD38⁻, en tanto que las que iniciaron cierto grado de diferenciación, comienzan a expresar el CD38 resultando transitoriamente CD34⁺/CD38⁺, para luego perder el antígeno de inmadurez CD34, y quedar como CD34⁻/CD38⁺.

El fenotipo celular de nuestra Línea K562, mostro la expresión de los marcadores de diferenciación comisionados para el linaje eritroide tales como CD33⁺ y glyA⁺, con pérdida del antígeno de célula primitiva mieloide CD34, el cual es un marcador crucial para el mantenimiento de la hematopoyesis (Suárez L et al, 2004). De esta forma nuestras células resultaron ser CD34⁻ y CD117^{-/+} (Tabla R-I-8). Se ha mencionado que la expresión del CD117 (ligando c-Kit) sería importante para mantener a las células HSCs en reposo a través de la inhibición de la progresión del ciclo celular (Thoren L et al, 2008).

Se sabe que normalmente las células *Stem* CD34⁺ expresan el fenotipo MDR-1⁺ / ABCB1 y que este podría estar conservado durante la transformación leucémica (Van Sonneveld P et al, 2000), y de esa manera jugando un rol importante en la resistencia debido al transporte de drogas mediada por la proteína P-gp. Nuestros hallazgos demuestran que el fenotipo CD34⁻/MDR-1⁺, junto con la alta carga de BCR-ABL1, se asociaron al fenotipo resistente a ITK, como un indicador de alto riesgo de progresión. Estas características sugieren que estaríamos ante la presencia de células con cierto grado mínimo de diferenciación, pero con un alto poder proliferativo debido a la alta carga de BCR-ABL1 y resistentes a la quimioterapia por la expresión de P-gp y BCRP. Estas proteínas fueron detectadas por anticuerpos monoclonales específicos, dirigidos a diferentes epitopes, como el C494 y el C219 en el caso de P-gp y el BxP21 (BCRP). Normalmente la P-gp y BCRP se encuentran expresados en células progenitoras tempranas de la hematopoyesis, y su expresión se pierde con la progresiva diferenciación celular. La P-gp se encuentra expresada transitoriamente en la superficie de SCH (CD34 positivas) y la proteína BCRP en precursores SCH aún más tempranos que habitualmente son CD34 negativas, y en condiciones normales, ambos transportadores dejan de expresarse a medida que avanza la maduración/diferenciación celular (Wagner-Souza Karen et al; 2008).

Nuestros resultados mostraron que las células de la línea K562 con fenotipo CD34⁻ expresan ambas glicoproteínas, indicando una persistencia aberrante de ambos transportadores, a pesar del avance madurativo observado (GlyA+) en dicha línea celular.

Por otra parte, diferentes mutaciones en el gen BCR-ABL1, generan falta de respuesta a los tratamientos con ITK. Siete de esas alteraciones (T315, Y253, E255, M351, G250, F359 y H396) se encuentran entre los exones del 4 al 7 del gen BCR-ABL1, y representan el 66% de dichas mutaciones encontradas en los sitios catalíticos de la proteína BCR-ABL. La frecuencia de ocurrencia de estas diferentes mutaciones, puede variar acorde a los distintos estadios de la enfermedad como al tiempo de iniciado el tratamiento (Branford S et al, 2009).

Estudios previos realizados en la Academia Nacional de Medicina, demostraron que la Línea K562 no presentaba ninguna de estas 7 mutaciones, por tal motivo, su selección como modelo farmacológico de farmacorresistencia al Imatinib, se restringe a la sobreexpresión del BCR-ABL y de los transportadores a multidrogas investigados. Debemos destacar que esta línea celular nunca fue tratada con inhibidores de TK previo

al desarrollo de los experimentos del presente trabajo, debido a que el tratamiento a largo plazo podría resultar en la causas de generación de las mutaciones mencionadas, como se ha sugerido sucede en pacientes con LMC en fase crónica, tratados con Imatinib.

Si bien no conocemos los efectos a largo plazo del tratamiento con Imatinib sobre la aparición de dichas mutaciones en esta línea celular, nuestros resultados descartan que cualquiera de estas mutaciones, pudiera ser un posible factor fármaco-dinámico responsable de la farmacorresistencia al Imatinib observada en este estudio.

El MDR-1/ABCB1 es un gen polimórfico, en el que se han identificado más de 216 polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs). Varios, pero no todos de estos SNPs, pueden afectar la expresión y/o funcionalidad de la glicoproteína P-gp, y en este sentido, los SNPs *C1236T*, *G2677T/A* y *C3435T* estudiados en el presente trabajo, son las variantes polimórficas más comúnmente investigadas en relación a los fenotipos clíco-terapéuticos en muchas patologías y tratamientos farmacológicos.

El análisis de los mencionados SNPs en la Línea celular K562, mostró el siguiente haplotipo: *C1236C*, *G2677G*, y *T3435T*, que denominaremos como: *CC/GG/TT*. Este haplotipo mostró que la línea celular resultó ser *wild type* para los exones 12 (CC) y 21 (GG), en tanto que presentó un genotipo modificado (full-mutado TT) para el exón 26.

El estudio realizado por el grupo de Kimchi-Sarfaty C y col. en otras líneas celulares como las epiteliales renales BSC-1 o las de cáncer cérvico-uterino HeLa, demuestra el importante rol que juegan los SNPs silenciosos (es decir, aquellas que no afectan a la secuencia de aminoácidos) en la función y plegamiento de las proteínas (Kimchi-Sarfaty C et al, 2007).

En nuestro caso el estudio realizado sobre la línea K562 mostró un cambio del nucleótido 3435 del codón ATC por ATT, para el exón 26, pero dicho cambio no modifica la presencia del aminoácido Isoleucina correspondiente al genotipo wt. Este SNP resulta ser entonces un *SNP sinónimo* (o mutación silenciosa) sin variación en la secuencia aminoacídica. A su vez, para establecer si el fenotipo de resistencia se asociaba a una capacidad de transporte alterada o aumentada de la glicoproteína P-gp, usamos la Rho-123 como un sustrato fluorescente, que permite medir la función de bombeo activo de dicho sustrato desde el interior hacia el exterior celular.

En este caso, la presencia del genotipo homocigota modificado (TT) encontrado en la línea celular, y en ausencia de las mutaciones de TK antes mencionadas, podría tener relación con la alta expresión proteica de la P-gp detectada por los estudios de IHQ, y su

importante capacidad funcional medida por la expulsión activa de la Rho-123, que concuerda con la alta resistencia al Imatinib observada. Es decir, que si el SNP-*T3435T* del exón 26 generase alguna modificación de la P-gp, ésta debería ser solamente por incremento en su expresión y capacidad funcional. Es posible que este hallazgo pudiera tener alguna relevancia clínica, pero se requieren estudios con de muestras poblacionales más numerosas de pacientes con LMC en todas sus fases. En nuestra casuística, 6 pacientes presentaron el SNP-*T3435T*, uno en Crisis Blástica quien mostró RM nula inicial, pero luego de rotar la medicación a Nilotinib, mostró RMM a los 12/18 meses. Otro caso, desarrolló un Carcinoma de mama y su seguimiento fue incompleto. El resto pareció desarrollar un fenotipo respondedor.

Con respecto al uso del ITK Imatinib, nuestros resultados muestran que la su administración, conjuntamente con un bloqueante de la P-gp como la CyA, a dosis capaces de recuperar la acumulación intracelular de Rho-123, logra efectivamente la inducción de apoptosis en el 72% de las células con una concentración creciente de concentración entre 100 y 200uM en cultivos a 24 hs y hasta el 82% a 72hs. Estos resultados evidencian la presencia de un mecanismo activo y funcional de la P-gp., Efectivamente, el experimento de citotoxicidad mediado por Imatinib sobre las células K562, mostró un progresivo incremento de dicho efecto relacionado con las dosis crecientes de Imatinib pero sólo cuando el cultivo celular fue tratado conjuntamente con CyA que inhibe a P-gp.

De todas formas, tanto el nivel máximo de inhibición del crecimiento celular, como la retención de Rho-123, no llegaron al 100%, indicando que la capacidad inhibitoria del CyA sobre la P-gp no es completa. Este hecho concuerda con su condición de inhibidor inespecífico, pero además sugiere que posiblemente otros factores podrían estar biológicamente activos generando la farmacoresistencia residual observada, como podría ser la expresión de la proteína BCRP detectada, la cual no es inhibida por CyA, u otros transportadores no estudiados en el presente trabajo. También podría ser consecuencia de la presencia de otras TKs no inhibibles por Imatinib, como se mencionò antes.

Estudios previos demostraron que diferencias en los haplotipos del gen ABCB1 en los exones de interés (1236C>T/2677G>T/3435C>T), se asocian a distinta efectividad inhibitoria sobre la P-gp, tanto del verapamil como de la CyA. Dichos estudios mostraron que la presencia de haplotipos mutados resultan asociados a menor efectividad de dichos

tratamientos inhibitorios. Es más, la combinación de por lo menos dos genotipos heterocigotas, generaba menor eficacia de la CyA respecto del genotipo wt (GG/CC/GG). Dichos autores sugieren que la carga total de SNPs mutados presentes en el haplotipo completo, podría determinar cambios farmacodinámicos de la P-gp que influyen en la efectividad de sus inhibidores (Chung-Jung Tsai et al, 2008; Sauna ZE et al; 2007; Kimchi-Sarfaty C et al; 2007).

En este sentido, y acorde a lo señalado por estos autores, nuestros resultados en la línea celular, muestran la presencia del haplotipo GG/CC/TT, con un genotipo únicamente alterado en el exón 26 (3435TT). Este hallazgo podríamos considerarlo como de presencia de variantes T escasa en la línea celular, que explicaría su baja “resistencia” a la acción inhibitoria de la CyA, pero alta resistencia espontánea al Imatinib. Concordante con esta observación, la Línea celular llamativamente contiene SNPs wt en los otros dos exones (12 y 21), los cuales sólo estuvieron presentes en los casos full-wt GG/CC/CC de los pacientes estudiados, y en cuyo grupo se detectó la mayor tasa de fármaco-resistencia a los ITK (66%). ¿Es entonces necesaria la presencia de variantes T en todos los SNPs del haplotipo completo, para tener altas chances de una buena respuesta terapéutica? Dicho de otra manera, ¿la ausencia de variantes T en el haplotipo completo, es un marcador de alto riesgo de desarrollar farmacoresistencia a los ITK y/o evolución tórpida de la enfermedad?. ¿Pero a su vez, dicha falencia no favorece la acción adyuvante de la CyA, para sensibilizar el tratamiento con ITKs?

A su vez, la variante TT encontrada en la línea celular, podría explicar quizás la falta de una inhibición completa de la actividad de P-gp, por la antes mencionada, y esta carga de alelos TT, podría ser un factor a considerar sobre los posibles cambios farmacodinámicos antes descritos. Todos estos datos y consideraciones, abren la discusión respecto a si otros inhibidores de TK tales como Nilotonib o Dasatinib, deberían ser evaluados con este sistema, y/o cuales son las concentraciones intracelulares mínimas necesarias para alcanzar completamente la inhibición de la TK, detener el crecimiento celular e inducir su apoptosis.

En base a estos datos, el estudio del genotipo MDR-1 en pacientes con LMC podría jugar un rol importante como marcador de evolución de la enfermedad y/o como un factor pronóstico de progresión hacia un fenotipo de resistencia a ITK, pero a su vez susceptible de ser resensibilizado con inhibidores de P-gp. Es importante destacar, que el grupo de Dohse y col (Dohse M et al, 2010) demostró que los ITKs como Imatinib,

Nilotinib y Dasatinib son sustratos de ambos transportadores P-gp y BCRP, y que el efecto inhibitorio sobre el eflujo de Rho-123 y Hoeschst en células K562 era mayor con Nilotinib, seguido de Imatinib y de Dasatinib.

Estos estudios son de importancia y de trascendencia pues señalan la necesidad de considerar los mecanismos de resistencia múltiple a drogas, como factores adicionales a los previamente descritos, en el desarrollo de la refractariedad al tratamiento con Imatinib u otros ITK, y permitirían optimizar la terapéutica incluso en casos con amplificación génica del gen BCR-ABL1 y alta expresión de P-gp y/o BCRP.

CONSIDERACIONES DE LOS ESTUDIOS CLÍNICOS

Ya en el área Clínica, la Leucemia Mieloide Crónica, afecta mayoritariamente a una población adulta con un pico de incidencia entre los 46 a 55 años de edad y con una distribución homogénea respecto al género (Goldman and Melo, 2003; Berger U et I, 2005). Estos reportes son similares a lo encontrado en nuestra población en estudio.

De los 24 pacientes investigados en el presente trabajo, dos se encontraban en crisis blástica al momento del diagnóstico, y uno de ellos falleció al mes de iniciado el tratamiento con Imatinib + Dasatinib (Tabla R-III15).

Si bien se han diferenciado tres grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) respecto al Modelo Sokal, ninguno de dichos grupos se asoció a algún haplotipo y/o genotipo en particular.

Según las recomendaciones internacionales, tales como las de la Red Europea de la Leucemia (ELN) y la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN- USA), los pacientes con LMC en fase crónica deben comenzar su tratamiento con una dosis "estándar" de Imatinib de 400 mg/día. Para aquellos pacientes que no logran una respuesta Hematológica completa a los 3 meses de iniciado el mismo, ó presentan ausencia de respuesta citogenética completa (RCC) a los 6 meses, deben recibir una terapéutica de segunda línea (Dasatinib o Nilotinib), dado que las respuestas aún subóptimas obtenidas inicialmente con Imatinib, son consideradas como "fallos" en el tratamiento y deben ser observadas en un tiempo más corto de lo recomendado (Radich Jerald P, 2010).

Algunos pacientes entraron en el protocolo TOPS (Adelaide, Australia) que se basa en una dosis inicial de 800 mg/día de Imatinib (Cortez J. E. et al, 2010), o bien en el Protocolo Fase III aleatorizado, que utiliza Nilotinib en primera Línea. En todos estos casos el criterio de inclusión es el diagnóstico citogenético (Phi+) de LMC en fase crónica.

En base a estas consideraciones, 11 pacientes (45,8%) fueron tratados únicamente con Imatinib, y 7 casos (29,2%) recibieron monoterapia con otro ITK (Dasatinib 1 caso; Nilotinib 6 casos). Los restantes 6 pacientes (25%), iniciaron su tratamiento con Imatinib, pero debieron luego rotar hacia un ITK de 2da generación por los que recibieron terapia combinada-secuencial con dos ITK (Imatinib + Dasatinib, o Imatinib + Nilotinib) (Tabla R-III15).

De todos los pacientes que recibieron inicialmente Imatinib (17), 11 de ellos permanecieron con dicho tratamiento y alcanzaron una respuesta citogenética "óptima" o molecular mayor. Incluso en algunos casos antes de los 6 meses de iniciado el tratamiento, y con un seguimiento promedio de 26 meses libres de eventos. No parece haber un haplotipo o genotipo de los SNPs estudiados que pueda predecir la necesidad de los otros 6 casos de recibir una terapia de segunda línea.

En dos casos de pacientes en Fase Crónica, se observaron respectivamente una aplasia medular, y un segundo tumor correspondiente a un carcinoma de Mama invasor de tipo tubular, desarrollado a los 11 meses de iniciada la terapia. Estos dos pacientes recibieron tratamiento con Imatinib + HO-Urea, o Imatinib + Dasatinib respectivamente. Es interesante destacar que este último caso presentaba una LMC con una variante citogenética compleja (caso 8; Tabla R-III16). Muchos grupos de trabajo han realizado estudios randomizados para optimizar los beneficios de los diferentes tratamientos, encontrando similares resultados en el tiempo de sobrevida libre de eventos (superior al 85% de los casos bajo tratamiento con Imatinib), pero discrepando en el porcentaje de las recaídas o sus fallas terapéuticas (Pavlovsky C et al, 2011; Cortez J et al, 2010). Es más, dos trabajos contemporáneos e independientes (Hughes et al, 2009; Muller MC et al, 2009), demostraron que en el 55% de los casos donde se observa resistencia al Imatinib, la rotación de la terapia a ITKs de 2^{da} línea tampoco aseguran una RCC dentro de los primeros 3 y 6 meses del tratamiento (Dasatinib o Nilotinib). Actualmente, se estima que el éxito de la terapéutica con las drogas de 2^{da} línea está alrededor del 40% de los casos en fase crónica, pero dicho éxito cae al 20% cuando los pacientes se encuentran en fase acelerada o en crisis blástica.

En la terapia para la fase crónica (FC) con Imatinib, la farmacorresistencia está asociada con tasas de supervivencia significativamente bajas. Durante la FC la resistencia primaria al Imatinib medida por la respuesta hematológica a los tres meses, se produce en menos del 5% de los casos. En cambio, la falla en la respuesta citogenética puede observarse entre el 3%-18% de los casos a los 6 meses, entre el 15% -27% de casos a los 12 meses, y 23%-49% a los 18 meses (Druker BJ et al, 2006; Kantarjean H et al, 2008, Shah NP et al, 2008).

Según la opinión de otros grupos de investigadores (Radich J.P, 2010; Kim TM et al, 2011), la falta de una respuesta citogenética completa dentro de los 6 y 12 meses parece ser uno de los más firmes parámetros predictivos de fracaso al tratamiento. Sin embargo, una respuesta citogenética completa, no cuenta con la suficiente sensibilidad como método de evaluación de la enfermedad mínima residual, siendo el nivel de respuesta molecular alcanzado, acorde al índice internacional, el verdadero marcador tanto de pronóstico y como de evolución.

Con el propósito de encontrar un mejor biomarcador predictivo de la respuesta terapéutica y/o de evolución de la enfermedad, muchos grupos analizaron los niveles de transcritos del gen BCR-ABL1 obtenidos tempranamente en el tratamiento. El grupo de Marin David, (Marin D et al, 2012) encontró que el número de transcritos hallado a los 3 meses de iniciado el tratamiento, en comparación al valor basal, resulta ser el dato que mejor se ajusta a un marcador pronóstico. En tanto que las evaluaciones a los 6 y 12 meses, contribuyen poco a identificar pacientes con alto riesgo de progresión, aún en presencia de RCC. Este valor pronóstico fue independiente del hecho que los pacientes hubieran suspendido temporalmente el tratamiento. En este sentido, nuestro estudio, evaluó la respuesta molecular a los 6, 12 y 18 meses en la mayoría de los casos. Motivo por el cual no podremos hacer una comparación respecto a lo indicado por Marin y Col. Sin embargo, uno de los pacientes quien sí mostró una RMM a los 3 meses, pero lamentablemente, luego hizo una recaída sin respuesta óptima, y se lo consideró como No-responder. Este comportamiento parece contradir lo mencionado por el estudio de Marin D. Llamativamente, dicho estudio no incluyó el análisis de los SNPs del gen MDR-1, y llamativamente, nuestro paciente es portador de un wt-haplotipo (CC/GG/CC). Nos preguntamos si esta diferencia de respuesta terapéutica, no podría estar relacionada al haplotipo wt detectado en nuestro paciente.

Distintos estudios en pacientes con LMC tratados con ITKs, han demostrado que bajo esas condiciones de presión farmacológica, la progresión de la enfermedad hacia una fase acelerada, necesariamente se debe a una resistencia (intrínseca o adquirida) a la terapia con dichos inhibidores. No sabemos si la presencia de los ITKs son responsables en sí mismos de la adquisición (de-novo) de las mutaciones en el gen BCR-ABL1 que generan en parte la mencionada resistencia al tratamiento. De hecho, se sospecha que en tal caso, la administración de los ITKs, podrían generar un escenario favorable para la expansión de clones mutados preexistentes.

Debido a que tanto en la línea celular como en el 100% de los casos incorporados al presente estudio, no se detectó ninguna de las mutaciones más frecuentes en el gen BCR-ABL1, es probable que otros mecanismos, tales como la sobreexpresión del mismo gen BCR-ABL1, o del gen MDR-1 u otros transportadores, generen aún en fase crónica, mayor resistencia al ITKs (Mahon FX et al, 2003; Donato NJ et al, 2003; Barnes DJ et al, 2005; Khorashad JS et al, 2006). Si bien como ya mencionamos, nuestros pacientes no presentaban dichas mutaciones, estas observaciones sugieren que todos estos mecanismos no son excluyentes entre sí, y bien pueden potenciarse mutuamente, lo que explicaría cierto grado de heterogeneidad intrínseca de la enfermedad.

Los ITK como que Nilotinib, Dasatinib e Imatinib son sustratos tanto de la P-gp como de BCRP, pero a su vez pueden actuar como inhibidores de estas bombas, dependiendo de la concentración del fármaco utilizada (Hamada A et al, 2003; Illmer et al, 2004; Nakanishi et al, 2006; Brendel et al, 2007). Esto coincidiría con nuestros resultados experimentales in vitro, dada la alta expresión de P-gp concomitante con una expresión más débil de BCRP encontrada en la línea celular, la cual mostró alta resistencia cuando fue tratada a bajas concentraciones de Imatinib. A su vez, la resistencia inicialmente detectada fue parcialmente revertida ante la presencia de CyA (inhibidor de ambos transportadores P-gp y BCRP), pero la eficacia del tratamiento se incrementó significativamente recién cuando se incrementó las dosis de Imatinib a 100 y 200 μ M. De hecho, recientemente el grupo de Dohse Marius (Dohse M et al, 2010) demostró en células hematopoyéticas humanas y de ratones, que los ITKs inhiben la actividad de transporte de la Rho-123 y Hoechst 33342 mediadas por P-gp y BCRP respectivamente. Ellos encontraron que dicha inhibición fue mayor con Nilotinib, luego con Imatinib y por último con Dasatinib. Es más, Nilotinib mostró ser efectivo en la inhibición tanto para el transporte mediado por P-gp como para BCRP (Tiwari AK et al, 2009).

Hasta aquí podríamos especular sobre la posible existencia de mecanismos mixtos de comportamiento (como sustratos y como inhibidores) de los ITKs frente a los transportadores de drogas, de modo tal que podría existir una amplia variabilidad de resultados acorde a los diferentes modelos experimentales utilizados con las distintas líneas celulares, y dependiente del escalamiento en las dosis administradas, hecho que quizás podría evidenciarse también en los pacientes.

Teniendo en cuenta que los ITK son administrados por vía oral, la localización predominante de estos transportadores en todo el tracto gastrointestinal (TGI), jugaría un rol clave en la absorción y biodistribución de las dosis de los fármacos mencionados. Si bien la alta expresión de los transportadores en TGI sería un factor limitante de la absorción de los ITKs, se podría especular también con que las altas concentraciones de ITK que se generan en el sitio de absorción ante cada dosis administrada, jugarían un rol inhibitorio de los transportadores, compensando la limitación mencionada. En base a estas consideraciones diferentes trabajos han señalado que a iguales dosis de ITKs, los niveles sanguíneos de los mismo no serían idénticos en todos los pacientes, hallándose grupos con niveles subterapéuticos persistentes de ITKs en plasma, asociados a respuestas terapéuticas subóptimas, por lo cual se considera que niveles superiores a 1,000 ng/mL son necesarios para alcanzar una respuesta favorable (Hübner Martins D et al 2011).

En diferencia de lo que ocurre en el sitio de absorción, a nivel del nicho de las células madres de las células hematopoyética, las concentraciones de ITKs serán significativamente más bajas, y allí los ITKs sólo podrían jugar un rol como sustratos de estas bombas, y así generarse la farmacorresistencia, no relacionada a la absorción ni a la biodistribución del fármaco, sino directamente a su incapacidad de alcanzar concentraciones críticas inhibitorias intracelulares (Marin JG et al; 2014).

Dentro de la evaluación de los diferentes mecanismos de resistencia antes mencionados, el estudio de los transportadores de drogas, puede tener un papel importante en la caracterización de los posibles mecanismos presentes al inicio de la terapia. Más allá de la dinámica de la expresión de P-gp ó BCRP, e independizándonos de la exposición prolongada y/o dosis más altas de fármacos, es factible que los polimorfismos genéticos de alguno de estos transportadores, particularmente de P-gp, como mostramos en este estudio, puedan predisponer a diferentes comportamientos terapéuticos en cada caso.

El grupo de Agrawal y col (Agrawal et al, 2014) encontró que en pacientes con altos niveles de transcritos de MDR-1 y que a su vez resultaron resistentes a Imatinib, se lograba una mejor respuesta terapéutica con Nilotinib a 48 meses de tratamiento, si a su vez eran portadores de variantes mutadas en los exones 12 y 21 en comparación a casos similares pero con wt-haplotipos. Estas observaciones agregan importancia a los genotipos de los exones 12 y 21, en referencia a la posible alta carga de transcritos o expresión proteica del gen MDR-1, y apoyan el concepto que las variantes mutadas, podrían tener una glicoproteína-P “menos efectiva” en su actividad de eflujo que las variantes wt, independientemente de su nivel de expresión. Estos resultados parecen concordar con nuestros resultados que muestran una alta tasa de “respondedores” al Imatinib, en los casos con haplotipos T-variantes respecto a los wt.

Cuando analizamos los polimorfismos del gen MDR-1 presentes en los tres exones más estudiados por otros grupos, encontramos un total de 17 diferentes haplotipos entre pacientes y voluntarios sanos. Un total de 6 haplotipos fueron detectados únicamente en los pacientes, otros 7 haplotipos únicamente en los voluntarios sanos, y otros 4 en ambos grupos. Un dato llamativo, y con cierta tendencia hacia la falta de respuestas óptimas, fue que el haplotipo wt-CC/GG/CC (full homocigota) no fue detectado en ningún caso de los voluntarios sanos, y resultó ser el haplotipo más preponderante en los pacientes leucémicos (presente en el 25% de los casos), donde a su vez significativamente se observó la mayor frecuencia de falta de respuesta terapéutica con evolución tórpida de la enfermedad (66%).

Si bien nuestros resultados fueron similares a los encontrados por el grupo de Dulucq S. (Dulucq et al, 2008), respecto de las frecuencias alélicas en el exón 12 (C1236T), nosotros obtuvimos comparativamente un mayor porcentaje de las variantes 2677G>T/A (50% vs 39,5%) y C3435T (36,4 % vs 18,9%) en los exones 21 y 26 respectivamente.

En el SNP C3435T del exón 26, la presencia de un único alelo T encontrado en 8 casos de pacientes en fase crónica, se asoció sin excepción con Respuesta Citogenética Completa (RCC) dentro de los primeros 6 meses de tratamiento y/o RMM, observada a los 12 meses, sin complicaciones ni comorbilidades posteriores. En cambio, la presencia de dos alelos TT en dicho exón, observados en otros 5 pacientes en FC y uno en crisis blástica, se asoció también a RCC y/o RMM en 4 de los casos en fase crónica y en el

paciente con CB. El restante paciente presentó una Respuesta Citogenética Nula (RCN) dentro de los 3 y 6 meses de tratamiento y desarrolló un Cáncer de Mama de tipo Nodular.

En los dos casos con Crisis Blástica, los hallazgos reproducen lo observado en la Fase Crónica, con la presencia de un haplotipo full-heterocigota CT/GA/CT en el paciente n° 2, y el haplotipo CT/GT/TT en el caso n° 5. Dado que se trató solamente de dos casos con respuestas y/o evoluciones clínicas totalmente opuestas, no podemos arribar a ninguna conclusión que relacione los genotipos y/o haplotipos con la condición de Crisis Blástica ni con el haplotipo de la línea celular.

Es interesante destacar que analizando el genotipo del exón 26 en pacientes en fase crónica, los 9 casos heterocigota CT (100%) y 4 de los 5 casos homocigotas TT (80%), mostraron respuesta adecuada al tratamiento con inhibidores de TK. En cambio, dicha respuesta disminuyó al 33% en los casos homocigota CC. Este último alelo homocigota parece ser un marcador predictivo de menor eficacia terapéutica y estar acorde a lo previamente descrito por Hoffmeyer S y col (Hoffmeyer S et al ,2000).

Si analizamos el SNP C1236T del exón 12, la presencia de un único alelo T se encontró en 9 casos de pacientes en fase crónica, que se asociaron con RMM en 8. En cambio, la presencia de dos alelos TT en el exón 12, se observó en 5 pacientes en FC con RCC y/o RMM en todos ellos (100%).

El genotipo CC para el exón 12 se encontró en 8 casos de FC, de los cuales 5 tuvieron RCC/RMM, en tanto que los otros tres resultaron sin respuesta citogenética y/o molecular (casos 7, 4 y 12), y aplasia medular en uno (caso 22).

En el polimorfismo G2677T/A del exón 21, la presencia de un único alelo T se encontró 10 pacientes en fase crónica, de los cuales 8 tuvieron una respuesta citogenética completa y molecular mayor, en cambio un caso presentó una complicación de carcinoma invasor con respuesta citogenética nula y el restante con respuesta molecular menor. La presencia de dos alelos T en dicho exón, se encontró en 3 casos de FC, y todos con RCC/RMM.

Finalmente, el genotipo GG se encontró en 8 casos de FC de los cuales 5 presentaron una RCC/RMM. Los restantes tres casos desarrollaron fallos terapéuticos mostrando RCN/RMN (caso 7), RMMe (caso 12) o aplasia medular (caso 22).

El caso particular del SNP G2677/A del exón 21 descrito como muy poco frecuente (Cascorbi I et al, 2001; Milojkovic M et al; 2011), se ha mencionado que la presencia del alelo A estaría asociado a mejor respuesta citogenética (Ling-Na Ni et al, 2010). En nuestro grupo de pacientes fue detectado solamente en dos casos, uno en FC (caso 23) con RCC/RMM, y el otro caso en CB que falleció al mes de iniciado el tratamiento. Dicho polimorfismo no fue detectado en ninguno de los controles normales. Por su escasa frecuencia, no podemos concluir su importancia fenotípica en nuestra población.

Entre los diferentes grupos que han investigado los SNPs del gen MDR-1, en referencia a la mayor resistencia al tratamiento con ITK, se encuentran resultados aún contradictorios. En especial cuando se comparan dos SNPs, G2677T/A y C3435T en los exones 21 y 26 respectivamente en los diferentes grupos étnicos (Cascorbi et al, 2001; Zheng H et al, 2002; Milojkovic et al, 2011).

En la búsqueda de distintos polimorfismos, surgió curiosamente la existencia de variantes intrónicas (C2734T) lindantes al exón 21 en 5 casos, y uno en la región intrónica lindante del exón 26 (A3449T). Tres de los primeros tuvieron mala respuesta terapéutica, Pero los otros tres casos, tuvieron buena respuesta terapéutica, dato que sugerimos debiera estudiarse con más casos que permitan establecer un valor pronóstico de dichos polimorfismos intrónicos (Datos no mostrados).

Es de destacar que analizando la evolución clínico-terapéutica de los 6 pacientes con Haplotipos wt (CC/GG/CC), nos encontramos que 4 de ellos desarrollaron respuestas moleculares Nulas (2), Mínima (1), o aplasia medular (1), y los dos restantes habían desarrollado intolerancia al Imatinib, por lo que debieron ser tratados con Nilotinib, droga con la que sí alcanzaron la respuesta molecular completa. Sin duda entonces, en el 100% de estos casos, la presencia del haplotipo wt resultó ser un indicador predictivo de pobre respuesta al Imatinib, que se asoció a una mayor frecuencia de recaídas citogenéticas o fallo terapéutico, comparado a los casos con haplotipo mutado o variante-T, en cualquiera de sus combinaciones. En este contexto podemos mantener la hipótesis que un SNPs *alterado* sería un predictor de mejor RC y/o molecular, ante las diferentes estrategias terapéuticas utilizadas en el tratamiento de la LMC, durante la fase temprana de la enfermedad.

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la presencia de al menos un *alelo variante* (T o A) en cualquiera de los 3 exones estudiados, se correlaciona con una mejor respuesta terapéutica en el 93,75%, en tanto que en ausencia de dichos alelos variantes o haplotipo wt, la respuesta favorable al tratamiento no logra superar el 33,3% de los casos (Figura R-III 43).

Existen pocos estudios de los SNPs del gen MDR-1 en pacientes con diagnóstico de LMC, los cuales mostraron resultados variables. Uno de ellos señala la posible relación entre los distintos genotipos con la respuesta molecular alcanzada. Dulucq y col (Dulucq S et al, 2008) reportaron por primera vez la asociación entre el genotipo TT/TA (mutado) en el exón 21 (G2677/TA) y TT (mutado) en el exón 12 (C1236T), con un aumento en el número de casos con Respuesta Molecular Mayor. Además, observó que los casos con haplotipos wt (CC/GG/CC) presentaban una menor frecuencia de Respuesta Molecular Mayor. Estas observaciones son similares a las encontradas en nuestro estudio.

Maffioli y col (Maffioli M et al, 2011) refieren que la presencia del alelo T en el exón 21 se asoció con una mejor respuesta, y también mostró que el haplotipo caracterizado por un alelo T en el exón 12, acompañado de variantes wt en los exones 21 y 26 (1236T-2677G-3435C) fueron un hallazgo común en pacientes con resistencia primaria al imatinib.

Una conclusión diferente fué recientemente descrita por el grupo de Angelini S y col (Angelini S et al, 2012) indicando que el genotipo wt (CC) en el exón 26, se asociaba significativamente con RMC comparado con los genotipos alterados CT o TT (heterocigotas o full mutados), y además no halló ninguna relación entre los diferente haplotipos con las respuestas terapéuticas, y esta observación, se contradice con lo postulado por Hoffmeyer S (Hoffmeyer S et al., 2000), donde los genotipos CC de dicho exón, tendrían mayor predisposición a la farmacoresistencia. Nuestros datos apoyan esta última hipótesis. Si bien nuestros resultados se condicen con lo descrito por el grupo de Dulucq en lo referente a la respuesta terapéutica, también sugieren una potencial relación entre los genotipos y/o haplotipos estudiados con el riesgo de desarrollo y la evolución de la enfermedad. A pesar de este minucioso análisis, la presencia de al menos un alelo T y su relación con la respuesta terapéutica, no parece estar relacionada con un exón en particular. Estas consideraciones pueden estar vinculadas al concepto recientemente descritos de SNP de tipo funcional, regulatorio y/o codificante, y que los mismos generen variantes funcionales de la P-gp que modifican su comportamiento frente a la terapéutica (Ramírez-Bello J, et al, 2013).

CRISIS BLÁSTICA

Debemos aclarar que la línea celular K562 (crisis blástica), se origina a partir de una paciente con LMC quien fue reportada en 1975 (Lozzio et al, 1975), cuando no existían estos tratamientos dirigidos con inhibidores de TK, ni tampoco, la posibilidad de estudios de secuenciación como los ahora aplicados. A su vez, el gen MDR-1 aún no había sido descubierto. Dado que no hay reportes en la literatura que hayan analizado los genotipos de los exones mencionados del gen MDR-1 en la línea K562, el presente trabajo es el primer estudio que caracteriza el haplotipo correspondiente a los exones 12, 21 y 26, del gen MDR-1 en dicha línea celular.

Un análisis separado merecen entonces los dos casos con crisis blásticas, dado que los mismos fueron incorporados al estudio cuando ya habían desarrollado la transformación blástica de su LMC, sin tratamiento previo alguno. Dado que se trata de solamente 2 pacientes, no se pueden sacar conclusiones definitivas. Sin embargo, presentan cierta similitud con la línea celular K562 cuyo haplotipo es CC/GG/TT. Estos pacientes con crisis blástica presentaban alelos T/A en los tres exones estudiados (CT/GT/TT y CT/GA/CT), y la línea celular también cuenta con un genotipo TT en el exón 26. La mayor similitud con el haplotipo de la línea celular la tuvo el paciente con haplotipo CT/GT/TT que inicialmente mostró falta de respuesta al Imatinib, pero logró una RM Mayor con el agregado de Nilotinib. Este comportamiento terapéutico de resistencia al Imatinib, concuerda con lo observado experimentalmente en los ensayos realizados con la línea celular. Sin embargo, es de destacar, que la gran similitud de haplotipos de la línea celular en crisis blástica, se encuentra con los casos portadores de Haplotipos WT, los únicos casos que poseen los genotipos CC y GG en los exones 12 y 21 respectivamente. Estos pacientes fueron los que presentaron mayor porcentaje de refractariedad al tratamiento con Imatinib. Teniendo en cuenta que la línea celular logró mejores respuestas al incrementar las dosis de Imatinib en presencia de CyA, es dable especular que estos pacientes, se verían significativamente beneficiados con terapia con altas dosis de ITK más el agregado de un inhibidor de P-gp.

Otros dos pacientes en fase crónica presentaron idéntico haplotipo al caso arriba descrito, pero con respuestas terapéuticas opuestas entre sí. Si bien uno de ellos respondió adecuadamente al tratamiento con Imatinib, el otro, llamativamente presentó muy rápidamente, una respuesta molecular nula y desarrolló un carcinoma de Mama. Dada la ausencia de casos con el mismo haplotipo de la línea celular, no es posible

asociar dichos haplotipos al riesgo de desarrollo de crisis blásticas. Sin embargo, estos datos sugieren, que otros mecanismos genéticos, diferentes a los polimorfismos del gen MDR-1, estarían gobernando la transformación blástica de esta leucemia.

Las respuestas variables a los fármacos, tienen un origen complejo, en el cual se ven involucrados múltiples factores genéticos. Esto hace posible que las expresiones génicas sean herramientas muy útiles en la caracterización individual de los pacientes, dado que como hemos examinado, la LMC tiene un comportamiento muy heterogéneo en su evolución. Frente a la administración de un ITK, con la información genética que nos proporcionan los estudios de los SNPs para el gen MDR-1, podríamos predecir el tipo de respuesta citogenética ó molecular que va a tener un paciente en un corto plazo.

Con el mismo interés se investigó las posibles frecuencias y distribuciones en los SNPs del gen MDR-1 en sujetos sanos (no leucémicos). Estos estudios demostraron que la distribución de las frecuencias de los diferentes alelos en la población caucásica estudiada fue similar en el exón 12 para las tres variantes posibles (wt, heterocigotas o full mutados). A su vez, el alelo wt se encontró en proporciones similares en los tres exones analizados (31,6%, 28% y 32% respectivamente). Sin embargo, en los exones 21 y 26, se observaron frecuencias alélicas similarmente elevadas para las variantes heterocigotas (68% y 60% respectivamente), y frecuencias muy bajas (4%) para los genotipos homocigotas TT en ambos SNPs (Figura R-IV47). Esta particular distribución, se diferenció significativamente de lo hallado en los pacientes con LMC.

A su vez, en los normales no se halló ningún caso con haplotipos wt, variante A en el exón 21, ni tampoco haplotipos full mutados (TT/TT/TT). De aquí se desprende que la existencia de dos alelos T (TT) en un mismo exón mostró diferente distribución entre los individuos normales y los leucémicos. La presencia de alelos TT en el exón 12 fue predominante en los controles en tanto que su presencia en los exones 21 y 26 fue predominante en los leucémicos (Fig- R-IV 49).

De acuerdo al trabajo publicado por el grupo de Yaya y col (Yaya K et al, 2014), el SNPs 1236TT sería un indicador de riesgo 3,3 veces mayor para el desarrollo de la enfermedad, respecto a los genotipos CC y CT para dicho SNP.

Según nuestros cálculos obtenidos de la Relación Relativa entre pacientes sanos y Leucémicos, la menor expresión de la variante TT en el exón 12, y la presencia

de los genotipos TT en los exones 21 y 26, se puede considerar como un haplotipo un indicador de riesgo de desarrollo de enfermedad comparado. Nuestro estudio no fue coincidente con lo reportado por el grupo de Yaya y col, quienes señalan que la presencia del alelo TT en el exón 12, sería de alto riesgo de desarrollo de la LMC, en tanto la carga de alelos TT encontrada en el exón 12 en nuestro estudio, tuvo mayor frecuencia en los individuos sanos que en los leucémicos, en quienes a su vez, esta proporción se invierte en los otros exones 21 y 26.

De esta investigación surge que el análisis de los genotipos y sus posibles haplotipos, permitiría contar con un perfil genético de las distintas variantes de los SNPs del gen MDR-1, con alto valor indicativo tanto del posible riesgo de desarrollo de la enfermedad, de su evolución clínica como de la respuesta terapéutica.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES ESPECIFICAS

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir

- a- Que la sobreexpresión de los transportadores de drogas P-gp y BCRP, generan resistencia al Imatinib en la línea celular K562.
- b- La inhibición de la actividad funcional de estos transportadores mediada por CyA, revierte dicha resistencia.
- c- El escalamiento de dosis de Imatinib resulta mucho más efectivo en presencia de CyA
- d- El estudio de los SNPs del gen MDR-1/ABCB1 (exones 12, 21 y 26), en esta línea celular, mostró el haplotipo CC/GG/TT, caracterizado por la presencia de un haplotipo wt en los exones 12 y 21 y full mutado TT en el exón 26.
- e- Dicho resultado es la primera comunicación de las características genéticas de la línea celular K562, respecto a los mencionados SNPs.
- f- Los polimorfismos hallados en la línea celular, no resultó coincidente con ningún caso clínico de los 24 pacientes con LMC estudiados, aún aquellos que desarrollaron la CB. Estos datos indican que la predisposición al desarrollo de la crisis blástica, no puede ser inferida a partir de estos estudios moleculares.
- g- Desde el punto de vista clínico el riesgo pronóstico según el Modelo Sokal, no mostró ninguna asociación con dicha evolución terapéutica ni con los haplotipos encontrados en los pacientes con LMC.

- h- La combinación de genotipos homocigotas ya sean wt completos (CC/GG/CC) o full mutados (TT/TT/TT) fueron exclusivamente detectados en los casos leucémicos.
- i- Los haplotipos WT-CC-GG-CC se asociaron a alto nivel de fallo terapéutico y mal pronóstico.
- j- Los haplotipos T-variantes, se asociaron a buena respuesta terapéutica.
- k- Si bien los estudios citogenéticos y moleculares de seguimiento como marcadores de Enfermedad Mínima Residual, son los métodos confiables como marcadores de evolución terapéutica, los mismos no son de valor pronóstico previo al tratamiento

CONCLUSION FINAL

Los estudios realizados en el presente trabajo sugieren que:

- a- Los SNPs de genes de resistencia a multidroga, particularmente en los exones 12, 21 y 26 del gen MDR-1 (ABCB1) de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica, permiten definir que particularmente al Haplotipo-wt CC-GG-CC, como una nueva herramienta o perfil genético predictivo de riesgo de desarrollo de la LMC en sí misma, de una evolución clínica tórpida de la enfermedad.
- b- Dicho perfil (haplotipo WT), sería indicador de alto riesgo de fallo terapéutico con ITK.
- d- Su detección precoz al momento del diagnóstico, permitiría redefinir nuevas estrategias farmacológicas, que contemplen la inhibición funcional de la glicoproteína P, con mejor respuesta terapéutica como lo observado experimentalmente en la línea celular K562.

BIBLIOGRAFIA

A

Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinman L. Polycythemia vera; stem cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976;295:913-916.

AGRAWAL M, HANFSTEIN B, ERBEN P, WOLF D, ERNST T, FABARIUS A, SAUSSELE S, PURKAYASTHA D, WOODMAN R C, HOFMANN W-K, HEHLMANN R, HOCHHAUS A AND M C MÜLLER. MDR1 expression predicts outcome of Ph+chronic phase CML patients on second-line nilotinib therapy after imatinib failure. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1478-85

ALBERTS B, LEWIS J ET AL. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA, PÁG. 595, 4ª EDICIÓN, ED. OMEGA, 2004

Allabi AC, Horsmans Y, Issaoui B, Gala JL. Single nucleotide polymorphisms of ABCB1 (MDR1) gene and distinct haplotype profile in a West Black African population. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61(2):97-102.

Andreu Enrique J, Lledo Elisa, Poch Enric, Ivorra Carmen, et al. BCR-ABL Induces the Expression of Skp2 through the PI3K Pathway to Promote p27 Kip1 Degradation and Proliferation of Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Cancer Res* 2005;65:(8):3264-3272.

Angelini, Sabrina Simona Soverini, Gloria Ravegnini, Matt Barnett, Eleonora Turrini, Mark Thornquist, Fabrizio Pane, Timothy P. Hughes et al. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therap. *Hematologica*, 2012; DOI: 10.3324/haematol.2012.066480

Arunasree KM, Roy KR, Anilkumar K, Aparna A, Reddy GV, Reddanna P. Imatinib-resistant K562 cells are more sensitive to celecoxib, a selective COX-2 inhibitor: role of COX-2 and MDR-1. *Leuk Res* 2008;32(6):855-64.

Assef Y, Rubio F, Coló G, Del Mónaco S, Costas M, Kotsias BA. Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. *Leukemia Research* 2009, 33:710–716.

Assef Y, Cavarra S, Damiano A, Ibarra C, Kotsias BA. Ionic currents in multidrug resistant K562 human leukemic cells. *Leuk Res* 2005;29(9):1039-47.

Athens, John W. Leucemia mielocítica crónica. Wintrobe, Hematología Clínica, Cap 75, 1708-Ed Inter-Médica, 1995

Azzariti A; Porcelli L, Simone Grazia M. Tyrosine kinase inhibitors and multidrug resistance proteins: interactions and biological consequences *Cancer Chemother Pharm* 2010;65:335-46.

B

BACCARANI M, CORTES J, PANE Y COL. CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: AN UPDATE OF CONCEPTS AND MANAGEMENT RECOMMENDATIONS OF EUROPEAN LEUKEMIANET. *J CLIN ONCOL* 2009;27:6041-51.

BACCARANI M; SAGLIO G, GOLDMAN J, ET AL. EVOLVING CONCEPTS IN THE MANAGEMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA: RECOMMENDATIONS FROM AN EXPERT PANEL ON BEHALF OF THE EUROPEAN LEUKEMIA NET. *BLOOD* 2006;108:1809-20.

Baker Emma K. and Assam El-Osta. The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer. *Experim Cell Res* 2003;290:177–194.

Balram C, Sharma A, Sivathasan C, Lee EJ. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates. *Mol Biol Rep* 2006; 33:295-30.

Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis BS, Wong ASM, Wong A et al. BCR-ABL expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2005;65:8912–8919.

Bellgoy L y col. "GUIA de DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE LMC. SAH- 2013.

Belli C, Alú MF, Alfonso G, Bianchini M, Larripa I. Novel Variant Ph Translocation t(9;22;11)(q34;q11.2;p15)inv(9)(p13q34) in Chronic Myeloid Leukemia Involving a One-Step Mechanism. *Cytogenetic Genome Res* 2011;132:304-308.

BENDAYAN R , RONALDSON PT , GINGRAS D , M BENDAYAN . IN SITU LOCALIZATION OF P-GLYCOPROTEÍN (ABCB1) IN HUMAN AND RAT BRAIN. *J HISTOCHEM CYTOCHEM* 2006;54:1159-67.

Beld M, Cees S, Goudsmit J, Boom R. Fractionation of nucleic acids into single-stranded and double-stranded forms. *Nucleic Acids Research* 1996;24,(13)2618–2619.

Bengiό RM, Riva ME, Moiraghi B, Lanari E, Milone J, Ventriglia V, Bullorsky E, Tezanos Pinto Md, Murro H, Bianchini M, Larripa I. Clinical outcome of chronic myeloid leukemia imatinib-resistant patients: do BCR-ABL kinase domain mutations affect patient survival? First multicenter Argentinean study. *Leuk Lymphoma* 2011;52(9):1720-6.

Benitez Ortiz J. El genoma humano: aplicaciones en la práctica Pediátrica. *Vox Paediatrica* 2002; 10,1(7-12).

Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from

suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J* 1845;64:413–423.

Bereshchenko O, Mancini E, Moore S, Bilbao D, Mansson R, Luc S, Grover A, Jacobsen SE, Bryder D, Nerlov C. Hematopoietic stem cell expansion precedes the generation of committed myeloid leukemia-initiating cells in C/EBPalpha mutant AML. *Cancer Cells* 2009;16(5):390-400.

Berger U, Maywald O, Pfirrmann M, Lahaye T, Hochhaus A, Reiter A, Hasford J, Heimpel H, Hossfeld DK, Kolb H-J, Löffler H, Pralle H, Queisser W, Hehlmann R and the German CML-Study Group. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long-term results from randomized studies. *Leukemia* 2005;19:984–989.

Bianchini M, De Brasi C, Gargallo P, Gonzalez M, Bengio R, Larripa I. Specific assessment of BCR-ABL transcript overexpression and imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* 2009;82(4):292-300.

Boenisch Th. Inmunohistoquímica Básica. Manual Métodos Inmunohistoquímico de Coloración. Ed. 3era Editor T Boenisch, 2001.

Bohmer FD, Karagyozov L, Uecker A, Serve H, Botzk A, Mahboobi S, Dove S. Single Amino Acid Exchange Inverts Kinases for the ATP Site Inhibitor STI-571 Tyrosine Susceptibility of Related Receptor. *JBC* 2003;278:5148-5155.

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

Brendel C, Scharenberg C, Dohse M, Robey RW, Bates SE, Shukla S, Ambudkar SV, Wang Y, Wennemuth G, Burchert A, et al. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21:1267–1275.

Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 2002;20,11–20.

Bunting K, Robert D, Hawley G. Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells. *Biology of the Cell* 2003;95:563–578.

By Mickley LA, Lee JS; Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wyndham W, Bates SE, Fojo T. Genetic Polymorphism in *MDR-1*: A Tool for Examining Allelic Expression in Normal Cells, Unselected and Drug-Selected Cell Lines, and Human Tumors. *Blood* 1998;91: 1749-1756.

Byrne JI, Carter GI, Davies JM, Haynes AP, Russeln HI, Cross CP. A novel BCR-ABL fusion gene (e2/1a) in a patient with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukaemia and an aggressive clinical course. *Br J Haematol* 1998;103,791–794.

C

Carlo Gambacorti-Passerini, Zucchetti M, Russo D. A1 Acid Glycoprotein Binds to Imatinib (STI571) and Leukemia Patients Substantially Alters Its Pharmacokinetics in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:625-632.

Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol* 2011;20:261-83.

Cascorbi I; Gerloff Th, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. The frequency of P-dlycoprotein in single nucleotide polymorphiosms drug transporte MDR1 gene in white. *Clin Pharmacol & Ther* 2001;69,169-174.

Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann, Matter A. Glivec (STI571, IMATINIB), a rationally developed targeted anticancer drug. *Nature Reviews* 2002;1:493-502.

Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *JBC* 1990;265(1):506-14.

Chava Kimchi-Sarfaty, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, In-Wha Kim, Jones A, Arora M, Gribar J, Gurwitz D, Gottesman MM. Ethnicity-Related Polymorphisms and Haplotypes in the Human *ABCB1* Gene. *Pharmacogenomics* 2007;8(1):29–39.

Chung-Jung Tsai, Zuben E. Sauna, Chava Kimchi-Sarfaty, Suresh V. Ambudkar, Michael M. Gottesman, Ruth Nussinov .Synonymous Mutations and Ribosome Stalling Can Lead to Altered Folding Pathways and Distinct Minima . *J Mol Biol* 2008;383(2):281–291.

Cheol-Hee Choi. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the Development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell International*, 2005, 5:30.

Choczynski P, Sacchi N Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem*, 1987;162:156-159.

Chung-Pu W, Calcagno A M, Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: Evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol* 2008;1(2):93–105.

CIVIN CI, ALMEIDA-PORADA G, LEE MJ, ET AL. SUSTAINED, RETRANS-PLANTABLE, MULTILINEAGE ENGRAFTMENT OF HIGHLY PURIFIED ADULT HUMAN BONE MARROW STEM CELLS IN VIVO. *BLOOD* 1996;88(11):4102-9.

Cortes JE: When imatinib falls, what else is there?. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*.2009;402-406.

Cortes JE, BACCARANI M, GUILHOT F, DRUKER BJ, et al. Phase III, Randomized, Open-Label Study of Daily Imatinib Mesylate 400 mg Versus 800 mg in Patients With Newly Diagnosed, Previously Untreated Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase Using Molecular End Points: Tyrosine

Kinase Inhibitor Optimization and imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol*. 2009;27(25):4204-10.

Cortes JE, Baccarani M, Guilhot f, Druker BJ, et al. PHASE III, RANDOMIZED, OPEN-LABEL STUDY OF DAILY IMATINIB MESYLATE 400 MG VERSUS 800 MG IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED, PREVIOUSLY UNTREATED CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IN CHRONIC PHASE USING MOLECULAR END POINTS: TYROSINE KINASE INHIBITOR OPTIMIZATION AND SELECTIVITY STUDY. TOPS (*Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity*). *J Clin Oncol* 2010;12,59-66.

Craiz F; Foon K. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasm. *Blood* 2008; 8:3941-67.

Cross N, White H, Muller M, Saglio G, Hochhaus A. Standardization definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012;26,2172-2175.

D

D Primo, Taberero MD, Rasillo A, Sayagués JM, Espinosa AB, Chillón MC, Garcia-Sanz R, Gutierrez N, Giralt M, Hagemeijer A, San Miguel JF, Orfao A. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in BCR/ABL+ leukemias: incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia* 2003;17,1124–1129.

Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 1951; 6: 372-375.

Dassa E and Bouige P. The ABC of ABCS: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* 2001,152:211–229.

Declaración de Helsinki- Asociación Médica mundial.1994-Helsinki, 1975-Tokio, 1983-Venecia, 1989- Hong Kong, 1996-Somerset West, 2000-Escocia, 2002-GinebraNota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002.Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004.59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008.

Deininger M, Goldman J and Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-3356.

Deininger M, Vieira SA, Parada Y, Banerji L, Lam EW, Peters G, Mahon FX, Köhler T, Goldman JM, Melo JV. Direct relation between BCR-ABL tyrosine kinase activity and cyclin D2 expression in lymphoblasts. *Cancer Res* 2001;61(21):8005-13.

Deininger M, Buchdunger E, Druker B. Development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005;105:2640–2653.

Deininger M; Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:10:3343-3353.

Deininger MW, Druker BJ. Circumventing imatinib resistance. *Cancer Cell*, 2004; 6:108–10.

Dohse M, Scharenberg Ch, Shukla S, Robey RW, Volkmann Th, Deeken JF, Brendel C, Ambudkar SV, Neubauer A, Bates SE. Comparison of ATP-Binding Cassette Transporter Interactions with the Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib. *Drug Metabolism and Disposition* 2010;38,(8):1371-80.

Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003;101:690–698.

Drach D, Zhao S, Drach J, et al. Subpopulations of Normal Peripheral Blood and Bone Marrow cells express a Functional Multidrug Resistant Phenotype. *Blood* 1993;81:3480-1,

Druker B, Guilhot F, O'Brien S, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355:2408–2417.

Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, et al. Multidrug resistance gene (*MDR1*) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008;112:2024-2027.

E

Ernst Th, Hoffmann J, Erben P, Hanfstein B, Leitner A, Hehlmann R, Hochhaus A, Müller MC. ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93(9):1389-93.

E.G. van Lochem VHJ. van der Velden, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NAC, van Dongen JJM. Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2004;60:1–13.

Ethical Guidelines for Biomedical research involving Human Subjects. Organización mundial de la salud (OMS) y el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS), 1993.

F

Fabienne Grandjean - Forestier, Christophe Stenger, Jacques Robert, Mireille Verdier, and Marie - H é l è ne Ratinaud. ABC Transporters and Multidrug Resistance, Edited by Ahcène Boumendjel, Jean Boutonnat and Jacques Robert Copyright © 2009 by John Wiley & Sons, Inc.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *NEJM* 1999;341:164-178.

Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. Chronic Myelogenous Leukemia: Update on Biology and Treatment. *ONCOLOGY* 1999;3(2):169-184.

Figueiredo-Pontes L; Pintao T; liveira L et al. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:163-8.

Fiona E. Craig and Kenneth A. Foon. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111(8):3941-67.

FU Jianxin; Chen Z; Cen J and Ruan CH. Expression of the human multidrug resistance gene *mdr1* in leukemic cells and its application in studying P-glycoprotein antagonists. *Chin Med J* 2000;113: 228-231.

G

Gabert J; Beillard E, van der Velden V et al. Standardization and quality control studies of real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in Leukemia: a Europe against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318-2357

Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galietta A, Rostagno R, Scapoza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol* 2003;4(2):75-85.

Gesbert F, Ellers W, Signoretti S, Loda M, Griffin J. BCR/ABL regulate expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} through the phosphatidylinositol-3 kinase/AkT pathway. *JBC* 2000;275:39223-230.

Gibson & Muse. A Primer of Genome Science, 2nd Edition. Sinauer Associates. 2004.

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

GRANDJEAN—FORESTIER F; STENGER C, VERDIER R J, AND RATINAUD M. THE P —GLYCOPROTEIN 170: JUST A MULTIDRUG RESISTANCE PROTEIN OR A PROTEAN MOLECULE? ABC TRANSPORTERS AND MULTIDRUG

RESISTANCE, EDITED BY AHCÈNE OUMENDJEL, JEAN BOUTONNAT AND JACQUES ROBERT COPYRIGHT ©. 2009, BY JOHN WILEY & SONS, INC.

Green H; Sorderkvist P, Rosenberg, P et al. Mdr-1 Single Nucleotide Polymorphisms in Ovarian Cancer Tissue: G2677T/A Correlates with Response to Paclitaxel Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:854-9.

Gribble SM, Roberts I, Grace C, Andrews KM, Green AR, and Nacheva EP: Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence insitu hybridization. *Cancer Genetic and Cytogenetics* 2000;118:1-8.

Guilhot F, Chastang C, Michallet M, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:223–9.

Gupta A, Dai Y, Vethanayagam RR, Hebert MF, Thummel KE, Unadkat JD, Ross DD, Mao Q. Cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:374–383.

Gutierrez MI, Timson G, Siraj AK, Bu R, Barbhaya S, Banavali S, Bhatia K. Single Monochrome Real-Time RT-PCR Assay for Identification, Quantification, and Breakpoint Cluster Region Determination of t(9;22) Transcripts . *J Mol Diagn* 2005,7,(1):40-7.

H

Halvor LH, Shadidi M, Narvhus K, Kjøsnes O, Tierens A, Aasheim H-Ch. Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis. *J Leuk Biol* 2008;84:1183-5.

Hamada A, Miyano H, Watanabe H, and Saito H. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2003,307:824–828.

Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:850–858.

Hasford J, Baccarani M, Hoffman V et al. Predictin complete cytogenetic response and subsequent -progression free survival in 2060 patients whit CML on imatinib treatment: The EUTOS scores. *Blood* 2011;118(3):686-692

Hegedu's Tama's, La'szlo Orfi , Attila Seprodi , Andra's Va'Radid ,Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1587 318–325

Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, et al. Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia:prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 1993;82:398–407.

Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronicmyelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 1994;84:4064–77.

Henkes Martin; Heiko van der Kuip, Walter E Aulitzky.Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (GlivecR, GleevecTM). *Ther & Clin Risk Management* 2008;4(1):163-87.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*; 1992; 8:67–113.

Ho M; Hogge D and Ling V. MDR1 and BCRP expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology* 2008,36:433-42,

Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosee P, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002;16:2190-2196

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrugresistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo.*PNAS* 2000;(97),7:3473–3478.

Holtz Melissa, Marilyn L. Slovak, Feiyu Zhang, Charles L. Sawyers, Stephen J. Forman and Ravi Bathia Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant abnormally increased proliferation progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood* 2002,99;3792-3800.

Hong Qian, Jennifer Antonchuk, and Sten-Eirik W. Jacobsen.Kit Regulates Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells.The Journal of Immunology 2008, 180: 2045–2053.

Hughes T, Deininger M, Hochhaus A et al.Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors, review and recommendations for harmonizing current methodology for

detecting BCR-ABL transcripts and Kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2008;108:27-37,

Hughes T, Saglio G, Branford S, Soverini S, Kim DW, Müller MC, Martinelli G, Cortes J, Beppu L, Gottardi E, Kim D, Erben P, Shou Y, Haque A, Gallagher N, Radich J, Hochhaus A. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol* 2009;27:4204–4210.

Hübner MD, Comparsi Wagner S, dos Santos TV, Lizot LF, Antunes M V, Capra M, Linden R. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33(4):302-6.

I

Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, Poerio A, Soverini S, Bassi S, Cilloni D, Bassan R, Breccia M, Lauria F, Izzo B, Merante S, Frassoni F, Paolini S, Montefusco E, Baccarani M, Martinelli G. GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:3037-4520.

Illmer Th, Schuler Ulrich S, Thiede Ch, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund D, Schäkel U, Ehninger G, Schaich M. *MDR1* Gene Polymorphisms Affect Therapy Outcome in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Cancer Res* 2002;62:4955-4962.

J

Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. Treatment selection after imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Target Oncol* 2009;4:3-10.

Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. Long-Term Outcomes in the Second-Line Treatment of Chronic Myeloid Leukemia . A Review of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer* 2011;117:897–906

Jaffe SE, Harris N, Stein H, Vardiman J. WHO Cassification of Tumors. Eds. IARC Press. 2001: 20-26.

Jamroziak K and Robak T. Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 Gene: the Influence on Risk and Clinical Outcome of Haematological Malignancies. *Hematology* 2004;9:91–105.

Jonuleit T, van der Kulp H, Miething C, Michels H, Dyster J and Aulitzky W. Bcr-Abl kinase dwn-regulates cyclin- dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood* 2000, 96:1933-39,

Juliano RL and Ling V A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455:152–162.

K

Kantarjian HM, Keating MJ, Smith TL, Talpaz M, McCredie KB. Proposal for a simple synthesis prognostic staging system in chronic myelogenous leukemia. *Am. J. Med* 1990;88:1-8.

Kantarjian H, O'Brien S, and Shan J, Huang X, Garcia-Manero G, Faderl S, Ravandi-Kashani F, Verstovsek S, Beth Rios M, Cortes J : Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia: need for new response definitions? *Cancer* 2008; 112: 837–45.

Kawasaki E, Clark S, Coyne M, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leucemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1988; 85:5698–5702.

Khalidi SA, Brynes RK, Medeiros LJ, Chang KL, Eslovaquia ML, Snyder DS, Arber DA The immune of chronic myelogenous leukemia in blastic transformation: a high frequency of phenotype mixed lineage in explosions "lymph" and a comparison of the morphological findings, immunophenotypic and molecular. *Mod Pathol* 1998;11(12):1211-21.

Kharas GM, and Fruman A. Abl oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 2005;65:2047-53.

Khorashad, JS M Anand, D Marin, S Saunders, T Al-Jabary, A Iqbal, S Margerison, JV Melo, JM Goldman, JF Apperley and J Kaeda. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 2006;20,658–663

KIM TM, HA SA, KIM HK, YOO J, KIM S, YIM SH, JUNG SH, KIM DW, CHUNG YJ, KIM JW. GENE EXPRESSION SIGNATURES ASSOCIATED WITH THE IN VITRO RESISTANCE TO TWO TYROSINE KINASE INHIBITORS, NILOTINIB AND IMATINIB. *BLOOD CANCER J* 2011;1(8):1-11::E32. DOI: 10.1038

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I-W, et al. A 'Silent' polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315:525–8.

Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P., and Gerard, G.F. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res* 1988 ;16(1):265-77

Kuppens IE, Witteveen EO, Jewell RC, Radema SA, Paul EM, Mangum SG, Beijnen JH, Voest EE, Schellens JH. A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;13:3276–3285.

L

LABIALLE S, GAYET L, MARTHINET E, RIGAL D, BAGGETTO LG. TRANSCRIPTIONAL REGULATORS OF THE HUMAN MULTIDRUG RESISTANCE 1 GENE: RECENT VIEWS. *BIOCHEM PHARMACOL* 2002;64(5-6):943-8

Larson Richard A. CML: Live long and prosper. *Inside Blood* 2011;118(17):4554-8.

Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang J, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao X, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 1996;2(12):1329-37.

LEE YL, CHEN CW, LIU FH, HUANG YW, HUANG HM. ACLACINOMYCIN A SENSITIZES K562 CHRONIC MYELOID LEUKEMIA CELLS TO IMATINIB THROUGH P38MAPK-MEDIATED ERYTHROID DIFFERENTIATION. *PLOS ONE*. 2013 17;8(4).

Ling-Na Ni, Jian-Yong Li, Kou-Rong Miao, Chun Qiao, Su-Jiang Zhang, Hai-Rong Qiu, Si-Xuan Qian. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol* 2011;28(1):265-9.

Loor F, Tiberghien F, Wenandy T, Didier A, Traber R Cyclosporins: Structure- Activity Relationships for the Inhibition of the Human MDR1 P-Glycoprotein ABC Transporter. *J Med Chem* 2002;45: 4598-4612.

Lozzio CB and Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975;45:321-34

Lozzio CB, **Lozzio BB** Human Chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975,45: 321.

Lübbert M, Herrmann F, and Koeffler P. Expression and Regulation of Myeloid-Specific Genes in Normal and Leukemic Myeloid Cells. Review Article. *Blood*, 1991, 77: 909-924.

Lundàn T Juvanén V, Mueller MC, Mustjoki S, Lakkala T, Kairisto V, Hochhaus A, Knuutila S, Porkka K. Comparison of bone marrow high mitotic index metaphase fluorescence in situ hybridization to peripheral blood and bone marrow real time quantitative polymerase chain reaction on the International Scale for detecting residual disease in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93: 178-185.

M

Maffioli M, Camós M, Gaya A, Hernández-Boluda JC, Alvarez-Larrán A, Domingo A, Granell M, Guillem V, Vallansot R, Costa D, Bellosillo B, Colomer D, Cervantes F. La correlación entre los polimorfismos genéticos de los *hOCT1* y *MDR1* genes y la respuesta a imatinib en pacientes recién

diagnosticados en fase crónica con leucemia mieloide crónica. *Leukemia Research* 2011;(35): 1014-1019.

Mahon FX; Hayette S, Lagarde V, Belloc F, Turcq B, Nicolini F, Belanger C, Manley PW, Leroy C, Etienne G, Roche S, Pasquet JM. Hayette S Lagarde V. Evidence that Resistance to Nilotinib May Be Due to BCR-ABL, Pgp, or Src Kinase Overexpression. *Cancer Res* 2008;68:9809-9816.

Mahon FX, Deininger MWN, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance *BLOOD* 2000; 96,(3),1070-79.

Mahon FX , Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV., Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J . MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003;101:2368–2373.

Munteanu E, Verdier M, Grandjean-Forestier F, Stenger C, Jayat-Vignoles C, **Huet S**, Robert J, Ratinaud MH. Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in Doxorubicin - resistant K562 cells. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1162–1174.

Marcel Beld, Cees Sol, Jaap Goudsmit and René Boom Fractionation of nucleic acids into single-stranded and double-stranded forms . *Nucleic Acids Research* 1996,24(13): 2618–2619.

Marin David, Amr R. Ibrahim, Claire Lucas, Gareth Gerrard, Lihui Wang, Richard M. Szydlo, Clark RE, Apperley JF, Milojkovic D, Bua M, Pavlu J, Paliompeis C, Reid A, Rezvani K, Goldman JM, Foroni L. Assessment of *BCR-ABL1* Transcript Levels at 3 Months Is the Only Requirement for Predicting Outcome for Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors. *J CLIN ONCOL* 2012;30(3), 232-38.

Marin JG, Monte MJ, Blazquez AG, Macias R, Serrano MA, Briz O. The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacologica Clinica* 2014;35:1–10.

Marshall A. Lichtman. Clasificación y manifestaciones clínicas de los trastornos mieloides clonales. Capítulo 91, pg 771. Williams Hematología. Edición en español de Williams Hematology 6ª ed, 2007 Editorial Marbán®

Martins DH, Wagner SC, dos Santos TV, de Lima Feltraco Lizot L, Venzon Antunes M, Capra M, Linden R. Monitoring imatinib plasma concentrations in chronic myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 33(4): 302–306.; Koren-Michowitz M1, Volchek Y, Naparstek E, Gavish I, Levi I, Rowe JM, Shimoni A, Nagler A. Imatinib plasma trough levels in chronic myeloid leukaemia: results of a multicentre study CSTI571AIL11TGLIVEC. *Hematol Oncol* 2012;30(4):200-5).

Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA, Penfold GK, Jacobson RJ, Fialkow PJ. Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1980;287: 49–50.

Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:13-33.

Masashi Narita, Krizhanovsky V, Nuñez, S, Chicas A, Hearn, SA, Myers, M P. and Scott W. Lowe .A Novel Role for High-Mobility Group A Proteins in Cellular Senescence and Heterochromatin Formation. *Cell* 2006;126:503-14.

Melo Junia V and Barnes David J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *NATURE REVIEWS CANCER* 2007;7(6):441-53.

Melo JV. BCR-ABL gene variants. *Baillieres Clin-Haematol* 1997;10:203-222.

Mickley L A, Lee JS; Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wyndham W, Bates SE. and Fojo T Genetic Polymorphism in *MDR-1*: A Tool for Examining Allelic Expression in Normal Cells, Unselected and Drug-Selected Cell Lines, and Human Tumors. *Blood* 1998; 91:1749-1756.

Milojkovic M, S Stojnev, me Jovanovic, S Ljubisavljevic, V Stefanovic, Sunder-Plassman R. Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacol Rep* 2011;63(3):808-14.

Mishell B B, Shiigi SM, Henry C, Chan EL, North J, and Gallily R (1980). Preparation of mouse cell suspensions. In selected Methods in Cellular Immunology (B.B. Mishell and S.M. Shiigi, eds. W. H Freeman, New York 21-22

Mitelman F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993;(11)11–15.

Muller MC, Cortes JE, Kim DW, Druker BJ, Erben P, Pasquini R, Branford S, Hughes TP, Radich JP, Ploughman L, Mukhopadhyay J, Hochhaus A. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* 2009, 114:4944–4953.

Munteanu E, Verdier M , Grandjean - Forestier F , Stenger C , Jayat - Vignoles C Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells. *Biochem Pharmacol* 2006;71(8):1162-74.

N

Nagar B, Bornmann W, Pellicena P. Crystal structures of the kinase domain of c-abl in complex with the small molecule inhibitors pd173955 and imatinib (sti-571). *Cancer Research* 2002;62, 4236–4243.

Nakanishi T, Shiozawa K, Hassel BA, and Ross DD. Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood* 2006;108:678–684

Naumann S, Reutzel D, Speicher M, Decker HJ. Complete karyotype characterization of the K562 cell line by combined application of G-banding, multiplex-fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization. [*Leuk Res*](#) 2001;25(4):313-22.

Nikolas von Bubnoff, Justus Duyster. Chronic Myelogenous Leukemia. Treatment and Monitoring Deutsches REVIEW ARTICLE Deutsches Ärzteblatt International. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107(7): 114–21

Ni LN, JY Li, Miao KR, C Qiao, SJ Zhang, HR Qiu, SX Qian. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol* 2011; 28(1):265-9.

Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:85-109,

P

Palandri Francesca, Fausto Castagnetti, Ilaria Iacobucci, Martinelli G, Amabile M, Gugliotta G, Poerio A, Testoni N, Breccia M, Bocchia M, Crugnola M, Rege-Cambrin G, Martino B, Pierri I, Radaelli F, Specchia G, Pane F, Saglio G, Rosti G, Baccarani M. The response to imatinib and interferon-alpha is more rapid than the response to imatinib alone: a retrospective analysis of 495 Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase. *Haematology* 2010, 95:1415-9.

Pasternak T, Hochhaus A, B Schultheis, Hehlmann R. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998,124(12);643-60.

Pavlovsky C, Giere I, Moiraghi B. Molecular monitoring of Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia Patients in Complete Cytogenetic Remission: Does Achievement of a Stable Major Molecular Response at any Time Point Identify a Privileged Group of Patients? A Multicenter Experience in Argentina and Uruguay. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011 11:280-5.

Peters DG, Perlingeiro RC, Klucher KM, et al. Generation of a hematopoietic stem cell line from ES cells using the oncogene BCR/ABL. *Blood* 1999;94:252.

Pinkel D, Straum T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2934-8.

Preet M, Chaudhary and Roninson I B. Igor Expression and Activity of P-Glycoprotein, a Multidrug Efflux Pump, in Human Hematopoietic Stem Cells. *Cell* 1991;66:85-94.

Q

Quintas-Cardama Alfonso, Jorge Cortes MOLECULAR BIOLOGY OF BCR-ABL1-POSITIVE CHRONIC MYELOID LEUKEMIA. *Blood* 2009;113:1619-1630.

R

Roberts RL, Joyce PR, Mulder RT, Begg EJ and Kennedy MA. A common P-glycoprotein polymorphism is associated with nortriptyline-induced postural hypotension in patients treated for major depression. *The Pharmacogenomics Journal* 2002;2:191–196.

R. BOOM, C. J. A. SOL M, M. M. SALIMANS, C. L. JANSEN, P. M. E. WERTHEIM-VAN DILLEN, AND J. VAN DER NOORDA. A rapid and simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol* 1990:495-503

Raaijmakers M, Elke GP; Grouw PL, et al. Breast Cancer Resistance Protein in Drug Resistance of Primitive CD34+38 Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 2005;11:2436–2444.

Radich JP. Chronic Myeloid Leukemia 2010: Where Are We Now and Where Can We Go? ASH, 2010

RAMÍREZ-BELLO J, VARGAS-ALARCÓN G, TOVILLA-ZÁRATE C, FRAGOSO JM. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs): FUNCTIONAL IMPLICATIONS OF REGULATORY-SNP (RSNP) AND STRUCTURAL RNA (SRSNPs) IN COMPLEX DISEASES]. *GAC MED MEX* 2013;149(2):220-8.

Raub TJ. P-Glycoprotein Recognition of Substrates and Circumvention through Rational Drug Design. *MOL PHARMACEUTICS* 2005,3:3-25.

Ravi Bathia. Why is it so difficult to target leukemic stem cell. *PNAS* 2003;100:11842-11849

Riva, A. and Kohane, I.S. "SNPper: retrieval and analysis of human SNPs" *Bioinformatics* 2002; 18, 1681–1685.

Riveros D; Moiraghi B; Enrico Ay Milone J.Recomendaciones de la Sociedad Argentina de Hematología para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica del adulto. *Hematología* 2011; 15(1):8-14

Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Laï JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002;100:1014-1018.

Roepe PD. What is the precise role of human MDR 1 protein in chemotherapeutic drug resistance? *Curr Pharm Des* 2000;6:241-60.

Ross DM, Hughes TP, Melo JV. Do we have to kill the last CML cell? *Leukemia* 2011;25:193-200.

Rothemberg ML; Mickley LA; Cole DE; Bales FM; Tsuruo T; Poplack DG, Fojo T. Expression of the mdr-1/P-170 gene in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1989;74:1388-95.

Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-293.

S

Sambrook J, Fritsch, E. F, Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauna ZE, Chava Kimchi-Sarfaty, Surech V, Ambudkar, et al. Silent polymorphisms Speak: How They Affect Pharmacogenomics and the treatment of Cancer. *Cancer Res.* 2007;67:9609-9612.

Scha Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Laï JL, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C, Sheffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab, M.Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet* 2001;358:383-384.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000;289:1938-1942

Schlaifer D, Laurent G, Chittal S, Tsuruo T, Soues S, Muller C, Charcosset JY, Alard C, Brousset P, Mazerrolles C, et al..Immunohistochemical detection of multidrug resistance associated P-glycoprotein in tumor and stromal cells of human cancers. *Br J Cancer* 1990;62:177-82.

Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, Réa D, Dorlhiac-Llacer PE, Milone JH, Vela-Ojeda J, Silver RT, Khoury HJ, Charbonnier A, Khoroshko N, Paquette RL, Deininger M, Collins RH, Otero I, Hughes T, Bleickardt E, Strauss L, Francis S, Hochhaus A. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg

once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:3204–12.

Sharom FJ. ABC multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9:105–127.

Shukla S, Sauna Z, and Ambudkar S. Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site (s) of multidrug-resistance-linked ABC drug transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2. *Leukemia* 2008;22:445-447,

Sillaber, C, Mayerhofer M, Agis H et al. Chronic myeloid leukemia: Pathophysiology, diagnostic parameters, and current treatment concepts. *Wien Klin Wochenschr*, 2003; 14:485–504.

Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995;86:726-736.

Skorski T. Chronic myeloid leukemia cells refractory/resistant to tyrosine kinase inhibitors are genetically unstable and may cause relapse and malignant progression to the terminal disease state. *Leuk Lymphoma* 2011;52 Suppl 1:23-29.

Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gómez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F, et al. Prognostic discrimination in “Good Risk” chronic granulocytic. Leukemia. *Blood* 1984;63: 789-799.

Solazzo M, Fantappiè O, Lasagna N, Sassoli C, Nosi D, Mazzanti R. P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Exp Cell Res* 2006;312:4070–4078.

Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange Th, Saglio G, Pane F, Muller MC, Ernst Th, Rosti G, Porkka K, Baccarani M, Cross NCP, Martinelli G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011;118:1208-1215.

Suárez L; Vidriales MB; García Laraña J et al. CD34+ Cells from Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndromes, and Normal Bone Marrow Display Different Apoptosis and Drug resistance- Associated Phenotypes. *Clin Cancer Res* 2004;10:7599-7606.

Suvannasankha A, Niderman H, O’Loughlin K, Nakanishi T, Ford L, Greco W, Wetzler M, Ross D and Baer M. Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in adult lymphoblastic leukaemia: frequent expression and possible correlation with shorter disease-free survival, *BJ Haematol* 2004; 127:392-98

Swerdlow SH et al. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid *Tissues*. Lyon, France: IARC Press, 2008.

Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, and Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:219–234.

T

Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1137-1143.

Tefferi A and Gilliland. D G. Oncogenes in Myeloproliferative Disorders. Review. *Cell Cycle* 2007; 5,550-566.

Tefferi A, Schad CR, Pruthi RK, Ahmann GJ, Spurbeck JL, Dewald GW. Fluorescent insitu hybridization studies of lymphocytes and neutrophils in chronic granulocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83:61-64,

TEFFERI A, THIELE J, VARDIMAN JW. THE 2008 WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION SYSTEM FOR MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS: ORDER OUT OF CHAOS. *CANCER* 2009;115(17):3842-7.

Thoren LA., Liuba K, Bryder D, Nygren JM, Jensen ChT. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol* 2008,180(4):2045-53.

Tiwari AK, Sodani K, Wang SR, Kuang YH, Ashby CR Jr, Chen X, and Chen ZS. Nilotinib (AMN107, Tasigna) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochem Pharmacol* 2009;78:153–161.

T-M Kim, S-A Ha, HK Kim, J Yoo, S Kim, S-H Yim, S-H Jung, D-W Kim, Y-J Chung and JW Kim. Gene expression signatures associated with the in vitro resistance to two tyrosine kinase inhibitors, nilotinib and imatinib. *Blood Cancer Journal* 2011;1,e32.

Thomas Julia, Lihui Wang, Richard E. Clark, and Munir Pirmohamed Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004;104: 3739-3745

Topaly J, Zeller WJ, Fruehauf S. Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 2001;15:342-7

Tothova, Elena Carmino De Souza, Marc Rudoltz, Richard Yu, Tillmann Krahnke, Hagop M. Kantarjian, Jerald P. Radich, and Timothy P. Hughes. Phase III, randomized, open-label study of

daily imatinib mesylate 400 mg versus 800 mg in patients with newly diagnosed, previously untreated chronic myeloid leukemia in chronic phase using molecular end points: tyrosine kinase inhibitor optimization and selectivity study. *J Clin Oncol* 2010;20;28:424-30.

Turgut Sebahat , Günfer Turgut , Erol Ömer Atalay. Genotype and frequencies of alleles of multiple-drug-resistant human (MDR1) gene polymorphism C3435T in Denizli province of Turkey. *Biol Mol Reports* 2006;33,4:295-300.

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Increased accumulation of vincristine and Adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 1982;42:4730–4733.

Twentyman PR, Fox NE, White DJ. Cyclosporine A and its analogues as modifiers of Adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. *Br J Cancer* 1987; 56:55–57.

V

Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, Mori BM, Tone LG. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) -gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J* 2004;122:166-71.

Van den Elsen JM; Kuntz D; Hoedemaeker JF, and Rose D. Antibody C219 recognizes an-helical epitope on P-glycoprotein. *PNAS. Biochemistry* 1999;23:13679-13684.

Van den Heuvel-Eibrink, M.M., Wiemer EA, de Boevere MJ, van der Holt B, Vossebeld PJ, Pieters R, Sonneveld P. “MDR1 gene-related clonal selection and P-glycoprotein function and expression in relapsed or refractory acute myeloid leukemia”. *Blood* 2001, 97:3605–3611.

Van den Heuvel-Eibrink MM, van Schaik RHN, van der Heiden I, Sonneveld P, Pieters R, Wiemer EAC. “MDR-1 Gene Polymorphisms G2677T and C3435T Do Not Correlate with P-Glycoprotein Expression and Function in Acute Myeloid Leukemia (AML)”, *Blood* 2002;98,308a.

Van den Heuvel-Eibrink M ; Van der Holt-Alan K Bronno; Wolfgang U et al. CD 34- related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age. *Ann Hematol*, 2007; 86:329-337.

Van Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38:94-110.

Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid Neoplasms. *Chemico-Biological Interactions* 2010;184:6–20.

Vellon L. Gonzalez Cid M, Campos Nebel M, Larripa I. Additive apoptotic effect of STI571 with the cytoprotective agent amifostine in K-562 cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:602–608.

Virgili Anna and Elisabeth P Nacheva. Genomic amplification of *BCR/ABL1* and a region downstream of *ABL1* in chronic myeloid leukaemia: a FISH mapping study of CML patients and cell lines. *Mol Cytogenet* 2010;3:15; 17.

Vicente J, Sinues B Fanlo A, Vasquez P, Medina JC, Martinez- Janeya B. Polymorphism C3435T of the MDR1 gene in Central Americans and Spaniards. *Mol Biol Rep* 2008,35(3):473-8.

Virchow R. Weisses Blut. *Froriep's Notzien*, 1845;36: 151–156.

Virgili, Anna Elisabeth P Nacheva. Genomic amplification of *BCR/ABL1* and a region downstream of *ABL1* in chronic myeloid leukaemia: a FISH mapping study of CML patients and cell lines. *Molecular Cytogenetics* 2010, 3:15

Volk H, Potschka H, Löscher W Immunohistochemical Localization of P-glycoprotein in Rat Brain and Detection of Its Increased Expression by Seizures Are Sensitive to Fixation and Staining Variables. *J Histochem Cytochem*; 2005;53:517–531.

Vossebeld PJ; Sonneveld P. Reversal of multidrug resistance in hematological malignancies. *Blood Reviews*, 1999; 1: 67-78.

W

Wadkins RM, Roepe PD. Biophysical aspect of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Int Rev Cytol*; 1997; 171: 121-65.

Wang C, LaRue H, Fotin A , Gariépy G, Têtu B. Mdr1 mRNA expression by RT-PCR in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy. *Breast Cancer Res & Treat* 1997;45:63–74.

WAGNER-SOUZA, Karen Hilda Rachel Diamond, Maria Helena Ornellas, Bernadete Evangelho Gomes, Aline Almeida-Oliveira, Eliana Abdelhay, Luis Fernando Bouzas and Vivian Mary Rumjanek. Rhodamine 123 efflux in human subpopulations of hematopoietic stem cells: Comparison between bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood CD34+ cells. *International JMol Medicine* 2008; 22: 237-242.

Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, Huntly B, Fabbro D, Fendrich G, Hall-Meyers E, Kung AL, Mestan J, Daley GQ, Callahan L, Catley L, Cavazza C, Azam M, Neuberg D, Wright RD, Gilliland DG, Griffin JD. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*; 2005; 7:129-141.

Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007; 72B:S14-S22.

Y

Y Lai, Zhang J, Wang Y, Wang X, Li JL, Wang YH, Zeng YJ, Huang M. CYP3A5*3 and MDR-1 C3435T single nucleotide polymorphisms in six Chinese ethnic groups. *Pharmacie* 2011;66(2):136-40.

Y. Lynn Wang, Lee JW, Cesarman E, Jin DK, Csernus B. Molecular Monitoring of Chronic Myelogenous Leukemia Identification of the Most Suitable Internal Control Gene for Real-Time Quantification of BCR-ABL Transcripts. *J Mol Diagnost* 2006;8:232-239.

Yaya K, Hind D, Meryem Q, Asma Q, Said B, Sellama N. Single nucleotide polymorphisms of multidrug resistance gene 1 (MDR1) and risk of chronic myeloid leukemia. *Tumour Biol* 2014;35(11):10969-75.

Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999; 399:814-817.

Z

Zalcberg J; Hu XF, Wall DM, Mirski S, Cole S, Nadalin G, De Luise M, Parkin JD, Vrazas V, Campbell L, et al. Cellular and karyotypic characterization of two doxorubicin resistant cell lines isolated from the same parental human leukemia cell line. *Int J Cancer* 1994;57:522-528.

Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Lamba J, Bowman P, Burckart GJ. The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients. *Hum Immunol* 2002;63(9):765-70.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide

variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001;7:1028-71034.

Zhou S. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008;38: 802–832.

ANEXO