

**Universidad Nacional de Buenos Aires  
(UBA)**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental -  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas  
y Técnicas - Academia Nacional de Medicina de  
Bs. As. (IMEX-CONICET-ANM)**

**Título del trabajo: “Estudio de los mecanismos de  
resistencia asociados al tratamiento con inhibidores de  
tirosina kinasas en leucemias *philadelphia* positivas”**

**Autor: Cristian Alberto Ferri**

**Director: Dra. Irene Beatriz Larripa**

**Director Adjunto: Dr. Michele Bianchini**

**Consejero: Dr. Carlos Davio**

**Año: 2014**

## Producción científica desarrollada durante este trabajo de tesis

### ➤ Publicaciones Científicas en Revistas Internacionales con Referato

- Clinical activity of ponatinib in one patient with chronic myeloid leukemia in chronic phase with e19a2 transcript and T315I mutation. **Ferri CA**, Bianchini M, Bengió RM, Moiraghi EB, Gonzalez MS, Noriega MF, Larripa IB. *European Journal of Haematology*. 2014. doi: 10.1111/ejh.12358. [Epub ahead of print]
- Expression of *LYN* and *PTEN* genes in chronic myeloid leukemia and their importance in therapeutic strategy. **Ferri, C**; Bianchini, M; Bengió, R; Larripa. *Blood cells molecules and diseases. Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2014; vol. 52(2-3): Pages 121-125.
- Early detection and quantification of mutations in the tyrosine kinase domain of chimerical *BCR-ABL1* gene combining high-resolution melting analysis and mutant-allele specific quantitative PCR. **Ferri, C**; Bianchini, M; Icardi, G; Belli, C; Bengió, R; Larripa, I. *Leukemia & Lymphoma*, 2013, Vol.54, No.3 ,Pages 598-606 ISSN:1042-8194.  
Online: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/10428194.2012.718767>
- CAMKII $\gamma$ , HSP70 and HSP90 transcripts are differentially expressed in resistant mutated patients with Chronic Myeloid Leukemia. Gonzalez M, De Brasi C, Ferri C, Bengió R, Bianchini M, Larripa I, *Leukemia & Lymphoma*. 2013. [Epub ahead of print]  
Online: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.861070>
- New Mutation L324M in the *ABL1* Kinase Domain: does it confer high resistance to second-generation inhibitors? Noriega MF, Ferri CA, Icardi G, Bullorsky E, Korin J, Larripa I. *Leukemia & Lymphoma*, 2014;55(3):698-701.

### ➤ Publicaciones Científicas en Libros o Capítulos de Libro con Referato

**Chapter:** Clonal Evolution and Cytogenetics Changes in Chronic Myeloid Leukemia. Gutiérrez L., Belli C., **Ferri C.** and Larripa I. Nova Science Publisher, Inc. En prensa 2013.

### ➤ Premios Obtenidos

Premio Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal (COFyBCF) “Mejor Comunicación Libre” por el trabajo titulado: Cuantificación del Reordenamiento Molecular P230<sup>BCR-ABL1</sup> en Leucemia Mieloide Crónica. XII Congreso Nacional Bioquímico- 70° Congreso Argentino de Bioquímica (CUBRA-ABA 2013) del 9 al 11 de septiembre de 2013. **Ferri C.**, Bianchini M., Noriega MF, González M., Bengió R., Moiraghi E, Larripa I.

Premio Adolfo H. Aztiria de la Academia Nacional de Medicina al mejor trabajo de Investigación Clínica, Título: “La expresión de los genes CAMKII $\gamma$ , HSP70 y HSP90 se

asocia con resistencia al tratamiento en leucemia mieloide crónica”. Año: 2013  
Gonzalez M., Bianchini M., **Ferri C.**, Bengió R., Larripa I.

Premio Bienal Fundación Florencio Fiorini 2012: “Nuevo desarrollos diagnósticos y/o terapéuticos en cáncer”

Premio accésit: “Desarrollo de una metodología Molecular para la detección y cuantificación de mutaciones en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica tratados con inhibidores de Tirosinas kinasas” **Ferri C.**, Bianchini M., Icardi G., Larripa I.

#### ➤ **Subsidios Obtenidos**

Subsidio de la Fundación Alberto J. Roemmers. (35° Llamado a Concurso)

Título: Expresión de los genes *LYN* y *PTEN* en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica resistentes a los Inhibidores de Tirosina Kinasa

Investigador Principal: **Ferri C.**, Investigador Colaborador: González M.

Duración del subsidio: 1 Año.

#### ➤ **Trabajos en Eventos Científico-Tecnológicos Publicados. Presentaciones a Congresos Nacionales**

Cuantificación de la Enfermedad Mínima Residual en Leucemia Linfoblástica Aguda pediátrica *Philadelphia* positivo. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 19 al 22 de noviembre de 2014. Ferri C., Riccheri C., Bietti J., Cedola A., Bianchini M., Aversa L., Pennesi S., Milone G., Larripa I.

Expresión de los genes *LYN* y *PTEN* en Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Póster XV Congreso Latinoamericano de Genética, XLI Congreso Argentino de Genética, XLV Congreso de la Sociedad de Genética de Chile, II Reunión Regional SAG-Litoral, 28 al 31 de octubre de 2012. **Ferri C.**; Bianchini M.; Bengió R.; Larripa I. Journal of basic & applied genetics (Formerly Mendeliana). Bs. As. Sup. Vol. XXIII (1) – Octubre 2012. Pág. 98. ISSN 1852-6233.

Expresión Genética de Marcadores de Resistencia en Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC). XX Congreso Argentino de Hematología, VI Congreso de la División Inter-Americana de la International Society of Hematology, VI Congreso del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo, VI Congreso de Enfermería Hematológica. González M.; De Brasi C.; Bianchini M.; **Ferri, C.**; Larripa I. Hematología Argentina. Bs. As. Vol.15 – N° 2 – Julio-Octubre 2011. Pág. 99. ISSN 0329-0379.

Base de Datos del Departamento de Genética de la Academia Nacional de Medicina Referida a la Cuantificación del Transcripto BCR-ABL en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) en Tratamientos con Inhibidores de Tirosinas Kinasas.

XX Congreso Argentino de Hematología, VI Congreso de la División Inter-Americana de la International Society of Hematology, VI Congreso del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo, VI Congreso de Enfermería Hematológica. Icardi G.; Bianchini M.; **Ferri, C.**; Larripa I.

Hematología Argentina. Bs. As. Vol.15 – N° 2 – Julio-Octubre 2011. Pág. 98. ISSN 0329-0379.

Nueva Mutación L324M en el Dominio ABL Kinasa. ¿Confiere Resistencia secundaria a los inhibidores de Segunda Generación? XX Congreso Argentino de Hematología, VI Congreso de la División Inter-Americana de la International Society of Hematology, VI Congreso del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo, VI Congreso de Enfermería Hematológica. Noriega F.; **Ferri, C.**; Icardi G; Bullorsky E.; Korin J.; Larripa I. Hematología Vol.15 – N° 2 – Julio-Octubre 2011. Pág. 99. ISSN 0329-0379.

Detección de Mutaciones en Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) Aplicando *High Resolution Melting* (HRM)/ARMS-QPCR. LV Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de de Investigación Clínica (SAIC). Reunión Científica Anual 2010, Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). XLII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). **Ferri, C.**; Cuello M.T.; Bengió R.; González M.; Bianchini M.; Larripa I. Medicina. Vol. 70 Supl. II – 2010. Pag. 197. ISSN 0025.7680

Expresión Diferencial de Marcadores de Proliferación Celular en Leucemia Mieloide Crónica (LMC). LV Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de de Investigación Clínica (SAIC). Reunión Científica Anual 2010, Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). XLII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). González M.; De Brasi C.; **Ferri, C.**; Bengió R.; Bianchini M.; Larripa I. Medicina. Vol. 70 Supl. II – 2010. Pag. 195. ISSN 0025.7680

➤ **Trabajos en Eventos Científico-Tecnológicos.  
Presentaciones a Congresos- Internacionales**

Establishment and validation of freeze dried cell lines as reference materials for the standardization of quantitative bcr-abl1 measurements on the international scale. Póster ESH - iCMLf International Conference on CML - Biology and Therapy. Bianchini M, Ruiz MS, **Ferri C**, Icardi G, Medina MS, Tapia I, Barrio MM, Mordoh J, Larripa I. Estoril, Portugal - 26 al 29 de septiembre de 2013.

Early detection and dynamics of mutated clones in chronic myeloid leukemia patients with suboptimal response. Póster. ESH - iCMLF - 14th International Conference CML- Biology and Therapy. Organizadores: JM Goldman (London), T Hughes (Adelaide), J Cortes (Houston), T Holyoake (Glasgow), D Perrotti (Columbus), J Radich (Seattle), R Van Etten (Boston). **Ferri C.**; Bianchini M.; Icardi G.; Belli C.; Bengió R.; Larripa I. Baltimore. 20-23 Septiembre 2012.

Inter-Americana de la International Society of Hematology, VI Congreso del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo, VI Congreso de Enfermería Hematológica. **Ferri, C.**; Bianchini M.; Belli C.; Icardi G.; González M.; Noriega F.; Bengió R.; Larripa I. Hematología Argentina. Bs. As. Vol.15 – N° 2 – Julio-Octubre 2011. Pág. 98. ISSN 0329-0379.

Inverse correlation between BAX/BCL-XL and BCR-ABL gene expression in chronic myeloid leukemia. Poster. "International Chronic Myeloid Leukemia Foundation." ESH-ICMLF International Conference. Organizadores: J.M. Goldman, J. Cortes, T.P. Hughes Washington DC. Estados Unidos. Septiembre de 2010.

## **Agradecimientos**

- A la Dra. Irene Larripa, directora de esta tesis, por confiar, brindarme su apoyo y conocimientos para llevar adelante este trabajo.
- Al Dr. Michel Bianchini, por su compromiso e invaluable aporte al trabajo y a mi formación en investigación.
- A mi esposa Silvia y mi hijo Sebastián por acompañarme siempre, soportar y comprender mis ausencias.
- A los Dres. Fernanda Noriega, Carlos De Brasi, Marcela González Cid, Marcelo De Campos Nebel, Carolina Belli, Ariela Fundia y Mariana Gonzalez, por su aporte desinteresado durante estos 5 años de trabajo.
- A todo el personal de genética de la Academia Nacional de Medicina y en especial a mis compañeros de laboratorio por los buenos momentos compartidos y por estar siempre.
- A mis amigas y colegas de Misiones, Mercedes, Valeria y Marcela por su apoyo incondicional.
- A mis padres por ser como son y ayudarme a ser quien soy.
- A mi hermana Gabriela y mis sobrinos Matías y Natalia por acompañarme en todo momento.

1.	Resumen .....	5
2	Antecedentes .....	9
2.1	Leucemia Mieloide Crónica (LMC).....	10
2.1.1	Reseña histórica de la Leucemia Mieloide Crónica .....	10
2.1.2	Gen <i>ABL1</i> .....	12
2.1.3	Gen <i>BCR</i> .....	13
2.1.4	Características clínicas de la LMC .....	14
2.1.5	Translocación <i>BCR-ABL1</i> .....	15
2.1.6	Rearreglos moleculares <i>BCR/ABL1</i> <sup>P210</sup> , <i>BCR/ABL1</i> <sup>P190</sup> , <i>BCR/ABL1</i> <sup>P230</sup> .....	17
2.1.7	Activación y señalización celular por BCR-ABL1 .....	18
2.1.8	Tirosinas kinasas como blancos terapéuticos contra el cáncer.....	20
2.1.9	Tratamientos convencionales de la LMC .....	23
2.1.9.1	Terapias previas a los Inhibidores de Tirosina Kinasa.....	23
2.1.9.2	Trasplante de Médula ósea.....	24
2.1.9.3	Terapia con inhibidores de tirosina kinasa.....	24
2.1.10	Predictores de respuesta a ITKs en pacientes con LMC.....	29
2.1.10.1	<i>Scores</i> pronósticos.....	29
2.1.10.2	Deleciones del cromosoma 9 [der (9)].....	29
2.1.11	Indicadores de respuesta al tratamiento con ITKs .....	30
2.1.11.1	Respuesta hematológica.....	30
2.1.11.2	Respuesta citogenética .....	30
2.1.11.3	Respuesta Molecular .....	31
2.1.11.4	Estandarización internacional y monitoreo molecular.....	32
2.1.12	Resistencia a los ITKs.....	33
2.1.12.1	Detección de mutaciones .....	37
2.1.13	Amplificación génica de <i>BCR-ABL1</i> y sobreexpresión de proteínas .....	40
2.1.14	Transportadores de drogas.....	41
2.1.15	Resistencia relacionada a sobreexpresión y subexpresión de proteínas.....	42
2.2	LLA Philadelphia Positiva. Aspectos generales.....	43
2.2.1	Tratamiento de la LLA Ph positiva .....	44
2.2.2	Factores de riesgo en LLA .....	45
2.2.3	Resistencia a los Inhibidores de Tirosina Kinasa en la LLA Ph <sup>+</sup> .....	45
2.2.4	Trasplante de Médula ósea en LLA.....	46
3.	Hipótesis de trabajo y objetivos .....	47

4.	Materiales y Métodos .....	49
4.1	Técnicas experimentales con material celular obtenido de pacientes y líneas celulares .....	50
4.1.1	Línea K562 .....	50
4.1.2	Línea HL-60 .....	50
4.1.3	Tipos de muestra.....	50
4.1.3.1	Leucocitos totales de pacientes .....	50
4.1.4	Técnicas experimentales con ARN .....	51
4.1.4.1	Extracción de ARN celular total .....	51
4.1.4.2	Cuantificación espectrofotométrica del ARN .....	51
4.1.4.3	Reacción de retrotranscripción inversa (RT-PCR).....	51
4.1.5	Amplificación de ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Cuantificación en tiempo real (qRT-PCR) .....	52
4.1.5.1	Análisis cuantitativo qRT-PCR de <i>BCR-ABL</i> <sup>P210</sup> .....	52
4.1.5.2	Validación y estandarización del análisis de qRT-PCR a la escala internacional (IS); obtención del factor de conversión.....	53
4.1.5.3	Análisis cuantitativo qRT-PCR de <i>BCR-ABL</i> <sup>P190</sup> .....	54
4.1.5.4	Análisis cuantitativo qRT-PCR de <i>BCR-ABL</i> <sup>P230</sup> .....	55
4.1.6	Curvas de calibración de los <i>primers</i> y estimación de cuantificación absoluta .....	56
4.1.6.1	Determinación de las curvas de calibración de <i>BCR-ABL</i> <sup>P210</sup> .....	57
4.1.6.2	Determinación de las curvas de calibración de <i>BCR-ABL</i> <sup>P190</sup> y <i>BCR-ABL</i> <sup>P230</sup> .....	57
4.1.7	Detección de mutaciones en gen <i>BCR-ABL</i> .....	57
4.1.7.1	Amplificación del rearrreglo molecular <i>BCR-ABL</i> para la búsqueda de mutaciones en el dominio kinasa del gen <i>ABL</i> en <i>BCR-ABL</i> <sup>P190</sup> , <i>BCR-ABL</i> <sup>P210</sup> y <i>BCR-ABL</i> <sup>P230</sup> .....	57
4.1.7.2	Detección de mutaciones en el dominio kinasa del gen <i>ABL</i> en <i>BCR-ABL</i> <sup>P190</sup> , <i>BCR-ABL</i> <sup>P210</sup> y <i>BCR-ABL</i> <sup>P230</sup> utilizando el método de secuenciación directa.....	59
4.1.7.3	Control de polimorfismos.....	60
4.1.7.4	<i>Screening</i> de Mutaciones en el dominio kinasa del gen <i>ABL</i> en <i>BCR-ABL</i> <sup>P210</sup> y <i>BCR-ABL</i> <sup>P190</sup> mediante el método de <i>High Resolution Melting</i> (HRM).....	60
4.1.7.5	Polimorfismos de conformación de cadena simple o SSCP (del inglés <i>Single-strand conformation polymorphisms</i> ) .....	62
4.1.7.6	Detección de mutaciones en el dominio kinasa del gen <i>BCR-ABL</i> <sup>P210</sup> <i>BCR-ABL</i> <sup>P190</sup> y <i>BCR-ABL</i> <sup>P230</sup> utilizando el método ARMS-qPCR.....	63



4.1.8	Clonado de las mutaciones más relevantes .....	66
4.1.8.1	Obtención de los controles plasmídicos negativos y positivos.....	66
4.1.8.2	Procedimiento de clonado .....	66
4.1.8.3	Procedimiento para transformación de bacterias.....	67
4.1.8.4	Preparación de medio LB líquido y LB-agar.....	67
4.1.8.5	Extracción de plásmidos.....	68
4.1.9	Caracterización de los diferentes rearrreglos de <i>BCR-ABL1</i> mediante PCR multiplex.....	68
4.1.9.1	Caracterización de los transcritos de <i>BCR-ABL1</i> <sup>P190</sup> , <i>BCR-ABL1</i> <sup>P210</sup> y <i>BCR-ABL1</i> <sup>P230</sup> .....	68
4.1.10	Asociación de la resistencia a ITKs con mecanismos independientes de <i>BCR-ABL1</i> .....	70
4.1.10.1	Expresión de <i>LYN</i> y <i>PTEN</i> mediante PCR en tiempo real.....	70
5.	Resultados .....	72
5.1	Obtención de controles plasmídicos de las variantes génicas e1a2 y e19a2 .....	73
5.2	Determinación de la selectividad y sensibilidad del método HRM mediante los controles plasmídicos.....	75
5.2.1	Determinación de la selectividad del método ARMS-qPCR mediante los controles plasmídicos.....	81
5.3	Comparación del método HRM con la secuenciación directa.....	87
5.4	Confirmación y cuantificación por ARMS-qPCR de los perfiles detectados como mutados por HRM.....	88
5.5	Detección de mutaciones y monitoreo de pacientes con LMC en respuesta subóptima .....	90
5.6	Seguimiento y evolución de pacientes portadores de mutaciones diagnosticados por métodos de alta sensibilidad (HRM/ARMSqPCR) .....	93
5.7	Protocolo Clínico: Estudio de mutaciones en LMC .....	95
5.7.1	Población estudiada .....	95
5.7.2	Detección de mutaciones en el Dominio Kinasa del <i>BCR-ABL1</i> .....	96
5.7.3	Cuantificación y seguimiento de los pacientes portadores de mutaciones .....	98
5.8	Detección del rearrreglo molecular e19a2 <sup>P230</sup> .....	100
5.8.1	Búsqueda de mutaciones en e19a2 .....	102
5.8.2	Determinación y seguimiento del porcentaje de transcritos e19a2 y clon mutado .....	103
5.9	Análisis de los genes <i>LYN</i> y <i>PTEN</i> .....	104
5.9.1	Población seleccionada .....	104

5.10	Expresión de los genes <i>LYN</i> y <i>PTEN</i> .....	105
5.10.1	Expresión de <i>LYN</i> en pacientes resistentes a los ITKs .....	105
5.10.2	Expresión de <i>PTEN</i> en pacientes resistentes a ITKs .....	106
5.10.3	Relación entre la expresión de los genes ( <i>LYN/PTEN</i> ) .....	107
5.10.4	Correlación entre <i>LYN/PTEN</i> y transcriptos <i>BCR-ABL1</i> en pacientes tratados con imatinib y nilotinib .....	109
5.11	LLA Ph <sup>+</sup> en población pediátrica: Protocolo Clínico, GATLA (Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda) LLA-Ph <sup>+</sup> 2011 .....	111
5.11.1	Población estudiada .....	111
5.11.2	Determinación del valor basal de referencia .....	112
5.11.3	Cuantificación de la enfermedad mínima residual en pacientes LLA-Ph <sup>+</sup> .....	112
6.	Discusión.....	114
6.1	Screening, confirmación y cuantificación de mutaciones por HRM y ARMS-qPCR.....	115
6.2	Determinación y seguimiento del porcentaje de <i>BCR-ABL1</i> <sup>P230</sup> .....	119
6.3	Detección de mutaciones en pacientes con LMC resistentes a ITKs de segunda y tercera generación .....	119
6.4	Expresión de los genes <i>LYN</i> y <i>PTEN</i> .....	121
6.5	Detección de Enfermedad Mínima Residual en pacientes con LLA Ph <sup>+</sup> .....	123
7.	Conclusiones.....	127
8.	Bibliografía .....	129

# 1. Resumen

## 1. Resumen

Las leucemias *Philadelphia* positivas ( $\text{Ph}^+$ ) se caracterizan por presentar la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)], que genera la yuxtaposición de los genes *BCR* y *ABL1* originando una proteína oncogénica con actividad de tirosina kinasa incrementada. Los puntos de ruptura más frecuentes en el gen *BCR* ocurren en los exones: 1(e1), 13(b2) ó 14(b3) y 19(e19) y el punto de ruptura en el gen *ABL1* habitualmente se produce en el exón 2(a2), generando los reordenamientos e1a2, b2a2 ó b3a2 y e19a2 que originan las proteínas de fusión  $\text{BCR/ABL1}^{\text{P190}}$ ,  $\text{BCR/ABL1}^{\text{P210}}$  y  $\text{BCR/ABL1}^{\text{P230}}$  respectivamente. El desarrollo de los inhibidores de tirosina kinasa (ITKs) ha mejorado notablemente la sobrevida y evolución de la enfermedad debido a su gran efectividad en la inactivación de la proteína oncogénica.

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) en la mayoría de los casos presenta la proteína de fusión  $\text{BCR/ABL1}^{\text{P210}}$  mientras que la Leucemia Linfoblástica Aguda  $\text{Ph}^+$  (LLA  $\text{Ph}^+$ ) se asocia con la proteína  $\text{BCR/ABL1}^{\text{P190}}$ . Esta alteración genética, se observa en el 25% de las LLA del adulto y en el 3-5% de las LLA pediátricas, le confiere mal pronóstico y alta probabilidad de recaída con el tratamiento convencional, es por ello que se han desarrollado protocolos más agresivos que incluyen ITKs. El reordenamiento e19a2 ha sido descrito en la LMC neutrofílica y asociado a un curso clínico benigno a menos que presente anomalías cromosómicas adicionales. Los ITKs constituyen el tratamiento de elección en las leucemias  $\text{Ph}^+$  por su excelente respuesta a nivel hematológico, citogenético y molecular, sin embargo, algunos pacientes no responden adecuadamente al tratamiento. El fenotipo de resistencia se relaciona con numerosos mecanismos biológicos, entre ellos se encuentran la adquisición de mutaciones en *BCR-ABL1* y expresión desregulada de otras kinasas y/o genes oncosupresores.

La hipótesis de este trabajo fue investigar si la detección temprana de mutaciones en el dominio tirosina kinasa del *BCR-ABL1* y la expresión de los transcritos de la ser-kinasa *LYN* y el gen supresor *PTEN* estarían involucrados en la resistencia al tratamiento, lo cual permitiría estratificar precozmente el riesgo individual y definir el tratamiento más adecuado en cada caso. A fin de demostrar esta hipótesis, el objetivo general del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de resistencia dependientes e independientes del reordenamiento *BCR-ABL1*, a fin de esclarecer las posibles causas

implicadas en la falta o pérdida de la respuesta al tratamiento en pacientes tratados con ITKs.

En este trabajo de tesis se implementó la metodología de *high resolution melting* (HRM) como *screening* para la detección temprana de mutaciones. Este método fue combinado con ARMS-qPCR con el fin de confirmar y cuantificar las mutaciones detectadas. La utilización de ambas metodologías demostró ser un método efectivo en la identificación temprana de mutaciones, incrementando en un 16% la detección de las mismas respecto de la secuenciación directa. Los métodos HRM/ARMS-qPCR también demostraron ser útiles en la detección y monitoreo de pacientes con pérdida de la respuesta molecular mayor, en los cuales pudo detectarse clones mutados en muy baja proporción (< 1%).

La mayor sensibilidad de detección y posterior cuantificación del clon mutado indican que HRM/ARMS-qPCR sería más conveniente para el seguimiento de pacientes con signos clínico-genético de resistencia a los ITKs. Esta metodología permitió analizar la dinámica del clon mutado y de los transcritos *BCR-ABL1* permitiendo definir el rol de la mutación en la resistencia, seleccionar el ITK adecuado y evaluar respuesta al tratamiento.

Con respecto a los mecanismos independientes de BCR-ABL1, si bien el análisis de los genes *LYN* y *PTEN* por separado mostró aumento de expresión de *LYN* en la población resistente en fase acelerada/crisis blástica (FA/CB), la relación *LYN/PTEN* resultó ser más informativa y permitió identificar a un 23% de pacientes en fase crónica (FC) y un 33% en FA/CB que presentaban valores significativamente incrementados respecto del grupo control (individuos sanos) y pacientes con buena respuesta al tratamiento. Los pacientes identificados mediante la relación *LYN/PTEN* eran resistentes al tratamiento con imatinib o nilotinib y no presentaban mutaciones, indicando que la expresión diferencial de los genes *LYN* y *PTEN* podría vincularse a la resistencia independiente de BCR-ABL1.

Este trabajo permitió evaluar la respuesta al tratamiento en el marco de dos protocolos clínicos, uno de detección de mutaciones en pacientes con LMC resistentes a ITKs de segunda y tercera generación y el otro basado en la determinación molecular de enfermedad mínima residual en LLA Ph<sup>+</sup>.

En población argentina con LMC resistente a los ITKs de segunda y tercera generación, se determinó el porcentaje y distribución de las mutaciones, observándose mayor

frecuencia en el dominio *ATP-binding*, siendo las mutaciones más frecuentes la T315I (22%), F317L (16,7%) y V299L (16,7%).

La cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> en pacientes LLA Ph<sup>+</sup> demostró ser una herramienta importante para evaluar la respuesta al tratamiento y definir enfermedad mínima residual, previo al trasplante de médula ósea.

Teniendo en cuenta la importancia del estudio de los mecanismos de resistencia, a fin de poder tomar decisiones terapéuticas rápidas, adecuadas y personalizadas, las metodologías desarrolladas en este trabajo serían una herramienta eficaz para la detección precoz de mutaciones y el monitoreo del clon mutado, lo cual permitiría evaluar la respuesta terapéutica y definir el tratamiento adecuado.

## **2. Antecedentes**

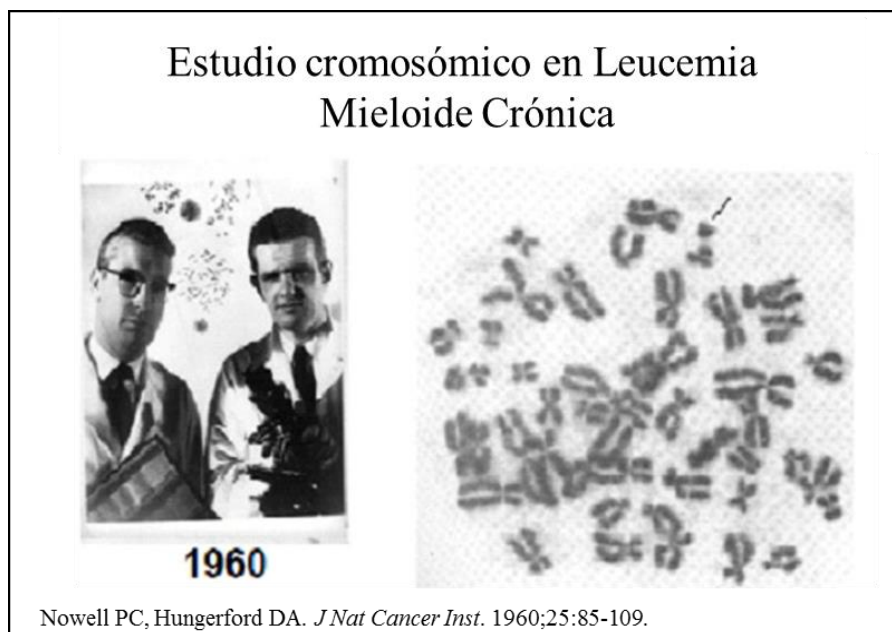
## 2.1 Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

### 2.1.1 Reseña histórica de la Leucemia Mieloide Crónica

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo crónico de naturaleza clonal, con origen en una *stem cell* pluripotente que produce las tres series hematopoyéticas (eritroide, granulocítica y megacariocítica). Esta neoplasia hematológica presenta una expansión anormal de progenitores granulocíticos en médula ósea (MO) y sangre periférica (SP); las células neoplásicas poseen la capacidad de maduración inalterada y sus funciones normales disminuidas (Olofsson 1976).

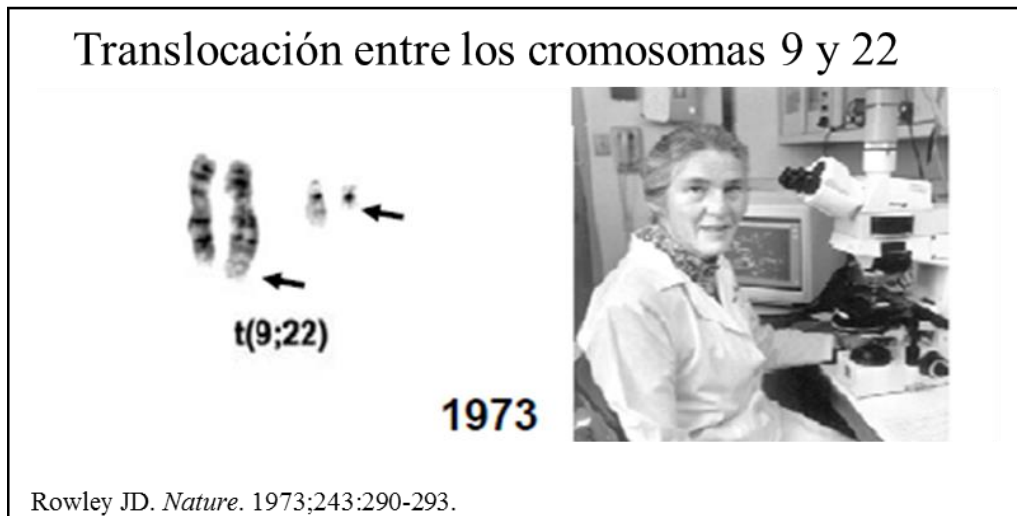
En el año 1960 Nowell y Hungerford (Nowell 1960) reportaron dos pacientes con leucemia granulocítica crónica que presentaban pérdida del brazo largo en un cromosoma del grupo G y fue llamado cromosoma *Philadelphia* (Ph) en honor a la ciudad donde fue descrito por primera vez [Figura 1]. En un primer momento se pensó que se trataba del cromosoma 21, el cual está implicado en el Síndrome de *Down*, en 1973 gracias al desarrollo de técnicas de “bandeo cromosómico” Janet Rowley (Rowley 1973) demostró que en realidad se trataba de una translocación recíproca y balanceada entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22; [t(9;22)(q34;q11)] [Figura 2].

[Figura 1]





[Figura 2]



En 1982 mediante el desarrollo de técnicas de biología molecular, fue posible demostrar que el oncogen *Abelson* (*ABL1*) es translocado desde el cromosoma 9 al cromosoma 22. Si bien la región de ruptura en el cromosoma 9 es variable, en el cromosoma 22 el punto de ruptura se da en el área denominada “*breakpoint cluster region*” (*BCR*). La translocación [t(9;22)(q34;q11)] origina un gen híbrido *BCR-ABL1*, el cual desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la LMC. Sin embargo hasta el momento es desconocido el fenómeno mutagénico inicial así como los mecanismos moleculares implicados en la aparición del cromosoma Ph. Se ha postulado el posible papel de las secuencias repetitivas Alu y de los duplicones como mediadores de los intercambios genéticos que darían origen a la recombinación de los genes *ABL1* y *BCR* durante el proceso de mitosis celular (Martinelli 2000). Hasta el momento el agente etiológico que ha sido asociado al desarrollo de las leucemias es la exposición a radiaciones ionizantes (Moloney 1987).

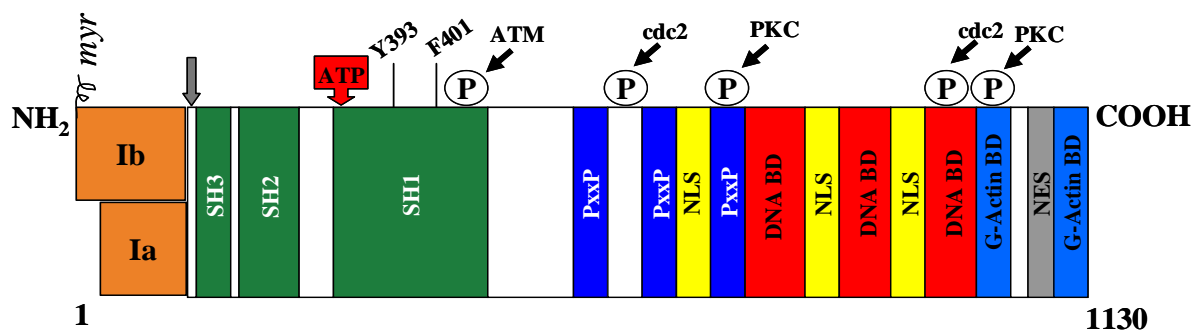
La LMC representa el 7% al 15% del total de las leucemias de los individuos adultos y se estima que su incidencia es de un caso nuevo cada 100.000 habitantes por año. El cromosoma Ph está presente en más del 95% de los pacientes al diagnóstico, la edad de debut se encuentra entre 50 a 60 años; existiendo un ligero predominio en varones, con una relación de 1,3:1 (Willey-Blackwell 2009).

### 2.1.2 Gen *ABL1*

Las proteínas kinasas han sido muy estudiadas como blanco terapéutico por su participación en numerosos procesos patológicos como neoplasias, enfermedades autoinmunes y trastornos metabólicos. Varias drogas han sido desarrolladas para uso clínico y la mayoría están dirigidas al sitio de unión del ATP en el dominio kinasa de las proteínas, por lo tanto, bloquean la unión y la fosforilación de los sustratos, atenuando los efectos de la actividad kinasa en los procesos patológicos.

El gen *ABL1*, situado en el cromosoma 9, es un gen humano homólogo al oncogén viral de leucemia murino Abelson (*v-abl*) (Abelson 1970) y codifica una Tirosina Kinasa (TK) no receptora (Szczylik 1991). Este gen codifica a la proteína citoplasmática y nuclear ABL1 de 145 KDa; se conocen dos isoformas generadas por *splicing* alternativo del primer exón (*ABL1a* y *ABL1b*) (Deininger 2000). La proteína ABL1 está implicada en procesos de división, diferenciación y adhesión celular y en la respuesta a estrés. Tres dominios *SRC-homology* (SH1, SH2 y SH3) están localizados hacia la región NH<sub>2</sub>. La actividad de la proteína ABL1 está regulada negativamente por su dominio SH3 y la supresión de este dominio convierte al gen *ABL1* en un oncogén. El dominio SH1 lleva la función de tirosina kinasa, mientras que el SH2 y SH3 permiten la interacción con otras proteínas. Regiones centrales ricas en prolina pueden interactuar con el dominio SH3 de otras proteínas como por ejemplo Crk [Figura 3].

Es conocido que la proteína ABL1 presenta un rol complejo como modulador celular que integra múltiples señales intra y extra celulares y esto influiría en las decisiones respecto del ciclo celular y apoptosis (Van Etten 1999).



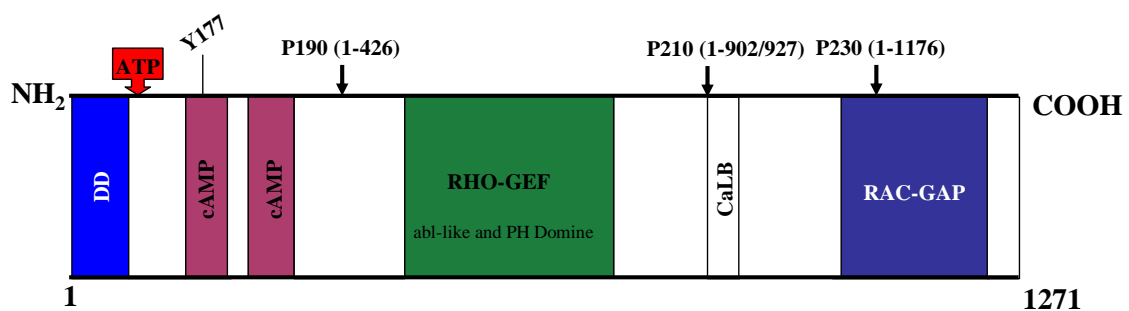
**Figura 3: Estructura de la proteína ABL1.** La isoforma Ia es más corta que la Ib, la cual contiene un sitio de miristoilación (myr) para fijar a la membrana plasmática. Los 3 dominios *SRC-homology* (SH) están situados hacia el NH<sub>2</sub> terminal. Y393 es el sitio principal de autofosforilación dentro del dominio kinasa. Fenilalanina 401 (F401) está altamente conservada en las proteínas tirosinas kinasas. La porción media de cada proteína está dominada por regiones ricas en prolina (PxxP) capaces de unir a los dominios SH3 y alberga 1 de 3 señales de localización nuclear (NLS). La carboximetilcelulosa terminal contiene

sitios de unión al ADN, así como dominios de G- y F-actin-binding. Se muestran los sitios de fosforilación por ATM, cdc2 y PKC. La flecha gris indica la posición del punto de ruptura en la proteína para generar el gen de fusión *BCR-ABL1* (Deininger 2000).

### 2.1.3 Gen *BCR*

El gen *BCR* (*Break point cluster region*), situado en el cromosoma 22, codifica una proteína de 160 KDa, al igual que *ABL1*, es de expresión ubicua (Nowell 1960). La región N-Terminal del primer exón codifica una serina-treonina kinasa; el único sustrato de esta kinasa conocido hasta la fecha es el Bap-1. La molécula contiene en su región central una región similar a *ABL1* y dominios homólogos Pleckstrin (PH) que estimulan el intercambio de trifosfato de guanidina (GTP) por difosfato de guanidina (GDP) en factores de intercambio de guanidina Rho (Denhardt 1996), que a su vez pueden activar factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (Montaner S 1998).

El C-terminal tiene actividad GTPasa para Rac, una pequeña GTPasa de la superfamilia Ras que regula la polimerización de la actina y la actividad de una NADPH oxidasa en células fagocíticas (Szczylik 1991). Además, *BCR* puede ser fosforilado en varios residuos de Tirosina, especialmente la tirosina 177, la cual une Grb-2, una importante molécula adaptadora involucrada en la vía de señalización de Ras (Ma G 1997) [Figura 4]. Se ha demostrado que *ABL1* fosforila a *BCR* en células de la línea celular COS1, resultando en una disminución de la actividad de *BCR*. Si existe un rol de *BCR* en la patogénesis de las leucemias *Philadelphia* positivas aún no está clarificado.



**Figura 4: Estructura de la proteína BCR.** Dominio de dimerización (DD) y dos dominios homólogos adenosina monofosfato cíclico kinasa en la región N-terminal. Y177 es el sitio de autofosforilación crucial para la unión de Grb-2. El centro de la molécula contiene la región homóloga al factor de intercambio de nucleótidos guanidina Rho (Roh-GEF), así como el dominio *abl-like* y pleckstrin (PH). Hacia el C-terminal se encuentra un sitio putativo de unión a lípidos calcio-dependiente (CaLB) y un dominio de activación para Rac-GTPasa (Rac-GAP). Las flechas indican la posición de los puntos de ruptura en las proteínas de fusión *BCR-ABL1* (Deininger 2000).

#### 2.1.4 Características clínicas de la LMC

La LMC sigue un curso evolutivo trifásico: fase crónica (FC), fase acelerada (FA) y crisis blástica (CB). La mayoría de los pacientes son diagnosticados durante el transcurso de la FC, caracterizada por una clínica relativamente estable, “indolente” y una población tumoral en expansión, sin fallos en la diferenciación celular. Esta situación se mantiene durante algunos años, es difícil precisar la fecha de inicio y por lo tanto resulta difícil establecer su duración, se calcula que podría rondar los 3 a 5 años. No obstante este periodo puede ser variable y en algunos casos superar los 10 años. Muchas veces el hallazgo de la enfermedad se realiza en estudios de rutina sin sintomatología, pero cuando se presentan generalmente son astenia, palidez, adelgazamiento o relacionadas con la esplenomegalia (dolor o sensación de ocupación en hipocondrio izquierdo, molestias posprandiales, etc.). El dato más relevante para arribar al diagnóstico, sumado a la esplenomegalia, es la leucocitosis cuyos valores pueden oscilar entre 40.000 hasta 300.000 células/mm<sup>3</sup>.

Luego de un tiempo variable la enfermedad puede progresar a FA, es posible que los pacientes manifiesten deterioro progresivo de su estado general, dolores óseos persistentes, aumento de la hepato-esplenomegalia y en los recuentos leucocitarios a pesar del tratamiento. Finalmente la enfermedad progresa a la etapa final o CB, presentando un cuadro de insuficiencia medular, semejante a la leucemia mieloide aguda (70%), linfoide aguda (25%) o con fenotipo indiferenciado (5%) (Weisberg 2000). En aproximadamente un 5% de los casos el diagnóstico se realiza durante la CB de la LMC, lo que sugiere la existencia de una FC subclínica que ha pasado inadvertida. El cuadro clínico de la CB es más agudo y más grave que el de las leucemias agudas, con mala respuesta a los citostáticos y una expectativa de vida de 4 a 5 meses desde el diagnóstico de esta fase de la enfermedad. Los síntomas de la CB son pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y dolores óseos. También se observa anemia, complicaciones infecciosas y trombocitopenia. Las células blásticas pueden expresar marcadores de cualquier linaje hematopoyético, lo que indica que el clon que da origen a la CB deriva de una célula madre pluripotente muy indiferenciada (Urbano-Ispizua 1993). Los criterios para definir las fases de la enfermedad fueron propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en numerosos trabajos previos (Kantarjian 2002; Sawyers 2002; Talpaz 2002; Sureda 2003; Kantarjian 2004; Lahaye 2005; O'Brien 2005), **Tabla 1**.

**Tabla1: Criterios propuestos por la OMS y otros investigadores para definir FA y CB.**

Fase de la enfermedad	OMS	Otros criterios
Fase Acelerada (FA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Blastos en SP o MO 10%-19%</li> <li>Basófilos en SP <math>\geq</math> 20%</li> <li>Trombocitopenia (Plaquetas <math>&lt;</math> <math>100 \times 10^9/L</math>) no relacionada con la terapia</li> <li>Trombocitosis (plaquetas <math>&gt;</math> <math>1000 \times 10^9/L</math>) refractaria a la terapia</li> <li>Incremento del tamaño del bazo y aumento del Recuento de GB refractarios a la terapia</li> <li>Evolución citogenética clonal (aparición de alteraciones genéticas adicionales ausentes al debut)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Blastos en SP o MO 15%-29%. Blastos más promielocitos en SP o MO <math>&gt;</math>30% (con blastos <math>&lt;</math>30%)</li> <li>Blastos más promielocitos en SP o MO <math>&gt;</math>30% (con blastos <math>&lt;</math>30%)</li> <li>Basófilos en SP <math>\geq</math> 20%</li> <li>Trombocitopenia (Plaquetas <math>&lt;</math> <math>100 \times 10^9/L</math>) no relacionada con la terapia</li> <li>No incluido</li> <li>Recuento de GB <math>&gt;</math> <math>50 \times 10^9/L</math>, Hto <math>&lt;</math> 25% y trombocitopenia <math>&lt;</math> <math>100 \times 10^9/L</math>, no controlables con el tratamiento</li> </ul>
Crisis Blástica (CB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Blastos en SP o MO <math>\geq</math> 20%</li> <li>Proliferación extramedular de blastos</li> <li>Grandes focos de blastos en biopsia de MO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Blastos en SP o MO <math>\geq</math> 30%</li> <li>Proliferación extramedular de blastos</li> </ul>

### 2.1.5 Translocación *BCR-ABL1*

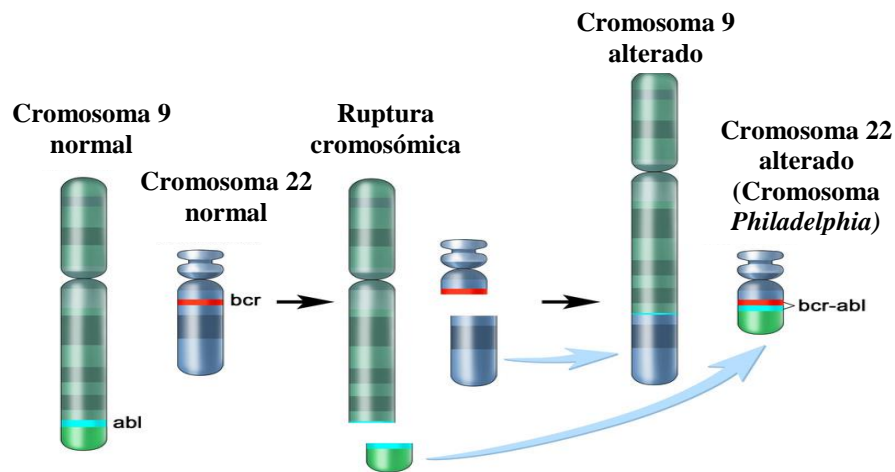
El gen *ABL1* contiene 11 exones y codifica una proteína de 145 KDa que da lugar a dos isoformas como resultado de *splicing* alternativo del primer exón. La proteína normal se localiza en el núcleo y citoplasma donde participa principalmente en el proceso de mielopoyesis, interviene en la respuesta celular al estrés genotóxico y está involucrada en la transmisión de señales a través de integrinas (Lewis 1998).

La proteína ABL1 recibe señales intra y extracelulares que regulan el ciclo celular y apoptosis (Sawyers 1994).

El gen *BCR* se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11), está compuesto por 23 exones y codifica la síntesis de una proteína de 160 KDa. Está expresada en múltiples tejidos humanos y el hecho de que se localice en el citoplasma de células quiescentes o en el núcleo de células en mitosis sugiere su posible función en la regulación del ciclo celular (Wetzler 1995). El primer exón confiere la actividad serina treonina kinasa del *BCR*. Un dominio de oligomerización DD en el N-terminal permite la formación de dímeros proteicos *in vivo* (McWhirter 1993). El centro de la molécula

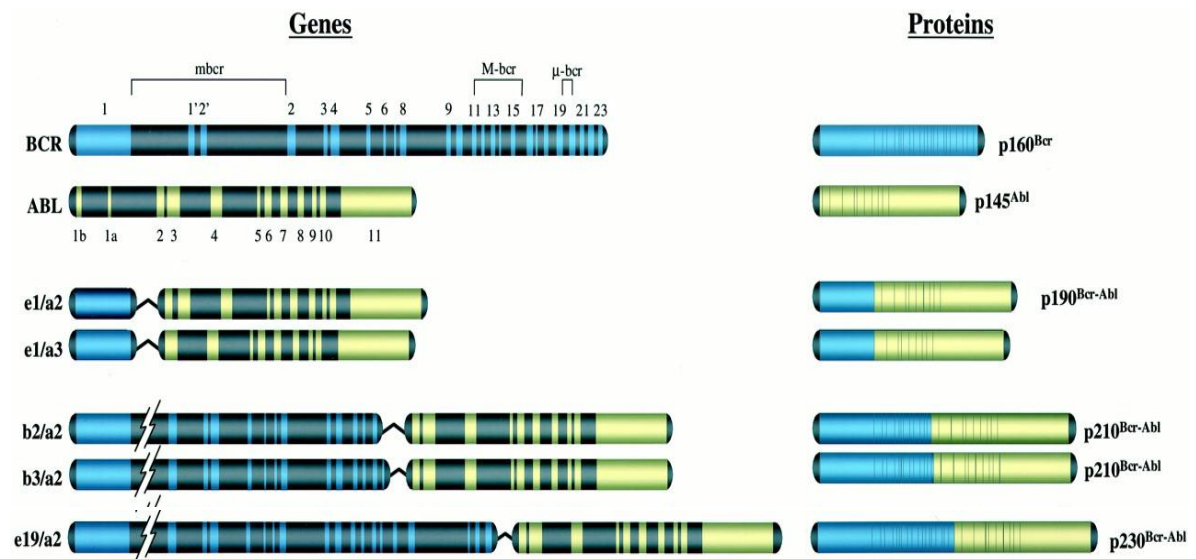
contiene una región con dominios que intercambian GTP por GDP (Nowell 1960; Van Etten 1999).

La t(9;22)(q34;q11.2) yuxtapone las secuencias 3' del gen *ABL1* (9q34) a la región 5' del gen *BCR* (22q11.2) (Groffen 1984; Heisterkamp 1985). Este reordenamiento resulta en la formación de un gen híbrido *BCR-ABL1* que codifica principalmente una proteína quimérica BCR-ABL1 de 210 KDa. La consecuencia molecular de esta translocación es el reemplazo del primer exón del *ABL1* con secuencias del gen *BCR*, resultando en un gen de fusión *BCR-ABL1* cuyo producto proteico muestra actividad de TK incrementada (Heisterkamp 1983; Druker 2000). Este gen quimérico, origina tres proteínas principales que surgen de puntos de ruptura diferentes en el gen *BCR* ubicado en el cromosoma 22 [Figura 5].



**Figura 5: Intercambio de material genético entre el cromosoma 9 y 22.** Formación de un gen híbrido (*BCR-ABL1*) en la zona de fusión del cromosoma 22.

Los puntos de ruptura más frecuentes en el gen *BCR* ocurren en los exones: 1(e1), 13(b2), 14(b3) y 19(e19) y el punto de ruptura en el gen *ABL1* habitualmente se produce en el exón 2 (a2), generando los reordenamientos e1a2, b2a2 o b3a2 y e19a2. Los productos de estos reordenamientos corresponden a proteínas de fusión de diferente peso molecular, de 190 kDa ( $BCR/ABL1^{P190}$ ), de 210 kDa ( $BCR/ABL1^{P210}$ ) y de 230 kDa ( $BCR/ABL1^{P230}$ ) (Groffen 1984; Fainstein 1987; Saglio 1990), que contienen la región genómica correspondiente a la TK *ABL1* en el extremo COOH-terminal y la secuencia *BCR* de diferente tamaño (dependiendo del punto de ruptura) en el NH2-terminal (Li, Ilaria et al. 1999) [Figura 6].



**Figura 6: Representación esquemática de los genes *BCR*, *ABL1*, *BCR-ABL1* y las proteínas que codifican.** Los números corresponden al número de exón. En el gen *BCR*, exones 1' y 2' son exones alternativos contenidos en el primer intrón. El gen *ABL1* tiene dos isoformas alternativas en el primer exón denotadas como 1b y 1a. Las proteínas de fusión se ilustran en la columna de la derecha. Modificado de: (Laurent 2001).

Los tres rearrreglos de *BCR-ABL1* se asocian con diferentes tipos de leucemias (Van Etten 1993; Melo 1996). La proteína *BCR/ABL1*<sup>P210</sup> se encuentra en las células tumorales de pacientes con LMC y con menor frecuencia en leucemias agudas linfoides o mieloides (Chen 1988; Jorgensen 2001). Por el contrario, *BCR/ABL1*<sup>P190</sup> se encuentra comúnmente en la leucemia linfoblástica aguda *Philadelphia* positivo (LLA Ph<sup>+</sup>) (Hirsch-Ginsberg 1988), ocasionalmente, en leucemia mieloide aguda (Schaefer-Rego 1988) y raras veces en la LMC (Selleri 1990; Melo 1994). Se han descrito varios pacientes Ph<sup>+</sup> con un síndrome mieloproliferativo semejante a la LMC, pero con síntomas clínicos leves, incluyendo un recuento bajo de leucocitos en sangre periférica que consiste principalmente en neutrófilos (Pane 1996). Estos pacientes pertenecen a una entidad clínica llamada LMC neutrofílica y asociada con la isoforma *BCR/ABL1*<sup>P230</sup> (Selleri 1990; Emilia 1997; Mitre 1997).

### 2.1.6 Rearreglos moleculares *BCR/ABL1*<sup>P210</sup>, *BCR/ABL1*<sup>P190</sup>, *BCR/ABL1*<sup>P230</sup>

La LMC se caracteriza por presentar la translocación t(9;22)(q34;q11) que genera el cromosoma (Ph) (Nowell 1960). El gen de fusión *BCR-ABL1* codifica tres oncoproteínas de diferente tamaño dependiendo del sitio de ruptura en el gen *BCR*; *major* (M-BCR, codifica la P210), *minor* (m-BCR, codifica la P190) y *micro* (μ-BCR,



codifica la P230) (Chasseriau 2004). Debido a que el punto de ruptura en el gen *ABL1* habitualmente se produce en el exón 2, si el punto de ruptura en el gen *BCR* es en el exón 13 o 14, se genera el reordenamiento e13a2 (b2a2) o e14a2 (b3a2), ambos genes de fusión transcriben un ARNm de 8,5 kb que codifica la proteína de 210 KDa. Estos reordenamientos representan más del 95% de los pacientes con diagnóstico de LMC.

La actividad y la estructura de la proteína de fusión BCR-ABL1 de 210 KDa son similares al producto oncogénico del virus de la leucemia murina Abelson de 160<sup>gag/v-abl</sup>, que induce linfoma agudo. Por tal motivo, para evaluar si la proteína BCR-ABL1 era capaz por sí misma de inducir LMC, se realizó el trasplante de médula ósea previamente transfectada con retrovirus portando el reordenamiento *BCR-ABL1* en ratones previamente irradiados. Los ratones luego de este procedimiento desarrollan una enfermedad mieloproliferativa similar a la LMC del humano (Daley 1990; Chalandon 2005). En la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica se detecta el rearreglo *BCR-ABL1* hasta en un 5% de los casos, siendo la isoforma e1a2 la más prevalente, originando la oncoproteína de 190 KDa. El punto de ruptura  $\mu$ -BCR conecta el exón 19 del *BCR* con el exón 2 del *ABL1* originando el transcrito e19a2, el cuál ha sido asociado con un fenotipo más leve de LMC (Mondal 2006), definido como Leucemia neutrofílica crónica Ph<sup>+</sup> (LNC-Ph<sup>+</sup>). Este es un desorden mieloproliferativo poco común que presenta un curso más indolente que la LMC clásica (Saglio 1990; Pane 1996).

### 2.1.7 Activación y señalización celular por BCR-ABL1

La consecuencia molecular de la proteína de fusión BCR-ABL1 es la hiperactividad del dominio TK del ABL1 como resultado de la falta de autoinhibición debido a la pérdida del dominio N-terminal regulador de la proteína.

Las células que expresan la oncoproteína muestran fosforilación aberrante de múltiples proteínas, incluyendo proteínas adaptadoras del citoesqueleto y factores de transcripción. BCR-ABL1 kinasa conduce directa o indirectamente a la activación de múltiples vías celulares incluyendo PI3K, AKT, MTOR, RAS, EGFR, MAP-kinasa, JNK/SAPK, JAK1-3, SRC-kinasas como LYN, HCK, y FGR, PTPN11, NF- $\kappa$ B, fosfolipasa C y STAT5 (Bernt 2014).

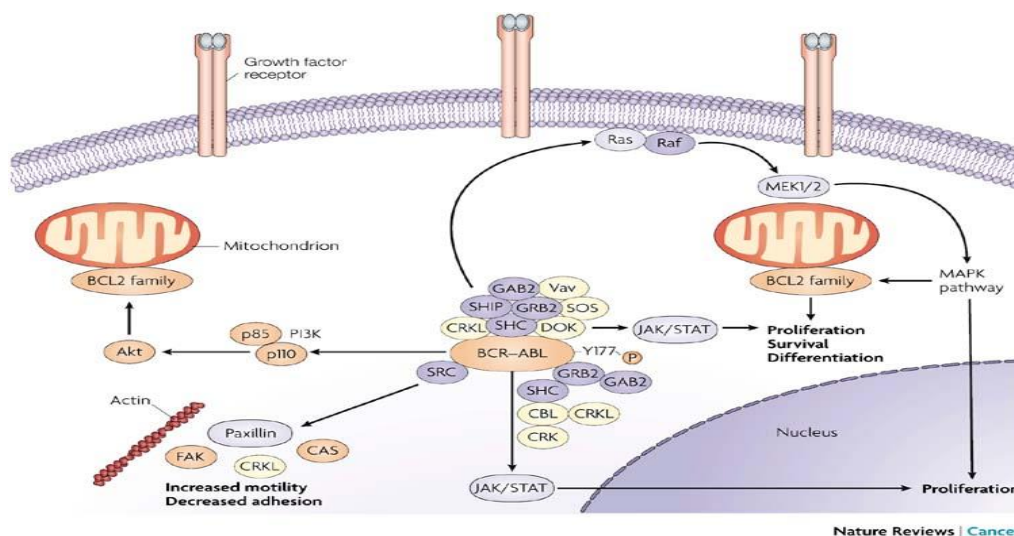
La fosforilación constitutiva de los factores de transcripción STAT (STAT1 y STAT5), ha sido reportada en varias líneas celulares que expresan BCR-ABL1 (Ilaria 1996). Esta activación de STAT5 contribuye a la transformación maligna, su efecto sobre células



transformadas es principalmente antiapoptótico e involucra la activación transcripcional de BCL-XL (Horita 2000). La autofosforilación del BCR-ABL1, genera en la proteína sitios de unión que permiten la interacción con proteínas adaptadoras (GRB2 y CRKL), que a su vez, reclutan otras moléculas como GAB2 y la subunidad regulatoria P85 de PI3K (Goss 2006). El resultado es la formación de complejos de señalización multiméricos que son mantenidos principalmente por interacciones dependientes de fosfotirosinas. El resultado de la activación de vías de señalización tales como MAPK/AKT/mTor (Melo 2004), es la inhibición de la apoptosis, aumento de proliferación y alteraciones en la adhesión celular. Una de las principales tirosinas fosforiladas involucradas en la movilidad (Uemura 1999) y adhesión celular mediadas por integrinas es CRKL, mediante su asociación con otras proteínas de adhesión focal tales como paxilina, FAK, P130CAS y HEF1 (Salgia 1996).

También existen evidencias de que BCR-ABL1 afecta la reparación del ADN e induce inestabilidad genómica mediante una gran variedad de mecanismos (Skorski 2002). La proliferación de las células BCR-ABL1 positivas requieren de la actividad kinasa de PI3K (Skorski 1995). BCR-ABL1 forma complejos multiméricos con PI3K, CBL, CRK y CRKL; el siguiente sustrato en esta cascada es la serina treonina kinasa AKT.

La autofosforilación de la tirosina 177 provee un sitio para la molécula adaptadora GRB2, la cual luego de unirse a la proteína SOS (*son of sevenless*) estabiliza Ras en su forma activa unida a GTP. Otras moléculas adaptadoras SHC y CRKL, también pueden activar Ras; ambas son sustrato de BCR-ABL1 (Pelicci 1995) y se unen a la oncoproteína por sus dominios SH2 (SHC) o SH3 (CRKL). La estimulación de receptores de citoquinas tales como IL-3 conducen a la activación de Ras y el subsecuente reclutamiento de la serina treonina Raf a la membrana celular (Marais 1995). Raf inicia una cascada de señalización a través de la MEK1/MEK2 y ERK desencadenando transcripción (Cahill 1996). La activación de la vía JNK/SAOK por BCR-ABL1 es necesaria para la transformación maligna (Raitano 1995). En la [Figura 7] se esquematizan las principales vías de señalización desencadenadas por BCR-ABL1.



**Figura 7: Señalización desencadenada por la presencia de BCR-ABL1.** Con la ayuda de varias proteínas mediadoras, BCR-ABL1 se asocia con Ras y estimula su activación. La proteína adaptadora (GRB2) interactúa con BCR-ABL1 a través de su dominio de unión SH2 generado cuando el residuo Y177 del BCR-ABL1 es autofosforilado. Cuando GRB2 se une a BCR-ABL1 interactúa con la proteína SOS y el complejo resultante BCR-ABL1-GRB2-SOS activa a Ras. Las proteínas adaptadoras CRKL (CRK-like) y SHC (SH2-containing protein) puede también mediar la activación de Ras por BCR-ABL1. El camino de señalización de Ras y MAPK (mitogen activated proteína kinase) está acoplado a Raf (serine/threonine kinase). Raf cataliza la fosforilación de MEK1 y MEK2 (mitogen-activated and extracellular-signal regulated kinase 1 y 2) lo que resulta en su activación.

A través de la estimulación de la vía Ras-Raf, BCR-ABL1 incrementa el crecimiento celular y proliferación. BCR-ABL1 también se asocia con la activación de PI3K (phosphatidylinositol-3-Kinase) suprimiendo la muerte celular programada e incrementando la supervivencia. BCR-ABL1 se asocia con componentes de adhesión focal (como ser actina, paxillin y focal adhesion kinase o FAK); la activación de CRKL-FAK-PYK2 lleva a una disminución de la adhesión celular. BCR-ABL1 se asocia con Janus Kinasa activando la vía de señalización JAK-STAT. Finalmente, BCR-ABL1 activa vías de señalización que desencadenan respuestas atípicas a factores quimiotácticos lo cual incrementa la migración celular. BCR-ABL1 también se asocia con proteínas de supervivencia que interactúan con proteínas de la familia de BCL2 (mitochondrial-based); (Weisberg 2007).

### 2.1.8 Tirosinas kinasas como blancos terapéuticos contra el cáncer

Las tirosinas kinasas (TKs) son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a residuos de tirosina en polipéptidos. El genoma humano contiene aproximadamente 90 receptores TK y más de 40 genes asociados a ellas, cuyos productos regulan proliferación, supervivencia, diferenciación, función y movilidad celular (Krause 2005).

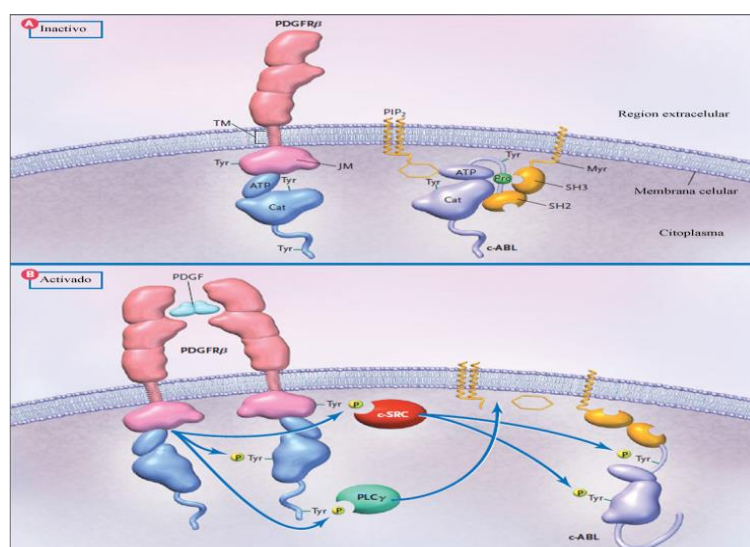
Las TKs se dividen principalmente en 2 grupos: receptoras y no receptoras. Las primeras son proteínas transmembrana que poseen un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio kinasa catalítico intracelular, mientras que las no receptoras carecen de dominio transmembrana y se encuentran en el núcleo, citosol y en la superficie interna de la membrana plasmática. El dominio kinasa de todas las TKs tiene un lóbulo con un extremo N-terminal que une ATP y magnesio, un lóbulo C-terminal

conteniendo el *loop* de activación y una grieta entre ambos donde se unen los sustratos polipeptídicos.

En ausencia de ligando, las TKs receptoras se encuentran desfosforiladas, son monoméricas y la conformación de su dominio kinasa está inactiva. En algunas TKs receptoras la región juxtamembrana citoplasmática inhibe la enzima interactuando con el dominio kinasa (Griffith 2004).

Las TKs receptoras se activan por la unión del ligando al dominio extracelular, resultando en la oligomerización del receptor, interrupción de la interacción autoinhibitoria juxtamembrana y autofosforilación de la tirosina regulatoria dentro del *loop* de activación de la kinasa [Figura 8] (Krause 2005). Estos cambios reorientan residuos de aminoácidos críticos, incrementando la actividad catalítica de la enzima. Luego de la activación, la autofosforilación genera sitios de unión para proteínas de señalización, reclutándolas a la membrana y activando múltiples vías de señalización (Schlessinger 2000).

Las TKs no receptoras se mantienen en estado inactivo por lípidos y proteínas inhibitorias o a través de una autoinhibición intramolecular (Van Etten 2003). Su activación está mediada por diversas señales intracelulares, como reclutamiento de receptores transmembrana (causando oligomerización y autofosforilación) o por *trans*-fosforilación de kinasas. La señalización por TKs es finalizada en parte por acción de tirosinas fosfatasas que hidrolizan y por inducción de moléculas inhibitorias.

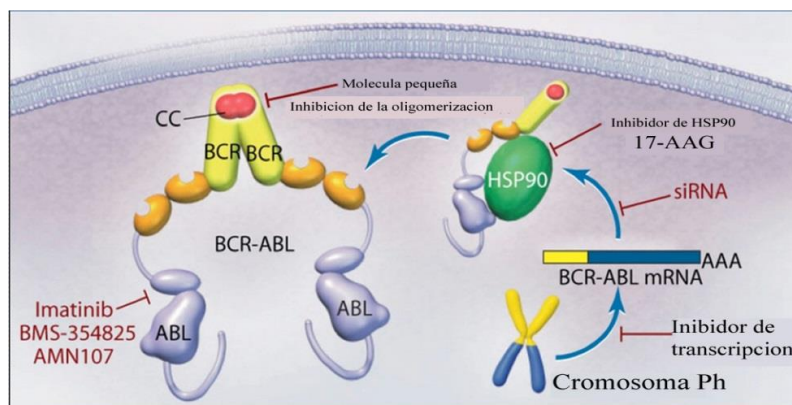


**Figura 8: Mecanismo de activación de Tirosinas Kinasas.** Un receptor típico de TK (PDFGR $\beta$ ) y una TK no receptora (c-ABL) están representados con el ATP-binding (ATP) y lóbulos catalíticos (Cat) de los dominios de la kinasa y la región transmembrana (TM) de PDFGR $\beta$ . El panel A muestra ambas kinasas

en su estado inactivo. PDFGR $\beta$  en su estado inactivo es monomérico, se encuentra desfosforilado y el dominio catalítico es inhibido por protrusión de una tirosina reguladora (Tyr) en el *loop* de activación hendidura y por interacción intramolecular con el dominio juxtamembrana (JM). c-ABL está asociado a la membrana a través de su unión covalente a un grupo N-terminal miristilo (Myr) y es inhibido por interacción molecular del dominio SH3 con un residuo de prolina adyacente (Pro) y por interacción directa del dominio catalítico con un lípido de membrana inhibitorio, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (PPI<sub>2</sub>).

En el panel B, PDFGR $\beta$  es activado por unión al ligando (dímero PDFGR $\beta$ ) el cual induce oligomerización del receptor y fosforilación intramolecular (P en amarillo) del *loop* de activación de la tirosina. Esto conduce a un cambio conformacional en el dominio catalítico y un incremento de la actividad enzimática mientras que mientras que la fosforilación de otras tirosinas dentro del dominio intracelular del receptor crea sitios de unión para proteínas conteniendo el dominio SH2, incluyendo c-SRC (óvalo rojo) y fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ) (óvalo verde). c-ABL es activado por fosforilación de las dos tirosinas reguladoras, una el *loop* de activación y la otra cerca del dominio SH3, las cuales pueden ser fosforiladas por otras tirosinas kinasas como c-SRC. Además la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ) puede hidrolisar y destruir el lípido inhibitorio PPI<sub>2</sub> (Krause 2005).

Debido a los múltiples niveles de regulación de las TKs, es comprensible que estén desreguladas en las células tumorales. La activación anormal de estas proteínas puede tener un efecto oncogénico, provocando la activación constante de ciertas vías de señalización, esto puede suceder a través de diversos mecanismos; el más importante es la formación de un gen de fusión (ya sea por translocaciones u otros reordenamientos cromosómicos), en el que la aparición de nuevos dominios en la proteína, genere una activación constitutiva, como sucede en el BCR-ABL1 (Smith 2003; Mitsudomi 2010). Las TKs pueden ser inhibidas farmacológicamente por múltiples mecanismos. El objetivo del descubrimiento o generación de drogas anti-tirosina kinasas, es encontrar una molécula pequeña que inhiba directamente la actividad catalítica de la kinasa interfiriendo en la unión del ATP o inhibiendo la activación por bloqueo de su dimerización. La estabilidad de algunas TKs está regulada por su unión a proteínas de shock térmico (HSP90) por lo tanto los inhibidores de HSP90 pueden interrumpir su unión determinando degradación de BCR-ABL1 [Figura 9].



**Figura 9: Fusión de TKs no receptoras ejemplificado por BCR-ABL1.** En la figura se mencionan ejemplos de blancos terapéuticos. Los inhibidores de TK usualmente bloquean la unión del ATP o del

sustrato al dominio catalítico de la TK. BCR-ABL1 podría ser inhibido además por compuestos tales como 17-AAG, que interfiere con la unión de chaperonas moleculares como HSP90. Otra estrategia es la utilización de compuestos que bloquean la oligomerización, por *small interfering RNA* (siRNA) que inducen degradación del ARN mensajero de BCR-ABL1; o por inhibición de la transcripción de BCR-ABL1 (Krause 2005).

### 2.1.9 Tratamientos convencionales de la LMC

El tratamiento de la LMC antes de la introducción de los inhibidores de tirosina kinasa (ITKs) tenía como principal objetivo la prolongación de la sobrevida y sólo era posible la curación en aquellos pacientes elegibles para trasplante. En la actualidad el objetivo es más ambicioso, en orden lógico, en primer lugar el tratamiento debe impedir la progresión a fase acelerada (FA) o crisis blástica (CB) y reducir el riesgo de muerte por leucemia. Actualmente se encuentran en desarrollo protocolos de discontinuación de los tratamientos con ITKs, los resultados son promisorios ya que en algunos pacientes la LMC podría curarse solamente bajo tratamiento con inhibidores de TK (Mahon 2010).

#### 2.1.9.1 Terapias previas a los Inhibidores de Tirosina Kinasa.

En 1865 se comunicó la remisión clínica de un paciente con leucemia mieloide crónica (LMC) al ser tratado con una solución de arsenito de potasio (solución de Fowler). A partir de entonces, el arsénico se indicó regularmente como tratamiento de la LMC. Con el advenimiento de la radioterapia, la radiación esplénica se hizo popular entre 1920 y 1930, este tratamiento aliviaba la sintomatología pero no prolongaba la sobrevida. En la década del 80 la terapia se basaba en la administración de busulfán o hidroxiurea. El busulfán es un agente alquilante con gran eficacia para controlar el recuento de leucocitos durante periodos prolongados, sin embargo, los pacientes progresaban a fases avanzadas de la enfermedad con una supervivencia media de 45 meses. La hidroxiurea proporcionaba un control a corto tiempo del recuento leucocitario y del tamaño del bazo, pero al igual que con busulfán la progresión de la enfermedad era inevitable, siendo la supervivencia media de 58 meses. En ningún caso se lograba remisiones citogenéticas.

El interferón *alpha* (IFN $\alpha$ ) fue la primera droga que demostró una remisión citogenética (Talpaz 1983; Talpaz 1987), más durable y reproducible que la inducida por la quimioterapia. El IFN $\alpha$  es un estimulante del sistema inmune que activa a las células T logrando una respuesta hematológica completa (RHC) en más del 40% de los pacientes,

mientras que la respuesta citogenética completa (RCC) se alcanza en hasta un 15%. Un incremento moderado de la eficacia fue observado al combinar IFN $\alpha$  con bajas dosis de citarabina, sin embargo, el curso de la enfermedad no fue diferente del observado en el tratamiento con IFN $\alpha$  solo.

#### 2.1.9.2 **Trasplante de Médula ósea**

El trasplante de médula ósea (TMO) es un tratamiento potencialmente curativo para la LMC. Es un procedimiento de alta complejidad con una mortalidad relacionada elevada ( $\pm$  20%) (Milone 1999). La elegibilidad de un paciente para ser trasplantado se basa en la identificación de un donante compatible, la edad del paciente y duración de la enfermedad. Si el trasplante se realiza utilizando un donante relacionado compatible las chances de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo son de 50% a 75% (Clift 1994). En el caso de un donante no relacionado, las chances de supervivencia libre de enfermedad son de un 40% a 50%, con mayor riesgo de mortalidad temprana y reacción injerto contra huésped (Kernan 1993).

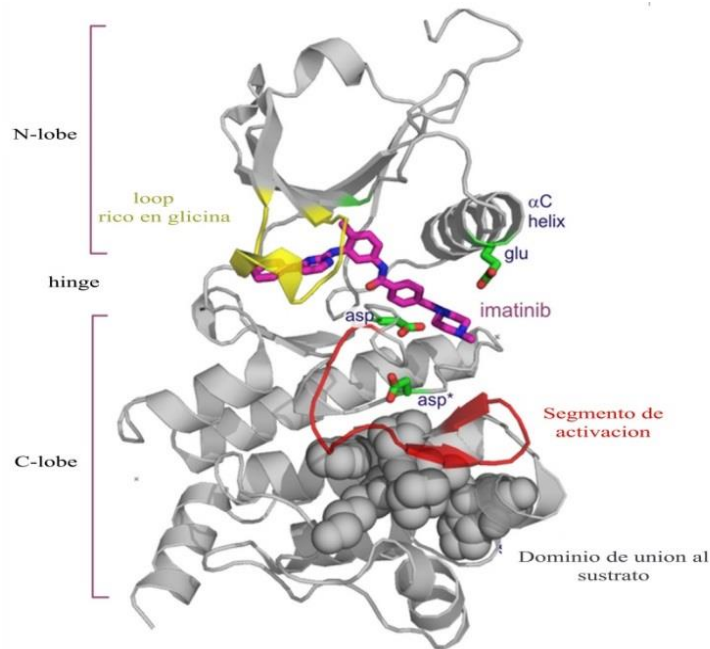
#### 2.1.9.3 **Terapia con inhibidores de tirosina kinasa**

El tratamiento de la LMC cambió radicalmente en las últimas décadas gracias a la introducción de los inhibidores de tirosina kinasa (ITK) (Frame 2007). Antes de la llegada de estos inhibidores, la supervivencia promedio de los enfermos era de 3 a 6 años desde el diagnóstico; durante la terapia con ITKs aproximadamente el 90% de los pacientes permanecían en fase crónica a los 5 años del diagnóstico (Druker 2006).

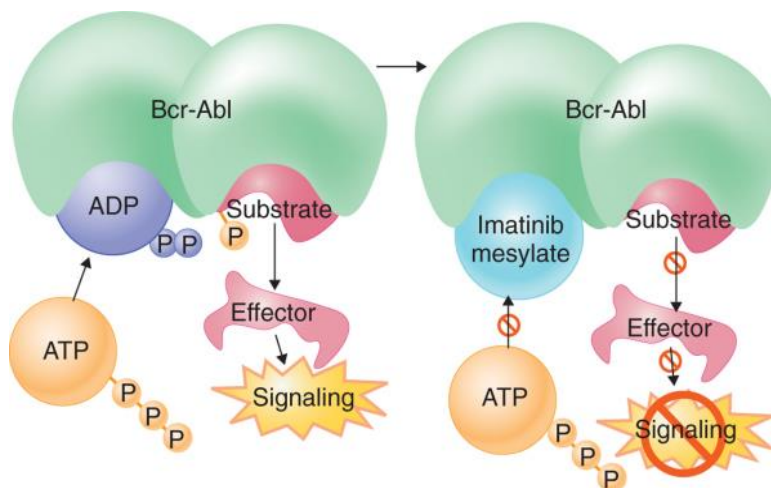
El primer inhibidor utilizado en el tratamiento de la LMC fue el Imatinib (STI571 o *Gleevec*, *Novartis*), un derivado de la 2-fenilaminopirimidina, que con limitada toxicidad, induce respuesta hematológica y citogenética en la mayoría de los pacientes (Druker 2001). Es una molécula pequeña antagonista con actividad frente a las TKs y ejerce una inhibición potente y específica de BCR-ABL1. El imatinib actúa bloqueando el sitio de unión del ATP en la kinasa ABL1, lo que inhibe la capacidad de la proteína para transferir grupos fosfato desde el ATP y residuos de tirosina fosforilados de proteínas sustratos, impidiendo la transducción de las señales. El imatinib reconoce la forma inactiva de la proteína, se une al sitio de unión del ATP en el dominio kinasa del ABL1 e inhibe la autofosforilación y la fosforilación del sustrato, provocando el arresto



del crecimiento y apoptosis de las células *BCR-ABL1* positivas con mínimo efecto sobre los progenitores hematopoyéticos normales (Druker 2001) [Figura 10, figura 11].



**Figura 10: Estructura cuaternaria de la tirosina quinasa ABL1 en su conformación inactiva unida a la molécula de imatinib.** El imatinib se une al bolsillo de unión del ATP de la tirosina quinasa en su conformación inactiva. El segmento de activación no está fosforilado y cubre el sitio de unión del sustrato. Imatinib impide el movimiento hacia el exterior del segmento de activación. También se observa que Asp y Glu (en la hélice  $\alpha C$ ) no están en la posición correcta para coordinar la unión del ATP.

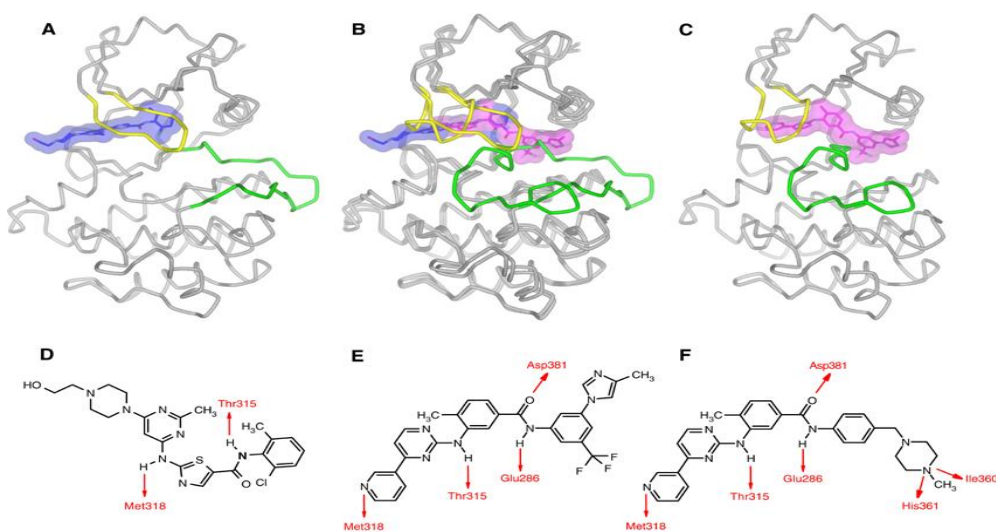


**Figura 11: Mecanismo de acción del imatinib con la proteína oncogénica BCR-ABL1.** El imatinib se une al bolsillo de unión al ATP del dominio quinasa de la proteína ABL1; previene la fosforilación de sustrato y activación aguas abajo de las señales, lo que inhibe los efectos leucémicos de BCR-ABL1 en las células de la LMC. Difosfato de adenosina ADP; Trifosfato de adenosina ATP; Grupo de fosfato P (Hagop Kantarjian 2006).

En el año 2000, los investigadores del grupo IRIS (*The International Randomized Study of Interferon and STI571*) empiezan el reclutamiento de pacientes con LMC en fase crónica en el marco de un estudio clínico de fase III, que tenía como propósito comparar la eficacia del tratamiento en primera línea del imatinib versus interferón/citarabina (IFN/Cit). En este estudio participaron 1.106 pacientes provenientes de 16 países; a los 5 años de comenzar el tratamiento con imatinib encontraron una normalización de los valores hematológicos y citogenéticos en el 98% y 96% de los pacientes, respectivamente. La supervivencia global a 5 años del grupo que recibió imatinib fue del 89,6% con progresión a fase acelerada o crisis blástica en sólo el 7% de los casos. Por cuestiones éticas 359 pacientes (65%) del grupo IFN/Cit que no alcanzaron la respuesta hematológica o citogenética pasaron en el transcurso del estudio al tratamiento con imatinib y solamente 14 a los 5 años, continuaron con el tratamiento IFN/Cit. Por este motivo no se pudo comparar directamente la eficacia de los dos tratamientos; sin embargo, comparado con datos históricos el imatinib mostró superioridad en todos los parámetros evaluados. Esto determinó que la FDA lo aprobara rápidamente para el tratamiento en primera línea de la LMC (Druker 2006). Otro aspecto relevante que surgió a partir del estudio IRIS es la definición de la respuesta molecular (RM). Debido a que el inhibidor reduce rápidamente la carga del clon leucémico, los estudios hematológicos y/o citogenéticos no tienen la sensibilidad suficiente para monitorear la enfermedad en el tiempo. Por tal motivo la cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* por real-time PCR representa la metodología *gold-standard* en el seguimiento del paciente con LMC tratado con inhibidores de TK. En el estudio IRIS se observó que la velocidad y la profundidad con que se alcanza la respuesta molecular eran factores de buen pronóstico; en particular la reducción de  $\geq 3$  logaritmos en los niveles del *BCR-ABL1*, respecto a un valor de referencia (estimado a partir de la mediana del nivel de *BCR-ABL1* de 30 muestras al diagnóstico) se estableció como el *end-point* clínico de mayor relevancia que se denominó respuesta molecular mayor (RMMa) (Hughes 2003). Alcanzar dicho grado de respuesta antes de los 18 meses desde el comienzo del tratamiento es un índice de buen pronóstico para el paciente. Estos resultados también sugirieron la necesidad de inhibidores más potentes que permitieran alcanzar en tiempos más cortos y con mayor “profundidad” la respuesta molecular; lo cual promovió al desarrollo de los agentes inhibidores de tirosina kinasa de segunda generación (nilotinib y dasatinib). El nilotinib es un compuesto derivado del



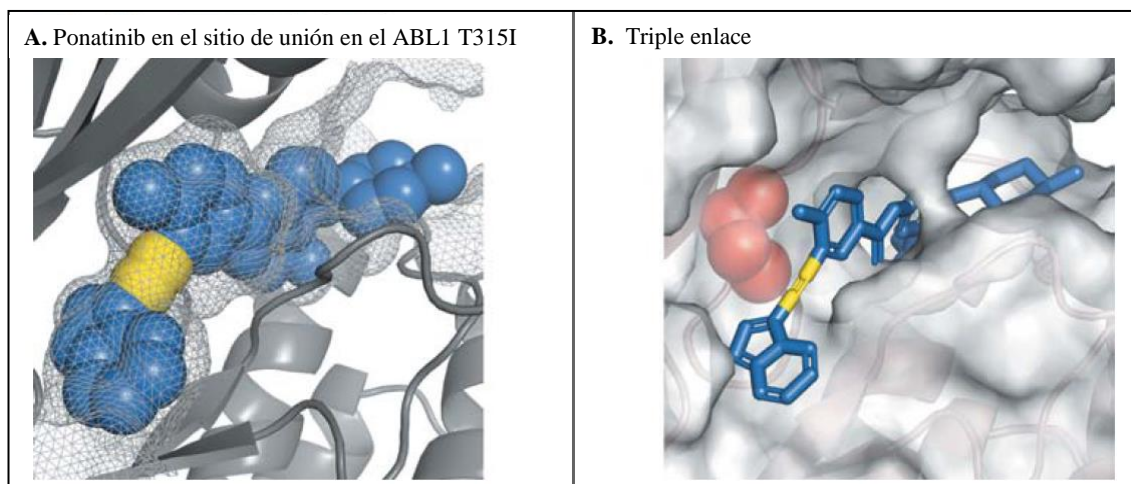
imatinib pero de mayor potencia (~30 veces) (Weisberg, Manley et al. 2005). Se comparó la eficacia del nilotinib (300 mg y 400 mg) con respecto al imatinib (400 mg) en un estudio clínico denominado ENEST (*Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients*). El porcentaje de pacientes que alcanzaron la RMMa a los 12 meses fue significativamente superior en los dos grupos con nilotinib (44% y 43%) con respecto al grupo de imatinib (22%). Estos resultados demuestran la mayor capacidad del nilotinib de lograr una respuesta terapéutica temprana y libre de eventos (Saglio 2010). El dasatinib, es un inhibidor con actividad dual, actúa sobre el *ABL1* y Src kinasas, es menos selectivo que el nilotinib y se une tanto a la conformación activa como inactiva de la kinasa (100-300 veces más potentes que el Imatinib) (Golas 2003; Puttini 2006; Tokarski 2006). En otro estudio clínico muy importante, DASISION (*The Dasatinib versus Imatinib Study in Treatment-Naive CML Patients*) se demuestra la mayor eficacia del dasatinib sobre el imatinib, pudiendo alcanzar porcentajes de RMMa a los 12 meses similares a aquellos obtenidos con nilotinib (Baccarani 2013) [Figura 12].



**Figura 12:** Estructuras de ABL1 kinasa (A) en el estado activo y (C) inactivos, con (azul) dasatinib y nilotinib (magenta). Las distintas conformaciones del P-loop (amarillo) y el lazo de activación (verde) son inducidos o estabilizados por los diferentes modos de unión de los dos inhibidores. (B) muestra una superposición de las dos diferentes conformaciones. Dasatinib (D), nilotinib (E), imatinib (F), sus respectivas interacciones (puentes de Hidrógeno) con el dominio kinasa del *ABL1* se indican en rojo (Weisberg, Manley et al. 2006).

Ponatinib (AP24534) es un inhibidor de tirosina kinasa de tercera generación, cuya estructura fue un diseño computacional. Contiene un nuevo triple enlace carbono-carbono diseñado para evitar el impedimento estérico causado por los residuos

voluminosos de isoleucina en la posición 315 en el la proteína BCR-ABL1 mutante T315I (Cortes 2012; Cortes 2013) [Figura 13].



**Figura 13: Estructura tridimensional del ponatinib unido al dominio kinasa del ABL1 en la proteína BCR-ABL1.** En el panel A, ponatinib (esferas en azul y amarillo) muestra un ajuste óptimo a la cavidad de unión al ABL1-T315I (indicado por un patrón de malla). En el panel B, el enlace triple (amarillo) es una característica estructural única de ponatinib (azul) que le permite evadir el impedimento estérico generado por la mutación T315I (esferas rojas).

Además de su gran eficacia sobre células BCR-ABL1 portadoras de la mutación T315I, ha demostrado actividad inhibitoria frente a BCR-ABL1 nativo y a una variedad de mutantes de BCR-ABL1. El ponatinib fue aprobado a finales del 2012 para el tratamiento de adultos con LMC en FC, FA o CB que sean resistentes o intolerantes a imatinib, dasatinib o nilotinib y en los que presenten la mutación T315I. También se aprobó el uso en pacientes con LLA Ph<sup>+</sup> que sean resistentes o intolerantes a imatinib o dasatinib o que presenten la mutación T315I. Se han reportado reacciones adversas graves con ponatinib, como oclusión vascular, insuficiencia cardíaca y hepatotoxicidad, por lo cual la *Food and Drug Administration* (FDA) debió emitir serias advertencias sobre su uso (Hoy 2014).

El ponatinib demostró una notable actividad en pacientes con LMC resistentes a todos los ITKs. Particularmente fue muy eficaz en pacientes con la mutación T315I pero antes de comenzar el tratamiento, los hematólogos necesitan considerar si los beneficios potenciales de la terapia superan a los riesgos (Hoy 2014).

## 2.1.10 Predictores de respuesta a ITKs en pacientes con LMC

### 2.1.10.1 *Scores* pronósticos

El tratamiento y pronóstico de la LMC ha ido evolucionando desde el descubrimiento del imatinib. A pesar de que las características moleculares en los pacientes con LMC son similares, la enfermedad es heterogénea. Existen varios sistemas de *scores* pronósticos para predecir sobrevida en pacientes con diagnóstico de LMC. En 1984, Sokal y colaboradores fueron capaces de clasificar a los pacientes con LMC en tres grupos pronósticos (riesgo bajo, intermedio y alto), empleando criterios definidos al diagnóstico (edad, recuento de plaquetas, tamaño del bazo y porcentaje de blastos en sangre periférica) (Sokal 1984). Este *score* fue desarrollado para clasificar a los pacientes con LMC en tratamiento con busulfán o hidroxiurea, pero provee información útil para predecir la sobrevida de pacientes tratados con interferón (Allan 1995) y el seguimiento de pacientes en tratamiento con imatinib (Druker 2006). Además este *score* puede ser utilizado en pacientes tratados con imatinib que previamente recibieron INT $\alpha$  y en aquellos bajo el tratamiento con ITKs de segunda generación (Marin 2011). En 1998 Hasford y colaboradores llevaron adelante un ensayo similar al utilizado por Sokal, incorporando el porcentaje de eosinófilos y basófilos en sangre periférica en pacientes tratados con INT $\alpha$  (Hasford 1998). A partir del 2011, surgió el *score* denominado EUTOS (*European Treatment and Outcome Study*) que utiliza el porcentaje de basófilos en sangre periférica y el tamaño del baso, clasificando a los pacientes en grupos de riesgo bajo o alto ( $\leq 87$  o  $> 87$ , respectivamente). Es utilizado para identificar pacientes con LMC que presentan menos posibilidades de responder a la terapia, por lo tanto, permite seleccionar a aquellos cuyo tratamiento debe ser observado cuidadosamente y de esta manera, de ser necesario, lograr una temprana intervención terapéutica (Hasford 2011).

### 2.1.10.2 Deleciones del cromosoma 9 [der (9)]

El gen *BCR-ABL1* está expresado en todos los pacientes con LMC, pero, el *ABL1-BCR* en el derivado 9 (9q<sup>+</sup>) solo se expresa en el 70% de los casos (Melo 1996). Es importante destacar que aunque se ha detectado ARNm de *ABL1-BCR*, no se ha encontrado ninguna proteína ABL1-BCR viable, por lo que se desconoce la función de los transcritos en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo se ha demostrado el

significado pronóstico desfavorable que conlleva la existencia de deleciones o microdeleciones sobre el derivado 9, las cuales están presentes en 10%-20% de los pacientes al diagnóstico (Sinclair 2000). Las deleciones pueden ser extensas dando lugar a pérdidas de 5,5 megabases en el cromosoma 9 y hasta 17 megabases en el cromosoma 22. Se ha postulado que la consecuencia biológica de las deleciones en el cromosoma 9 sería la pérdida de uno o más genes supresores de tumores, existen aproximadamente 300 genes que podrían estar implicados, pero se desconoce cuál de ellos conferiría el pronóstico desfavorable.

## **2.1.11 Indicadores de respuesta al tratamiento con ITKs**

### **2.1.11.1 Respuesta hematológica**

La respuesta hematológica completa (RHC), es el requisito indispensable para lograr la respuesta citogenética y por supuesto, esta última es necesaria para alcanzar la respuesta molecular. Solo unos pocos pacientes fallan en alcanzar la RHC bajo el tratamiento con ITKs. La RHC se logra cuando:

- Los recuentos de glóbulos blancos y plaquetas recuperan los niveles normales
- No se detectan células en estadios inmaduros en sangre periférica

### **2.1.11.2 Respuesta citogenética**

El análisis citogenético se basa en el estudio de células en metafase por bandeo cromosómico, es necesario analizar como mínimo 20 metafases y el resultado se expresa en porcentaje de células analizadas. La respuesta citogenética es nula (RCN) cuando se observa más del 95% de células  $Ph^+$ , con menos de un 35% la repuesta citogenética es parcial (RCP) y cuando no se observan células  $Ph^+$  (0%), hablamos de respuesta citogenética completa (RCC). La respuesta citogenética mayor (RCM) incluye a la RCC y a la RCP.

Mediante el estudio citogenético es posible identificar anomalías cromosómicas adicionales. La aparición de estas anomalías secundarias en las células  $Ph^+$  es indicativo de progresión de la enfermedad, siendo las duplicaciones del cromosoma  $Ph^+$ , la trisomía del cromosoma 8(+ 8) y el i(17q) las más frecuentes (Johansson 2002). También se ha reportado en un 5% de los pacientes que alcanzan RCC bajo terapia con

imatinib la presencia de trisomía 8 y -7/del (7q) asociado a un crecimiento de tipo mielodisplásico (Baccarani 2006).

La búsqueda del cromosoma Ph en la LMC al diagnóstico se debe realizar por análisis citogenético, pero frente a un estudio citogenético negativo, puede utilizarse la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) para identificar variantes o translocaciones críptica [Tabla 2] (Baccarani 2013).

### 2.1.11.3 Respuesta Molecular

La respuesta al tratamiento es un factor pronóstico muy importante, en la actualidad debido a que se encuentran disponibles varios ITKs, las recomendaciones no están centradas a que inhibidor debería utilizarse, sino a la respuesta que deben alcanzar los pacientes independientemente del ITK. La repuesta está definida como “óptima” o “falla” [Tabla 2] (Baccarani 2013). La respuesta óptima se asocia con un mayor tiempo de supervivencia; los pacientes logran valores hematológicos y calidad de vida comparables con los de la población sana. Los pacientes que se encuentran en “falla” deben modificar o recibir diferentes tratamientos para limitar el riesgo de progresión y muerte. Entre respuesta óptima y subóptima existe una situación de advertencia o “Warning”, lo cual, implica que las características de la enfermedad y la respuesta al tratamiento requiere supervisión más frecuentes para permitir cambios oportunos en la terapia en caso de fracaso del tratamiento (Baccarani 2013).

En la definición de respuesta, un punto controvertido es el valor de respuesta molecular temprana, particularmente después de 3 meses de tratamiento. Un valor de transcritos *BCR-ABL1* de 10%, fue reportado como valor pronóstico significativo de respuesta al tratamiento con ITKs (Hughes 2010). Sin embargo, la conclusión a la que se arriba es que una sola medición del nivel de transcritos *BCR-ABL1*, no sea suficiente para definir fracaso, lo que requeriría un cambio de tratamiento, mientras que dos determinaciones (a los 3 y 6 meses) y pruebas complementarias proporcionaría más apoyo a la decisión de cambio terapéutico. “Falla” debe ser distinguida como primaria (fracaso en alcanzar una respuesta determinada en un momento dado) o secundaria (pérdida de respuesta alcanzada) [Tabla 2]. Estas definiciones tiene profundas implicancias terapéuticas porque marcan los límites críticos entre ITKs y trasplante alogénico (Baccarani 2013).

Es evidente que el análisis de los niveles de ARNm de *BCR-ABL1* por PCR cuantitativa en tiempo real en muestras consecutivas, refleja con precisión, el nivel de inhibición inducido por la terapia y proporciona una estrategia de supervisión apropiada para los pacientes con LMC. La RMMa era considerada como un objetivo primario de la terapia ya que este valor está asociado a mejor sobrevida libre de progresión. En la actualidad se desean alcanzar respuestas moleculares más profundas.

**[Tabla 2] Definición de respuesta a TKIs**

	<b>Óptima</b>	<b>Warning (Advertencia)</b>	<b>Falla</b>
Al diagnóstico	NA	Riesgo alto o anomalías cromosómicas adicionales	NA
3 meses	BCR-ABL1 $\leq 10\%$ y/o Ph+ $\leq 35\%$	BCR-ABL1 $> 10\%$ y/o Ph+ 36-95%	No RHC y/o Ph+ $> 95\%$
6 meses	BCR-ABL1 $< 1\%$ y/o Ph+ 0%	BCR-ABL1 1-10% y/o Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 $> 10\%$ y/o Ph+ $> 35\%$
12 meses	BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$	BCR-ABL1 $> 0,1-1\%$	BCR-ABL1 $> 1\%$
En cualquier momento después de los 12 meses	BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$	CCA/Ph- (-7, o 7q-)	Pérdida de la RHC Pérdida de la RCC

NA: No aplicable.

#### 2.1.11.4 Estandarización internacional y monitoreo molecular

Un consenso internacional realizado en octubre de 2005 en Bethesda (Hughes 2006) propuso armonizar los valores de transcritos *BCR-ABL1* a la escala internacional (IS). Para ello se utilizaron los valores del estudio IRIS, es decir el 100% de transcritos corresponde al nivel basal y la reducción de 3 logaritmos (0,1%) a la Respuesta Molecular Mayor (RMMa). La conversión de los valores *BCR-ABL1* a la IS se realiza mediante la aplicación de un factor de conversión específico para cada laboratorio. Esto es necesario teniendo en cuenta la alta variabilidad inter-laboratorios debido a los numerosos pasos pre-analíticos y analíticos que requiere el estudio. El factor de conversión puede determinarse por comparación entre los valores obtenidos en el laboratorio a estandarizarse y los obtenidos en el laboratorio de referencia (*Institute of*

*Medical and Veterinary Science*, Adelaida, Australia). Una vez determinado el factor de conversión debe ser validado en un conjunto posterior de muestras.

Si bien, la RMMa continúa siendo un objetivo en la terapia de la LMC, en la actualidad, se busca obtener respuestas moleculares más profundas. El término de respuesta molecular completa (RMC) ya ha dejado de utilizarse y fue reemplazado por respuesta molecular con una reducción de  $\geq 4$  logaritmos (RM<sup>4</sup>),  $\geq 4,5$  logaritmos (RM<sup>4.5</sup>) y  $\geq 5$  logaritmos (RM<sup>5</sup>) (Cross 2012). Los valores de respuestas moleculares están indicados en la [Tabla 3].

[Tabla 3] Criterios de respuesta molecular

% <i>BCR-ABL1/ABL1</i>	Reducción log	Respuesta Molecular	Nº de copias <i>ABL1</i> *
$\leq 0,001\%$ o indetectable	$\geq 5.0$ log	RM 5.0	$\geq 100.000$
$\leq 0,0032\%$ o indetectable	$\geq 4.5$ log	RM 4.5	$\geq 32.000$
$\leq 0,01\%$ o indetectable	$\geq 4.0$ log	RM 4.0	$\geq 10.000$
0,01% - 0,1%	$\geq 3.0$ log	RMMayor	
0,1% - 1%	$\geq 2.0$ log	RMMenor	
1% - 10%	$\geq 1.0$ log	RMMínima	
> 10%	< 1.0 log	RMNula	

\* En las Respuestas Moleculares Completas (RM 4.0, RM 4.5 y RM 5.0) se debe tener en cuenta el nº de copias del gen *ABL1* para evitar falsos negativos (Cross 2012)

### 2.1.12 Resistencia a los ITKs

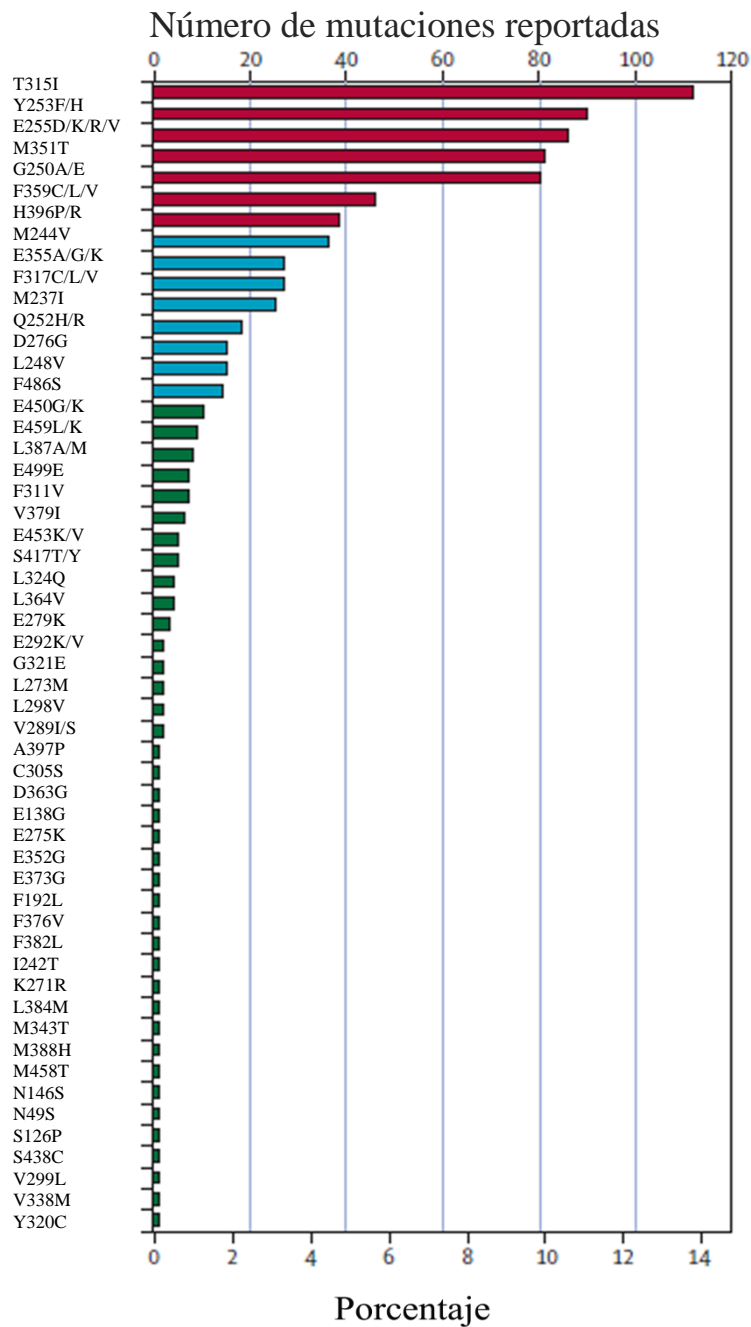
El tratamiento de la LMC con ITK puede inducir respuestas duraderas en la mayoría de los pacientes (Druker 2006). Sin embargo, en el caso del imatinib, entre un 10-20% de pacientes tratados en fase crónica temprana y un 40% de aquellos tratados en fases más avanzadas, muestran falta de respuesta inicial o bien una recaída temprana de la enfermedad, también se observa resistencia durante el tratamiento con ITKs de segunda generación. Existen varios mecanismos conocidos relacionados al fracaso de la terapia con ITKs, entre ellos la amplificación génica, sobreexpresión de transcritos *BCR-ABL1* (Weisberg 2000) o bien mecanismos independientes del *BCR-ABL1* como la expresión desregulada de canales de membrana que alteran el flujo de la droga dentro de la célula. Sin embargo, el mecanismo más frecuente de resistencia es la presencia de mutaciones puntuales en el gen *BCR-ABL1* que origina cambios de aminoácidos en la proteína quimérica alterando su conformación y reduciendo la capacidad de los ITKs para inhibir la actividad TK de la enzima (Weisberg 2007). No obstante, el crecimiento de clones



leucémicos resistentes portadores de mutaciones en el dominio kinasa puede ser contrarrestado, en algunos casos específicos, a través de un aumento de la dosis o un cambio de ITK. De aquí la importancia de poder determinar precozmente la aparición de clones *BCR-ABL1* mutados y definir el tratamiento más adecuado.

Se han descrito más de 100 mutaciones en el dominio kinasa del *BCR-ABL1* con una frecuencia muy heterogénea y diferente grado de relevancia clínica (Mathisen 2011). En el año 2007 Apperley describió 50 mutaciones con diferentes frecuencias; 15 de ellas son responsables de más del 85% de los casos de resistencia reportados. Las sustituciones aminoacídicas: G250, Y253, E255, T315, M351, F359, H396 son las más frecuentes y representan un 66% de los casos. Además, se han observado diferentes sustituciones en el mismo residuo (por ejemplo, F317C, F317L y F317V), lo cual confiere diferente sensibilidad a los ITKs (Apperley 2007) [Figura 14].





**Figura 14: Incidencia de Mutaciones en la práctica clínica.** Incidencia de mutaciones en orden de frecuencia; las siete mutaciones más frecuentes se representan en rojo, las siguientes ocho más comunes en azul y en verde las de menor frecuencia (Apperley 2007).

Como mencionamos anteriormente las mutaciones tienen diferente frecuencia y niveles de resistencia. En la [Tabla 4], se muestran 18 mutaciones para las cuales se ha determinado *in vitro* la Concentración Inhibitoria 50 (IC50), lo cual permite definir el nivel de resistencia inducido por cada una de ellas frente a los diferentes ITKs actualmente utilizados en el tratamiento de la LMC (Redaelli 2009).

**Tabla 4: IC50 de células BCR-ABL1 positivas portadoras de mutaciones con respecto a células BCR-ABL1 no mutadas o *wild type*.**

		<i>Imatinib</i>	<i>Dasatinib</i>	<i>Nilotinib</i>
	<i>wt</i>	1	1	1
<b><i>P-LOOP</i></b>	L248V	3,54	5,11	2,8
	G250E	6,86	4,45	6,69
	Q252H	1,39	3,05	2,64
	Y253F	3,58	1,58	3,23
	E255K	6,02	5,61	6,69
	E255V	16,99	3,44	10,31
<b><i>C-HELIX</i></b>	D276G	2,18	1,44	2
	E279K	3,55	1,64	2,05
<b><i>ATP BINDING</i></b>	V299L	1,54	8,65	1,34
	T315I	17,5	75,03	39,41
	F317L	2,06	4,46	2,22
<b><i>SH2-CONTACT</i></b>	M351T	1,76	0,88	0,44
<b><i>Substrate binding region</i></b>	F359V	2,86	1,49	5,16
<b><i>A-LOOP</i></b>	L384M	1,28	2,21	2,33
	H396P	2,43	1,07	2,41
	H396R	2,43	1,07	2,41
	G398R	0,35	0,69	0,49
<b><i>C terminal lobe</i></b>	F486S	8,1	3,04	1,85

<b>Sensible</b>	≤ 2
<b>Moderadamente resistente</b>	>2 ≤ 4
<b>Resistente</b>	>4 ≤ 10
<b>Altamente resistente</b>	> 10

**Tabla 4:** Valores de concentración inhibitoria 50 (IC50) para imatinib, dasatinib y nilotinib en 18 mutaciones de *BCRABL1*, expresadas *in vitro* en células murinas Ba/F3. *Wild type*: wt (Redaelli 2009).

El 35% de los pacientes con LMC en fase crónica que desarrollan resistencia al imatinib, presenta una o más mutaciones en el dominio kinasa del *BCR-ABL1*, mientras que la frecuencia de mutación se incrementa en FA o CB (Bengiό 2011).

La importancia del análisis mutacional recae en el hecho que varias mutaciones son resistentes o poco sensibles a imatinib y no todas son igualmente sensibles a otros ITKs.

Además, conocer la mutación involucrada en la resistencia provee una guía racional para la elección del tratamiento de segunda y/o tercera línea.

Como se sabe, la mutación T315I es resistente a todos los ITKs de primera y segunda generación, pero es altamente sensible a ponatinib. Este inhibidor posee 20 veces más actividad sobre BCR-ABL1<sup>T315I</sup> que sobre el BCR-ABL1 no mutado. Las mutaciones Q252H, E255V y F317L son pobremente sensibles a dasatinib, mientras que, Y253H, E255K/V y F359V son poco sensibles a nilotinib y se ha observado que E255V y H396R parecen responder deficientemente al ponatinib. Sin embargo, para algunos ITK y algunas mutaciones la sensibilidad real es incierta, puesto que en muchos casos los datos son escasos e insuficientes. El valor de identificar una mutación no es absoluto, pero sigue siendo importante para evitar continuar con un medicamento equivocado o para cambiar el ITK.

#### 2.1.12.1 Detección de mutaciones

Para la detección de mutaciones existe un abanico de posibilidades metodológicas cada una con diferentes ventajas y desventajas. El método clásico es la secuenciación automática que utiliza el método de Sanger, el cual se basa en el uso de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) como terminadores de la cadena de ADN. Esta reacción necesita una hebra molde de ADN de cadena simple, un *primer*, una ADN polimerasa, nucleótidos marcados con fluorescencia y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de ADN. La secuenciación directa del dominio kinasa del *BCR-ABLI*, es el método más utilizado, es relativamente rápido y detecta mutaciones con una sensibilidad de aproximadamente el 20%. Este método si bien permite la detección de todas las mutaciones presentes en el dominio kinasa del *BCR-ABLI*, no las cuantifica y es poco sensible (Branford 2006).

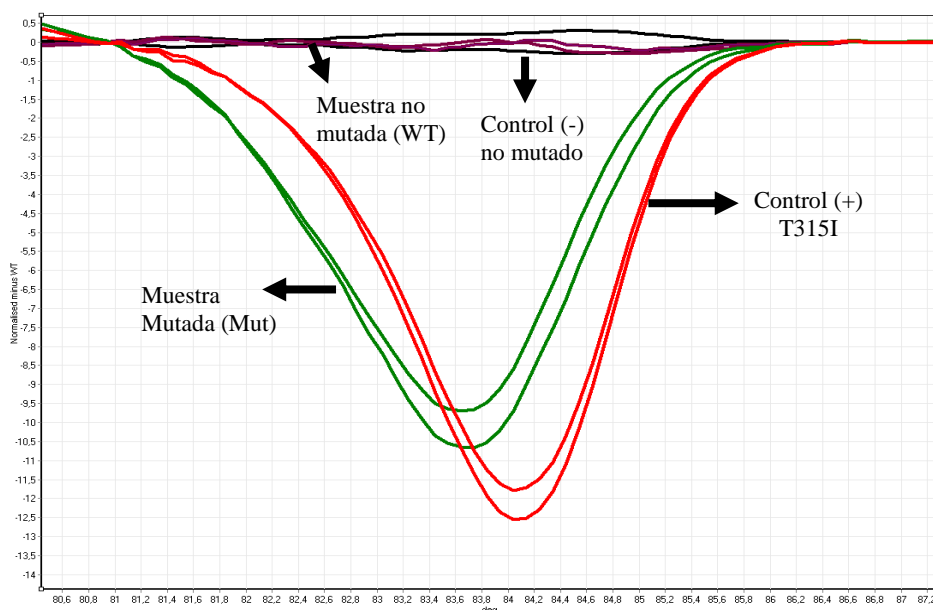
La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación de ADN, desarrollada inicialmente por Mostafa Ronaghi y colaboradores a finales de los años 90 (Ronaghi 1996; Ronaghi 1998; Ronaghi 2000). Está basada en la secuenciación, acoplado a la síntesis de ADN una reacción quimioluminiscente, lo que permite una rápida determinación de secuencias en tiempo real. La técnica utiliza cuatro reacciones enzimáticas que tienen lugar en un único tubo en el que se monitorea la síntesis de la cadena complementaria usando como molde ADN de cadena simple. Los nucleótidos son agregados de forma consecutiva a la reacción y en caso de incorporación, se libera

pirofosfato inorgánico (PPi). El PPi desencadena una serie de reacciones que resultan en la producción de luz, de forma proporcional a la cantidad de ADN y el número de nucleótidos incorporados. La generación de luz se detecta en forma de pico y se graba gracias a un sistema de detección, reflejando la actividad de las enzimas en la reacción. La pirosecuenciación permite cuantificar la abundancia relativa de la mutación con una sensibilidad de hasta un 5%, pero es costoso y requiere de equipamiento específico.

El método D-HPLC (*Denaturing High Performing Liquid Chromatography*) se utiliza como *screening* en la detección de mutaciones. Una vez extraído el ADN, se amplifica el fragmento del gen a estudiar por medio de una PCR convencional; posteriormente, se realiza una desnaturalización seguida de una disminución progresiva de la temperatura, permitiendo así que las hebras renaturalicen lentamente. Con este proceso provocamos que se forme nuevamente la doble hebra de ADN, tanto la *wild type* (wt) como la mutada, a las que llamaremos homodúplex. Además provocamos que se unan combinaciones de las cadenas sentido y antisentido de cada homodúplex (wt y mutado), para formar los llamados heterodúplex. El D-HPLC detecta las mutaciones del gen estudiado, según los diferentes homodúplex y heterodúplex que se forman. Los heterodúplex, que son térmicamente menos estables que su correspondiente homodúplex, se separan por cromatografía líquida de fase reversa. La clave del funcionamiento consiste en una fase estacionaria inerte física y químicamente, compuesta por partículas de poliestireno-divinilbenceno de 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Con el fin de permitir que el ADN se una a la fase estacionaria, se usa una molécula conocida como acetato de trietilamonio. La elución de las moléculas de ADN se consigue haciendo pasar por la columna acetonitrilo (solvente orgánico) que será la fase móvil, lo cual resulta en la desorción del ADN. Dicha elución se revela gracias a un detector de ultravioleta. El tiempo de retención de la doble cadena de ADN cambia con la temperatura de la columna. A temperatura  $< 50^{\circ}\text{C}$  el orden de elución es estrictamente basado en la longitud de la doble cadena de ADN, en cambio a temperatura  $> 50^{\circ}\text{C}$  las moléculas de ADN se desnaturalizan, separándose en dos cadenas simples complementarias. El tiempo y temperatura de desnaturalización en los heterodúplex es menor que el correspondiente a los homodúplex, que tienen las bases perfectamente apareadas, por consiguiente, los heterodúplex se retienen menos, eluyendo delante de los homodúplex como uno o más picos adicionales, dependiendo del número de mutaciones que existan. El límite de detección se encuentra entre 1% y 10%; es un

método de *screening* útil para la investigación en gran escala (Soverini 2004), sin embargo, al no ser específico, al presentar dificultades en la interpretación de los datos y a la gran complejidad del equipamiento requerido, hacen que no sea recomendable en el diagnóstico de rutina.

El *High Resolution Melting* (HRM) es una técnica de análisis post-PCR basado en el análisis de fusión (*melting*) del ADN. A través de la detección de la señal fluorescente proveniente del ADN (debido a la presencia de Eva-Green), durante la fase de transición de ADN doble cadena a simple cadena, obtenida a través del incremento constante de la temperatura, los equipos de HRM permiten detectar cambios de una sola base dentro de una secuencia de 200-300 nucleótidos. La diferencia más relevante con respecto al *Low Resolution Melting* (LRM) es que en el HRM el incremento de temperatura se puede hacer con intervalos mucho más pequeños ( $< 0,1$  °C) aumentando de esta manera la resolución del análisis. De forma similar a lo expuesto anteriormente en la descripción del D-HPLC, la formación de homoduplex y heteroduplex, previamente al análisis por HRM, es fundamental para detectar la presencia de mutaciones. Sin embargo en este caso todo el proceso, desde la PCR hasta el HRM, es llevado a cabo en un solo equipo, haciendo de este un método rápido, sencillo y de bajo costo, tanto en término de equipamiento como de reactivos. Permite además el análisis de muchas muestras a la vez, con una sensibilidad comparable o superior al D-HPLC, pirosecuenciación o la secuenciación directa [Figura 15].



**Figura 15:** Gráfico diferencial del HRM. Control positivo portando la mutación T315I (rojo), perfil compatible con la presencia de una mutación (verde), muestra no mutada (violeta). Control negativo wt (negro).

La PCR alelo específica *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) se basa en la utilización de *primers* específicos para la secuencia wt y mutada. Por lo cual, se realizan dos reacciones de PCR que comparten un mismo *primer Forward* y los *primer reverse* específicos para cada alelo (wt y mutado). La PCR ARMS, es una técnica cualitativa que permite la detección de cualquier mutación puntual, es un método relativamente sencillo, rápido y confiable. Las muestras pueden ser analizadas inmediatamente después de terminada la amplificación mediante un gel de poliacrilamida o de agarosa. Si este sistema de ARMS es abordado en un termociclador en tiempo real, utilizando sondas específicas o fluorocromos y realizando curvas de calibración, además de detectar mutaciones de punto, se adiciona la posibilidad de cuantificar los clones. En este caso hablamos de una PCR ARMS cuantitativa (ARMS-qPCR). En la [Tabla 5] se muestra la sensibilidad reportadas en referencia a los métodos descriptos.

**Tabla 5: Sensibilidad de los métodos más frecuentemente utilizados para el screening y detección de mutaciones.**

<b>Método</b>	<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>Cuantitativo</b>
Secuenciación directa	15 - 25	No
Pirosecuenciación	5	Semicuantitativo
D-HPLC	0,1 - 10	No
HRM	1,5 -5	No
ARMS-qPCR	0,1	Si

### 2.1.13 Amplificación génica de *BCR-ABL1* y sobreexpresión de proteínas

La amplificación de *BCR-ABL1* y la sobreexpresión de la proteína como posibles causas de resistencia a los ITKs, son eventos identificados tanto *in vivo* como *in vitro* (le Coutre 2002) y han sido muy estudiados en LMC bajo tratamiento con imatinib (Mahon 2000; Weisberg 2000; Hochhaus 2003).

La amplificación génica implica múltiples copias del reordenamiento *BCR-ABL1*, lo cual lleva a un desplazamiento de la relación inhibidor/blanco terapéutico; por lo tanto la cantidad de inhibidor disponible dentro de la célula no es suficiente para bloquear a todas las moléculas. La sobreexpresión implica el aumento desregulado de los transcritos *BCR-ABL1* permitiendo que el clon leucémico prolifere aún en presencia de ITKs.

### 2.1.14 Transportadores de drogas

Alteraciones en el transporte de los ITKs a las células así como la disponibilidad, puede resultar en una concentración subóptima de la droga y por consiguiente desencadenar resistencia al tratamiento. La concentración intracelular de imatinib está determinada por bombas activas de ingreso y egreso, así como también por su unión a proteínas plasmáticas. El imatinib se une a proteínas plasmáticas como glicoproteína  $\alpha$ -1 ácida ( $\alpha$ -1 GP) (Capdeville 2002). El incremento en el nivel de esta proteína podría reducir la concentración plasmática del imatinib libre disponible para la inhibición de BCR-ABL1. La correlación entre la carga tumoral y el estadio de la enfermedad en los pacientes con LMC (le Coutre 2002), permitió determinar que un nivel elevado de  $\alpha$ -1 GP antes de la terapia, conduce a una respuesta más lenta a imatinib. Sin embargo el nivel de esta proteína no altera la eficacia del fármaco *in Vitro* (Jørgensen 2002).

La respuesta a imatinib podría ser distinta como resultado de las diferencias intrínsecas en el modo en que las *stem cells* leucémias incorporan la droga. El imatinib es sustrato de un transportador de membrana asociado a resistencia (MDR-1), por lo tanto, puede ser expulsado activamente de la célula (Sparreboom 2003; Fromm 2004). Se ha observado que existe sobreexpresión de *MDR-1* en líneas celulares resistentes a imatinib y que la inhibición de MDR-1, revierte parcialmente la resistencia (Mahon 2000). Además se ha observado un aumento de MDR-1 en células progenitoras de pacientes con CML en CB mieloide respecto de controles sanos (Lange 2003). Otro transportador identificado es el hOCT-1 (*human organic cation transport-1*), el cual estaría involucrado en el transporte activo del imatinib hacia adentro de la célula (Thomas 2004). La internalización variable de imatinib a la célula es un factor clave para determinar respuesta. Se evaluó el nivel de expresión de *hOCT-1* en células de LMC y se encontró que en pacientes con elevada expresión de *hOCT-1* era más probable que alcanzaran buena respuesta citogenética (Crossman 2005). En contraste con lo expuesto, recientemente se reportó que hOCT-1, no participaría en la internalización del imatinib en células, por lo tanto no sería biomarcador válido para resistencia a imatinib en LMC (Nies 2014). En general, los mecanismos de transporte de droga son de importancia potencial para la supervivencia de células leucémicas en presencia de ITKs. Sin embargo la evidencia de que los mecanismos fármaco-cinéticos desempeñan un papel importante en la resistencia a ITKs, todavía no son muy concluyentes ya que no se ha identificado ningún mecanismo crítico.

### 2.1.15 Resistencia relacionada a sobreexpresión y subexpresión de proteínas

La expresión de BCR-ABL1 altera numerosas vías de señalización que aumentan la supervivencia y alteran el ciclo celular, lo cual puede promover la generación de alteraciones cromosómicas adicionales y la aparición de mutaciones (Faderl 1999; Sattler 2001). Numerosas publicaciones han podido demostrar en ensayos *in vitro* empleando líneas celulares desafiadas con concentraciones crecientes de ITKs, que la resistencia puede originarse por otros mecanismos independientes del reordenamiento *BCR-ABL1*, ligados a la sobreexpresión de Src kinasas tales como LYN (*Lck/Yes related novel protein tyrosine kinase*), FYN (*src/yes-related novel gene*) y HCK (*hemopoietic cell kinase*) (Donato 2003; Dai 2004; Grosso 2009). El gen *LYN* se ubica en el cromosoma 8q13 y codifica una tirosina kinasa muy similar a la tirosina kinasa del ratón p56lck, el gen *FYN* se ubica en el cromosoma 6q21 y da origen a una tirosina kinasa asociada a membrana con la subunidad p85 de la fosfatidylinositol 3-kinasa; *HCK* se ubica en el cromosoma 20q11.21 y está expresada predominantemente en células granulocíticas y en monocitos. Las tirosinas kinasas LYN y FYN están vinculadas al control de crecimiento e implicadas en caminos de señalización “aguas abajo” respecto del *BCR-ABL1*. LYN y HCK son src-kinasas que están expresadas en células de LMC y son activadas por BCR-ABL1 (Saglio 2010; Wei 2010). Resultados de estudios con genes *knock out* confirman el rol de LYN en la transformación y leucemogénesis mediada por BCR-ABL1 kinasa (Danhauser-Riedl 1996; Roginskaya 1999). BCR-ABL1 controla la activación de LYN y HCK en células extraídas de pacientes con LMC (Hu 2004), sin embargo, la activación de estas kinasa puede ser controlada por otros mecanismos. Por ejemplo, LYN está sobreexpresada en líneas celulares resistentes a imatinib y su activación es independiente de BCR-ABL1 (Lionberger 2000; Wilson 2002). Fue observado que la inhibición de proteínas de la familia de *src*-kinasas, inducen arresto de crecimiento y apoptosis en células BCR-ABL1 (Meyn 2006). La expresión desregulada de LYN puede interferir en la inhibición de los ITKs en uno o más miembros del complejo camino de señalización de BCR-ABL1, incluyendo CRKL, STAT5 y MAPK (Warmuth 1997; Meyn 2006).

En muchos cánceres humanos, como se mencionó anteriormente, la progresión tumoral está caracterizada por la adquisición de alteraciones genéticas adicionales y por inactivación de genes supresores de tumores. *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)*



está usualmente deletado o inactivado en muchos tipos de tumores (Li 1997; Carpten 2007; Peng 2010). El gen *PTEN*, se localiza en el cromosoma 10q23 y pertenece a la familia de genes PTP (*Protein Tyrosine Phosphatase*) y su función principal es desfosforilar el sustrato PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato). PIP3 activa las kinasas PKB/AKT las cuales regulan proliferación, migración y angiogenesis. Cuando el gen supresor *PTEN* presenta subexpresión o mutaciones en su dominio fosfatasa la desactivación de PIP3 no se produce, por lo tanto la activación de PKB/AKT es constante determinando descontrol del ciclo celular.

## 2.2 LLA *Philadelphia* Positiva. Aspectos generales

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad neoplásica que resulta de una proliferación clonal de precursores linfoides generando un grado variable de pancitopenia. Puede comprometer diferentes órganos y/o sistemas y causar muerte por hemorragia y/o infección. En la Argentina se registra 370 casos/año en menores de 15 años (Guías hematológicas, Sociedad Argentina de Hematología). Se caracteriza por tener una distribución bimodal con un primer pico en pacientes menores de 20 años y el segundo a partir de los 45 años de edad. Representa el 75% - 80% de las leucemias agudas en edad pediátrica con un pico de incidencia entre los 2 a 5 años y el 20% de las de edad adulta.

Con los tratamientos actuales se ha observado un significativo progreso en la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida global (SG) a largo plazo, este beneficio se observa particularmente en el grupo pediátrico (> 70%) siendo inferior en población adulta (30 - 40%).

La LLA se clasifica, en base a las características morfológicas-citoquímicas y se subclasifica según perfil inmunológico, citogenético y molecular. Las características mencionadas sumadas a los parámetros clínico-hematológicos, respuesta inicial al tratamiento y a la evaluación de la enfermedad mínima residual (EMR), conforman diferentes grupos pronósticos.

La edad es un factor determinante del pronóstico en los pacientes con LLA, siendo la sobrevida cercana al 80% en niños menores de 5 años y disminuye hasta un 50% en adolescentes.

El cromosoma Ph se ha encontrado en aproximadamente 20 -30% de las LLA del adulto y entre un 2 - 5% de las LLA pediátricas. Estos pacientes poseen muy mal pronóstico y

alta probabilidad de recaída con el tratamiento convencional. Aunque del 50 - 80% de los casos logran remisión completa la sobrevida libre de leucemia a 5 años es menor al 15%. Es por ello, que se han desarrollado protocolos más agresivos que incluyen ITKs, que han mejorado el pronóstico y sobrevida de los pacientes.

### **2.2.1 Tratamiento de la LLA Ph positiva**

La historia del tratamiento de la LLA pediátrica, dentro del espectro de patologías malignas de la infancia es una historia de éxitos escalonados que llevaron a que en la actualidad aproximadamente el 80% - 85% de los niños tuvieran posibilidades de curación. Los grandes avances constituyeron: la concepción de la poliquimioterapia de inducción, el reconocimiento de grupos pronóstico, la prevención temprana de la enfermedad en sistema nervioso central (SNC), el concepto de re-inducción (protocolo II) y últimamente la adecuación del tratamiento a la respuesta medida con la enfermedad mínima residual (Makiya 2013).

La recaída continúa siendo la causa más común de fracaso del tratamiento, que ocurre aproximadamente en el 15% - 20% de los pacientes. Las recaídas se producen frecuentemente en Médula ósea ya sea en forma aislada o combinada con sistema nervioso central (SNC) o testículos, siendo infrecuentes en otros sitios. El panorama de tratamiento para la LLA Ph<sup>+</sup>, ha mejorado con la incorporación de los ITKs, aunque el tratamiento con un ITK como única droga, es insuficiente, la combinación de poliquimioterapia más ITK induce remisiones completas en un 95% de los pacientes (Lee KH 2005). Los inhibidores de segunda generación (dasatinib, nilotinib) han demostrado resultados prometedores en el tratamiento de la LLA Ph<sup>+</sup> resistente a imatinib (Kantarjian 2006; Ottmann 2007).

La EMR ha resultado ser un factor pronóstico importante para la estratificación de pacientes en tratamiento (Jacquy 1997), tanto en población pediátrica como adulta. Se ha observado que los niveles de EMR en SP son comparables a los de MO para pacientes con LLA a precursores T, no así en pacientes con LLA a precursores B, donde son menores en SP. No obstante, la recaída temprana puede ser evaluada en SP (van Rhee 1995). En el 2002 se realizó el primer estudio clínico en niños tratados con quimioterapia combinada con imatinib (340mg/m<sup>2</sup>/día). El tratamiento fue bien tolerado y no se observaron aumentos en la toxicidad al compararlo con la quimioterapia sola. La

sobrevida fue del 80% a los 3 años de tratamiento mientras que en grupos tratados con terapia convencional era del 35% (Schultz 2009).

### 2.2.2 Factores de riesgo en LLA

La LLA infantil puede ser clasificada en grupos de riesgo estándar, alto o muy alto; dependiendo de ello el tratamiento es más o menos intenso; generalmente los niños de riesgo bajo tienen un mejor pronóstico. La presencia del cromosoma Ph ubica a los pacientes en el grupo de alto riesgo. A continuación se describen los factores de riesgo, siendo la edad al diagnóstico y el recuento de glóbulos blancos los parámetros más importantes.

1. **Edad:** Los mejores resultados corresponden a niños entre 1 a 10 años seguidos de adolescentes y adultos jóvenes, mientras que los lactantes y adultos >30-35 años tienen peor pronóstico.
2. **Recuento de Leucocitos:** El valor pronóstico es claro cuando se comparan recuentos extremos: <10.000 y >100.000/mm<sup>3</sup>.
3. **Fenotipo inmunológico:** Las LLA de precursor B, especialmente “B común”, están asociadas a un mejor pronóstico y las de línea T, a un pronóstico adverso, con excepción de la LLA T cortical no hiperleucocitarias.
4. **Citogenético/molecular:** alteraciones citogenéticas y/o moleculares tienen impacto y definen grupos de riesgo.
5. **Respuesta a la inducción:** Un marcado y rápido descenso de blastos en sangre periférica (SP) (día 8) y/o Médula ósea (MO) (día 15) y respuesta completa al final de inducción definen riesgo.
6. **Enfermedad Mínima Residual:** Es un factor de riesgo relevante. El método habitual es por citometría de flujo y biología molecular (Hematología 2013).

### 2.2.3 Resistencia a los Inhibidores de Tirosina Kinasa en la LLA Ph<sup>+</sup>

Al igual que en LMC, la resistencia los ITK se debe a mecanismos dependientes e independientes de BCR-ABL1, siendo la presencia de mutaciones el mecanismo más frecuente. Las mutaciones encontradas también son las mismas descritas en LMC y la T315I es la que confiere mayor resistencia al tratamiento (Watanabe 2012). Un estudio reciente reporta que el 70% de los pacientes resistentes a imatinib presentan mutaciones,

siendo la T315I, E255K y Y253H las más frecuentes. El 78% de los pacientes resistentes a ITKs de segunda generación que habían fallado previamente a imatinib presentaban mutaciones y el 58% tenían mutaciones múltiples. Los ITKs de segunda generación aseguran una citoreducción más rápida y existen menos mutaciones insensibles, pero el control de la enfermedad a largo plazo sigue siendo un problema y la mutación T315I altamente frecuente (Soverini 2014).

#### **2.2.4 Trasplante de Médula ósea en LLA**

Varios estudios han documentado que el trasplante alogénico de dador relacionado histocompatible ofrece ventajas en recaídas tempranas. Por el contrario el estudio publicado por Schultz en el año 2009, no pudo demostrar una ventaja significativa en recaídas tardías para los pacientes que recibieron trasplante de médula ósea (TMO) sobre los tratados con quimioterapia.

Los pacientes que recaen en forma temprana y con compromiso medular tienen una sobrevida cercana al 0% a 5 años sin TMO. Por lo tanto, la indicación de TMO en recaídas de alto riesgo es mandatoria, sea éste de un dador relacionado o no relacionado. En la actualidad el 70% de los pacientes que carecen de dador relacionado tienen posibilidades de acceder a un TMO con dador no relacionado (Borgmann 2003).

Cualquiera que sea el tipo de trasplante, éste debería realizarse en aquellos que logren la segunda remisión después de 2 o 3 ciclos de quimioterapia de consolidación, dirigidos a obtener baja EMR ya que esto implica un mejor pronóstico (Leung 2012).

### **3. Hipótesis de trabajo y objetivos**

### 3. Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta que la etiopatogenia de las leucemias Ph<sup>+</sup> radica en la presencia del gen quimérico *BCR-ABL1* y sus productos oncogénicos, las estrategias terapéuticas apuntan a inactivar la proteína oncogénica, para ello, se desarrollaron ITKs. En pacientes con LLA Ph<sup>+</sup>, donde la presencia de este reordenamiento molecular le confiere mal pronóstico, el uso de los inhibidores proporcionó un gran avance en el tratamiento. En la LMC el mecanismo de resistencia mejor estudiado es la presencia de mutaciones en el dominio kinasa del gen quimérico, además la resistencia al tratamiento puede deberse a mecanismos independientes de *BCR-ABL1*, como la sobreexpresión de *Src* kinasas o subexpresión de genes oncosupresores. La hipótesis de este trabajo fue investigar si la detección temprana de mutaciones en el dominio tirosina kinasa del *BCR-ABL1* y la expresión de los transcritos de la *scr*-kinasa *LYN* y el gen oncosupresor *PTEN* estarían involucrados en la resistencia al tratamiento, lo cual permitiría estratificar precozmente el riesgo individual y definir el tratamiento más adecuado en cada caso. A fin de demostrar esta hipótesis, el **objetivo general** del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de resistencia dependientes e independientes al reordenamiento *BCR-ABL1*, a fin de esclarecer las posibles causas implicadas en la falta o pérdida de la respuesta al tratamiento en pacientes tratados con ITKs, siendo los **objetivos específicos**:

- Caracterizar el tipo y frecuencia de mutaciones en el dominio kinasa del gen *BCR-ABL1* en leucemias Ph<sup>+</sup> (LMC) resistentes al tratamiento con ITK en población local mediante secuenciación directa.
- Realizar la detección precoz de las mutaciones del dominio kinasa del gen *BCR-ABL1* mediante *screening* por HRM y posterior confirmación y cuantificación por ARMS-qPCR.
- Evaluar la dinámica de los clones mutados teniendo en cuenta las diferentes intervenciones terapéuticas y evolución de la enfermedad.
- Determinar el rol de *LYN* y *PTEN* en los mecanismos de resistencia independiente de *BCR-ABL1*.
- Determinar las implicancias clínicas del monitoreo molecular en pacientes con LMC resistente y LLA Ph<sup>+</sup>.

## **4. Materiales y Métodos**

## **4.1 Técnicas experimentales con material celular obtenido de pacientes y líneas celulares**

### **4.1.1 Línea K562**

La línea K562 obtenida en ATCC (cat. N° CCL-243) fue establecido en 1975 de una efusión pleural de un paciente femenino de 53 años con diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica en estadio terminal de una crisis blástica (Lozzio 1975). La población celular se caracteriza por ser altamente indiferenciada y poliploide. A nivel citogenético se observa la presencia del cromosoma *Philadelphia* (Ph), siendo la primera línea celular establecida con persistencia del cromosoma Ph a lo largo de sucesivos pasajes *in vitro*. A nivel molecular la línea presenta amplificación del reordenamiento *BCR-ABL1* correspondiente al rearrreglo b3a2. Las células fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB al 20% a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.1.2 Línea HL-60**

La HL-60 es una línea celular provista por ATCC (cat. N° CCL-240), establecida a partir de leucocitos de sangre periférica, obtenida por leucoféresis de una mujer de 36 años con diagnóstico de Leucemia Promielocítica Aguda (Collins 1979). El número de cromosomas es pseudodiploide, presentando 5 marcadores comunes en la mayoría de las metafases (M2 a M6). Esta línea celular no presenta el rearrreglo molecular *BCR-ABL1*. Las células fueron mantenidas en RPMI 1640 suplementado con SFB 10% a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.1.3 Tipos de muestra**

El material de partida fue sangre periférica (5-8 ml) y/o médula ósea extraídos con el anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Los estudios moleculares se realizaron a partir de leucocitos totales obtenidos de las muestras antes mencionadas. El diagnóstico de los pacientes fue LMC o LLA Ph positivo (Ph<sup>+</sup>) en tratamiento con inhibidores de tirosina kinasa.

#### **4.1.3.1 Leucocitos totales de pacientes**

Las muestras de sangre entera o médula ósea fueron sometidas a varios lavados con solución tampón de lisis de glóbulos rojos (NH<sub>4</sub>Cl 0,014M /NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,001M). La lisis



se realizó durante 10 min a temperatura ambiente en un homogeneizador circular para 20 tubos (Bioelec®), luego se efectuó una centrifugación a 3500 RPM durante 15 min. Este procedimiento es repetido dos o tres veces dependiendo del volumen inicial de la muestra. El *pellet* de leucocitos se resuspendió en 1 ml de TRIZOL (*Life Technologies*).

#### 4.1.4 Técnicas experimentales con ARN

##### 4.1.4.1 Extracción de ARN celular total

Aproximadamente  $10^6$  células se lisaron en 1 ml de TRIZOL durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 200  $\mu$ l de cloroformo; luego de una agitación vigorosa se dejó reposar la muestra 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 RPM por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase superior y el ARN fue precipitado en 500  $\mu$ l de Isopropanol frío por centrifugación a 4°C. El *pellet* de ARN se resuspendió en 60  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, previo lavado en Etanol al 75%. Una vez finalizado este procedimiento se evaluó la concentración y calidad del material.

##### 4.1.4.2 Cuantificación espectrofotométrica del ARN

Una vez aislado el ARN se cuantificó con el espectrofotómetro (GeneQuant pro). Es necesario valorar la pureza de la muestra, mediante la absorbancia a las longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm:

- Si la relación  $DO_{260} / DO_{230} < 1$ ; indica que la muestra está contaminada con fenol, por lo cual la cuantificación no será exacta.
- Si la relación  $DO_{260} / DO_{280} < 1,9$ ; indica que la muestra está contaminada con proteínas, por lo cual la cuantificación no será exacta.
- Si la relación  $DO_{260} / DO_{280} \geq 1,9$ ; la muestra es pura y puede calcularse la concentración de ARN teniendo en cuenta que:

$$1 \text{ unidad de } DO_{260} = 40 \mu\text{g ARN/ml}$$

La masa de ARN final a utilizar de cada muestra es de 1  $\mu$ g total.

##### 4.1.4.3 Reacción de retrotranscripción inversa (RT-PCR)

La obtención del ADNc, se realizó a partir de 1  $\mu$ g de ARN en un volumen final de 20  $\mu$ l. El protocolo utilizado en la reacción se describe en la [Tabla 6]:

**[Tabla 6]: Reactivos y amplificación de RT-PCR**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen <math>\mu</math>l</b>
<i>Random primers</i> ( 0,4 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1
dNTPs (10 mM)	1,5
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	5
ARN (0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5
<b>Desnaturalización inicial 5 min a 65°C</b>	
<i>5x First Strand Buffer</i>	4
<i>Rnase-out</i> (40 U/ $\mu$ l)	0,25
M-MLV RT (200U/ $\mu$ l)	1
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	2,25
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>
<b>Retrotranscripción 37°C 1 h</b>	
<b>Inactivación de la Transcriptasa inversa 70°C 15 min</b>	

Enzima transcriptasa reversa (M-MLV, *Promega*®)

RNasa out, dNTP (*Promega*®)

*Random primers* (*Invitrogen*®)

Ciclador *Biometra*®

#### **4.1.5 Amplificación de ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Cuantificación en tiempo real (qRT-PCR)**

##### **4.1.5.1 Análisis cuantitativo qRT-PCR de *BCR-ABLI*<sup>P210</sup>**

La cuantificación relativa de los transcritos *BCR-ABLI*<sup>P210</sup> respecto del gen control *ABLI* se realizó utilizando el kit Molecular MD (*MolecularMD*® *One-Step* qRT-PCR *BCR-ABL Kit*). Al utilizar este kit el material de partida es ARN y la retrotranscripción se realiza en el mismo tubo en la fase inicial del ciclado; se basa en la técnica de detección *taqman* y proporciona todos los componentes necesarios para la reacción (incluyendo dNTPs, *primers* y sondas para amplificar el reordenamiento *BCR-ABLI* y el gen control *ABLI*), cuenta con plásmidos en diluciones seriadas que permiten realizar curvas de calibración para cada gen. Además, posee controles equivalentes a respuesta molecular nula, mayor y completa, siendo el límite de detección de la técnica de 3 copias de *BCR-ABLI*. Los valores obtenidos se expresan en escala internacional (IS) aplicando un factor de conversión. El mismo fue determinado por el *Institute of Medical and Veterinary Science*, Adelaida, Australia (Hughes 2003). El producto obtenido tanto

para *ABL1* como para *BCR-ABL1* es de aproximadamente 95 pb. Las condiciones de reacción y el programa básico de ciclado se detallan a continuación [Tablas 7 y 8].

[Tabla 7]: qRT-PCR del *BCR-ABL1*<sup>P210</sup>

Reactivos	Volumen $\mu$ l
2X Reaction Mix Buffer ( 0,4 mM c/dNTPs)	10
P/P Set Molecular MD ( <i>Primers</i> , , sonda <i>Taqman</i> )	0,8
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	3,3
ROX (25 $\mu$ M)	0,1
<i>RNAse out</i> (40U/ $\mu$ l)	0,4
SuperScript® III RT/ <i>Platinum</i> ® <i>Taq Mix</i>	0,4
ARN (0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5
<b>Volumen Final</b>	<b>20</b>

[Tabla 8]: Ciclado qRT-PCR <sup>P210</sup>

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	3 min
Ciclo 1 (Generación del ADNc)	50° C	15 min
	95° C	2 min
Ciclos 2-45	95° C	15 seg
	60° C	60 seg

#### 4.1.5.2 Validación y estandarización del análisis de qRT-PCR a la escala internacional (IS); obtención del factor de conversión

Un total de 60 ARNs obtenidos de muestras de pacientes fueron enviadas en tandas separadas al laboratorio de referencia en Adelaida (Australia). Las primeras 30 muestras fueron utilizadas para determinar el factor de conversión y las 30 restantes para la validación del factor obtenido. Las muestras correspondían a pacientes con *BCR-ABL1*<sup>P210</sup> [b2a2 (e13a2), b3a2 (e14a2) o b2a2 y b3a2] y como condición los transcritos debían encontrarse entre respuesta molecular mayor y menor, siendo excluidos aquellos con valores superiores. La concentración de ARN requerida correspondió a una masa total de 6  $\mu$ g como mínimo.

El factor de conversión a IS para el laboratorio de Genética de la Academia Nacional de Medicina fue de 0,45.

#### 4.1.5.3 Análisis cuantitativo qRT-PCR de *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>

La cuantificación relativa de los transcritos *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> fue realizada mediante PCR en tiempo real, utilizando el equipo Rotor Gene 6000 de QIAGEN. Para obtener la curva de calibración se utilizaron plásmidos conteniendo el rearrreglo molecular (e1a2), para lo cual se realizó el clonado a partir del ARN de un paciente diagnosticado con LLA Ph positivo [ver sección 3.1.8]. La metodología empleada fue qPCR *taqman One-Step*; los *primers* utilizados y las condiciones de reacción se muestran en la [Tablas 9] (Gabert 2003). Las condiciones de amplificación se describen en [Tablas 10 y 11]:

[Tablas 9]: *Primers* y productos de amplificación

Nombre del <i>Primer</i>	Secuencia 5'-----3'	Tamaño de amplión (pb)	Sitio blanco
ENF402	ctggcccaacgatggcga		<i>BCR</i> Exón 1
ENR561	cactcagaccctgaggctcaa		<i>ABL1</i> Exón 2
ENP541	[6FAM]ccttcagcgccagtagcatctga[TAM]	92	<i>ABL1</i> Exón 2
ABL-Fw	tggagataaactctaagcataactaaaggt		<i>ABL1</i> Exón 3
ABL-Rv	gatgtagttgcttgggacca		<i>ABL1</i> Exón 3
Control ABL	[6FAM]cccttcagcgccagtagcatctga[TAM]	124	<i>ABL1</i> Exón 3

[Tablas 10]: Reactivos de amplificación de qRT-PCR *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>

Reactivos	Volumen $\mu$ l
2X <i>Reaction Mix Buffer</i> ( 0,4 mM c/dNTPs)	10
<i>Primer Fw</i> (10 $\mu$ M)	0,5
<i>Primer Rw</i> (10 $\mu$ M)	0,5
Sonda <i>Taqman</i> (10 $\mu$ M)	0,3
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	2,8
ROX (25 $\mu$ M)	0,1
<i>RNasa out</i> (40 U/ $\mu$ l)	0,4
SuperScript® III RT/ <i>Platinum</i> ® <i>Taq Mix</i>	0,4
ARN (0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

**[Tablas 11]:Ciclado qRT-PCR *BCR-ABL*<sup>P190</sup>**

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94° C	3 min
Ciclo 1 (Generación del ADNc)	50° C	15 min
	95° C	2 min
Ciclos 2-45	95° C	15 seg
	60° C	60 seg

#### 4.1.5.4 Análisis cuantitativo qRT-PCR de *BCR-ABL*<sup>P230</sup>

La cuantificación relativa de los transcritos *BCR-ABL*<sup>P230</sup>, al igual que para *BCR-ABL*<sup>P190</sup>, fue realizada utilizando PCR en tiempo real, en el equipo Rotor Gene 6000 de QIAGEN. A partir del ARN de un paciente diagnosticado con LMC portador del rearrreglo molecular e19a2, se obtuvo un fragmento de 1.263 pb. Este reordenamiento fue clonado en *Escherichia coli* mediante un constructo plasmídico, con el objeto de generar el control positivo para la curva estándar [ver sección 3.1.8]. La metodología empleada fue qPCR *taqman One-Step*; el *primer* Fw fue e19 (BCR) publicado por (Chasseriau 2004) y el *primer* Rv por (Gabert 2003) [Tablas 12]. Las condiciones de amplificación se describen a continuación [Tablas 13 y 14].

**[Tablas 12]: Primers y productos de amplificación (qRT-PCR *BCR-ABL*<sup>P230</sup>)**

Nombre del <i>Primer</i>	Secuencia 5'-----3'	Tamaño de amplificación (pb)	Sitio blanco
**E19 (BCR)	tggaggaggtgggcatctac		BCR Exón 19
*ENR561	cactcagaccctgaggctcaa	105	<i>ABL</i> Exón 2
*ENP541	[6FAM]ccttcagcgccagtagc atctga[TAM]		<i>ABL</i> Exón 2
*ABL-Fw	tggagataaacacttaagcataacta aaggt		<i>ABL</i> Exón 3
*ABL-Rv	gatgtagttgcttgggacca	124	<i>ABL</i> Exón 3
*Control ABL	[6FAM]cccttcagcgccagtag catctga[TAM]		<i>ABL</i> Exón 3

\*\* (Chasseriau 2004) \*(Gabert 2003)

**[Tablas 13]: Reactivos de amplificación de qRT-PCR *BCR-ABL1*<sup>P230</sup>**

Reactivos	Volumen $\mu$ l
<i>2X Reaction Mix Buffer</i> ( 0,4 mM c/dNTPs)	10
<i>Primer Fw</i> (10 $\mu$ M)	0,5
<i>Primer Rw</i> (10 $\mu$ M)	0,5
Sonda <i>Taqman</i> (10 $\mu$ M)	0,3
<i>H<sub>2</sub>O Rnase-Free</i>	2,8
ROX (25 $\mu$ M)	0,1
<i>RNAsa out</i> (40U/ $\mu$ l)	0,4
SuperScript® III RT/ <i>Platinum</i> ® <i>Taq Mix</i>	0,4
ARN (0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	5
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

**[Tablas 14] Ciclado qRT-PCR *BCR-ABL1*<sup>P230</sup>**

Ciclado	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94° C	3 min
Ciclo 1 (Generación del ADNc)	50° C	15 min
	95° C	2 min
Ciclos 2-45	95° C	15 seg
	60° C	60 seg

#### 4.1.6 Curvas de calibración de los *primers* y estimación de cuantificación absoluta

Al trabajar con PCR cuantitativa en tiempo real es necesario realizar una curva estándar, durante o previamente a la corrida de las muestras incógnitas, con diferentes concentraciones de los genes de interés. La curva estándar tiene importantes funciones a los fines de una correcta interpretación del resultado final:

- Permite la estimación del valor absoluto (cuantificación absoluta) del número de copias de un determinado transcripto.
- Permite calcular la eficiencia de amplificación de los *primers* y por consiguiente la eficiencia de la reacción.
- Permite calcular la variabilidad y normalizar los datos de diferentes experimentos (controles intra-experimentos).
- Permite determinar el rango dinámico de sensibilidad de la reacción.

#### 4.1.6.1 Determinación de las curvas de calibración de *BCR-ABL1*<sup>P210</sup>

La determinación de las curvas de calibración de transcritos de p210<sup>BCR-ABL1</sup> y los controles internos (Alto, medio y bajo) se realizó siguiendo el procedimiento según especificaciones del kit Molecular MD.

Para la determinación de los niveles de ARNm de *BCR-ABL1* y *ABL1* se utilizan los estándares correspondientes. Se disponen de 5 estándares con número de copias conocido ( $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^1$ ) mientras que para el *ABL1* se utilizan 4 estándares ( $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ). Para estimar el error estándar de la reacción se determina cada punto por duplicado.

#### 4.1.6.2 Determinación de las curvas de calibración de *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> y *BCR-ABL1*<sup>P230</sup>

En la determinación de los niveles de *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> y *BCR-ABL1*<sup>P230</sup> se utilizaron curvas de calibración realizadas con plásmidos específicos para cada reordenamiento molecular, clonados en nuestro laboratorio y con número de copias conocido ( $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^1$ ), las mismas diluciones plasmídicas fueron utilizadas para la cuantificación del gen control (*ABL1*). Para estimar el error estándar de la reacción cada punto fue amplificado por duplicado.

### 4.1.7 Detección de mutaciones en gen *BCR-ABL1*

#### 4.1.7.1 Amplificación del reordenamiento molecular *BCR-ABL1* para la búsqueda de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* en *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>, *BCR-ABL1*<sup>P210</sup> y *BCR-ABL1*<sup>P230</sup>

La búsqueda de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* se realizó mediante una PCR *heminested*, este procedimiento aumenta la sensibilidad de la detección de mutaciones dado que se estudia exclusivamente el alelo con el reordenamiento *BCR-ABL1*; el material de partida fue ADNc.

Para la detección de mutaciones correspondiente a p210<sup>BCR-ABL1</sup> se realizó una primera amplificación obteniendo una secuencia de 1.313 pb o 1.238 pb correspondiente a los reordenamientos b3a2 o b2a2, respectivamente. Para la detección del reordenamiento que codifica la oncoproteína p190<sup>BCR/ABL1</sup> (e1a2), utilizando un *primer forward* diferente se amplificó un fragmento de 1.473 pb [Tabla 15]. El producto de PCR correspondiente

a la oncoproteína p230<sup>BCR/ABL1</sup> (1.263 pb) fue amplificado al igual que los casos anteriores con un *primer reverse* común y un *primer forward* específico para este rearreglo [Tabla 15].

Los reactivos y las condiciones de reacción de PCR se describen a continuación [Tabla 16, 17 y 18].

[Tabla 15]: *Primers* y productos de amplificación de PCR *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>, *BCR-ABL1*<sup>P210</sup>

Nombre del <i>Primer</i>	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)	Sitio blanco
<b>Primer Round de PCR <i>BCR-ABL1</i><sup>P190</sup></b>			
ABL7-Rw	agacgtcggacttgatggagaact	1.473	<i>BCR(exón 1)-ABL(exón 7)</i>
BCR-190-Fw	gcagctccaatgagaacctc		
<b>Primer Round de PCR <i>BCR-ABL1</i><sup>P210</sup></b>			
BCR 13-Fw	tgtggacagtctggagttcaca	1.313	<i>BCR(exón 13)-ABL(exón 7)</i>
ABL7-Rw	agacgtcggacttgatggagaact		
<b>Primer Round de PCR <i>BCR-ABL1</i><sup>P230</sup></b>			
e-19-Fw	tggaggaggtggcactctac	1.263	<i>BCR(exón 19)-ABL(exón 7)</i>
ABL7-Rw	agacgtcggacttgatggagaact		
<b>Segundo round. Secuenciación directa</b>			
P-loop-Fw	gtgtccccaactacgacaa	586	<i>ABL(exón 4-7)</i>
ABL7-Rw	agacgtcggacttgatggagaact		

[Tabla 16]: Reactivos para la amplificación del primero y segundo round de PCR

Reactivos	Volumen $\mu$ l
5X Green GoTaq® Reaction Buffer	5
dNTPs (10 mM)	0,5
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	11,75
<i>Primer Fw</i> (10 $\mu$ m)	1,25
<i>Primer Rw</i> (10 $\mu$ m)	1,25
Go Taq® DNA polimerasa 5U/ $\mu$ l	0,25
ADNc	5
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>



[Tabla 17] Ciclado primer *round*

Ciclado	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95° C	3 min
<b>Ciclos 1- 5</b>	95° C	1 min
	65° C	30 seg
	72° C	1:30 min
<b>Ciclos 6-10</b>	95° C	1 min
	65° C (-1°C /Ciclo)	30 seg
	72°C	1:30 min
<b>Ciclos 11-40</b>	95° C	45 seg
	65° C	30seg
	72°C	45 seg
<b>Extensión final</b>	72°C	5 min

En una segunda PCR fue amplificando específicamente el dominio kinasa del gen *ABL1* de (586 pb) correspondiente a los exones 4 al 7. Todas las reacciones de PCR son realizadas en un ciclador Biometra®.

[Tabla 18] Ciclado segundo *round*

Ciclado	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95° C	3 min
<b>Ciclos 1-8</b>	95° C	1 min
	65° C	30 seg
	72° C	45 seg
<b>Ciclos 9-30</b>	95° C	30 seg.
	59° C	30 seg
	72°C	45 seg
<b>Extensión final</b>	72°C	5 min

#### 4.1.7.2 Detección de mutaciones en el dominio kinasa del gen *ABL1* en *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>, *BCR-ABL1*<sup>P210</sup> y *BCR-ABL1*<sup>P230</sup> utilizando el método de secuenciación directa

El producto de PCR se recupera a través de las columnas de purificación (GE *Healthcare*) y luego se determina la concentración en gel de agarosa. Los *primers* utilizados para la secuenciación son P-loop Fw y ABL7 Rv para todos los rearrreglos moleculares. Los electroferogramas se comparan con las secuencias wt del mensajero *BCR-ABL1* usando los programas *Mutation Surveyor* (*SoftGenetics*, de *State College*,

PA, USA) y *Chromas Lite* versión 2.01 y las posiciones de los nucleótidos están dadas respecto a la región codificante del ADNc, *GenBank* NM\_005157.4).

#### 4.1.7.3 Control de polimorfismos

En el caso de obtención de mutaciones no reportadas en la literatura, es necesario verificar si tal variación nucleotídica no corresponde a un polimorfismo. A tal fin se diseñaron *primers* específicos para amplificar el gen *ABL1* no rearrreglado. El ciclado y las condiciones utilizadas son los mismos que en la amplificación del *BCR-ABL1*, solamente varían los *primers* Fw y Rv utilizados en el primer round. La numeración correspondiente al archivo del GenBank *ABL1* ARNm para las variantes *ABL1a* y *ABL1b* es #NM\_005157.4 y NM\_007313.2 respectivamente [Tabla 19].

[Tabla 19]: *Primers* y productos de amplificación del gen *ABL1<sub>a</sub>* y *ABL1<sub>b</sub>*

Nombre del <i>Primer</i>	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)	Sitio blanco
<b>Primer Round de PCR</b>			
ABL1a Fw	ggggctgtcctcgtcctc	1334 bp	<i>ABL1a</i> (exón 1)
ABL8 Rv	gctccatgcggtagtcctt		<i>ABL1</i> (exón 8)
ABL1b Fw	ttgataaccgcaataat	1659 pb	<i>ABL1b</i> (exón 1)
ABL8 Rv	gctccatgcggtagtcctt		<i>ABL1</i> (exón 8)

La detección de mutaciones en el dominio kinasa del gen *ABL1* variantes *ABL1a* y *ABL1b* utilizando el método de secuenciación directa, se realiza del mismo modo que la búsqueda de mutaciones en el gen *BCR-ABL1* [Ver sección 3.1.7].

#### 4.1.7.4 *Screening* de Mutaciones en el dominio kinasa del gen *ABL1* en *BCR-ABL1<sup>P210</sup>* y *BCR-ABL1<sup>P190</sup>* mediante el método de *High Resolution Melting (HRM)*

Un volumen correspondiente a 5 µl de los productos de PCR del primer *round* [1.313pb (b3a2), 1.238pb (b2a2), 1.473pb (e1a2) ó 1.263pb (e19a2)] fue corrido en un gel de agarosa al 1%. Utilizando un sacabocado se recuperó la zona central de las bandas de interés, se las dejó hidratar en 1 ml de H<sub>2</sub>O durante 10 minutos, luego fueron mezcladas por 30 segundos en un vórtex y tras una nueva dilución (1/200) fueron utilizadas como templado para la reacción de HRM. Se realizaron tres PCRs que permiten amplificar el

dominio tirosina kinasa del *ABL1*: *P-loop* (170 pb), *ATP-Binding* (131 pb) y *Dominio Catalítico* (100 pb).

El primer paso del HRM corresponde a la amplificación de la región de interés, usando la técnica estándar de PCR en presencia de un colorante intercalante de ADN bicatenario (Eva-Green). La reacción de HRM se realiza en una rampa de temperatura que abarca desde 75°C a 95°C, con una incubación inicial (*pre-melt*) de 90 segundos, el incremento de temperatura es de 0,1°C cada 2 segundos. Luego se analizan las curvas del HRM y aquellas que difieran de las curvas control son consideradas como probables mutaciones. El equipo utilizado es *Rotor Gene* de *Qiagen*® serie 1.7. Los controles plasmídicos negativos y positivos fueron clonados a partir de muestras de ARN con mutaciones conocidas. Los *primers* utilizados se describen en la [Tabla 20]. Las condiciones de reacción de PCR se describen en las [Tablas 21, 22 y 23].

[Tabla 20]: *Primers* y productos de amplificación para el análisis de HRM

Nombre del <i>Primer</i>	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)	Segmento aminoacídico*	Sitio blanco
HRM-P Fw	caagcccactgtctatggtg			
HRM-P Rw	tggtgtcctccttcaaggtc	170	221-278	<i>P-loop</i>
HRM-A Fw	gaagctgcagtcataaaagaga			
HRM-A Rw	tcctcaggtagtcaggag	131	286-329	<i>ATP- Binding</i>
HRM-C Fw	ggccactcagatctcgtcag			
HRM-C Rw	caagtgggtctcccctacca	100	343-376	Dominio Catalítico

\*GenBank NM\_005157.4

[Tabla 21]: Reactivos de amplificación del dominio *P-loop*

Reactivos	Volumen µl
2 x Mezcla Real®	10
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	4
<i>Primer Fw</i> (10 µm)	1
<i>Primer Rw</i> (10 µm)	1
Templado (Producto de PCR 1.313 pb)	4
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

**[Tabla 22]: Reactivos de amplificación de los dominios *ATP-Binding* y Catalítico**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen <math>\mu</math>l</b>
2 x Mezcla Real®	10
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	7
<i>Primer Fw</i> (10 $\mu$ m)	0,5
<i>Primer Rw</i> (10 $\mu$ m)	0,5
Templado (Producto de PCR 1.313 pb)	2
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

**[Tabla 23] Ciclado de HRM**

<b>Ciclado</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95° C	5 min
<b>Ciclos 1-40</b>	95° C	10 seg
	60° C	20 seg

#### 4.1.7.5 Polimorfismos de conformación de cadena simple o SSCP (del inglés *Single-strand conformation polymorphisms*)

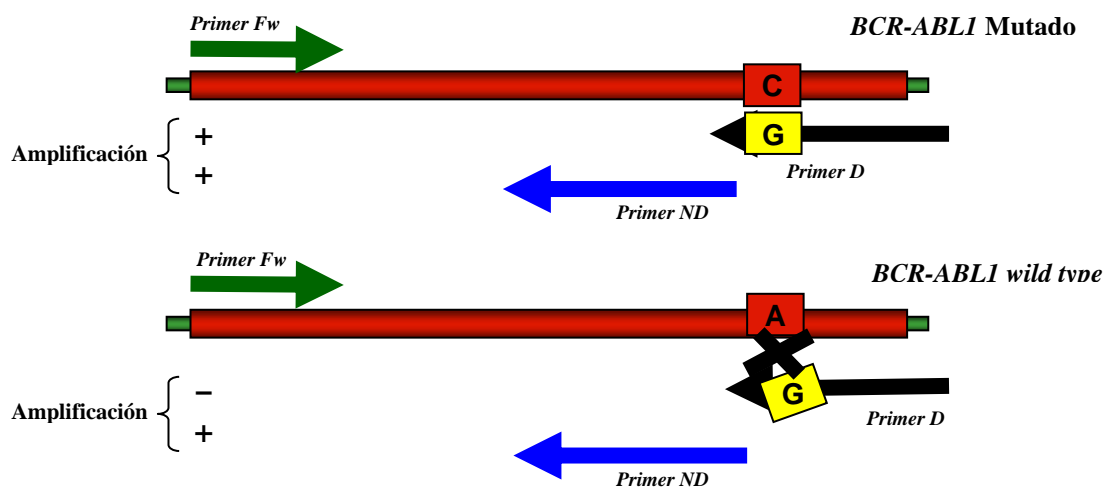
El SSCP es una técnica de *screening* de mutaciones utilizada en el diagnóstico molecular basada en la migración electroforética del ADN en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Es útil para detectar mutaciones constitucionales; sin embargo, es menos efectivo en enfermedades somáticas como el cáncer. Esta técnica posee una sensibilidad del 5% al 10% en la identificación de clones mutantes. El mismo producto de amplificación obtenido con HRM-PCR (HRM-P, HRM-A y HRM-C) fue analizado usando la técnica SSCP. Las condiciones del gel de poliacrilamida y las condiciones de corrida fueron optimizadas para poder discriminar los productos mutados de los no mutados. El análisis de SSCP se llevó a cabo de la siguiente manera: 3  $\mu$ l de producto de PCR se añadió a 2  $\mu$ l de solución desnaturalizante (0,05% de xileno-cianol, 0,05% de colorante azul de bromofenol y 20 mM de EDTA en formamida al 95%). Después de una desnaturalización del producto por calor (95°C durante 5 min), las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo y luego son corridas (3 horas y 30 minutos a 200 V, 4°C) en un gel al 17,5% de acrilamida: bisacrilamida (37:1) en una solución tampón al 1X de Tris-borato-EDTA. La corrida se realizó en el sistema Mini-Protean III (7,3 x

10,2 x 0,1 cm) (BioRad, California, EE.UU.). El cambio nucleotídico fue confirmado por secuenciación directa del producto de PCR.

#### 4.1.7.6 Detección de mutaciones en el dominio kinasa del gen *BCR-ABL1*<sup>P210</sup> *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> y *BCR-ABL1*<sup>P230</sup> utilizando el método ARMS-qPCR

Se utilizó la química de detección *Taqman* y/o Sybr Green combinada con *primers* específicos (ARMS) que permiten reconocer el alelo mutado y salvaje. Este abordaje nos permitió monitorear la presencia de las mutaciones más relevantes en los pacientes con Leucemias Ph<sup>+</sup> y al mismo tiempo cuantificar rápidamente la abundancia del clon *BCR-ABL1* mutado.

El sistema de ARMS-qPCR, posibilita la detección de polimorfismos constitucionales y mutaciones somáticas puntuales. El método ARMS es una modificación de la PCR que permite la amplificación de alelos específicos usando *primers* especiales que hibridan completamente con el alelo deseado y no lo hacen con el otro alelo debido a un cambio de base en su nucleótido 3' terminal [Figura 16].



**Figura 16: Representación esquemática del método ARMS-qPCR.** El *primer Fw* (*Forward*) es común para todos los ensayos. Los *primers* discriminantes (D) poseen en su extremo 3' una base complementaria a la mutación buscada, por lo tanto solo hay amplificación específica cuando los templados analizados presentan la mutación correspondiente. Con los *primers* no discriminantes (ND) siempre hay amplificación ya que están diseñados para hibridar en una región no involucrada en ningún cambio nucleotídico.

El abordaje de ARMS-qPCR nos permite detectar la presencia de mutaciones y al mismo tiempo cuantificar la abundancia del clon *BCR-ABL1* mutado. Este ensayo utiliza un fluorocromo cuya emisión de fluorescencia es proporcional a la acumulación

del producto PCR; luego de algunos ciclos, la fluorescencia producida por la reacción supera un determinado Ct que correlaciona con la cantidad inicial del *target* específico presente en la muestra. Cuanto más abundante es el *target* de interés menor será el número de ciclos necesarios para superar el umbral.

En un primer abordaje el ensayo se diseñó utilizando la química de detección *Taqman*, que requiere del diseño de sondas de oligonucleótidos específicos marcados con moléculas fluorescentes; posteriormente, probamos la detección basada en el uso de un intercalante fluorescente del DNA doble cadena (Sybr-Green). Dado que los resultados obtenidos con este segundo abordaje fueron comparables a los obtenidos con *Taqman*, decidimos adoptar la estrategia SYBR-Green. Esta elección presenta la ventaja de reducir costos y evitar el diseño de nuevas sondas en caso de agregar el estudio de mutaciones diferentes a las ya seleccionadas.

Para realizar esta PCR es necesario un *primer forward* para cada región, un *primer reverse* discriminante y no discriminante para cada mutación. Con la tecnología *Taqman* se diseñaron sondas específicas para cada región (*P-loop* 5' – 3' [6~FAM] AAG TGG GAG ATG GAA CGC ACG GAC [TAMRA ~6~FAM]; *ATP-Binding* 5' – 3' [6~FAM] ACC CTA ACC TGG TGC AGC TCC TT [TAMRA ~6~FAM]; *Catalitic Domain* 5' – 3' [6~FAM] TAC ATG GCC ACT CAG ATC TCG TCA [TAMRA ~6~FAM]). Como se mencionó anteriormente la metodología adoptada para realizar esta PCR fue Sybr Green (*LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green Roche S.A.*). Las condiciones de reacción de PCR se detallan a continuación [Tabla 24 y 25]. Los *primers* utilizados se muestran en la [Tabla 26]. El equipo utilizado es *Rotor Gene* de *Qiagen®* serie 1.7.

[Tabla 24] Reactivos de amplificación de ARMS-qPCR

Reactivos	Volumen µl
10 x SYBR-Green Universal PCR Master Mix 2x Syber Green I (Roche®)	2
Primer Fw ND	1
Primer Rv D	1
MgCL <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	12,4
Templado (Producto de PCR 1.313 pb)	2
<b>Volumen Final</b>	<b>20</b>

[Tabla 25] Ciclado de ARMS-qRT-PCR

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95° C	5 min
Ciclos 1-45	95° C	10 seg
	60° C	15 seg
	72° C	10 seg

[Tabla 26]: *Primers* utilizados para ARMS q-PCR.

Nombre del Primer	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)	Segmento aminoacídico	Sitio blanco
<b>ARMS-qPCR</b>				
ATP-Fw	tgca <sup>g</sup> tcata <sup>g</sup> aaagagatcaaa			
ND-Rw	gaactcagtgatgatataga	91	287-317	ATP-binding
D <sup>V299La</sup> -Rw	cagacccaaggagctacag		287-305	ATP-binding
D <sup>V299Lb</sup> -Rw	*agacccaaggagctaca		287-305	ATP-binding
ATP-Fw	tgca <sup>g</sup> tcata <sup>g</sup> aaagagatcaaa			
ND-Rw	ttgatctttcatgactgc	90	288-317	ATP-binding
D <sup>F311I</sup> -Rw	*gaactcagtgatgatggat		288-317	ATP-binding
D <sup>T315I</sup> -Rv	tcccgtaggtcatgaattca		287-322	ATP-binding
D <sup>F317La</sup> -Rw	*aggaggtcccgtaggtatc		287-324	ATP-binding
D <sup>F317Lb</sup> -Rw	*aggaggtcccgtaggtatt		287-324	ATP-binding
D <sup>F317Lc</sup> -Rw	*gtcccgtaggtcgtgag		287-322	ATP-binding
P-Fw	ggtgtgtccccaactacga			
ND P-Rw	cacagccctcgtacacc	104	227-261	P-loop
D <sup>M244V</sup> -Rw	cgcccagcttgctacac		227-244	P-loop
D <sup>L248M</sup> -Rw	gtactggccccggccac		227-253	P-loop
D <sup>G250E</sup> -Rw	acctccccgtactagccct		227-256	P-loop
D <sup>Q252H</sup> -Rw	tcgtacacctccctgtag		227-252	P-loop
D <sup>Y253H</sup> -Rw	ctcgtacacctcctgtg		227-253	P-loop
D <sup>Y253F</sup> -Rw	cctcgtacacctcctcga		227-253	P-loop
D <sup>E255K</sup> -Rw	acagccctcgtacattct		227-261	P-loop

D <sup>E255V</sup> -Rw	cacacgcctcgtat <u>ac</u> ca		227-261	<i>P-loop</i>
D-Fw	gaacgccgtggtgctgct			
ND C-Rw	tttctctccaggtactcc	67	335-357	Dominio Catalítico
D <sup>M351T</sup> -Rw	tttctctccaggt <u>g</u> ctccg		335-357	Dominio Catalítico
D <sup>E355G</sup> -Rw	*tgtggatgaagttttc <u>ct</u> cg		335-362	Dominio Catalítico
D <sup>E355K</sup> -Rw	tgtggatgaagttttc <u>ct</u> cta		335-362	Dominio Catalítico
D <sup>F359V</sup> -Rw	*agcaagatctctgtgga <u>cg</u> ac		335-365	Dominio Catalítico
F359C -Rw	ggcagcaagatctctgtg <u>tat</u> gc		335-366	Dominio Catalítico
F359I -Rw	ggcagcaagatctctgtg <u>tat</u> gat		335-366	Dominio Catalítico

\*(Gruber 2010)

#### 4.1.8 Clonado de las mutaciones más relevantes

##### 4.1.8.1 Obtención de los controles plasmídicos negativos y positivos

Las secuencias génicas *BCR-ABL1* mutada y no mutada (wt), provenientes de productos de PCR obtenidos con *primers* específicos a partir de ARN de pacientes con y sin la mutación fueron clonadas en el plásmido (pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>, Invitrogen). Los fragmentos mutados y *wild type*, correspondieron a los rearrreglos moleculares b2a2, b3a2, e1a2 o e19a2. Una vez obtenidos los constructos fueron utilizados en diluciones crecientes para obtener las curvas de calibración.

##### 4.1.8.2 Procedimiento de clonado

Los reactivos empleados para la ligación se detallan en la tabla [Tabla 27].

[Tabla 27]: Ligación

Reactivos	Volumen $\mu$ l
Producto de PCR	2
H2O	2
Solución salina	1
Vector	1
<b>Volumen final</b>	<b>6</b>

Luego de una homogeneización suave la mezcla para la ligación se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y fue pasada rápidamente a hielo.



#### 4.1.8.3 Procedimiento para transformación de bacterias

1. Se descongeló en hielo un tubo de *One Shot Cells* para cada transformación durante 30 min.
2. Se agregó 2,5 µl del producto de ligación a las *One Shot Cells*.
3. Se incubaron las células (*One Shot Cells*) con el producto de ligación durante 30 min.
4. Luego se incubaron exactamente 30 seg a 42°C en un baño termostatzado sin mezclar ni agitar.
5. Inmediatamente fueron pasadas a hielo.
6. Se agregaron 250 µl de medio SOC.
7. Se agitaron los tubos en posición horizontal durante 1h en un agitador a 225 RPM a 37°C.
8. Se sembraron 40 µl de cada transformación en una placa con medio sólido (Luria-Bertani) LB-agar.
9. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C.
10. Se seleccionaron hasta 10 colonias blancas para purificar el plásmido.
11. Las colonias seleccionadas fueron resuspendidas en 3 ml de medio líquido LB (Luria-Bertani).
12. Se incubaron en un agitador a 250 RPM durante 12 o 16 hs.
13. Luego se procedió a la extracción del plásmido.

#### 4.1.8.4 Preparación de medio LB líquido y LB-agar

LB líquido: 10 g de Bacto tryptona, 5 g de extracto de levaduras, 10 g de NaCl. Se llevó el volumen a 1 litro y ajustó el PH a 7,5 con NaOH 5N. Luego se esterilizó en autoclave.

LB-agar: 6 g de Bacto agar fueron agregados cada 400 ml de LB líquido y esterilizados en autoclave.

#### 4.1.8.5 Extracción de plásmidos

Se utilizaron las siguientes soluciones:

1. Solución A: 25 mM Tris PH 8 y 10 mM de EDTA, al momento de utilizar esta solución se agregó 100 µg/ml de RNasa.
2. Solución B: 0,2 M de NaOH y 0,1% de Dodecilsulfato sódico (SDS).
3. Solución C: 3 M Acetato de sodio a PH 5.

##### Procedimiento

- 1- Los 3 ml de medio líquido conteniendo la colonia fueron centrifugados durante 3 min y el *pellet* obtenido fue transferidos a un microtubo de 1,5 ml.
- 2- El *pellet* fue lavado con agua libre de nucleasas para eliminar todo el medio de cultivo.
- 3- Se agregaron 300 µl de Solución A y se resuspendieron suavemente con un *tip*.
- 4- Luego se agregaron 300 µl de Solución B, se agitó inmediatamente y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
- 5- Se agregaron 300 µl de Solución C, se agitó enérgicamente y luego se incubó en hielo durante 5 min.
- 6- Se centrifugó a 12.000 g durante 10 min y al sobrenadante se le agregaron 0,63 ml de isopropanol frío.
- 7- Luego de precipitar por 15 min en *freezer* se centrifugó a 15.000 g.
- 8- Se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido es fue lavado en etanol al 70% y resuspendido en 40 µl de H<sub>2</sub>O.

#### 4.1.9 Caracterización de los diferentes rearrreglos de *BCR-ABLI* mediante PCR multiplex

##### 4.1.9.1 Caracterización de los transcritos de *BCR-ABLI*<sup>P190</sup>, *BCR-ABLI*<sup>P210</sup> y *BCR-ABLI*<sup>P230</sup>

Mediante una PCR multiplex fue posible determinar el tipo de reordenamiento según el tamaño del producto de PCR obtenido. Los *primers* y las condiciones de reacción son los publicados por (Chasseriau 2004) y se detallan a continuación [Tabla 28, 29, 30 y 31].

[Tabla 28]: PCR multiplex

<i>Primer</i>	<i>Secuencia</i>
a 3 (ABL1)	gcttcacaccattccccatt
e 1 (BCR)	cctcgcagaactcgcacag
e 19 (BCR)	tggaggaggtgggcatctac
e 12 (BCR)	gcagagtggagggagaacat

[Tabla 29]: Productos de amplificación que pueden detectarse mediante PCR multiplex

Producto <i>BCR-ABL1</i> <sup>P190</sup> (pb)	Reordenamiento molecular	Producto <i>BCR-ABL1</i> <sup>P210</sup> (pb)	Reordenamiento molecular	Producto <i>BCR-ABL1</i> <sup>P190</sup> (pb)	Reordenamiento molecular
223	e1a3	92	b1a3	127	e19a3
397	e1a2	197	b2a3	262	e20a3
865	e6a3	272	b3a3	301	e19a2
		371	b2a2	436	e20a2
		446	b3a2		

[Tabla 30] PCR Multiplex

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen <math>\mu</math>l</b>
<i>5x Buffer</i>	5
dNTPs (10 mM)	0,5
<i>H<sub>2</sub>O Rnase-Free</i>	10,8
<i>Primers c/u</i> (10 $\mu$ m)	0,5
Go Taq®DNA Polimerasa 5U/ $\mu$ l	0,2
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5
ADNc	5
<b>Volumen final</b>	<b>25</b>

[Tabla 31] Ciclado PCR Multiplex

Ciclado	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	94° C	<b>2 min</b>
<b>Ciclos 30</b>	94° C	30 min
	58° C	30 seg
	72° C	30 seg
<b>Extensión final</b>	72° C	5 min

#### 4.1.10 Asociación de la resistencia a ITKs con mecanismos independientes de *BCR-ABL1*

##### 4.1.10.1 Expresión de *LYN* y *PTEN* mediante PCR en tiempo real

La cuantificación relativa de los transcritos de *LYN* y *PTEN* se realizó por PCR en tiempo real utilizando un intercalante de ADN doble cadena (Eva Green, a la longitud de onda de 530 nm). Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante un programa de “*melting*” realizado al término de cada ciclado, el cual permite evidenciar eventuales productos inespecíficos que pudieran alterar la calidad de la estimación cuantitativa. Como gen control se utilizó  *$\beta$ -actina*. El termociclador utilizado es el Rotor-Gene Q 6000 de QIAGEN. Las curvas de calibración se realizaron con diluciones seriadas de la línea K-562 en las cuales se evaluaron los genes en estudio. Los *primers* y las condiciones de reacción para cada gen se detallan a continuación [Tabla 32, 33 y 34].

[Tabla 32] Ciclado de amplificación de *LYN*, *PTEN* y  *$\beta$ -actina*

Reactivos	Volumen $\mu$ l
2 x Mezcla Real®	10
H <sub>2</sub> O <i>Rnase-Free</i>	7,5
<i>Primer Fw</i> (10 $\mu$ m)	0,25
<i>Primer Rw</i> (10 $\mu$ m)	0,25
ADNc	2
<b>Volumen final</b>	<b>20</b>

[Tabla 33] Ciclado de amplificación

Ciclado	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95° C	3 min
<b>Ciclo 1</b>	50° C	2 min
	95° C	10 min
<b>Ciclos 2-45</b>	95° C	15 seg
	60° C	60 seg

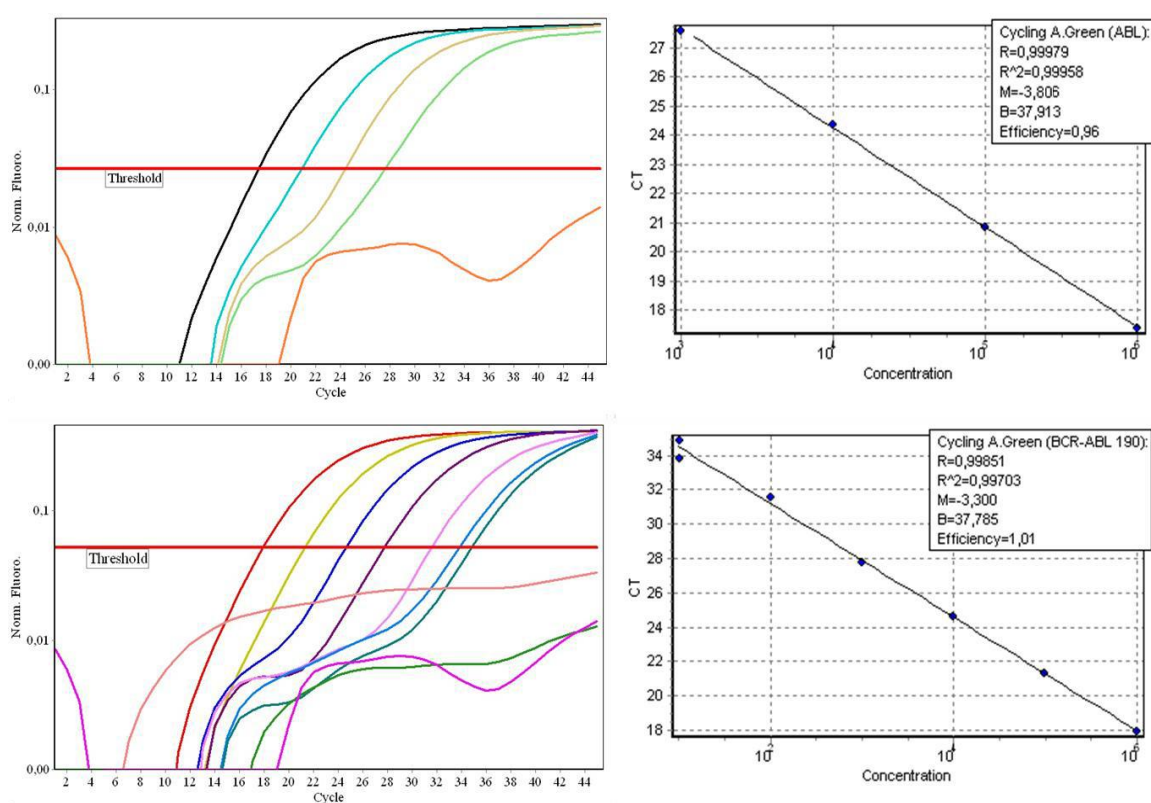
[Tabla 34] Secuencia de *primers* y tamaño de productos para cada gen

Genes	Secuencia de los primers	Producto (pb)
LYN	Fw: accaaggtggctgtgaaaac	201
	Rv: accttcategctcttcagga	
PTEN	Fw: cagtcagaggcgctatgtgtatta	207
	Rv: aacttgcttcccgtcgtgtg	
$\beta$ -actina	Fw: ccagaggcgtacagggatag	97
	Rv: ccaaccgcgagaagatga	

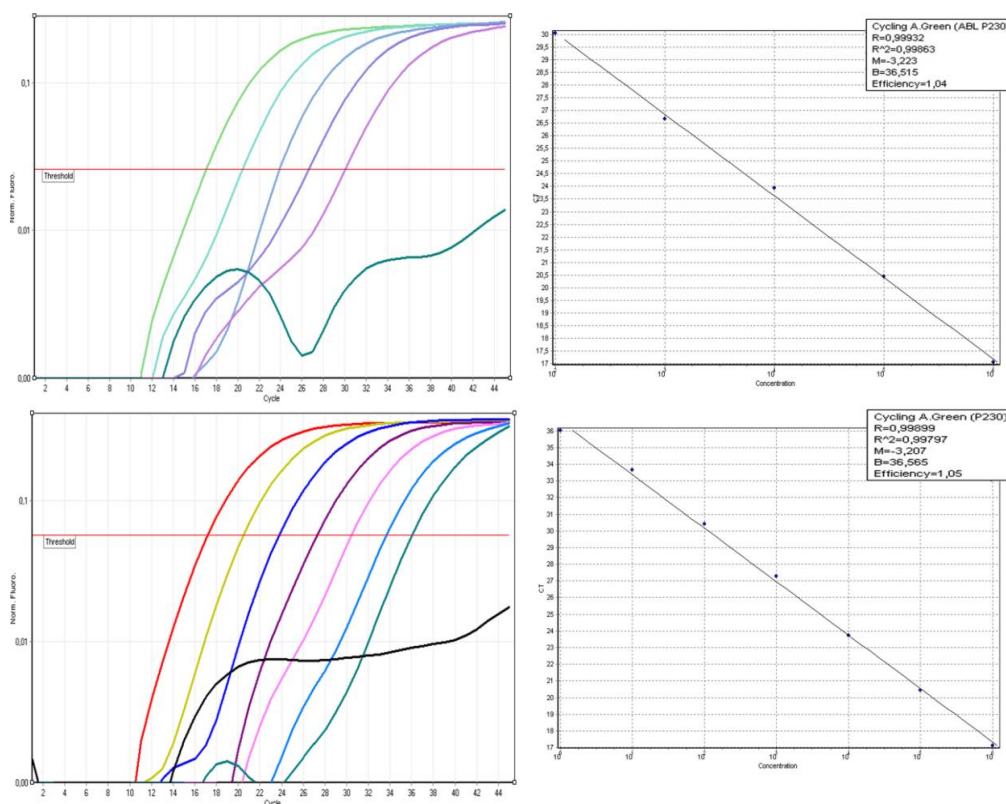
## **5. Resultados**

### 5.1 Obtención de controles plasmídicos de las variantes génicas e1a2 y e19a2

A partir de ARN de muestras de pacientes conteniendo los rearrreglos moleculares e1a2 y e19a2, se realizó la amplificación por PCR y luego el clonado de los productos de interés en el plásmido pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen). Estos controles plasmídicos fueron utilizados en la realización de las curvas de calibración para la cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1/ABL1* correspondientes a las isoformas e1a2 [Figura 17] y e19a2 [Figura 18].



**Figura 17: Curvas de amplificación e1a2.** Imagen superior, curva del gen control *ABL1*. Imagen inferior, curva del gen *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>. El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe poseer un valor de 0,99 para ser considerado de calidad. El resultado es una recta cuya pendiente teórica debe ser igual a  $-3,32$  si la eficiencia de amplificación es del 100% (rango aceptable  $-3,2$  a  $-3,8$  y eficiencia de  $1 \pm 10\%$ ).



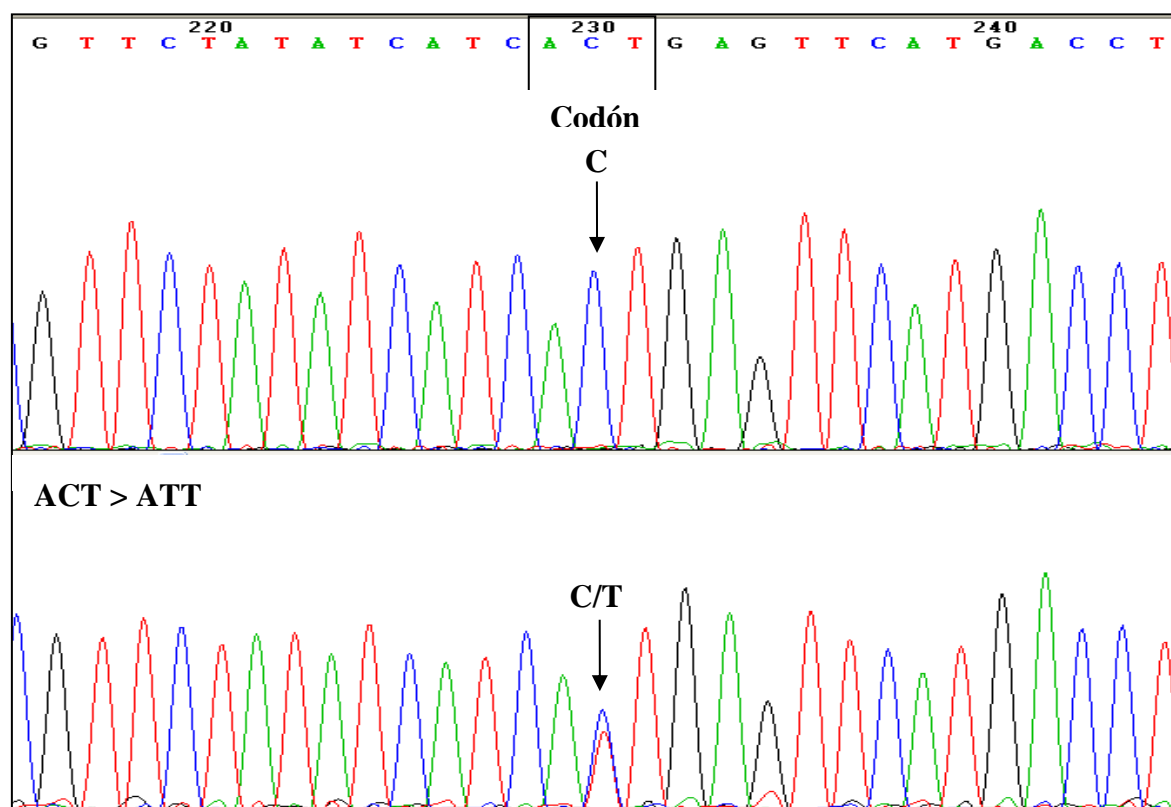
**Figura 18: Curvas de amplificación e19a2.** Imagen superior, curva del gen control *ABL1*. Imagen inferior, curva del gen *BCR-ABL1*<sup>P230</sup>. El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe poseer un valor de 0,99 para ser considerado de calidad. El resultado es una recta cuya pendiente teórica debe ser igual a  $-3,32$  si la eficiencia de amplificación es del 100% (rango aceptable  $-3,2$  a  $-3,8$  y eficiencia de  $1 \pm 10\%$ ).

#### 4.1.1 Obtención de controles plasmídicos positivos y negativos de las mutaciones clínicamente más relevantes

A pesar que los métodos HRM y ARMS-qPCR son técnicas de alta sensibilidad y especificidad, pueden generar falsos positivos o negativos, por lo tanto es necesario contar con controles de calidad que permitan monitorear la *performance* de los ensayos en todo momento. Por tal motivo, fue necesario construir un control negativo y controles positivos de cada una de las mutaciones de interés. Con el fin de obtener estos controles se procedió a clonar fragmentos de *BCR-ABL1*, provenientes de pacientes portadores de mutaciones específicas. Estos pacientes se seleccionaron de un estudio de mutaciones realizado en nuestro laboratorio utilizando secuenciación directa. Gracias a la disponibilidad del material biológico conservado, fue posible realizar la PCR y luego clonar el producto de interés en el plásmido pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen). De este modo, se obtuvieron plásmidos conteniendo las mutaciones y la secuencia wt.



La presencia de las mutaciones clonadas fue confirmada mediante secuenciación directa y evaluadas utilizando los programas *Mutation Surveyor* (SoftGenetics, de State College, PA, USA) y *Chromas Lite* versión 2.01 [Figura 19].



**Figura 19: Mutación T315I (cambio de Treonina por Isoleucina) detectada mediante secuenciación directa.** La secuencia *wild type* (codón ACT), se representa en el electroferograma superior y en el inferior la secuenciación de una muestra, con dos picos, correspondientes a timina (T) y citosina (C) en el nucleótido 947 (*GenBank* NM\_005157.4).

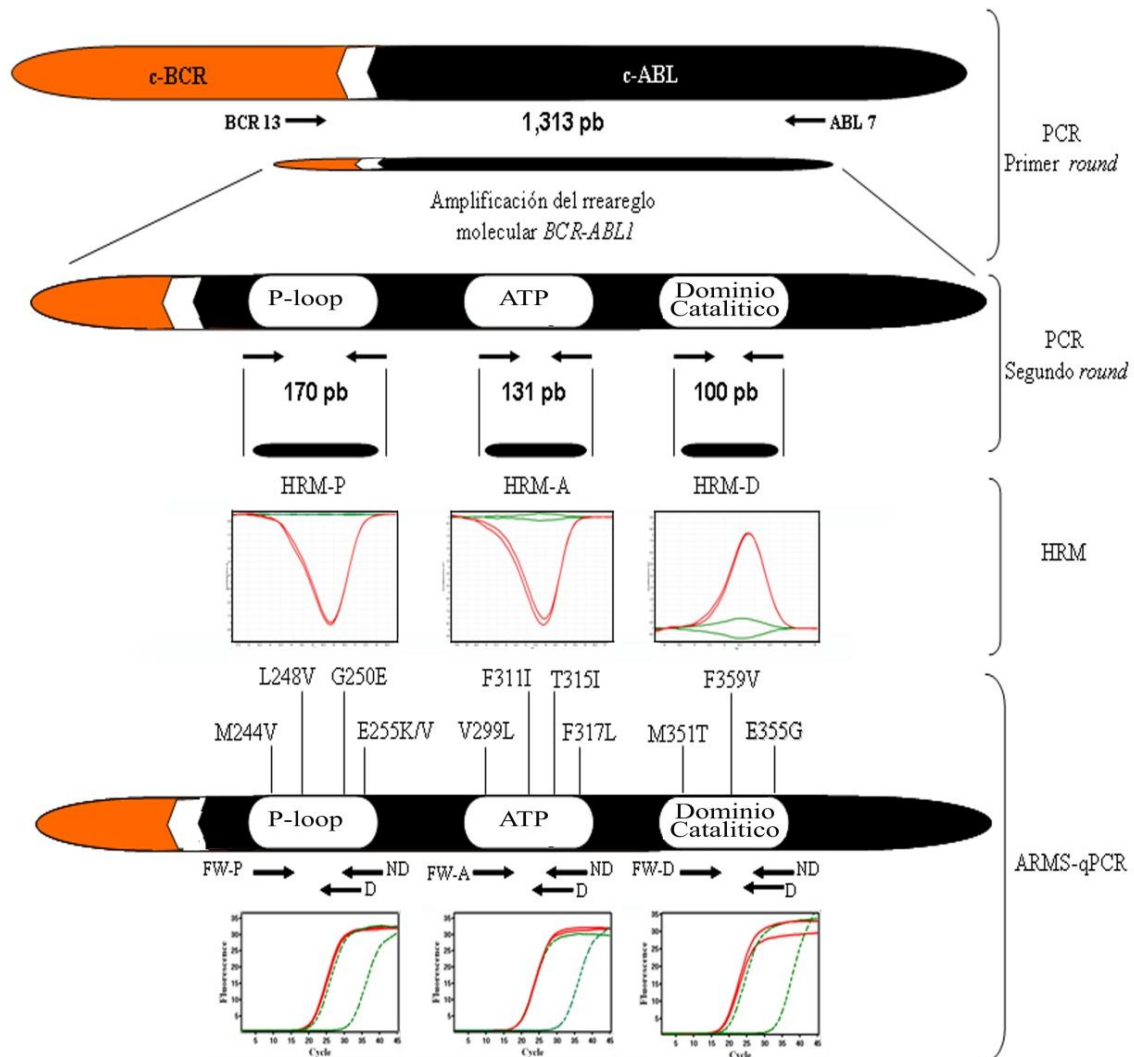
Inicialmente fue posible clonar 8 mutaciones de relevancia clínica en la resistencia a los ITKs (V299L, E255K, E255V, F311I, T315I, F317L, M351T, E355G) y el control *BCR-ABL1* no mutado. De ahora en adelante a los controles plasmídicos portadores de las diferentes mutaciones se los denomina control plasmídico positivo (CPP) y control plasmídico negativo (CPN) al plásmido no mutado. Posteriormente se clonaron las mutaciones Y253H, Q252H y G250E.

## 5.2 Determinación de la selectividad y sensibilidad del método HRM mediante los controles plasmídicos

Las mutaciones adquiridas durante el tratamiento pueden estar presentes en muy baja proporción; por este motivo, los ensayos de detección de las mismas tienen que ser muy

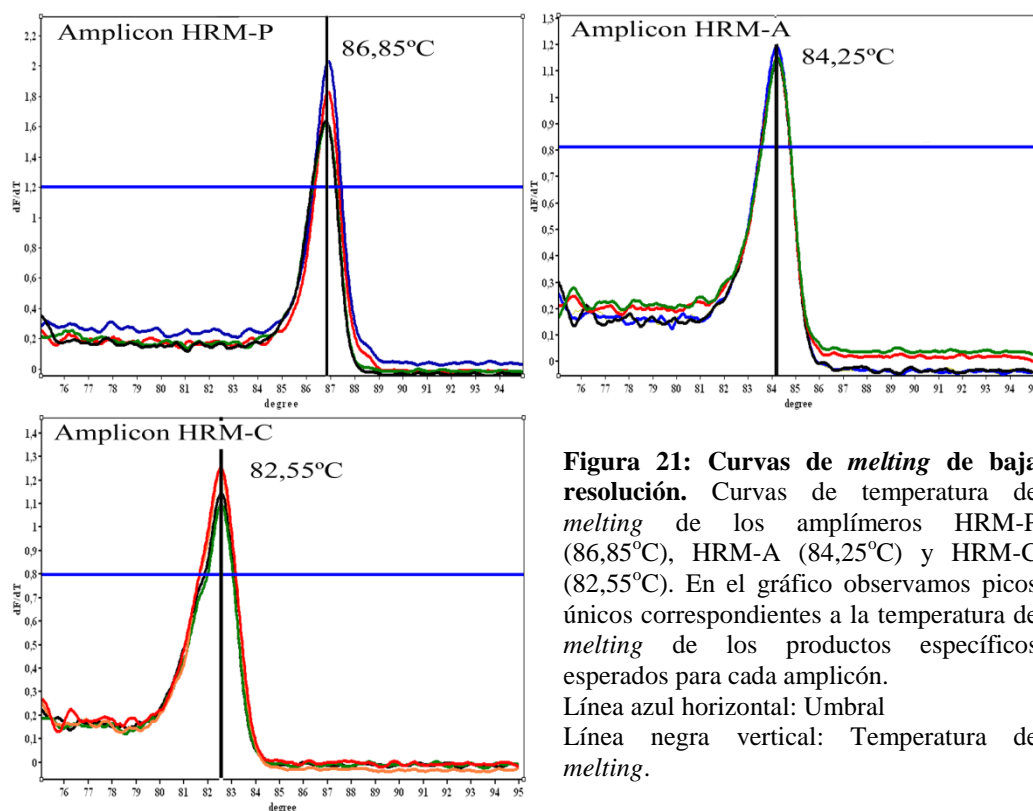
sensibles. Se define a la *sensibilidad* como la cantidad mínima de templado específico (*Match*) que puede ser detectado, a la *especificidad* como la máxima cantidad de un templado inespecífico (*Mismatch*) que resulta indetectable y a la *selectividad* como la capacidad del método para detectar exclusivamente el templado mutado en una alta concentración de templado wt.

Con el objetivo de mejorar aún más la sensibilidad del HRM, este estudio se realizó utilizando un abordaje de PCR *nested*. En el primer *round* de PCR, se logró la amplificación de un fragmento de 1.313 pb correspondiente al rearreglo genético *BCR-ABL1*. En el segundo *round*, con el fin de realizar un *screening* de mutaciones, se amplificaron 3 regiones correspondientes al dominio *P-loop* de 170 pb, abarcando los aminoácidos 221 a 278 (HRM-P), al dominio de unión al ATP de 131 pb comprendido entre los aminoácidos 286 y 329 (HRM-A) y al dominio catalítico de 100 pb conteniendo los aminoácidos 343 al 376 (HRM-C). El producto obtenido en el primer *round* de PCR, fue utilizado como templado para el análisis de ARMS-qPCR [Figura 20] y secuenciación directa.



**Figura 20:** Esquema general de la estrategia combinada del método HRM y ARMS-qPCR para la detección de mutaciones en del Dominio Tirosina Kinasa del gen quimérico *BCR-ABL1*. PCR primer round: amplificación del gen quimérico *BCR-ABL1* de 1.313 pb. PCR segundo round: amplificación de 3 amplicones HRM-P, HRM-A y HRM-C. Sólo cuando el análisis de HRM es positivo se investigan por ARMS-qPCR las mutaciones correspondientes a cada región. ND= *Primer no discriminante*; D= *Primer discriminante*; FW-P= *Primer forward* del fragmento de HRM-P; FW-A= *Primer forward* del fragmento HRM-A; FW-C= *Primer forward* del fragmento HRM-C.

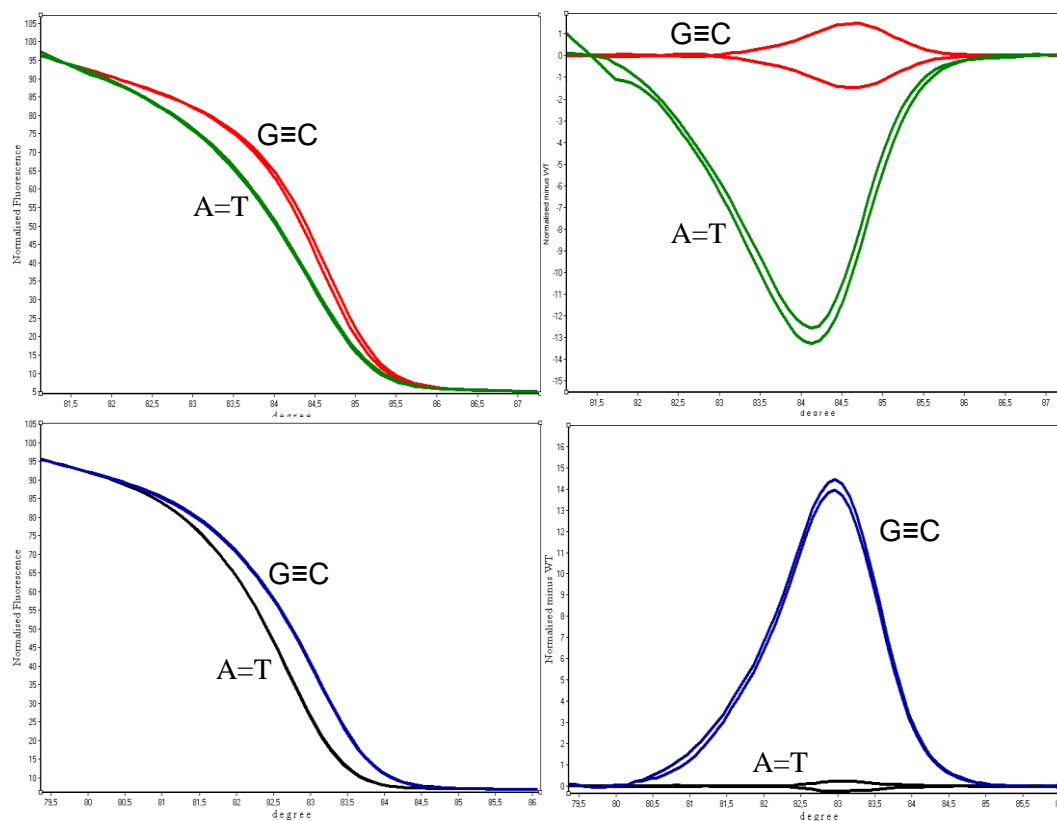
Los *primers* diseñados para obtener estos amplicones, se controlaron mediante el análisis de curvas de *melting* de baja resolución (LRM, *Low Resolution Melting*) y electroforesis en gel de agarosa al 2,5%, no observándose formación de dímeros de *primers* y/o productos inespecíficos [Figura 21].



**Figura 21: Curvas de *melting* de baja resolución.** Curvas de temperatura de *melting* de los amplímeros HRM-P (86,85°C), HRM-A (84,25°C) y HRM-C (82,55°C). En el gráfico observamos picos únicos correspondientes a la temperatura de *melting* de los productos específicos esperados para cada amplíción.  
Línea azul horizontal: Umbral  
Línea negra vertical: Temperatura de *melting*.

La calidad de los resultados del HRM, es altamente dependiente de la amplificación de la PCR. Por lo tanto, los datos de amplificación en tiempo real y el análisis de LRM se evaluaron antes del análisis de HRM. Los valores de ciclo umbral ( $C_t$ , *Cycle Threshold*,) reflejan la cantidad inicial de templado. El  $C_t$  debe ser similar en muestras y controles, un  $C_t \geq 30$  indica cantidad insuficiente de templado inicial o degradación del material, lo cual implica repetir el estudio.

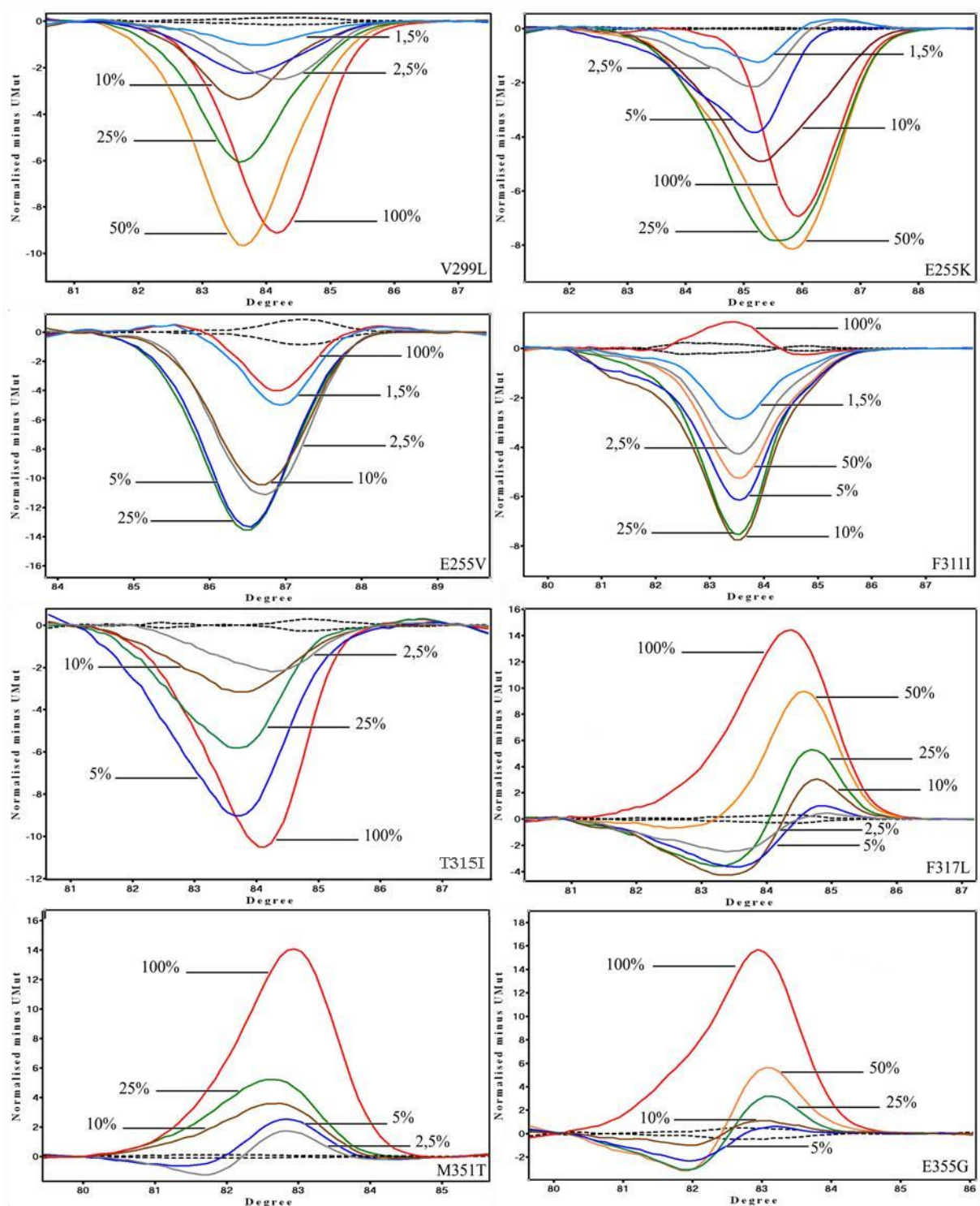
Al contrario del análisis de LRM, que permite diferenciar solamente cambios en el tamaño de los productos de PCR, el análisis por HRM, permite diferenciar cambios nucleotídicos puntuales. Las mínimas variaciones de temperatura producidas por el cambio de un nucleótido, se ven representados en los gráficos diferenciales del HRM. Cuando la modificación nucleotídica determina que se produzca un cambio de G≡C (3 puentes de Hidrógeno) a A=T (2 puentes de Hidrógeno), es decir, un enlace de menor energía la curva del HRM adopta valores negativos, mientras que los valores son positivos cuando el cambio es a la inversa [Figura 22].



**Figura 22: Análisis de datos del HRM.** Curvas de “normalización de datos” (izquierda), gráfico diferencial del HRM (derecha). Los cambios nucleotídicos están destacados en diferentes colores. Arriba, G=C (wt, rojo) y A=T (Mutado, verde); abajo, A=T (wt, negro) y G=C (Mutado, azul).

En primera instancia, se realizó un estudio cualitativo para determinar si era posible diferenciar los CPPs del CPN. Este análisis se realizó por duplicado usando  $10^5$  copias de cada plásmido y en todos los casos se pudo observar un perfil de HRM diferente respecto del control wt. La posibilidad de diferenciar con mayor o menor resolución, las curvas correspondientes a perfiles mutados de los no mutados depende tanto de la secuencia analizada como del cambio nucleotídico involucrado.

Finalmente, con el propósito de evaluar la selectividad del método HRM, se utilizaron diluciones seriadas de cada CPP en CPN (100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1,5%). Siempre se amplificaron 2 réplicas de cada dilución y 4 réplicas del CPN como muestra de referencia. Con excepción de la mutación E355G, la cual mostró una selectividad de entre el 5-10%, el valor promedio (considerando todas las mutaciones) fue de 2,5% (rango 1,5% - 5%). Las curvas de HRM de las diluciones se muestran en la **[Figura 23]**.



**Figura 23: Gráfico diferencial del análisis de HRM.** Diluciones seriadas de los 8 diferentes CPPs en CPN (100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, y 1,5%). Las diferencias en las señales del HRM, revelan que no son directamente proporcionales a la carga de la mutación, indicando que este método no es cuantitativo. Líneas continuas de colores (CPP). Líneas negras punteadas (CPN).

La selectividad del HRM [Tabla 35] muestra el gran poder de *screening* que posee este método. Los resultados de los experimentos con los 3 amplicones demuestran una mejora de aproximadamente 10 veces en la selectividad del HRM respecto de la

secuenciación directa. Estos resultados indican que se podría detectar mutaciones en una fase muy temprana de la resistencia al tratamiento, permitiendo una pronta intervención terapéutica.

**Tabla 35: Porcentaje de selectividad del método HRM para los diferentes CPPs.**

Mutación	HRM-P	HRM-A	HRM-C
E255K	1,5%		
E255V	1,5%		
V299L		1,5%	
F311I		1,5%	
T315I		2,5%	
F317L		2,5%	
M351T			2,5%
E355G			5%

### 5.2.1 Determinación de la selectividad del método ARMS-qPCR mediante los controles plasmídicos

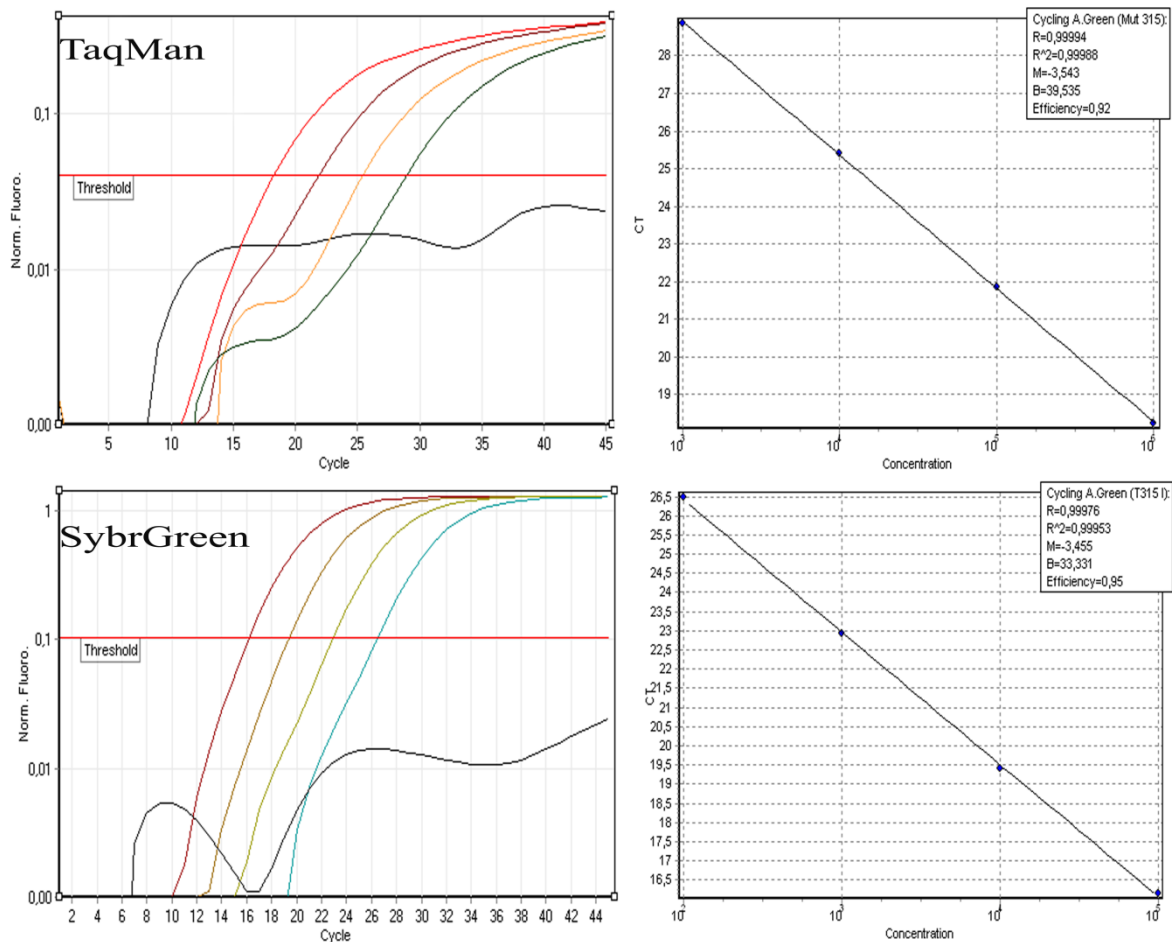
El sistema de ARMS-qPCR, posibilita la detección de polimorfismos constitucionales y mutaciones somáticas puntuales. El método ARMS es una modificación de la PCR que permite la amplificación de alelos específicos usando *primers* especiales que hibridan completamente con el alelo deseado y no lo hacen con el otro alelo debido a un cambio de base en su nucleótido 3' terminal.

El abordaje de ARMS-qPCR nos permite detectar la presencia de mutaciones y al mismo tiempo cuantificar la abundancia del clon *BCR-ABL1* mutado. Este ensayo utiliza un fluorocromo cuya emisión de fluorescencia es proporcional a la acumulación del producto PCR; luego de algunos ciclos, la fluorescencia producida por la reacción supera un determinado Ct que correlaciona con la cantidad inicial del *target* específico presente en la muestra. Cuanto más abundante es el *target* de interés menor será el número de ciclos necesarios para superar el umbral.

En un primer abordaje el ensayo se diseñó utilizando la química de detección *Taqman*, que requiere del diseño de sondas de oligonucleótidos específicos marcados con moléculas fluorescentes; posteriormente, probamos una química de detección basada en



el uso del intercalante fluorescente del DNA doble cadena Sybr-Green. Dado que los resultados obtenidos con este segundo abordaje fueron comparables a los obtenidos con *Taqman*, se adoptó la estrategia *SYBR-Green* [Figura 24]. Esta elección presenta la ventaja de reducir costos y evitar el diseño de nuevas sondas en caso de agregar la detección de otras mutaciones.



**Figura 24:** Curvas de amplificación y evaluación de las eficiencias obtenidas con *Taqman* y *SybrGreen*. Similitudes presentadas en la amplificación y eficiencia de un CPP (mutación T315I). Curvas de amplificación de ARMS-qPCR en escala logarítmica (izquierda). Umbral (*threshold*) calculado por el *software* del equipo (línea horizontal roja). Pendientes de las curvas (mutación T315I) amplificadas con *Taqman* y *sybrGreen* (derecha). Las eficiencias son similares y cercanas al 100%.

Los *primers* discriminantes (D), utilizados en la ARMS-qPCR poseen una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos. Éstos tienen la característica de tener la última base del extremo 3' complementaria a la variante mutada de interés. Además, se incorporó en el tercer o cuarto nucleótido del extremo 3' una base no complementaria a la secuencia. Este diseño favorece la unión de la secuencia mutada ya que la wt, al no tener la base



específica de la mutación, sumada a la no complementariedad en el tercer o cuarto nucleótido desestabiliza la unión del *primer* y la amplificación no se produce o lo hace en un ciclo mucho más tardío (generalmente mayor a 30 ciclos). Los *primers* no discriminantes (ND), tienen una longitud similar a los *primers* D, y están diseñados de tal forma que, la amplificación del producto PCR se produce independientemente de la presencia o ausencia de la mutación. Los *primers* utilizados se presentan en la tabla 26 de la sección materiales y métodos.

Similarmente al análisis de HRM, los 8 CPP fueron usados como templados en el ensayo de ARMS-qPCR. Una serie de diluciones, de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^1$  copias de los diferentes controles plasmídicos, se utilizaron para un ensayo de PCR en tiempo real con el propósito de generar curvas estándares y poder así estudiar el rango dinámico y la eficiencia de amplificación. Las pendientes de las curvas estándares (obtenidas graficando el número de copias vs. los Ct) se encontraban en un rango de -3,2 a -3,5, indicando que la eficiencia de la PCR fue cercana al 100% en todos los casos. Una vez determinados los parámetros de sensibilidad y eficiencia, dado que los métodos basados en la PCR son propensos a generar falsos positivos, es importante caracterizar la especificidad del ensayo. Para ello se utilizaron los CPN; el valor de Ct de este ensayo con el *primer* D es el que se toma en cuenta para calcular la inespecificidad o ruido. Conceptualmente, un buen ensayo es aquel que permite obtener una buena señal (Ct bajo, ~20 ciclos) cuando se amplifica el correspondiente CPP, y una señal pobre (Ct alto, > 30 ciclos) cuando se amplifica el CPN. Este concepto se resume matemáticamente calculando el delta Ct ( $\Delta Ct$ ); este representa la diferencia entre el *matching* (MAT; CPP amplificado con *primers* D, específicos de la mutación) y el *mismatching* (MIS; CPN amplificado con *primers* D, específicos de la mutación). A partir del cálculo de esta diferencia y teniendo en cuenta la eficiencia calculada por cada juego de *primers* podemos definir el ruido de fondo (Rdf), como medida de la inespecificidad de la reacción:

$$\mathbf{Rdf} = \frac{\mathbf{100}}{\mathbf{(1 + E_{MUT})}^{\Delta Ct^{(MIS-MAT)}}}$$

Rdf = Ruido de fondo de cada ensayo

$E_{MUT}$  = Eficiencia de los *primers* discriminantes

MIS = *mismatch*

MAT = *match*

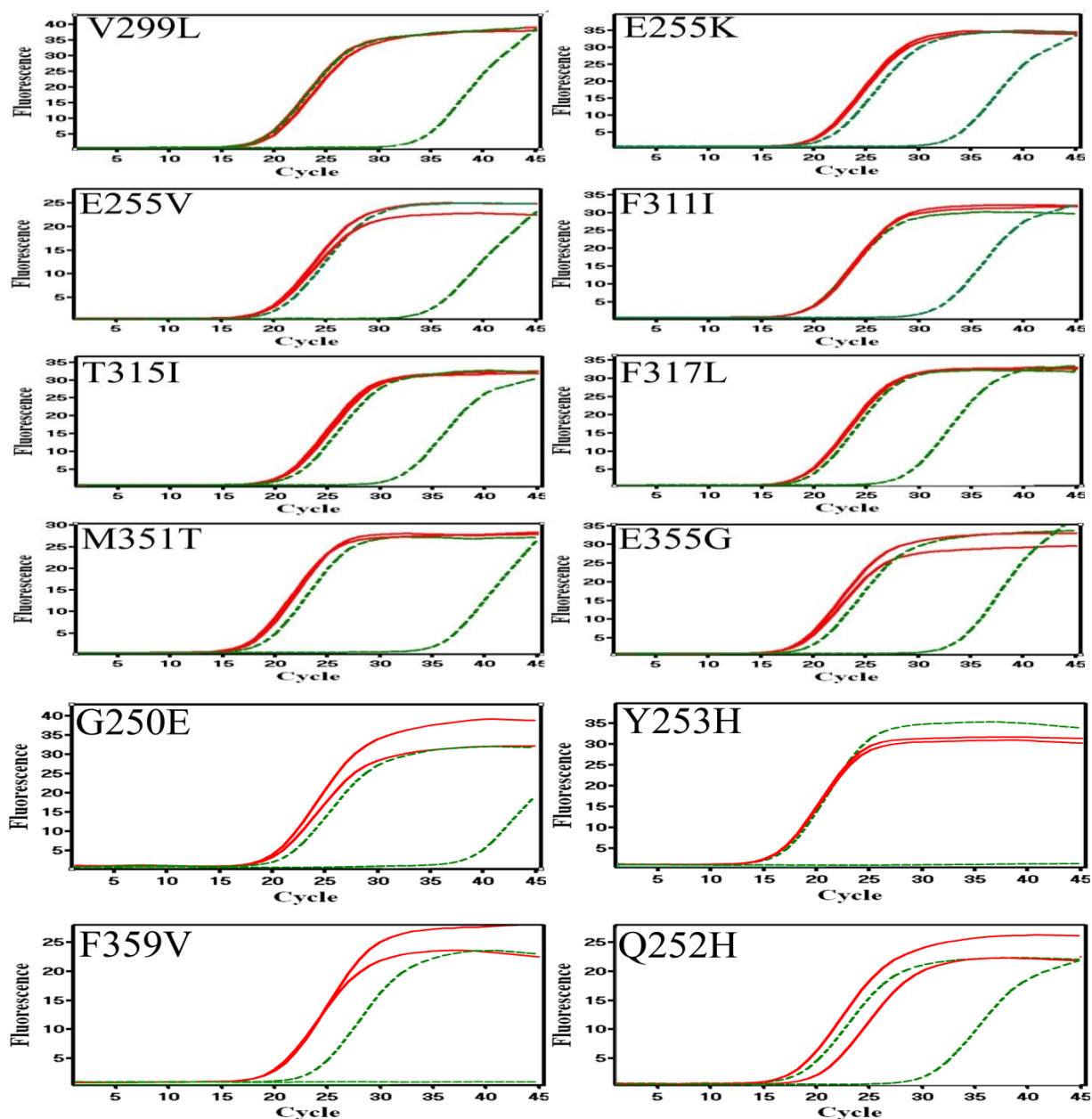
En la [tabla 36] se reportan los valores obtenidos para cada una de las variantes genéticas; podemos apreciar que los valores de Rdf son muy bajos, con un promedio de  $2,8 \times 10^{-2}$  (rango entre  $1,2 \times 10^{-1}$  -  $9,0 \times 10^{-8}$ ).

**Tabla 36: Evaluación de la especificidad de los *primers* utilizados para ARMS-qPCR**

Mutación	CPP		CPN			Rdf	Codón	Variantes Genéticas	
	Ct ND	Ct D	Ct ND	Ct D	$\Delta Ct^{(MIS-MAT)}$			Cambio aminoacídico	Cambio nucleotídico
V299L <sub>a</sub>	15,74	16,24	16,92	30,8	14,56	$4,1 \times 10^{-3}$	299	Val > Leu	G > C
F311I	16,48	16,47	16,42	28,46	11,99	$2,4 \times 10^{-2}$	311	Phe > Ile	T > A
T315I	17,55	17,92	18	28,77	10,85	$5,4 \times 10^{-2}$	315	Thr > Ile	C > T
F317L <sub>a</sub>	15,83	15,92	16,45	25,52	9,60	$1,2 \times 10^{-1}$	317	Phe > Leu	T > C
E255K	16,33	16,77	17,36	29,13	12,36	$1,9 \times 10^{-2}$	255	Glu > Lys	G > A
E255V	17,65	17,62	18,65	33,04	15,42	$2,2 \times 10^{-3}$	255	Glu > Val	A > T
M351T	15,12	15,45	16,52	33,47	18,02	$3,7 \times 10^{-4}$	351	Met > Thr	T > C
E355G	15,69	15,63	17,14	30,24	14,61	$3,9 \times 10^{-3}$	355	Glu > Gly	A > G
Q252H	15,8	18,32	15,57	39,80	21,48	$3,4 \times 10^{-5}$	252	Gln > His	G > C
G250E	15,71	15,75	15,57	39,88	24,13	$5,4 \times 10^{-6}$	250	Gly > Glu	G > A
Y253H	15,01	15,03	15,00	>45,0	>30,0	$<9,0 \times 10^{-8}$	253	Tyr > His	T > C
F359V	17,04	17,05	20,00	>45,0	>30,0	$<9,0 \times 10^{-8}$	359	Phe > Val	T > G

$C_t$  = Ciclo umbral; ND = Primer no discriminante; D = primer discriminante; Rdf = Señal de fondo o *background*. El subíndice (a) indica que la mutación presenta más de un cambio nucleotídico V299L<sub>a</sub>=GTG>CTG, F317L<sub>a</sub>=TTC>CTC.  $\Delta Ct$ : Diferencia entre el valor del  $C_t$  para el *match* (CPP amplificado con D) y el *mismatch* (CPN amplificado con D).

La especificidad del ensayo ARMS-qPCR para las diferentes mutaciones, se determinó calculando los valores de  $\Delta Ct$  entre el Ct MAT (CPP amplificado con *primers* D) y el Ct MIS (CPN amplificado con *primers* D) [Figura 25].



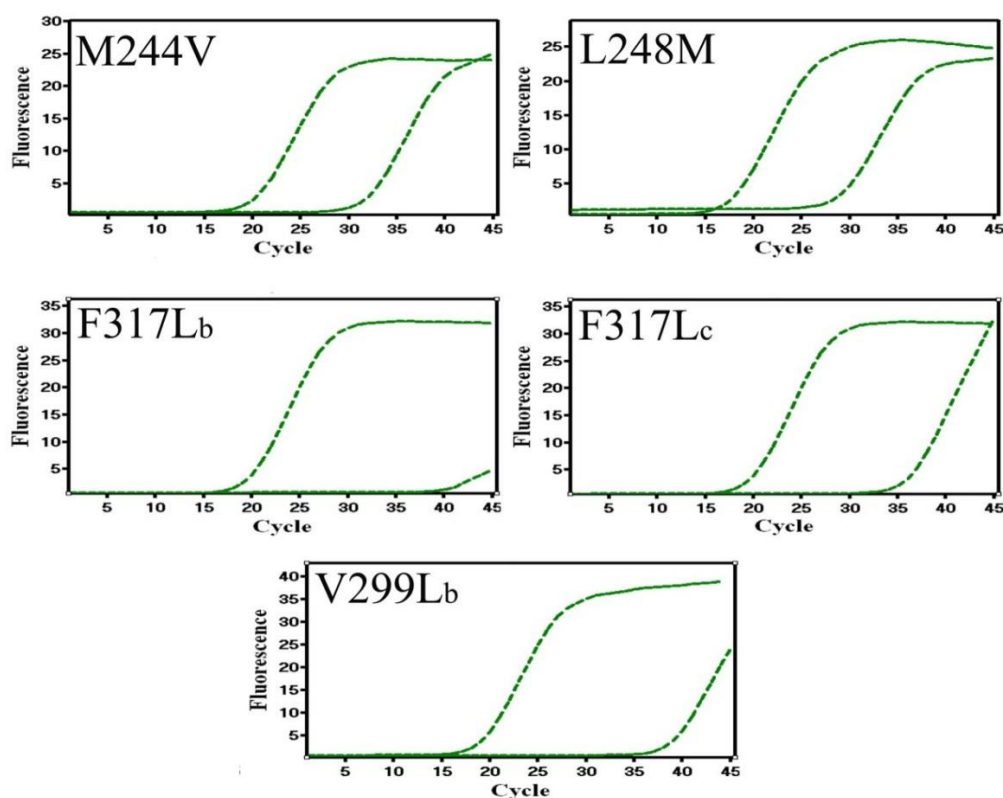
**Figura 25:** Curvas de amplificación para el análisis de ARMS-qPCR. Especificidad del ensayo para 12 mutaciones. Líneas verdes discontinuas en ciclos tempranos de amplificación: CPN amplificado con *primers* ND (no discriminante), líneas verdes discontinuas en ciclos tardíos de amplificación: CPN amplificado con *primers* D (discriminante). Líneas continuas rojas: CPP amplificados con *primers* D y ND.

De forma similar, para los *primers* de aquellas mutaciones de las cuales no se contaba con controles positivos, se utilizó la comparación entre los *primers* D y ND (asumiendo que la eficiencia de amplificación no es significativamente diferente). El cálculo del valor Rdf promedio fue de  $2,1 \times 10^{-2}$  (rango entre  $3,3 \times 10^{-2}$  -  $2,3 \times 10^{-4}$ ) [Tabla 37] [Figura 26].

**Tabla 37: Evaluación de la especificidad de los *primers* sin CPP utilizados en ARMS-qPCR**

Mutación	CPN				Variantes Genéticas		
	Ct ND	Ct D	$\Delta Ct^{(ND-D)}$	Rdf	Codón	Cambio	Cambio
						aminoacídico	nucleotídico
V299L <sub>b</sub>	16,92	35,63	18,71	$2,3 \times 10^{-4}$	299	Val > Leu	G > T
F317L <sub>b</sub>	16,45	39,43	22,85	$1,3 \times 10^{-5}$	317	Phe > Leu	C > G
F317L <sub>c</sub>	16,45	32,81	16,41	$1,1 \times 10^{-3}$	317	Phe > Leu	C > A
M244V	17,24	28,77	11,53	$3,3 \times 10^{-2}$	244	Met > Val	A > G
L248M	14,83	25,00	10,70	$6,0 \times 10^{-2}$	248	Leu > Met	C > A

C<sub>t</sub> = Ciclo umbral; ND= Primer no discriminante; D= primer discriminante; Rdf= Señal de fondo o *background*. El subíndice (b y c) indica que la mutación presenta más de un cambio nucleotídico V299L<sub>b</sub>=GTG>TTG, F317L<sub>b</sub>=TTC>TTG, F317L<sub>c</sub>=TTC>TTA.  $\Delta Ct$ : Diferencia entre el valor de C<sub>t</sub>, ND y D.



**Figura 26: Curvas de amplificación para el análisis de ARMS-qPCR para el cual los CPP no estuvieron disponibles.** Curvas de amplificación temprana: CPN amplificado con los *primers* ND, curvas de amplificación tardía: amplificaciones inespecíficas del CPN con los *primers* D. Estas amplificaciones inespecíficas son tenidas en cuenta en todos los casos para el cálculo del clon mutado. ND: *primer* no discriminante; D: *primer* Discriminante. V299L<sub>b</sub>=GTG>TTG, F317L<sub>b</sub>=TTC>TTG, F317L<sub>c</sub>=TTC>TTA.

La determinación del ruido de fondo, indirectamente otorga una estimación de la selectividad del ensayo que en cada caso es muy alta y suficiente para diferenciar mutaciones genuinas de falsos positivos. La relativización matemática de la abundancia del clon mutado (obtenida calculando el Ct D en cada caso) con respecto al total presente en la reacción (obtenido calculando el Ct ND) permite normalizar las cuantificaciones y estimar el porcentaje de carga tumoral (CT) mutada.

$$\%CT = \left[ \frac{(1 + E_{ND})^{Ct_{(ND)}}}{(1 + E_D)^{Ct_{(D)}}} - Rdf \right] \times 100$$

% CT = Porcentaje de carga tumoral

C<sub>t</sub> = Ciclo umbral

E<sub>ND</sub> = Eficiencia de los *primers* no discriminantes

E<sub>D</sub> = Eficiencia de los *primers* discriminantes

### 5.3 Comparación del método HRM con la secuenciación directa

Para determinar si el método utilizado exitosamente en plásmidos podía ser empleado en pacientes, se analizaron un total de 65 muestras provenientes de pacientes con LMC en fase crónica resistentes a imatinib y 15 muestras de donantes sanos. Las 65 muestras fueron previamente estudiadas por secuenciación directa, detectándose mutaciones en 15 casos y ninguna mutación en los 50 restantes. En todos los casos que resultaron mutados por secuenciación el perfil de HRM fue compatible con la presencia de este evento, mostrando una concordancia completa (15/15, 100%) [Tabla 38].

**Tabla 38: Pacientes mutados detectados por secuenciación directa y confirmados por HRM.**

Muestra	Secuencia	HRM-P	HRM-A	HRM-C
Mut 1	T315I		Mut	
Mut 2	T315I		Mut	
Mut 3	T315I		Mut	
Mut 4	T315I		Mut	
Mut 5	T315I		Mut	
Mut 6	F317L		Mut	
Mut 7	F317L/E255Q/V299L	Mut	Mut	
Mut 8	V299L /E355G		Mut	Mut
Mut 9	E255K	Mut		
Mut 10	E255V	Mut		
Mut 11	E255V	Mut		
Mut 12	G250E	Mut		
Mut 13	Y253H	Mut		
Mut 14	F359I			Mut
Mut 15	M351T			Mut

A su vez, un perfil no mutado fue encontrado en los 15 donantes sanos, confirmando la especificidad del método HRM. Al analizar por HRM los 50 pacientes clasificados previamente como no mutados por el método de secuenciación directa, encontramos un total de 13 pacientes con un perfil compatible con la presencia de mutaciones; 3 correspondientes a la región HRM-P, 7 en el HRM-A y 3 en el HRM-C [Tabla 39]. Estos resultados demuestran la mayor sensibilidad del método HRM; de aquí la importancia de utilizar un método de *screening* más sensible, ya que estos pacientes habían sido catalogados como no mutados por secuenciación directa.

#### 5.4 Confirmación y cuantificación por ARMS-qPCR de los perfiles detectados como mutados por HRM

Con el fin de identificar exactamente las mutaciones probables encontradas por HRM, los 13 pacientes positivos fueron estudiados por ARMS-qPCR. Se confirmó la presencia de mutaciones en 8 de ellos [Tabla 39]. La media de carga de clon mutado medido por ARMS-qPCR fue marcadamente menor al 20% [media de 8,8% (rango 1,2 a 23%)], confirmando que la secuenciación directa es una metodología con serias limitaciones

para caracterizar clones poco abundantes. El hecho que 5 casos positivos por HRM no pudieron ser confirmados por ARMS-qPCR, probablemente se deba a que presentaban mutaciones diferentes a las buscadas. Cabe destacar que de los 8 pacientes mutados 4 presentaban la mutación T315I, la cual es resistente a los ITK de primera y segunda generación disponible para el tratamiento de LMC. La identificación de T315I permite considerar tempranamente la opción de trasplante alogénico de células madre de médula ósea o rotar el tratamiento a ponatinib.

**Tabla 39: Pacientes no mutados por secuenciación directa estudiados por HRM y ARMS-qPCR**

Muestra	Secuencia	HRM	BCR-ABL1/ABL1 (%)	ARMS-qPCR (%)
<b>HRM-P</b>				
1	No Mut	Mut	15	No Mut*
2	No Mut	Mut	9	No Mut*
3	No Mut	Mut	25	G250E (4,2)
<b>HRM-A</b>				
4	No Mut	Mut	40	T315I (4)
5	No Mut	Mut	35	T315I (9,6)
6	No Mut	Mut	37	T315I (22)
7	No Mut	Mut	24	V299L (10)
8	No Mut	Mut	15	T315I (8)
9	No Mut	Mut	0,75	No Mut*
10	No Mut	Mut	23	No Mut*
<b>HRM-C</b>				
11	No Mut	Mut	12	No Mut*
12	No Mut	Mut	22	F359V (1,2)
13	No Mut	Mut	0,97	F359V (23)

Mut: Mutado. No Mut: No Mutado. No Mut\*: secuencia no mutada para las siguientes mutaciones: P-loop (M244V, L248V, G250E, E255V/K), ATP (V299L, F311I, T315I, F317L) y Dominio catalítico (M351T, F359V, E355G).

### 5.5 Detección de mutaciones y monitoreo de pacientes con LMC en respuesta subóptima

Teniendo en cuenta que HRM y ARMS-qPCR es una estrategia superior para la detección de mutaciones, se procedió a evaluar su utilización en muestras de pacientes con criterios de resistencia molecular, a los cuales nunca se les había realizado el estudio de mutaciones.

A partir de 856 pacientes con LMC seguidos durante un periodo de 2 años, se seleccionaron 32 casos que presentaban características de respuesta subóptima (No alcanzaron la RMMa después de 18 meses de tratamiento) (Baccarani 2009). Para ello, los valores de transcritos fueron armonizados a la escala internacional mediante la obtención de un factor de conversión.

La cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1* se realizó sobre el ARN total. Como gen control, para la normalización de los datos, se utilizó *ABL1* y la cuantificación del clon leucémico se expresó como relación ( $BCR-ABL1/ABL1 \times 100$ ). El ensayo se realizó de acuerdo a un protocolo estandarizado de PCR cuantitativa en tiempo real. Las diluciones de los plásmidos ( $3 \times 10^5$  a  $3 \times 10^0$ ) para los transcritos *BCR-ABL1* y *ABL1* fueron utilizados para generar las curvas de calibración. La metodología empleada para cuantificar la expresión de *BCR-ABL1* fue validada en el Instituto de Ciencia Médica y Veterinaria de Adelaida en Australia (Baccarani 2006). Esta validación con el laboratorio australiano, es necesaria para poder alinear los resultados cuantitativos de carga leucémica a la escala internacional, donde el valor de 0,10 % representa por definición la RMMa. Nuestro laboratorio está certificado por el laboratorio australiano para informar los valores de cuantificación de *BCR-ABL1* con un factor de conversión de 0,45.

De los 32 pacientes con respuesta subóptima, se detectó la presencia de mutaciones en 11 casos (11/32, 34,4%); sin embargo 2 perfiles positivos por HRM no pudieron ser confirmados mediante ARMS-qPCR por tratarse de un polimorfismo en un caso (L298L) y probablemente de alguna mutación no descrita o no buscada en el otro [Tabla 40].

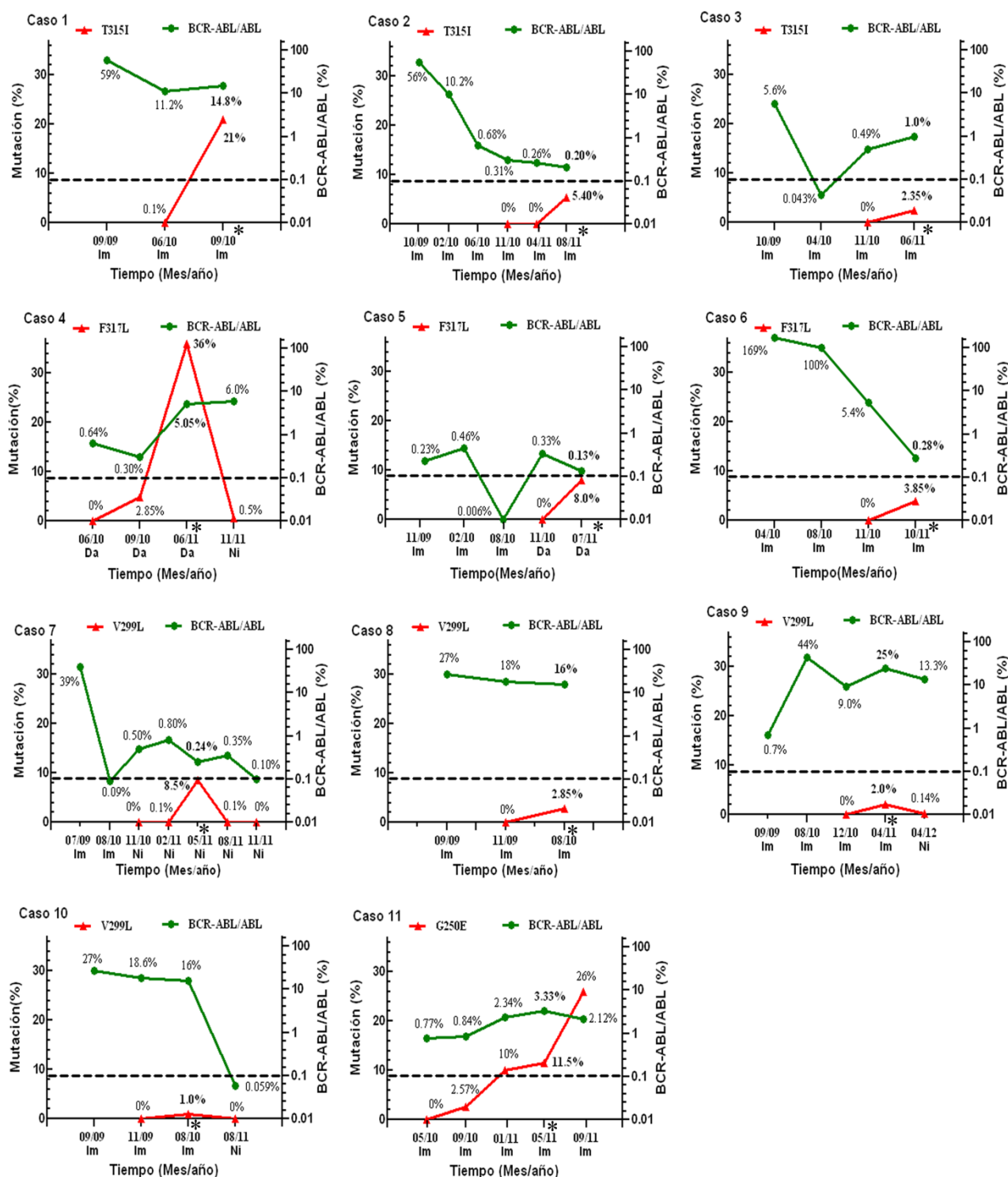


**Tabla 40: Análisis mutacional en pacientes con LMC y respuesta molecular subóptima a ITKs.**

Casos	Edad	Sexo	Tratamiento en meses	Tratamiento previo			Tratamiento en curso			Secuenciación	BCR-ABL1/ABL1(%)	HRM	ARMSqPCR (%)	$\Delta$ MUT <sup>AR</sup>
				ITK	mg	Meses	ITK	mg	meses					
1	48	M	24				Imatinub	400	24	T315I	14.8	Mut	T315I (21)	53.2
2	45	M	24	Imatinub	400	12	Imatinub	600	12	No Mut	0.20	Mut	T315I (5.40)	
3	55	M	47				Imatinub	400	47	No Mut	1.00	Mut	T315I (2.35)	
4	43	M	61	Imatinub	400	36	Dasatinub	100	25	F317L	5.05	Mut	F317L (36)	0.1
5	50	M	23	Imatinub	400/800	8/5	Dasatinub	100	10	No Mut	0.13	Mut	F317L (8)	
6	20	M	38	Imatinub	400	25	Imatinub	800	13	No Mut	0.28	Mut	F317L (3.85)	
7	41	F	33	Imatinub	600	15	Nilotinub	800	18	No Mut	0.24	Mut	V299L (8.5)	0.4
8	78	F	24				Imatinub	600	24	No Mut	0.11	Mut	V299L (2.85)	
9	36	M	37	Imatinub	400	24	Nilotinub	400/800	12/1	No Mut	25.0	Mut	V299L (2)	
10	68	F	108	Imatinub	400/800	84/12	Nilotinub	200	12	No Mut	16.0	Mut	V299L (1)	
11	54	M	23				Imatinub	400	23	No Mut	3.33	Mut	G250E (11.5)	0.3
12	69	M	42				Imatinub	600	42	L298L*	0.28	Mut	No Mut	
13	51	F	55				Imatinub	600	55	No Mut	0.87	Mut	No Mut**	

$\Delta$ MUT<sup>AR</sup> : Tasa de acumulación de la mutación. L298L\*: Polimorfismo. No Mut: No mutado. Mut: Mutado. \*\* Secuencia no mutada para las 12 mutaciones estudiadas por ARMS- qPCR

Debido a que se dispone de muestras de archivo, obtenidas durante el seguimiento de la enfermedad residual fue factible realizar un estudio retrospectivo. Para el estudio inicial de mutaciones siempre se usó la muestra correspondiente al pico máximo de expresión del *BCR-ABL1*, esta elección aumenta las chances de encontrar el clon mutado. Usando ARMS-qPCR, se pudo rastrear retrospectivamente las mutaciones, permitiendo el monitoreo del clon mutado aun en baja concentración [Figura 27].



[Figura 27]: Evaluación de los niveles de transcritos *BCR-ABL* y del clon leucémico mutado por PCR cuantitativa en tiempo real en muestras de archivo consecutivas. Dinámica de los transcritos *BCR-ABL* mutados medidos por ARMS-qPCR (líneas rojas). Niveles de transcritos total *BCR-ABL* medidos por qRT-PCR (líneas verdes). La RMMa (0,1%) (líneas discontinuas horizontales). El asterisco (\*) marca el momento en el cual se detecta la mutación por primera vez.

En 4 casos, cada uno con diferentes mutaciones (G250E, T315I, V299L y F317L), se calculó la relación entre la cuantificación relativa usando ARMS-qPCR y la

cuantificación relativa de transcritos *BCR-ABL1* obtenidos por qRT-PCR. Como se muestra en la tabla 8, estas relaciones son indicativas de la tasa de acumulación para cada mutación ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}}$ ), aplicando la siguiente formula:

$$\Delta\text{MUT}^{\text{AR}} = \frac{\left( \frac{(\text{ARMS-qPCR})}{(\text{qRT-PCR})} \right)_{\text{T}_L} - \left( \frac{(\text{ARMS-qPCR})}{(\text{qRT-PCR})} \right)_{\text{T}_F}}{\Delta\text{Tiempo}}$$

$\Delta\text{MUT}^{\text{AR}}$  = Tasa de acumulación

$\text{T}_L$  = Fecha del último estudio

$\text{T}_F$  = Fecha del primer estudio

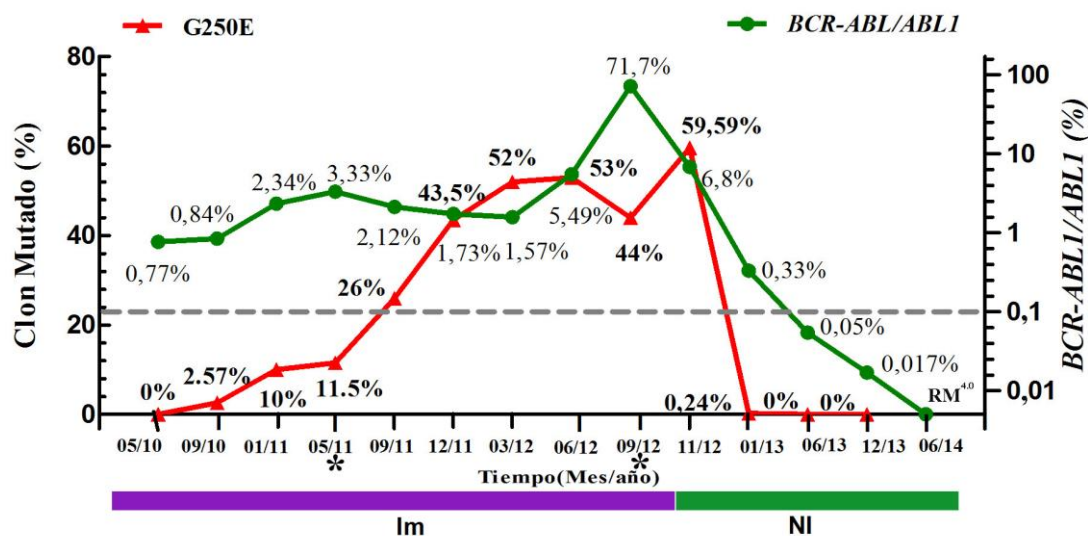
$\Delta\text{Tiempo}$  = diferencia en meses entre  $\text{T}_L$  y  $\text{T}_F$

La mutación T315I muestra una tasa de acumulación sensiblemente mayor ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}} = 53,2$ ; caso 1) comparada con las otras mutaciones F317L ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}} = 0,1$ ; caso 4), V299L ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}} = 0,4$ ; caso 7) o G250E ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}} = 0,3$ ; caso 11) [Tabla 8, Figura 27]. Esta mayor tasa de acumulación es acorde al fenotipo leucémico que se genera a partir de este cambio genético, siendo en este caso una enfermedad más agresiva e insensible a los tratamientos con ITKs disponibles hasta el momento de este análisis.

### 5.6 Seguimiento y evolución de pacientes portadores de mutaciones diagnosticados por métodos de alta sensibilidad (HRM/ARMSqPCR)

Se evaluó un paciente con LMC resistente mediante HRM/ARMS-qPCR, detectándose la mutación G250E en un 11%. Al analizar la muestra por secuenciación directa, la mutación no pudo ser detectada debido a que el clon mutado está por debajo del límite de detección del método [caso 11, Figura 27]. Si bien, la respuesta molecular se mantuvo constante (RMMin), la mutación se fue incrementando hasta alcanzar un 53%, momento en el cual el paciente pierde la respuesta citogenética y hematológica. Debido a esta mala evolución se inicia tratamiento con un ITK de segunda generación (nilotinib), teniendo en cuenta la mutación detectada. En los análisis sucesivos el

porcentaje de *BCR-ABL1* descendiendo al igual que la carga mutacional, lográndose una buena respuesta molecular y desaparición de la mutación [Figura 28].



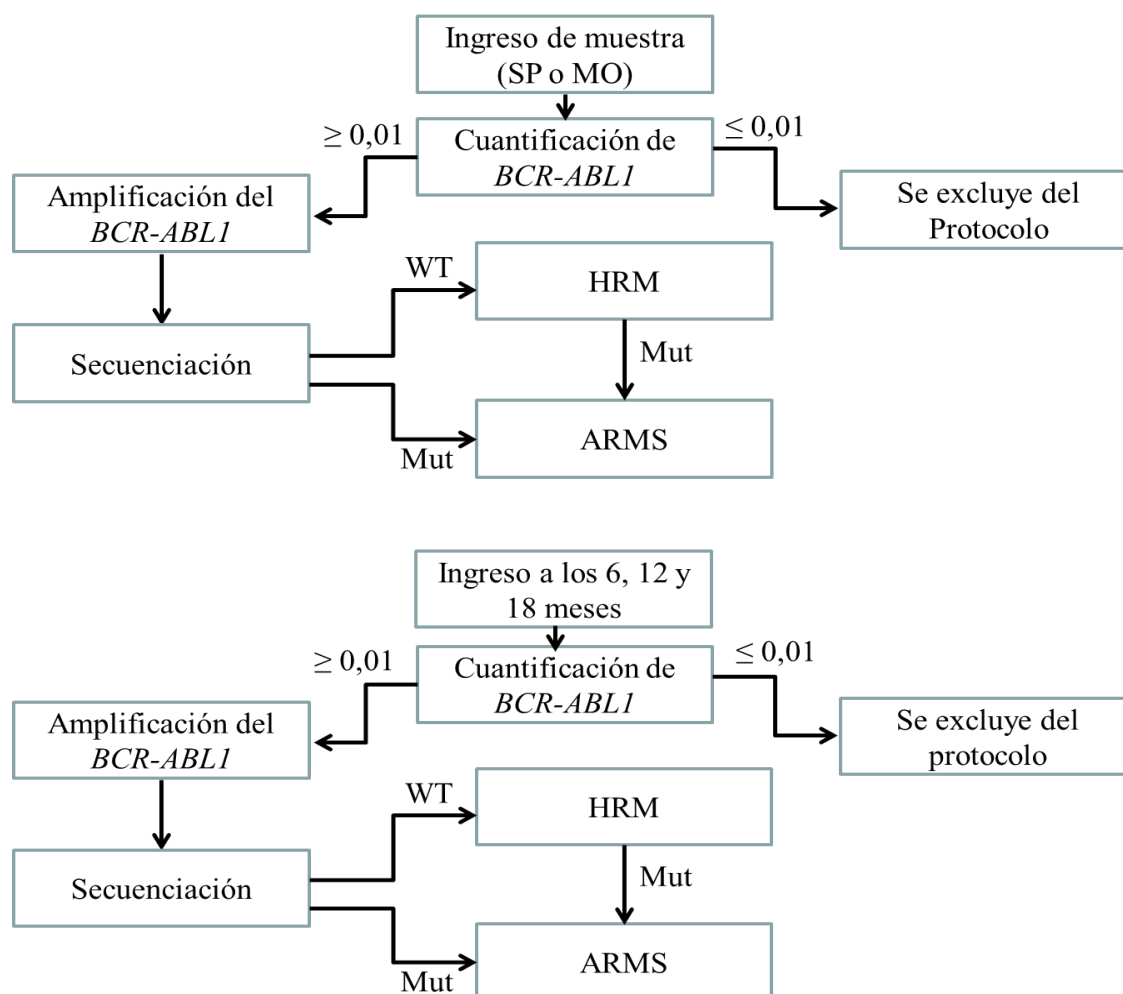
**Figura 28: Seguimiento del clon mutado y porcentaje de *BCR-ABL1* durante 49 meses.** El asterisco (\*) Muestra el momento en el cual se detectó la mutación y el momento en que se realizó el cambio de ITK. Luego de la intervención terapéutica la carga de la mutación y los transcritos *BCR-ABL1* disminuyeron a valores indetectables.

Otro caso, en el cual se realizó una detección temprana de mutaciones, fue en una paciente de 53 años con diagnóstico de LLA Ph<sup>+</sup> en recaída post-TMO bajo tratamiento con dasatinib. Mediante el método de secuenciación directa no se detectó ninguna mutación, sin embargo por HRM/ARMSqPCR, se evidenció la mutación T315I en un 15%, siendo el *BCR-ABL1* un 4,64%. Debido a que el hallazgo de mutaciones por métodos de mayor sensibilidad no son todavía reconocidos para realizar cambio de terapia, se continuó sin modificación del el tratamiento logrando reducción del *BCR-ABL1* a valores indetectables. Sin embargo 4 meses más tarde recayó, presentando 100% de transcritos *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> y detectándose la mutación T315I mediante secuenciación directa. En ese momento el estudio por ARMS-qPCR demostró que el clon mutado había ascendido al 100%. Se decidió tratar con ponatinib, teniendo en cuenta la mutación detectada, pero la paciente falleció antes de iniciar el tratamiento.

## 5.7 Protocolo Clínico: Estudio de mutaciones en LMC

### 5.7.1 Población estudiada

Los pacientes elegibles para el estudio mutacional fueron aquellos que se encontraban en fase crónica y presentaban resistencia al tratamiento con ITKs de segunda o tercera generación. A continuación se detalla el algoritmo de procesamiento de las muestras [Figura 29].

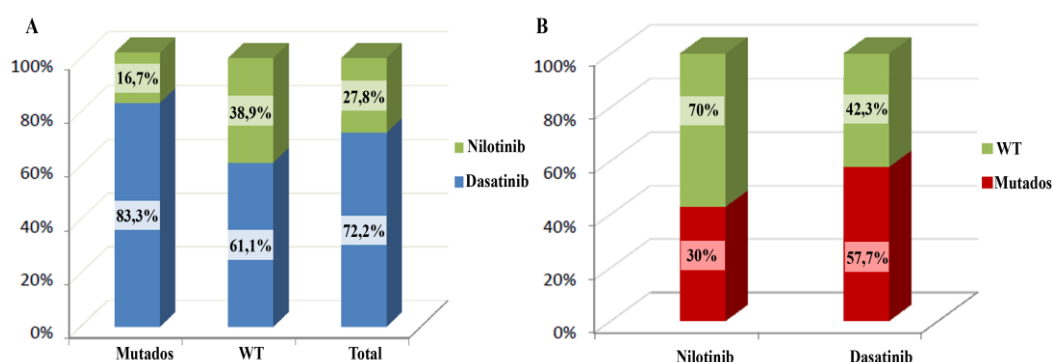


**Figura 29: Algoritmo de procesamiento de muestras.** Protocolo “Estudio de mutaciones en LMC en tratamiento con ITKs de segunda o tercera generación.

Se estudiaron 37 pacientes recibidos de múltiples centros de hematología del país, que se encontraban en tratamiento con ITKs de segunda y tercera generación. La mediana de edad al diagnóstico fue de 41,3 años (rango 4,3 a 63,4 años), siendo la mediana de edad al momento del estudio de mutaciones de 49,7 años (rango 19 a 68 años). El 86,5% (n=32) de los pacientes habían recibido imatinib en primera línea de tratamiento, el

10,8% (n=4) nilotinib y 2,7% (n=1) dasatinib. El 32,4% (n=12) de los pacientes habían recibido los tres inhibidores al momento del estudio. Los niveles de *BCR-ABL1* fueron testeados con el fin de evaluar la respuesta molecular antes de realizar el análisis de mutaciones en el dominio kinasa del *ABL1*. La mediana de tratamiento con ITKs de los pacientes estudiados fue de 5,1 años (rango 0,9 a 13,3 años). Un paciente se encontraba en tratamiento con ponatinib y los 36 restantes con ITKs de segunda generación [72,2% (26/36) con dasatinib y 27,8% (10/36) con nilotinib]. Teniendo en cuenta solamente los pacientes portadores de mutaciones, el 83,3% (15/18) estaba bajo tratamiento con dasatinib y el 16,7% (3/18) con nilotinib. [Figura 30A]. Sin embargo, si se considera la distribución de las mutaciones con respecto al ITK el 30% (3/10) recibían nilotinib y el 57,7% (15/26) dasatinib [Figura 30B].

El índice de sokal se pudo realizar en 35 pacientes, mediana 1,3 (rango 0,4 – 2,3), siendo el 60% (n=21) de riesgo alto, el 20% (n=7) de riesgo intermedio y el 20% (n=7) de riesgo bajo. Tres pacientes fallecieron durante el estudio, uno por complicaciones relacionadas al tratamiento, otro por recaída post-trasplante y el último por progresión a CB.



[Figura 30]: Distribución de mutaciones según el ITK. **A:** Distribución de pacientes mutados y no mutados según el tratamiento al momento del ingreso al protocolo. **B:** Distribución de las mutaciones con respecto al ITK. Mut: mutado, WT: no mutado.

### 5.7.2 Detección de mutaciones en el Dominio Kinasa del *BCR-ABL1*

El 48,7% (18/37) de los pacientes presentaron mutaciones, en total se detectaron 21 mutaciones: 33,3% (7/21) en el *P-loop*, 47,6% (10/21) en el *ATP-Binding* y 19,0% (4/21) en el Dominio Catalítico [Figura 31].

La mutación T315I se observó en el 22,2% (4/18) de los pacientes. Con respecto al índice de sokal, el 61,1% (11/18) de los pacientes portadores de mutaciones tuvieron

score alto, 22,2% (4/18) intermedio y el 16,7% (3/18) restante presentaban un sokal bajo.

Los pacientes que no presentaron mutaciones por secuenciación directa fueron estudiados por HRM/ARMS-qPCR. Esta metodología permitió incrementar la frecuencia de mutaciones en un 5% (1/20). En la [Tabla 41] se muestran las diferentes mutaciones y las variantes genéticas encontradas.

[Tabla 41]: Mutaciones en el Dominio Kinasa del gen *BCR-ABL1*

Variantes Genéticas			
Frecuencia de Mutación	Mutación	Cambio aminoacídico	Cambio nucleotídico
1	M244V	Met > Val	A > G
1	L248M	Leu > Met	C > A
2	G250E	Gly > Glu	G > A
1	Q252H	Gln > His	G > C
1	E255V	Glu > Val	A > T
1	Y253H	Tyr > His	T > C
3	V299L	Val > Leu	G > T
4	T315I	Thr > Ile	C > T
3	F317L	Phe > Leu	T > C
1	E355G	Glu > Gly	A > G
1	E355K	Glu > Lys	G > A
2	F359V	Phe > Val	T > G

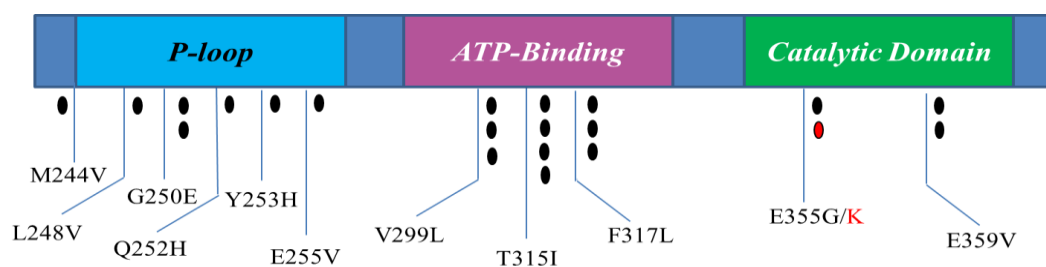


Figura 31: Tipo, frecuencia y distribución de mutaciones en el dominio kinasa del *ABL1*.

En la [Tabla 42] se observan los valores de *BCR-ABL1* y el porcentaje de mutaciones teniendo en cuenta la respuesta molecular al momento del análisis mutacional.

[Tabla 42]: Respuesta molecular al momento del análisis.

Total de pacientes	Respuesta molecular		
	% RMM <sub>e</sub>	% RMM <sub>in</sub>	% RMN
n=37	(n=13) 35,1	(n=9) 24,3	(n=15) 40,5
<b>Total de pacientes con mutación</b>			
n=18	(n=3) 16,7	(n=8) 44,4	(n=7) 38,9

La mediana de tratamiento de los pacientes que tuvieron mutaciones fue de 7,9 años (rango de 2 - 18 años) desde el diagnóstico. La mediana de tratamiento con un ITK de segunda generación de los pacientes que presentaban mutaciones fue de 3,3 años (rango 0,74 – 6,73 años). Se identificaron 3 pacientes con más de una mutación (n=2, dos mutaciones y n=1, tres mutaciones). Con respecto al tiempo de tratamiento con un ITK de primera generación y el tiempo con un ITK segunda generación no se observó diferencias significativas entre los pacientes mutados y no mutados (p=0,197 y p=0,666 respectivamente).

### 5.7.3 Cuantificación y seguimiento de los pacientes portadores de mutaciones

De las 20 muestras no mutadas por secuenciación directa, sólo en una se detectó la mutación F317L por HRM y ARMS-qPCR. El porcentaje de clon mutado detectado (15,4%) está por debajo del límite de sensibilidad de la secuenciación.

Los pacientes que presentaron mutaciones fueron evaluados clínicamente y en los casos en que fue posible el hematólogo realizó un cambio de terapia. Luego se determinó la dinámica del clon mutado y los transcritos *BCR-ABL1*, en muestras secuenciales, para evaluar la respuesta al ITK [Figura 32]. Se identificaron diferentes patrones de comportamiento con respecto a la cinética de los clones mutados (Khorashad JS 2006), los cuales serán discutidos más adelante. Durante el seguimiento de los 11 pacientes que cambiaron el tratamiento una vez detectada la mutación, un 45,4% (n=5 [Figura 32] casos 1, 3, 4, 5 y 12) respondió al cambio de ITK de manera satisfactoria, un 27,3% (n=3 [Figura 32] casos 7, 8 y 9) tuvo un descenso notable del clon mutado, no así de la respuesta molecular; el 27,3% (n=3 [Figura 32] casos 2, 10 y 14) restante no mostró ningún tipo de respuesta luego de la intervención terapéutica.



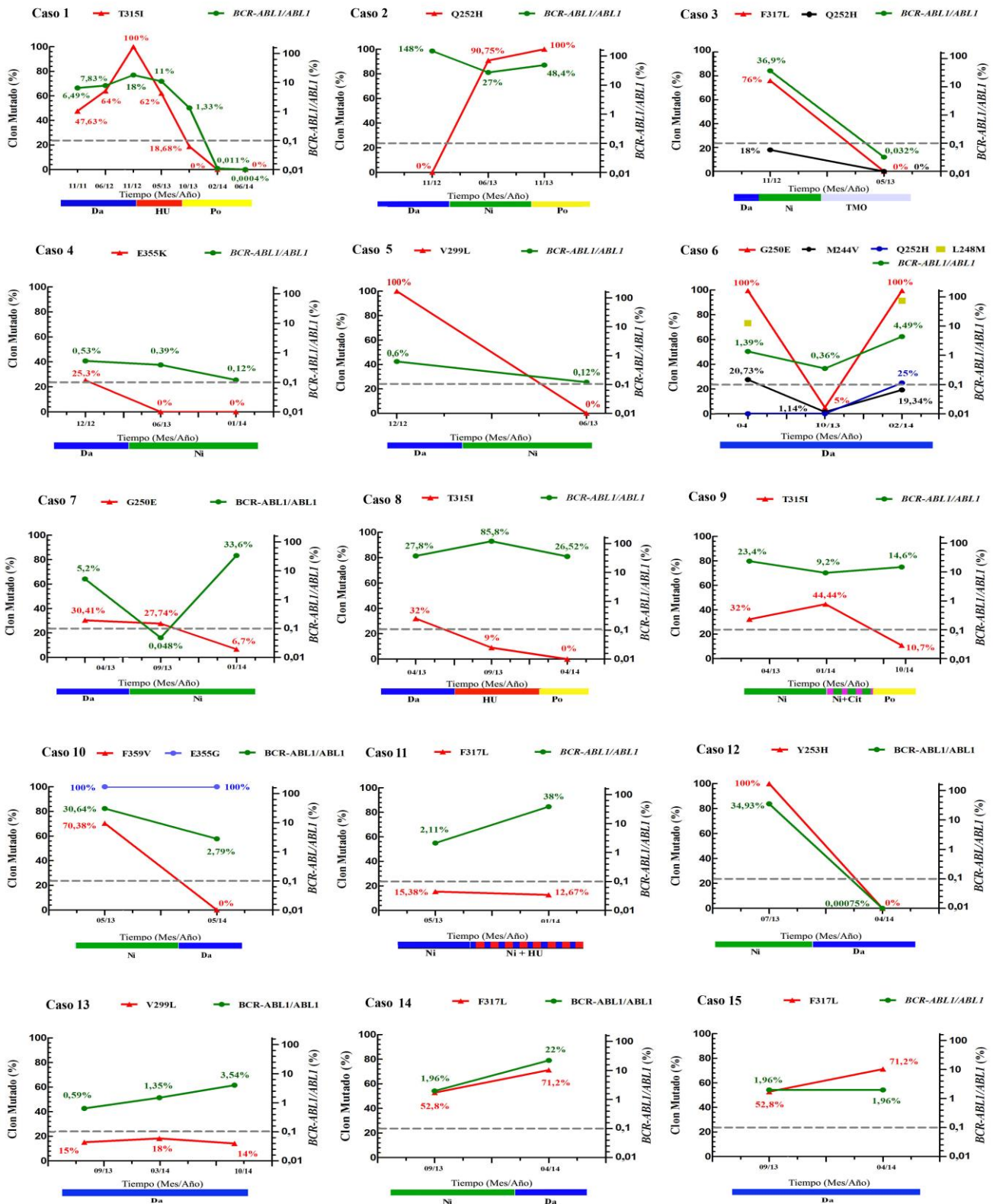
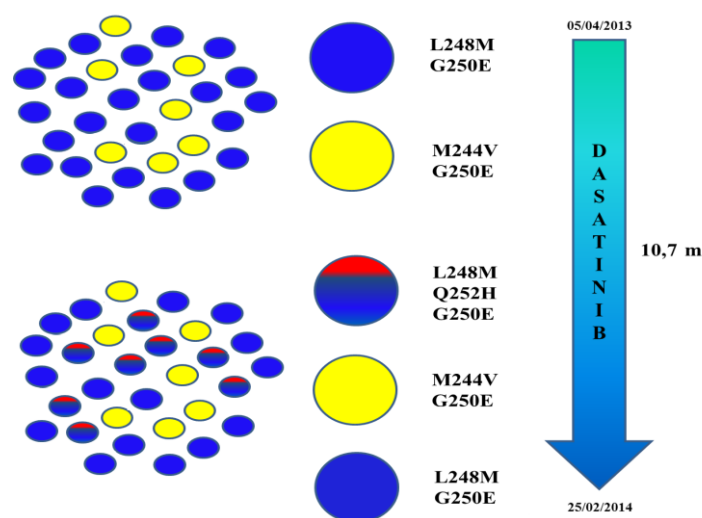


Figura 32: Evaluación de los niveles de transcritos *BCR-ABL1* y del clon leucémico mutado por PCR cuantitativa en tiempo real en muestras secuenciales. Dinámica de los transcritos *BCR-ABL1* mutados medidos por ARMS-qPCR (líneas rojas, azules y negras). Niveles de transcritos total *BCR-*

*ABL1* medidos por qRT-PCR (línea verde). La RMMa (0,1%) (Líneas discontinuas horizontales). Da: dasatinib, Ni: nilotinib, Po: ponatinib, HU: hidroxiurea, Cit: citarabina, TMO: trasplante de Médula ósea.

De los 18 pacientes con mutaciones [figura 32], solo se muestran 15 debido a que en 3 de ellos todavía no se cuenta con los datos de seguimiento.

El caso 6 de la [figura 32], diagnosticado en el año 2002, tratado inicialmente con imatinib y desde el 2007 con dasatinib, presentó mediante secuenciación directa 3 mutaciones (M244V, L248M, G250E). Con el fin de identificar si el paciente presentaba mutaciones compuestas (diferentes mutaciones dentro del mismo clon) o mutaciones policlonales (diferentes mutaciones en distintos clones) (Jamshid 2013) se precedió al clonado de la secuencia en *E. coli*. Mediante el clonado se identificó una nueva mutación (Q252H) no detectada por secuenciación convencional, además se demostró que las mutaciones eran compuestas y policlonales [figura 33]. Actualmente el paciente se encuentra bajo tratamiento con nilotinib y no ha transcurrido el tiempo suficiente para una nueva evaluación.



**Figura 33: Sucesiva adquisición de mutaciones.** La mutación Q252H no fue detectado por secuenciación directa. El clonado, la secuenciación y cuantificación confirmaron que la mutación G250E aparece como una mutación compuesta y presente en todos los clones.

## 5.8 Detección del rearrreglo molecular $e19a2^{P230}$

En julio de 2004, una mujer de 58 años se presentó con esplenomegalia, mostrando valores hematológicos alterados como se indica en la [Tabla 44]. El análisis de cariotipo realizado al diagnóstico fue 46,XX,t(9;22)(q34;q11) en 100% de las metafases

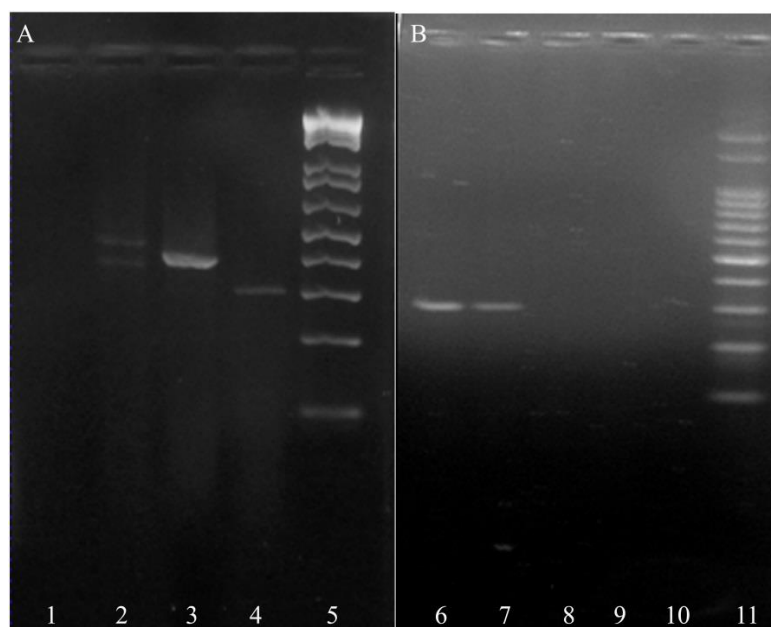
analizadas sin anomalías citogenéticas adicionales. El análisis de RT-PCR usando *primers* específicos para *M-BCR* dio una banda correspondiente a e14a2; por lo tanto, otros reordenamientos no fueron investigados. El paciente fue diagnosticado LMC en fase crónica, con riesgo de sokal alto e inicia tratamiento con imatinib 400 mg/d. Seis meses más tarde logra RHC, RCM y no se observó banda específica para *M-BCR* por RT-PCR. En agosto de 2007, el análisis de FISH de doble fusión detectó señales correspondientes a *BCR-ABL1* en el 10% de los núcleos interfásicos analizados; en consecuencia, la dosis de imatinib fue aumentada a 800 mg/d. En diciembre de 2008, la paciente sufre pérdida de respuesta citogenética (63% Ph<sup>+</sup>); por lo tanto, la terapia fue cambiada a nilotinib 800 mg/d, pero sólo logró una respuesta hematológica parcial. Seis meses más tarde comenzó el tratamiento con dasatinib, inicialmente en una dosis de 100 mg/d luego aumentó a 140 mg/d; sin embargo, debido a citotoxicidad, la dosis debió ser disminuida a 100 mg/d. En noviembre de 2012, los valores hematológicos y citogenéticos indicaron falla al tratamiento [Tabla 43], el cromosoma Ph se identificó en un 95% de células en metafase.

[Tabla 43]: Perfil hematológico del paciente

<b>Sangre periférica</b>	<b>Al diagnóstico</b>	<b>Al momento del análisis mutacional</b>
HGB (g/dl)	14.4	12,1
HCT (%)	45	35
RGB (x10 <sup>9</sup> /L)	24	68
RPLT (x10 <sup>9</sup> /L)	103.6	92
Mieloblastos (%)	0	0
Cayados Neutrófilos (%)	2	1
Neutrófilos (%)	77	88
Eosinófilos (%)	3	3
Basófilos (%)	3	2
Lymphocyte (%)	13	6
Monocitos (%)	0	0
<b>Aspirado de Médula ósea</b>		
Mieloblastos (%)	3	-

HCT: hematocrito; HGB: hemoglobina; RPLT: Recuento de plaquetas; RGB, recuento de glóbulos blancos.

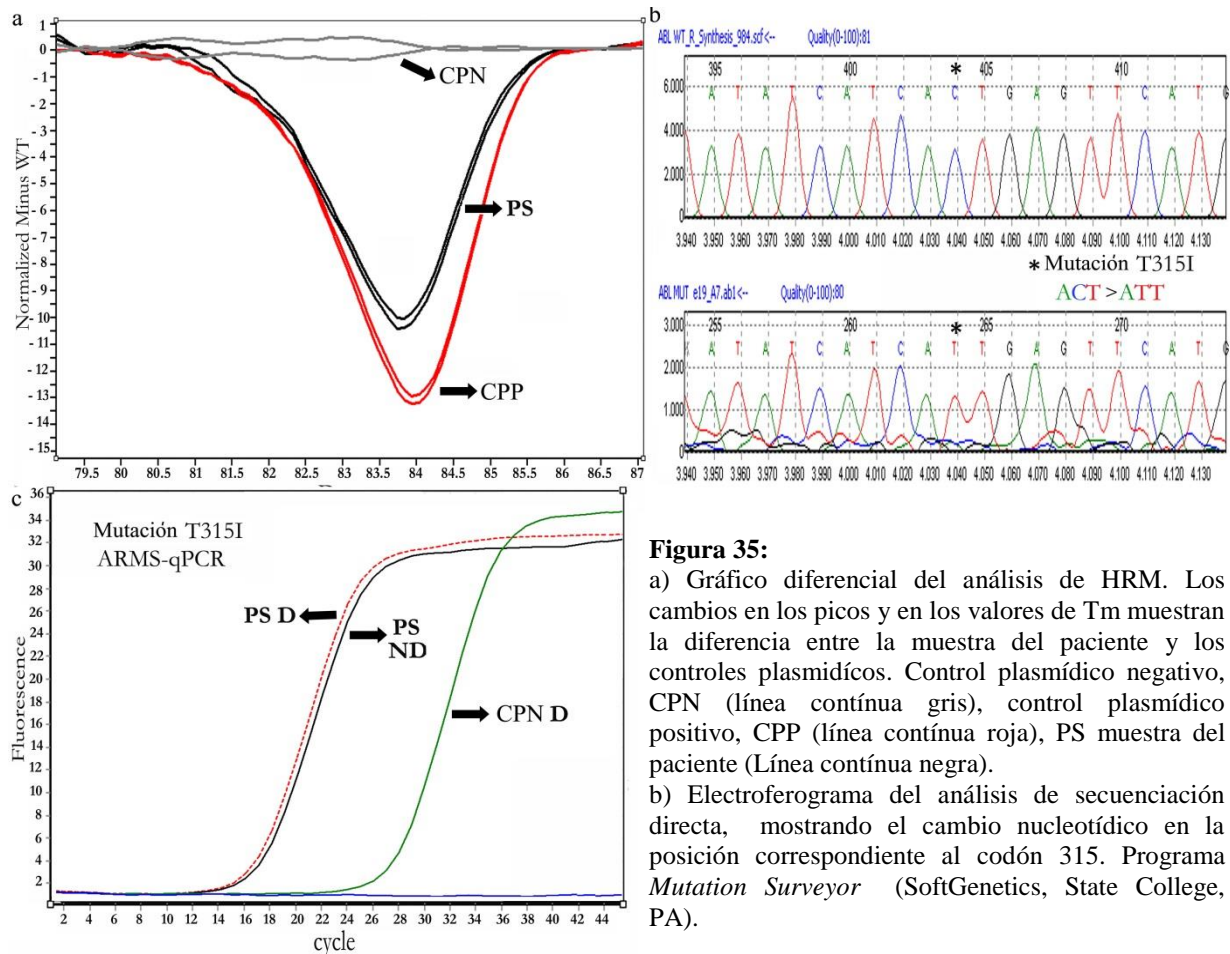
Debido a la baja respuesta a los tres ITKs, se realizó un análisis molecular más exhaustivo. La RT-PCR para el rearrreglo e13/e14-a2 resultará negativo; por lo tanto, se realizó una PCR múltiplex (Chasseriau 2004) con el fin de identificar otros posibles rearrreglos moleculares. La isoforma identificada correspondió a e19a2 [Figura 34].



**Figura 34:** Panel A, 1: Control negativo. 2: rearrreglos b2a2 y b3a2 de 371 y 446 pb. 3: rearrreglo e1a2 de 397 pb. 4: rearrreglo e19a2 de 301 pb. 5: Marcador de PM. Panel B, 6: PCR Multiplex, rearrreglo e19a2 de 301 pb. 7: PCR específica e19a2. 8: ausencia de amplificación, PCR específica b2a2/b3a2. 9: ausencia de amplificación, PCR específica e1a2. 10: Control negativo. 11: Marcador de PM.

### 5.8.1 Búsqueda de mutaciones en e19a2

Debido a la falta de respuesta y una vez identificado el rearrreglo molecular e19a2 se procedió a la búsqueda de mutaciones en el dominio kinasa del *ABL1*. En primera instancia se realizó el *screening* por HRM, el perfil fue compatible con la presencia de mutaciones en el dominio *ATP-binding*. Mediante secuenciación directa se identificó la mutación T315I [Figura 35], ante este hallazgo se procedió a la suspensión del tratamiento con dasatinib y se inició terapia con ponatinib.



c) Curvas de amplificación del análisis de ARMS-qPCR específico para la mutación T315I. PSD muestra del paciente amplificada con *primers* discriminantes de la mutación (línea continua negra). PSND muestra del paciente amplificada con *primers* no discriminantes (línea punteada roja). CPND control plasmídico negativo amplificado con *primers* discriminantes (línea continua verde).

### 5.8.2 Determinación y seguimiento del porcentaje de transcritos e19a2 y clon mutado

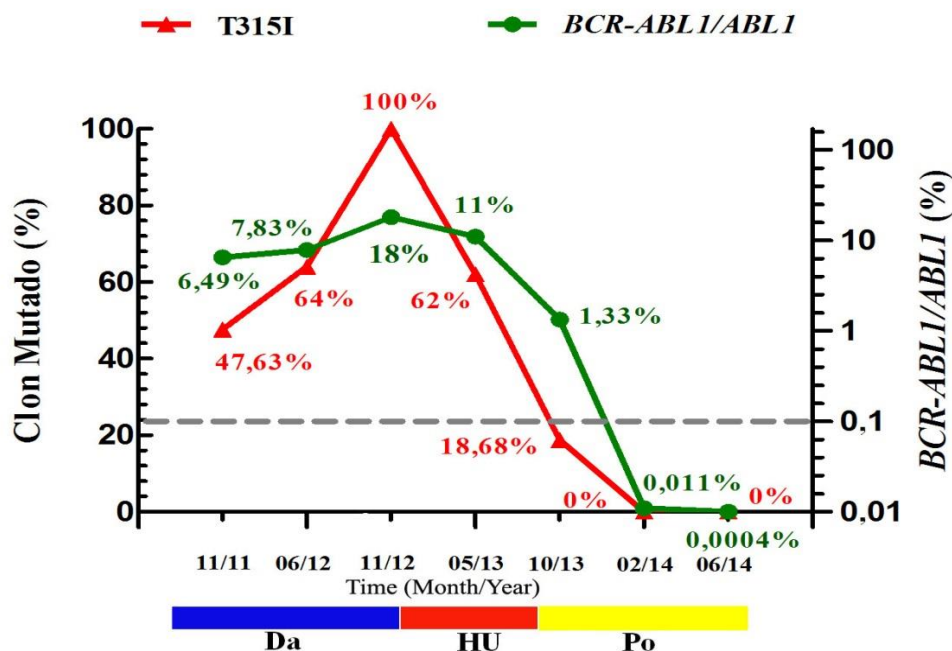
Se procedió a cuantificar el porcentaje de *BCR-ABL1* y el clon *BCR-ABL1* mutado mediante ARMS-qPCR. Con el objetivo de cuantificar los transcritos e19a2, se clonó un fragmento de ADN de 1.263 bp en un plásmido, para construir la curva de calibración. La cuantificación relativa de los transcritos se realizó mediante PCR *one-step* en tiempo real, con Sonda específica TaqMan y *primers* para el reordenamiento de e19a2.

Al momento del estudio, el porcentaje de *BCR-ABL1/ABL1* fue del 18%, además se analizaron dos muestras previas al estudio mutacional [Figura 36].

Se procedió a la cuantificación de mutaciones en el dominio kinasa del *ABL1*, al momento del análisis la mutación T315I se encontraba en un 100%. Una vez iniciada la



terapia con ponatinib, se observó una rápida respuesta molecular con un descenso importante de transcritos *BCR-ABL1/ABL1* y del porcentaje de clon mutado.



**Figura 36:** Análisis molecular del paciente portador del rearrreglo molecular *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>. El gráfico indica las mediciones secuenciales de los transcritos *BCR-ABL1/ABL1* (Línea verde) y el porcentaje de clon mutado (Línea roja) en un periodo de 26 meses de tratamiento. Da, dasatinib; Hu, hidroxiurea; Po, ponatinib.

## 5.9 Análisis de los genes *LYN* y *PTEN*

### 5.9.1 Población seleccionada

Con la finalidad de investigar otros mecanismos de resistencia no vinculados a la adquisición de mutaciones en el dominio kinasa del *ABL1*, se estudió la expresión de los genes *LYN* y *PTEN* en pacientes con buena respuesta y con resistencia a los ITK. Además, como control se analizaron 40 individuos sanos (IDS). El análisis de los genes *LYN* y *PTEN* se realizó en 139 pacientes: 88 con LMC resistentes a ITKs y 51 en FC y respuesta molecular  $\geq 3$  log de reducción. La población se dividió teniendo en cuenta la fase de la enfermedad, tratamiento recibido y estado mutacional. Los pacientes catalogados como respondedores óptimos (RO) fueron aquellos en fase crónica con valores de *BCR-ABL1/ABL1*  $\leq 0,1\%$  [Tabla 44].

**[Tabla 44]: Distribución de la población analizada.**

	Pacientes resistentes				Total
	RO	FC	FA y CB	Mutados	
Imatinib	35	29	9	2	75
Nilotinib	5	6	3	8	22
Dasatinib	11	11	10	10	42
Total	51	46	22	20	139

RO: Respondedores óptimos, FC: Fase Crónica, FA: Fase Acelerada, CB: Crisis Blática

## 5.10 Expresión de los genes *LYN* y *PTEN*

### 5.10.1 Expresión de *LYN* en pacientes resistentes a los ITKs

La expresión de los genes *LYN* fue comparada entre los diferentes grupos de tratamiento en función de evaluar su rol en la progresión de la enfermedad y resistencia al tratamiento. Los valores de expresión de *LYN* en los diferentes grupos de tratamiento mostraron un incremento significativo solo en los pacientes que se encontraban tratados con imatinib o nilotinib en FA o CB [Tabla 45 - Figura 37].

No se observaron diferencias significativas entre IDS y el grupo de pacientes respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib (RO-IN); estos resultados sugieren que los pacientes con buena respuesta a la terapia con ITK presentan valores de expresión comparables a los IDS. Dado que *LYN* es una *src* kinasa y dasatinib actúa sobre ésta, los pacientes con respuesta óptima a este inhibidor (RO-D), presentaron valores de expresión de *LYN* menores a los del grupo control [Tabla 45].

[Tabla 45]: Expresión del gen *LYN* en los pacientes con LMC tratados con ITKs.

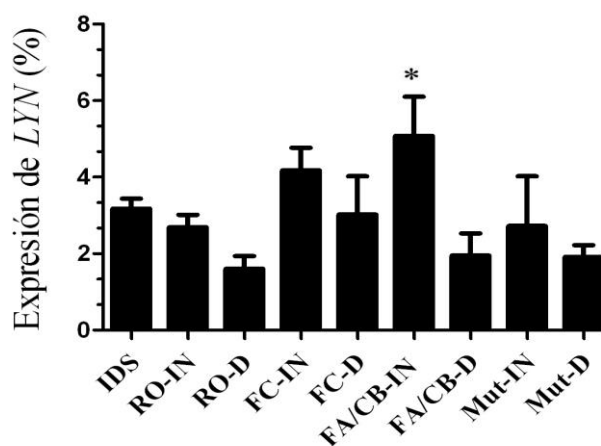
Grupos	<i>LYN</i> (X ± ES)	<i>p</i> valor
IDS (controles) (n=40)	3,176 ± 0,2624	
RO-IN (n=40)	2,693 ± 0,3225	0,2486
FC-IN (n=35)	4,174 ± 0,5954	0,1139
FA/CB-IN (n=12)	5,075 ± 1,027	0,0119*
Mut-IN (n= 10)	2,722 ± 1,300	0,5833
RO-D (n=11)	1,606 ± 0,3305	0,0048 <sup>a</sup>
FC-D (n=11)	3,022 ± 1,002	0,8313
FA/CB-D (n=10)	1,947 ± 0,5856	0,0460 <sup>a</sup>
Mut-D (n= 10)	1,914 ± 0,3077	0,0260 <sup>a</sup>

IDS: Individuos sanos, RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib, FC-IN: Fase crónica resistente tratados con imatinib o nilotinib, FA/CB-IN: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con imatinib o nilotinib, Mut-IN: Pacientes portando mutaciones tratados con imatinib o nilotinib

RO-D: Respondedores óptimos tratados con dasatinib, FC-D: Fase crónica resistente tratados con dasatinib, FA/CB-D: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con dasatinib, Mut-D: Pacientes portando mutaciones tratados con dasatinib

\*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

<sup>a</sup>: Diferencias estadísticamente significativas, disminución de la expresión de *LYN* relacionadas al tratamiento con dasatinib.



**Figura 37: Porcentaje de expresión del gen *LYN*.**

La expresión de *LYN* fue estadísticamente significativa (\*) en el grupo FA/CB-IN vs el grupo control.

IDS: Individuos sanos

RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib

RO-D Respondedores óptimos tratados con dasatinib

FC-IN: Pacientes resistentes en Fase crónica tratados con imatinib o nilotinib

### 5.10.2 Expresión de *PTEN* en pacientes resistentes a ITKs

La expresión de *PTEN* fue similar en todos los grupos de pacientes ( $p=0,4275$ ) [Tabla 46 - Figura 38]. En un primer análisis podría concluirse que la expresión de *PTEN* no estaría asociada con la resistencia al tratamiento observada en estos pacientes.



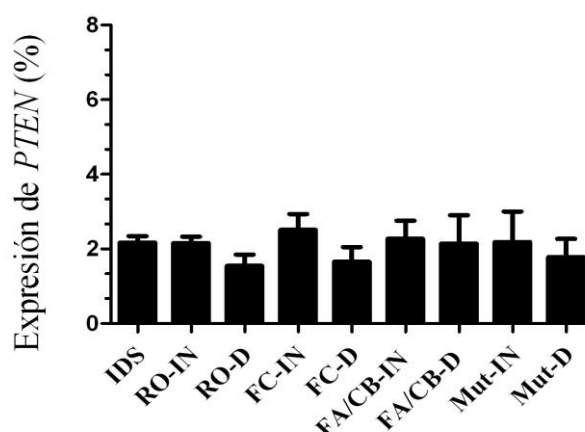
**[Tabla 46]: Expresión del gen *PTEN* en los pacientes con LMC tratados con ITKs.**

Grupos	<i>PTEN</i> (X ± ES)	<i>p</i> valor
IDS (controles) (n=40)	2,172 ± 0,1683	
RO-IN (n=40)	2,156 ± 0,1750	0,9452
FC-IN (n=35)	2,509 ± 0,4251	0,4600
FA/FC-IN (n=12)	2,271 ± 0,4829	0,8069
Mut-IN (n= 10)	2,186 ± 0,8203	0,9792
RO-D (n=11)	1,545 ± 0,3049	0,0783
CP-D (n=11)	1,545 ± 0,3049	0,0783
AP/BP-D (n=10)	2,144 ± 0,7613	0,9553
Mut-D (n= 10)	1,781 ± 0,4859	0,3479

IDS: Individuos sanos, RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib, FC-IN: Fase crónica resistente tratados con imatinib o nilotinib, FA/CB-IN: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con imatinib o nilotinib, Mut-IN: Pacientes que portan mutaciones tratados con imatinib o nilotinib

RO-D: Respondedores óptimos tratados con dasatinib, FC-D: Fase crónica resistente tratados con dasatinib, FA/CB-D: Fase acelerada/ Crisis blástica tratados con dasatinib, Mut-D: Pacientes que portan mutaciones tratados con dasatinib

\*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

**Figura 38: Porcentaje de expresión del gen *PTEN*.**

La expresión de *PTEN* fue constante en los diferentes grupos analizados.

IDS: Individuos sanos

RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib

OR-D Respondedores óptimos tratados con dasatinib

FC-IN: Pacientes resistentes en Fase crónica tratados con imatinib o nilotinib

### 5.10.3 Relación entre la expresión de los genes (*LYN/PTEN*)

A diferencia de los resultados obtenidos con *LYN* y *PTEN*, al analizar ambos genes como una relación (*LYN/PTEN*), además del grupo FA/CB-IN, se observó diferencias significativas en los pacientes resistentes en FC-IN. Lo que sugiere, que la relación entre los dos genes sería más informativa que cada uno por separado [Tabla 47 -

**Figura 39].** Los pacientes resistente portando mutaciones en el dominio kinasa no mostraron aumentos en *LYN*, *PTEN* y *LYN/PTEN*, independientemente del tratamiento; lo cual señalaría a las mutaciones como el mecanismo responsable de la resistencia y la expresión de estos genes no estaría involucrada [Tabla 45, 46 y 47].

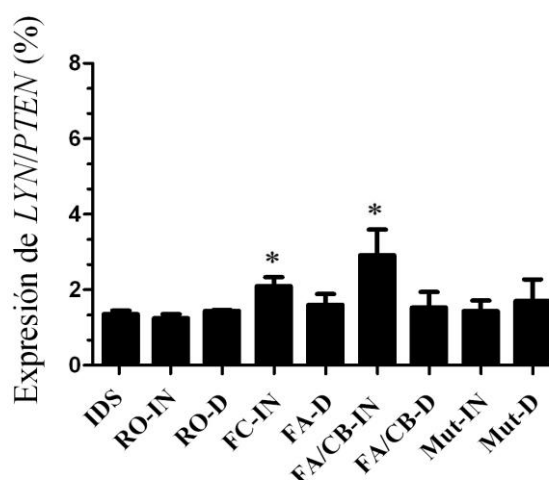
**Tabla 47: Expresión de la relación *LYN/PTEN* en pacientes con LMC tratados con ITKs.**

<b>Grupos en tratamiento con imatinib o nilotinib</b>	<b><i>LYN/PTEN</i> ratio (X ± SD)</b>	<b>p valor</b>
IDS (controles) (n=40)	1,35 ± 0,61	
RO (n=40)	1,25 ± 0,69	0,4727
FC-IN (n=35)	2,01 ± 1,39	0,0031*
FA/CB-IN (n=12)	2,91 ± 2,34	0,0003*
Mut-IN (n= 10)	1,43 ± 0,89	0,2810
<b>Grupos en tratamiento con dasatinib</b>	<b><i>LYN/PTEN</i> ratio (X ± SD)</b>	<b>p valor</b>
IDS (controles) (n=40)	1,35 ± 0,61	
RO (n=11)	1,44 ± 0,07	0,6271
FC (n=11)	1,60 ± 0,97	0,3026
FA y CB (n=10)	1,53 ± 1,31	0,5512
Mut-D (n= 10)	1,70 ± 1,82	0,8394

IDS: Individuos sanos, RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib, FC-IN: Fase crónica resistente tratados con imatinib o nilotinib, FA/CB-IN: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con imatinib o nilotinib, Mut-IN: Pacientes que portan mutaciones tratados con imatinib o nilotinib

RO-D: Respondedores óptimos tratados con dasatinib, FC-D: Fase crónica resistente tratados con dasatinib, FA/CB-D: Fase acelerada/ Crisis blástica tratados con dasatinib, Mut-D: Pacientes que portan mutaciones tratados con dasatinib

\*: Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.



**Figura 39: Porcentaje de expresión de la relación *LYN/PTEN*.**

La relación *LYN/PTEN* mostró diferencias estadísticamente significativas (\*) en dos grupos de pacientes resistentes vs grupo control: FC-IN y FA/CB-IN.

IDS: Individuos sanos

RO-IN: Respondedores óptimos tratados con imatinib o nilotinib

OR-D Respondedores óptimos tratados con dasatinib

FC-IN: Pacientes resistentes en Fase crónica tratados con imatinib o nilotinib

FC-D: Pacientes resistentes en Fase crónica tratados con dasatinib

FA/CB-IN: Fase acelerada/Crisis blástica tratados con imatinib o nilotinib

FA/CB-D: Pacientes en Fase acelerada/Crisis blástica tratados con dasatinib

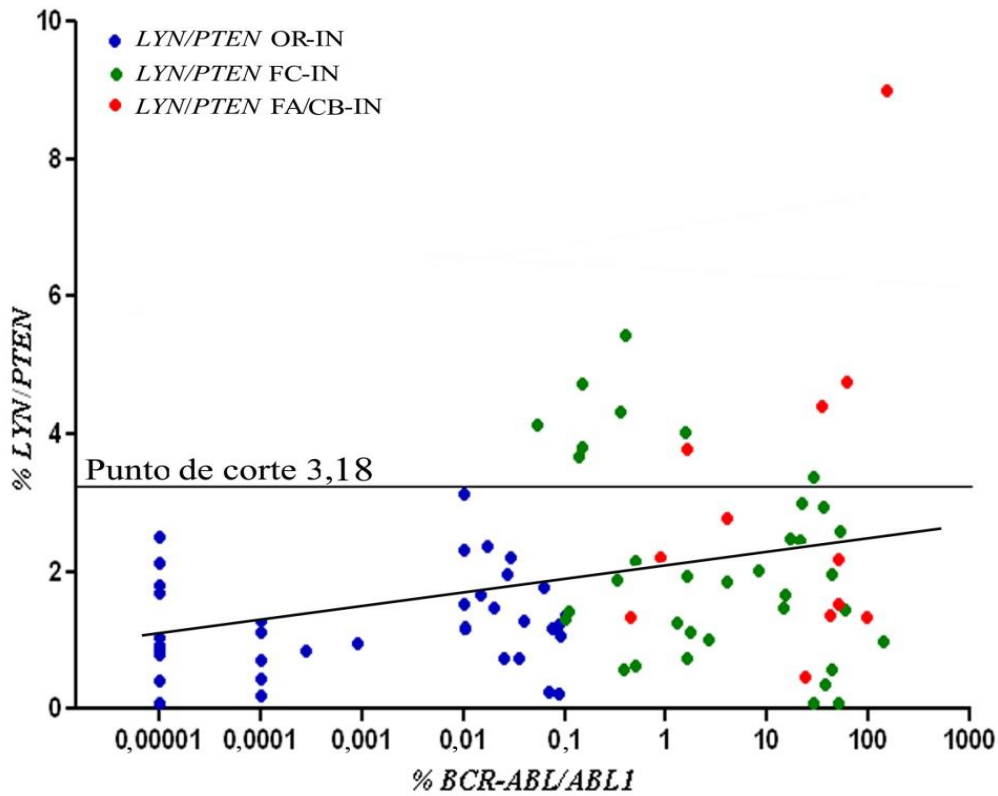
#### 5.10.4 Correlación entre *LYN/PTEN* y transcriptos *BCR-ABL1* en pacientes tratados con imatinib y nilotinib

En función de estimar la utilidad de la relación *LYN/PTEN* en la progresión de la enfermedad se realizó una correlación con los transcriptos *BCR-ABL1*. En el análisis solo se incluyeron los pacientes tratados con ITKs sin actividad sobre *src*-quinasas (imatinib y nilotinib). Los pacientes tratados con dasatinib fueron excluidos ya que este ITK es un inhibidor dual y por lo tanto inhibe la expresión *LYN*.

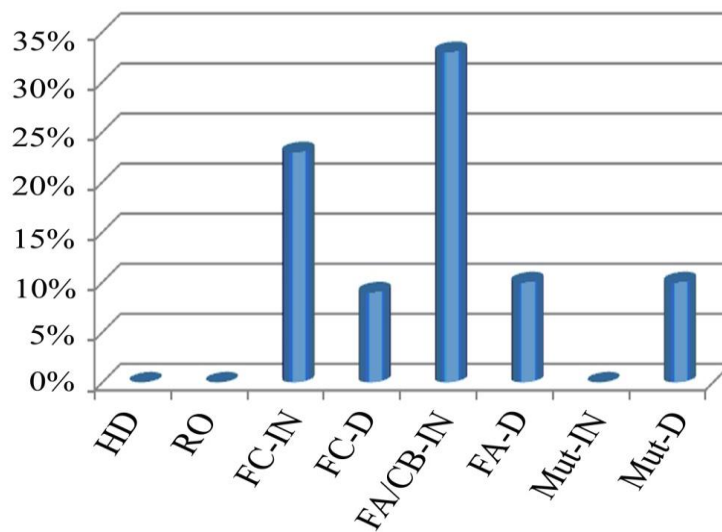
La relación *LYN/PTEN* mostró un nivel de correlación directa con los transcriptos *BCR-ABL1* (Spearman  $p < 0,00360$ ) [Figura 40].

Con el fin de determinar un *cut off* que permita definir los casos con niveles incrementados de *LYN/PTEN* respecto del grupo control, se estableció un valor de corte calculado de la siguiente manera: Media (IDS) + 3DS:  $1,35 + 3 \times 0,61 = 3,18$ .

Teniendo en cuenta este valor de corte, se identificó que el 23% de los casos en FC (8/35) y el 33% en FA/CB (4/12) presentaban una relación de *LYN/PTEN* superior al *cut off* [Figura 41]. En estos casos la resistencia al tratamiento podría asociarse con el aumento de la relación de *LYN/PTEN* en ausencia de mutaciones.



**Figura 40: Correlación entre *LYN/PTEN* y los transcritos *BCR-ABL1* en pacientes con LMC tratados con no-*src* ITKs.** Correlación de Spearman ( $p < 0,0036$ ); la línea inclinada muestra la correlación de Spearman positiva ( $r = 0,31$ ). La línea horizontal indica el valor de corte para *LYN/PTEN* obtenido a partir de los valores de IDS.



**Figura 41: Frecuencia de casos con valores de *LYN/PTEN*  $\geq 3,18$**   
 Porcentaje calculado teniendo en cuenta el valor de corte de IDS ( $X + 3SD = 3,18$ ).

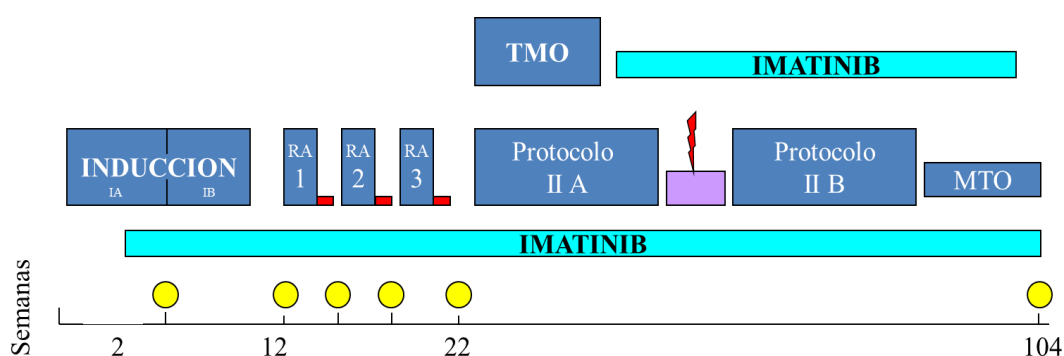
Valores altos de la relación *LYN/PTEN* se observó solo en pacientes resistentes no mutados que reciben un imatinib o nilotinib (23% en FC y 33% en FA/CB). En los restantes grupos de respuesta y tratamiento la relación *LYN/PTEN*, fue menor del 10%.

IDS: Dadores sanos, RO: Respondedores óptimos, FC: Fase crónica, FA: Fase acelerada, CB: Crisis blástica, IN: imatinib o nilotinib, D: dasatinib. Mut: pacientes portadores de mutaciones.

## 5.11 LLA Ph<sup>+</sup> en población pediátrica: Protocolo Clínico, GATLA (Grupo Argentino de Tratamiento de la Leucemia Aguda) LLA-Ph<sup>+</sup> 2011

### 5.11.1 Población estudiada

Los pacientes incorporados al estudio fueron aquellos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda *Philadelphia* positivo con un rango de edad de 1 a 21 años. Todos los pacientes enrolados al estudio clínico GATLA LLA-Ph<sup>+</sup>2011 recibieron vincristina, daunorubicina, prednisolona, asparaginasa, metrotexato e imatinib. El ITK se administró 300 mg/m<sup>2</sup>/día a partir del día 15 de la inducción hasta el inicio del acondicionamiento para el trasplante o hasta el final de la terapia de mantenimiento. El protocolo inicial consiste en una inducción IA (33 días) y IB (28 días), consolidación RA1, RA2 y RA3 (21 días cada bloque), re-inducción (Protocolo II A y B, 36 días cada uno) y mantenimiento hasta completar 2 años de tratamiento. El trasplante en los pacientes elegibles se realiza después del tercer bloque de consolidación [Figura 42].



**Figura 42:** Esquema representativo del protocolo de tratamiento GATLA LLA-Ph<sup>+</sup>2011

- Factor estimulante de colonias de granulocitos
- Cuantificación de *BCR-ABL1*
- Mantenimiento Intermedio / RDT cr (Radioterapia craneal)

El monitoreo de la enfermedad Mínima Residual (EMR), fue llevado a cabo mediante la cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> en diferentes fases del tratamiento. El

estudio de la EMR se realizó al final de la inducción AI, previo a RA1, RA2, RA3, previo al protocolo II (Fase IIA, IIB) y durante el mantenimiento o post-trasplante.

### 5.11.2 Determinación del valor basal de referencia

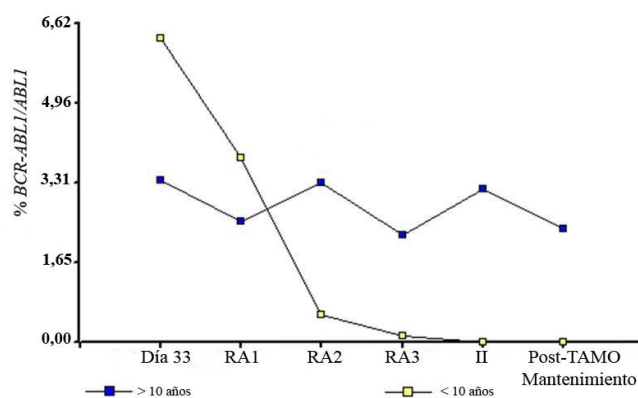
Se estudió el valor de *BCR-ABL1* en médula ósea de 11 pacientes pediátricos con LLA<sup>P190</sup> al diagnóstico, a fin de determinar el valor basal de referencia y estimar la reducción logarítmica de los transcritos. El valor medio de *BCR-ABL1*(e1a2)/*ABL1* obtenido en el grupo control fue de 55,5% (rango 29% - 92%). La respuesta molecular fue definida como óptima (RMO) o indetectable si la relación *BCR-ABL1/ABL1* era  $\leq 0,055\%$ , es decir 3 logaritmos de reducción.

### 5.11.3 Cuantificación de la enfermedad mínima residual en pacientes LLA-Ph<sup>+</sup>

Un total de 25 pacientes (hombres:mujeres, 16:9) se incorporaron al estudio a partir de noviembre de 2011 hasta julio de 2014. La edad media fue de 7 años (rango 2-19 años). El punto de ruptura más frecuente fue e1a2 en el 96% de los pacientes y sólo uno presentó un reordenamiento correspondiente al *major* BCR (b3a2). Durante el seguimiento (mediana: 15 meses) cinco pacientes (20%) fallecieron: 3 por sepsis, 1 por complicaciones post-TMO y 1 por progresión de la enfermedad. Dos pacientes tuvieron que rotar a dasatinib debido a recaída de la enfermedad: uno en sistema nervioso central y el otro post-TMO. Nuestros resultados preliminares mostraron que la supervivencia global fue del  $79\% \pm 10\%$  y la supervivencia libre de eventos (muerte, recaída de la enfermedad y aumento de *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>) fue del  $67\% \pm 10\%$  a los 12 meses.

Se observó una RMO en 13,3% de los pacientes en AI, 41,2% en RA1, 33,3% en RA2, 45,5% en RA3 y 76,9% durante el Protocolo II. De los 17 pacientes evaluables en mantenimiento y post-TMO, el 88% (15/17) obtuvo valores RMO y en 13 de ellos la RMO fue indetectables.

Al evaluar la cinética del clon tumoral durante el tratamiento respecto a la edad, los pacientes menores de 10 años alcanzaron una RMO superior a los mayores de 10 años (100% vs 33%,  $p=0,045$ ) durante el protocolo II, mostrando una respuesta molecular sostenida y más profunda [Figura 43]. Otros parámetros clínicos evaluados no mostraron una relación con RMO en las diferentes etapas del tratamiento.



**Figura 43:** Porcentaje de *BCR-ABL1* de la población de pacientes LLA Ph<sup>+</sup> mayores y menores de 10 años en diferentes etapas del tratamiento.

El monitoreo molecular no fue mandatorio en las decisiones terapéuticas, sin embargo incrementos del *BCR-ABL1*<sup>P190</sup>, condujeron a un estudio exhaustivo del paciente y el mayor valor clínico de la medición fue previo al trasplante y al finalizar el mantenimiento. Para evaluar la eficacia integral del tratamiento se requiere de un seguimiento prolongado.

## **6. Discusión**



### 6.1 *Screening*, confirmación y cuantificación de mutaciones por HRM y ARMS-qPCR

La LMC es la primera enfermedad oncológica asociada a un desorden genético, caracterizada por la translocación entre los cromosomas 9 y 22, originando el gen de fusión *BCR-ABL1*. Teniendo en cuenta que la etiopatogenia de la LMC radica en la presencia de este gen quimérico cuyo producto oncogénico es una proteína tirosina kinasa, las estrategias terapéuticas apuntan a inhibir su actividad. El desarrollo de los ITK ha revolucionado el tratamiento de esta patología, cambiado favorablemente el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, algunos pacientes generan resistencia a la terapia, lo cual se debe en gran medida a la presencia de mutaciones en el Dominio Kinasa del gen *BCR-ABL1*. Aunque los niveles de transcritos *BCR-ABL1* y el estudio de la dinámica del clon mutado permiten definir el rol de la mutación en la resistencia y elección del tratamiento, la detección temprana de mutaciones y su significado en la resistencia sigue siendo controversial.

Las presencia de mutaciones puntuales en el *BCR-ABL1* es la causa más frecuente asociada a la falta o pérdida de la respuesta en pacientes con LMC tratados con ITKs (Gorre 2001; Branford 2002). Estas mutaciones impiden o dificultan la unión del inhibidor a la proteína oncogénica, por lo tanto, ésta sigue manteniendo su activación constitutiva de tirosina kinasa. Hasta el momento se han detectado más de 100 mutaciones diferentes que afectan a más de 70 aminoácidos en el dominio kinasa del *BCR-ABL1* con diferente grado de relevancia clínica (Mathisen 2011). Estas mutaciones pueden preceder o acompañar la recaída o progresión de la enfermedad; por tal motivo es sumamente importante la detección temprana de las mismas a fin de seleccionar el tratamiento más apropiado. Varios métodos con diferente sensibilidad y selectividad han sido empleados para la detección de mutaciones. El más comúnmente utilizado es la secuenciación directa, con una sensibilidad de aproximadamente 20% (Branford 2003). Se han reportado otras metodologías más sensibles como pirosecuenciación y D-HPLC (Clayton 2000), sin embargo, su utilidad en el análisis de rutina se ve limitado debido a su alto costo. Por lo tanto, un método relativamente simple, rápido, de bajo costo y con alta capacidad de *screening* es deseable en este contexto (Polakova 2008; Doi 2009).

En este trabajo se ha demostrado a través de diferentes ensayos con controles plasmídicos y muestras de pacientes que la combinación de HRM con ARMS-qPCR es

una estrategia útil para la detección de mutaciones en el dominio kinasa del *BCR-ABL1* que cumple con los requisitos mencionados.

Para el desarrollo de la metodología HRM/ARMS-qPCR fue necesario disponer de controles positivos, para lo cual se generaron plásmidos con las mutaciones de mayor relevancia clínica. Se ha llevado a cabo el *screening* de las mutaciones del dominio kinasa del *ABL1* usando HRM y posterior confirmación y cuantificación por ARMS-qPCR. La especificidad del HRM fue evaluada mediante el análisis de muestras de sangre de donantes sanos y pacientes con LMC portando diferentes mutaciones, detectadas previamente por secuenciación directa. Las curvas de *melting* de baja resolución y los gráficos diferenciales no mostraron falsos positivos ni falsos negativos corroborando la alta especificidad del método. Un exhaustivo análisis de diluciones de plásmidos demostró una selectividad del 1,5% al 5%, dependiendo de la mutación investigada.

Teniendo en cuenta el alto poder de detección del HRM, se llevó a cabo el *screening* de mutaciones en 50 pacientes con LMC que habían perdido la respuesta citogenética durante el tratamiento con ITK y catalogados como no mutados por el método de secuenciación directa. El HRM identificó 13 casos de los 50 con un perfil consistente con algún cambio nucleotídico. Mediante el análisis de ARMS-qPCR en los casos positivos por HRM, se identificaron y cuantificaron 8 mutaciones de relevancia clínica en el tratamiento con ITK. De esta forma se incrementó la detección de mutaciones en un 16% (8/50). En todos los casos el porcentaje de clon mutado estuvo cerca o por debajo del límite de detección de la secuenciación directa (rango 1,2% - 23%) [Tabla 39]. El método ARMS-qPCR permitió evaluar la proporción del clon mutado, mediante el cálculo de la relación entre el *BCR-ABL1* mutado y los transcritos totales de *BCR-ABL1* medidos por PCR en tiempo real. Debido a que este estudio fue desarrollado solo para identificar mutaciones asociadas a resistencia, especulamos que los 5 casos restantes detectados por el método de *screening* HRM, podrían ser mutaciones aún no reportadas.

El seguimiento del clon *BCR-ABL1* mutado en pacientes con LMC, es importante para evaluar la respuesta al tratamiento con ITKs. Se ha demostrado que la aparición de mutaciones emergentes está asociada con el incremento de los niveles de *BCR-ABL1*, incluso pequeños aumentos medidos en al menos dos ensayos consecutivos tendría significación biológica en la identificación de los pacientes con mutaciones (Hughes

2006). Teniendo en cuenta que altos niveles de *BCR-ABL1* en pacientes con respuesta hematológica y citogenética podría deberse a la presencia de mutaciones (Branford 2004; Olsson-Strömberg 2010), se estudió por HRM/ARMS-qPCR 32 pacientes que solamente presentaban pérdida de la respuesta molecular (*BCR-ABL1* > 0,1%) en al menos dos ensayos consecutivos. Se identificaron mutaciones en el 34,4% de los casos (11/32), mientras que por secuenciación directa solo se detectó un 6,2% (2/32) [Tabla 40]. Además de demostrar la mayor sensibilidad del HRM/ARMS-qPCR vs la secuenciación directa, este abordaje permitió evaluar la dinámica del clon mutado mediante el análisis retrospectivo de muestras del mismo paciente. Es sabido que las mutaciones presentan ventajas proliferativas frente al tratamiento con ITKs, estudios mediante el cálculo de la IC50 y ensayos de señalización y proliferación han demostrado que la mutación T315I es la que genera mayor resistencia, (O'Hare T 2005; Redaelli 2009; Hartel 2012). En este trabajo se pudo estimar la tasa de acumulación de 4 mutaciones durante el seguimiento ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}}$ ) como una medida de la agresividad de la mutación. Las mutaciones V299L, F317L y G250E muestran una velocidad de acumulación significativamente menor ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}} \leq 0,4$ ) [Tabla 40], mientras que para la T315I la tasa de acumulación es marcadamente mayor ( $\Delta\text{MUT}^{\text{AR}} = 53,2$ ) demostrando la agresividad de esta mutación.

El estudio de la dinámica de los clones mutados permitió definir si el clon se encontraba en expansión o remisión. El seguimiento realizado en la población con pérdida de la respuesta molecular permitió identificar diferentes comportamientos del clon mutado [Figura 27]. Se ha reportado que la cuantificación de clones mutados y la evaluación de los transcritos totales *BCR-ABL1* pueden presentar diferentes patrones. Se describieron tres situaciones particulares, casos donde el clon mutado y los transcritos se incrementaban paulatinamente, casos en que la mutación estaba presente en un 100% y el *BCR-ABL1* era menor a 0,1% y casos en que el porcentaje de *BCR-ABL1* descendía mientras que el clon mutado aumentaba (Khorashad 2006). En nuestro trabajo se observaron las siguientes situaciones:

- Casos en que la mutación detectada es sensible al tratamiento recibido, sin embargo el paciente permanece con niveles incrementados de transcritos *BCR-ABL1*, lo cual indicaría que la resistencia no se asociaría a la mutación identificada (casos 7, 9, 8 y 10 [Figura 27]). El aporte del análisis molecular en esta situación sería ayudar a la adecuada elección del nuevo ITK.

- Casos en que la mutación detectada es reportada como resistente a los ITKs, pero teniendo en cuenta el porcentaje de clon mutado y los valores de transcritos *BCR-ABL1*, se requiere mayor seguimiento para sacar conclusiones (casos 2, 5 y 6 [Figura 27]).
- Casos en que la mutación detectada es resistente al ITK siendo responsable de la falta de respuesta al tratamiento (casos 1, 3, 4 y 11 [Figura 27]). En estos pacientes el correcto cambio de ITK es fundamental para revertir este fenómeno. En el caso 4, la mutación encontrada (F317L) es resistente a dasatinib, al rotar el tratamiento a nilotinib, lamentablemente, el paciente ya había progresado a crisis blástica, por lo cual, si bien se observó un descenso importante del clon mutado no se logró la reducción del *BCR-ABL1* y el paciente falleció.

En el caso 11 [Figura 27 y Figura 28], el clon mutado se caracterizó por la presencia de la mutación G250E detectada y cuantificada por HRM/ARMS-qPCR en un 11,5%. Debido a que los métodos de mayor sensibilidad aún no se han aceptado para introducir cambios de terapia, el paciente continuó con el mismo tratamiento. El aumento sucesivo de la carga mutacional determinó la pérdida de la respuesta citogenética y hematológica, momento en el que se decide modificar el tratamiento a nilotinib, logrando revertir el fenómeno de la resistencia.

Es importante mencionar que esta metodología también fue aplicable a pacientes con LLA Ph<sup>+</sup>, utilizando los *primers* específicos del rearrreglo e1a2 en la primera reacción de PCR, para asegurarnos de estudiar las mutaciones correspondientes al reordenamiento *BCR-AB*<sup>P190</sup>. Aplicando esta metodología se estudió un paciente con LLA Ph<sup>+</sup> en la cual se detectó la mutación T315I en un primer estudio en un 15%, sin embargo recién se decidió el cambio de terapia cuando el clon mutado se había incrementado y pesquisado por secuenciación directa. A partir de ese momento se intenta rotar a ponatinib pero la paciente evoluciona fatalmente. Estas observaciones indican que la detección temprana de mutaciones aplicando HRM/ARMS-qPCR podría ser considerada como una herramienta importante para decidir una intervención terapéutica temprana en pacientes que muestran signos de resistentes al tratamiento con ITKs con presencia de mutaciones de alta agresividad. Nuestros datos muestran que la detección precoz de mutaciones permitiría el seguimiento del paciente, evaluar el comportamiento del clon mutado a lo largo del tratamiento e intervenir en el momento más adecuado.

## 6.2 Determinación y seguimiento del porcentaje de *BCR-ABL1*<sup>P230</sup>

La presencia de mutaciones en el dominio TK del *BCR-ABL1* es un mecanismo sumamente importante en la resistencia a ITKs, siendo la mutación T315I la de mayor resistencia y frecuencia. Esta mutación bloquea el acceso de la droga al sitio de la enzima *ATP-binding* y confiere un alto grado de resistencia a los ITKs de primera y segunda generación. El ponatinib es un ITK de tercera generación muy efectivo en pacientes resistentes y especialmente en aquellos portadores de la mutación T315I.

La presencia del rearrreglo e19a2 en pacientes con LMC, generalmente está asociado a un curso clínico más benigno con buena respuesta a la terapia, a menos que presente alguna alteración adicional. En este trabajo se reporta el primer caso de LMC con *BCR-ABL1*<sup>P230</sup> y la mutación T315I que fue tratado con un ITK de tercera generación. En este caso la terapia fue efectiva y la mutación así como los transcriptos descendieron a valores indetectables.

Debido a la baja frecuencia de la isoforma e19a2 no están disponibles kits y/o estándares comerciales para tipificar y/o cuantificar dicho rearrreglo dificultando el diagnóstico y seguimiento de los pacientes. Es por ello, que en este trabajo se construyeron estándares y se adecuó el método de detección de esta isoforma.

La correcta caracterización y cuantificación a través del desarrollo de este método posibilitó el monitoreo molecular del paciente permitiendo tomar una conducta terapéutica acorde al genotipo identificado.

## 6.3 Detección de mutaciones en pacientes con LMC resistentes a ITKs de segunda y tercera generación

Se evaluó el primer estudio multicéntrico de Argentina enfocado a la búsqueda de mutaciones en los pacientes con LMC con falla o pérdida respuesta a ITKs de segunda y tercera generación, aplicando el método tradicional, la secuenciación automática, y técnicas moleculares de mayor sensibilidad (HRM/ARMS-PCR). El propósito del mismo fue evaluar el estado mutacional y la respuesta clínica en un grupo de pacientes resistentes a dasatinib, nilotinib o ponatinib. La población estudiada presentó una mediana de edad al momento del estudio de 49,7 años. El porcentaje de pacientes portadores de mutaciones fue de 48,6%, siendo la mutación T315I la más frecuente (22%, 4/18), similar a lo reportado en la literatura (Jamshid 2013).

En la mutación T315I el cambio nucleotídico (C > T) resulta en la sustitución de una treonina (Thr) por una isoleucina (Ile) en la posición 315 del ABL1 del BCR-ABL1. La Thr<sup>315</sup> forma un puente de hidrógeno con imatinib, nilotinib y dasatinib, la ausencia del átomo de oxígeno normalmente proporcionado por la cadena lateral de la Thr<sup>315</sup> impide la formación del enlace de hidrógeno con el grupo amino secundario de los ITKs de primera y segunda generación. La adquisición de esta mutación determina el mecanismo responsable de la pérdida de eficacia de los ITKs, dado que se pierde un sitio de suma importancia en el anclaje de la droga al BCR-ABL1. Una vez que el ITK deja de competir con el ATP se vuelve a producir la activación constitutiva del BCR-ABL1 activando nuevamente la señalización intracelular, desencadenando resistencia al tratamiento (Gorre 2001; Bose 2013).

Con respecto a los pacientes que presentaban más de una mutación, el paciente tratado con nilotinib y previamente con dasatinib (caso 3 [Figura 32]), una de las mutaciones fue F317L, la cual ha sido reportada como resistente a dasatinib. En el paciente tratado con dasatinib y previamente con nilotinib (caso 10 [Figura 32]), una de las mutaciones fue F359V que confiere resistencia nilotinib (O'Hare T 2005; Branford 2009; Redaelli 2009). Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura donde el análisis de las mutaciones, en pacientes tratados secuencialmente con diferentes ITKs, refleja el tipo de exposición al tratamiento previo (Jamshid 2013).

En la literatura las mutaciones del *P-loop* en el dominio kinasa del *BCR-ABL1* representan aproximadamente la mitad de todas las mutaciones e imparten mayor potencial de transformación con respecto a otras mutaciones y al *BCR-ABL1* no mutado (Branford 2003; Cang 2008). Los ITKs de segunda generación (nilotinib y dasatinib) tienen actividad diferencial contra ciertas mutaciones. Se ha observado resistencia clínica al dasatinib con las mutaciones T315I, V299L y F317L y al nilotinib con las mutaciones T315I, F359V, Y253H y E255K/V (Soverini 2006).

En nuestro trabajo se detectaron 21 cambios nucleotídicos en los 18 pacientes portadores de mutaciones, debido a que 3 de ellos presentaban más de una mutación. A diferencia de lo reportado en la literatura, en este trabajo, el mayor porcentaje de mutaciones correspondió al dominio *ATP-Binding* 47,6% (10/21) versus un 33,3% (7/21) del *P-loop*. Esta discrepancia podría deberse a que la gran mayoría de los pacientes se encontraban bajo tratamiento con dasatinib (72%) y el aporte mutacional

estuvo representado por mutaciones resistentes a este inhibidor (V299L y F317L) ubicadas en el *ATP-binding*.

Si bien el estudio por técnicas más sensibles como HRM/ARMS-qPCR no incrementó significativamente el número de mutaciones detectadas, ARMS-qPCR resultó ser sumamente útil en el seguimiento del tratamiento, en especial al evaluar la respuesta luego del cambio de terapia. Es importante destacar que la búsqueda de mutaciones con técnicas más sensibles sería de mayor utilidad en los pacientes con mutaciones incipientes y al comienzo de la resistencia; a diferencia de lo que ocurre en este estudio donde el 86,5% de los pacientes ya habían presentado resistencia al tratamiento previo con imatinib.

#### **6.4 Expresión de los genes *LYN* y *PTEN***

La falta o pérdida de la respuesta a los ITKs en LMC, puede estar relacionada a mecanismos dependientes o independientes de *BCR-ABL1*. Aunque las mutaciones en el dominio tirosina kinasa del *BCR-ABL1* es la causa predominante de resistencia, hay evidencias que sugieren que otras tirosina kinasas ubicadas *downstream* del *BCR-ABL1* pueden activarse en las células leucémicas contribuyendo a la resistencia y evolución a etapas más avanzadas de la enfermedad (Roginskaya 1999; Donato 2003). Pacientes con LMC en progresión de la enfermedad mostraron un incremento en la expresión de *LYN*, un elemento regulador involucrado en la hematopoyesis. La proteína kinasa *BCR-ABL1* controla la activación de *LYN* como se demostró en células obtenidas de pacientes con LMC (Donato 2003). La proteína *LYN* está sobreexpresada en líneas celulares y en algunos pacientes resistentes a imatinib y su activación no depende de *BCR-ABL1* (Wu 2008). La expresión desregulada de *LYN* puede interferir con la inhibición de uno o más miembros del camino de señalización del *BCR-ABL1*, como *CRKL*, *STAT5* y *MAPK* (Warmuth 1997; Meyn 2006). Cualquier desregulación de *LYN* puede interferir con el crecimiento y función celular normal, dando lugar a diferentes fenotipos hematológicos.

Por otro lado *PTEN*, ubicado en 10q23, fue originalmente identificado como un oncosupresor que frecuentemente se pierde en una variedad de tumores tales como cerebro, mama y próstata, donde se observan deleciones del cromosoma 10 (Li 1997).

En la actualidad se han descripto más de 2700 mutaciones en *PTEN* en 28 tipos diferentes de tumores (Gao 2013). *PTEN* es una proteína cuyo sustrato principal es el



fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfato (PIP3), el cual hidroliza al fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato (PIP2). PTEN bloquea la señalización del fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) por inhibición del proceso dependiente de PIP3, por lo tanto inhibe sobrediferenciación, crecimiento y proliferación celular (Hopkins 2014). Un aumento de la expresión de *PTEN* provocaría detención del ciclo celular y apoptosis de las células leucémicas, mientras que la subexpresión en LMC se asociaría con proliferación tumoral (Peng 2010).

En este trabajo, se evaluó la expresión de *LYN*, *PTEN* y la relación entre ambos genes en pacientes con LMC en diferentes fases de la enfermedad con y sin respuesta a ITKs. Teniendo en cuenta estas variables los pacientes se dividieron en 8 grupos además se evaluó un grupo control constituido por individuos sanos:

- Pacientes con buena respuesta al tratamiento con imatinib/nilotinib (RO-IN)
- Pacientes resistentes en Fase crónica en tratamiento con imatinib/nilotinib (FC-IN)
- Pacientes resistentes en Fase acelerada/blástica en tratamiento con imatinib/nilotinib (FA/CB-IN)
- Pacientes resistentes portadores de mutaciones en tratamiento con imatinib/nilotinib (Mut-IN)
- Pacientes con buena respuesta al tratamiento con dasatinib (RO-D)
- Pacientes resistentes en Fase crónica tratados con dasatinib (FC-D)
- Pacientes resistentes en fase acelerada/crisis blástica tratados con dasatinib (FA/CB-D)
- Pacientes resistentes portadores de mutaciones tratados con dasatinib (Mut-D)
- Grupo control individuos sanos (IDS)

Está reportado que bajos niveles de PTEN pueden provocar resistencia al tratamiento en los pacientes con LMC (Peng 2010); sin embargo, este gen no presentó cambios importantes en los niveles de expresión en los diferentes grupos de pacientes estudiados. Un aumento significativo en la expresión de *LYN* solo se observó en el grupo FA/CB-IN. Al analizar la relación *LYN/PTEN* se observó un nivel de expresión similar entre los IDS y los pacientes con buena respuesta, lo que indica que en estos casos la oncoproteína p210<sup>BCR-ABL1</sup> está eficientemente bloqueada por el ITK administrado. Por otro lado, se observó un aumento significativo de la relación *LYN/PTEN*, en el grupo de pacientes sin mutaciones que se encontraban en FA/CB-IN y FC-IN. La relación *LYN/PTEN* resultó ser más informativa que la expresión de ambos genes por separado. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *LYN* o subexpresión de *PTEN*



podrían estar asociado a la resistencia al tratamiento con imatinib o nilotinib. Estos hallazgos concuerdan con reportes previos donde una persistente activación de LYN (Wu 2008) y una disminución en la regulación de PTEN fue observada en casos de LMC sin mutación, resistentes a imatinib (Peng 2010).

Debido a que LYN es una *src*-kinasa, el tratamiento con dasatinib puede inhibir su expresión, lo que demuestra que el mecanismo de resistencia en los pacientes tratados con dasatinib no se relacionaría con la expresión alterada de los genes *LYN* y *PTEN*.

Los casos con mutaciones en el dominio kinasa del *BCR-ABL1* mostraron niveles de *LYN/PTEN*, similar al grupo IDS, independientemente del tratamiento, lo que indica que el mecanismo de resistencia en estos pacientes es dependiente de las mutaciones en *BCR-ABL1* e independiente de la expresión de *LYN* y *PTEN*.

Teniendo en cuenta que la resistencia no siempre puede explicarse por mecanismos dependientes de *BCR-ABL1*, mediante un *cutoff* obtenido en población control, fue posible asociar la resistencia a un incremento en la relación *LYN/PTEN* en el 23% de los pacientes en FC-IN y 33% en FA/CB-IN sin mutaciones [Figura 41]. La relación de *LYN/PTEN* mostró una correlación positiva significativa al compararla con los niveles de transcritos *BCR-ABL1* [Figura 40], indicando que valores elevados de *LYN/PTEN* se relacionan con progresión de la enfermedad. La medición de la relación *LYN/PTEN*, podría detectar casos donde la resistencia estaría relacionada a la expresión alterada de alguno de estos genes, sugiriendo que el cambio de tratamiento a un ITK dual con actividad sobre *src*-quinasas sería lo más adecuado para vencer la resistencia. En conclusión, el análisis de la relación *LYN/PTEN* es un estudio de relevancia a tener en cuenta en pacientes resistentes sin mutaciones bajo tratamiento con imatinib o nilotinib, en los cuales la falta de respuesta podría revertirse empleando un inhibidor dual.

### 6.5 Detección de Enfermedad Mínima Residual en pacientes con LLA Ph<sup>+</sup>

La LLA Philadelphia positiva (LLA Ph<sup>+</sup>) es una patología hematológica relativamente poco común que se observa en un 25% de las LLA del adulto y en un 2-5% en las LLA pediátricas. En ambos casos la presencia del reordenamiento *BCR-ABL1* está asociada a una neoplasia oncohematológica de muy mal pronóstico. Los tratamientos convencionales de poliquimioterapia no son muy efectivos y la mayoría de los casos sufren recaída con evolución fatal.

LLA Ph<sup>+</sup> es una de las pocas enfermedades en las que los hematólogos han llegado a un acuerdo casi inequívoco de que el TMO en primera remisión completa es el tratamiento más adecuado para los niños y adultos en condiciones clínicas de recibirlo y que dispongan de un donante histocompatible. Sin embargo más de la mitad de los casos no tienen esta posibilidad. A partir del desarrollo del imatinib, capaz de bloquear la oncoproteína P190, este fármaco, fue rápidamente incorporado al tratamiento de la LLA, utilizado como un puente al TMO en los casos donde sea posible. Nuevos protocolos de tratamiento incorporan el ITK en todos los bloques del esquema terapéutico lográndose una enorme ventaja en la supervivencia respecto a otros protocolos alternativos (Wassmann 2006). El papel potencial de la detección de EMR después de la inducción y consolidación, ha cobrado gran relevancia en el seguimiento de pacientes con LLAPh<sup>+</sup> (Campana 2010). Varios estudios en niños y adultos utilizando técnicas de PCR han demostrado la capacidad de detectar EMR y su papel potencial para estratificar el riesgo de recaída (Burke 2009; Ravandi 2013). Teniendo en cuenta la superioridad que se logra con los ITKs, los protocolos actuales incluyen la combinación de quimioterapia, inhibidores de TK (principalmente imatinib) y trasplante alogénico de médula ósea (Ravandi 2009 ). En este trabajo se evaluó el nivel de expresión del reordenamiento *BCR-ABL*<sup>P190</sup> en pacientes pediátricos incluidos en el Protocolo del GATLA: LLA-Ph<sup>+</sup>2011. El nivel de los transcritos *BCR-ABL*<sup>P190</sup> fueron evaluados al final de la inducción (AI), previo a cada uno de los bloques de consolidación RA1, RA2, RA3, previo al protocolo II (Fase IIA, IIB ) y durante el mantenimiento o post-trasplante.

Para poder determinar el valor basal y disponer de un dato inicial con el cual comparar la respuesta al tratamiento, se cuantificó el nivel de transcritos *BCR-ABL* en médula ósea de 11 pacientes pediátricos con LLA<sup>P190</sup> al diagnóstico. Esto permitió determinar el valor basal de referencia y estimar la reducción logarítmica de los transcritos en las diferentes etapas del tratamiento. El valor medio de *BCR-ABL*(e1a2)/*ABL* obtenido en el grupo control fue de 55,5%. Debido a que en esta patología no cuenta con una estandarización internacional que permita definir la respuesta a la terapia, en este trabajo se consideró que existe una respuesta molecular óptima (RMO) cuando la relación *BCR-ABL*/*ABL* era  $\leq 0,055\%$ , es decir 3 logaritmos de reducción.

El porcentaje de casos con RMO se fue incrementando con la progresión del tratamiento, desde un 13,3% al final de la inducción (33 días) hasta un 76,9% luego de

los tres bloques de consolidación y la fase II, indicando que en la mayoría de los casos la reducción del clon neoplásico requiere de un tiempo prolongado (dos años) para lograr la eliminación del clon tumoral.

La velocidad con que se logra la reducción del clon tumoral se considera un factor pronóstico. Estudios de monitoreo determinaron que una reducción de 3 log en los niveles de transcritos *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> después del primer mes de tratamiento con imatinib era un poderoso predictor de menor riesgo de recaída (Lee 2003). Aunque el TMO sigue siendo el estándar de tratamiento para estos pacientes, en algunos estudios se demostró la posibilidad de supervivencia a largo plazo sin trasplante (Schultz, Bowman et al. 2009; Ravandi 2010), aumentando las expectativas de sobrevida en los pacientes sin posibilidad de acceder a un TMO.

De los 25 pacientes estudiados, 4 recayeron, evidenciándose un incremento en los niveles de transcritos *BCR-ABL1*. En estos casos probablemente la presencia de pequeños clones mutados, por debajo del nivel de detección podrían ser los responsables de las recaídas o falta de respuesta al tratamiento, se ha podido demostrar que la presencia de mutaciones en el dominio kinasa frecuentemente preceden a la recaída de la enfermedad (Pfeifer 2007).

De los 17 pacientes restantes 12 se encuentran en mantenimiento y 5 post-TMO, la mayoría de ellos lograron una respuesta molecular óptima con una reducción de los transcritos mayor a tres logaritmos o valores indetectables de *BCR-ABL1*. Con el objeto de investigar factores pronósticos se evaluó la edad, sexo y recuento de glóbulos blancos, respecto de la cinética de reducción del clon tumoral. La única variable que presentó diferencias significativas fue la edad. Si bien los pacientes mayores de 10 años mostraron una mayor tasa de RMO en RA1 del 83% vs 27%, durante el avance de la terapia se observó que este grupo permaneció sin lograr mejores respuestas, mientras que en los menores de 10 años ( $p = 0,05$ ), el 100% alcanzó la RMO sostenida y profunda en el protocolo II vs 33% en los mayores de 10 años ( $p = 0,045$ ) [Figura 43]. Indicando que la edad entre 1 y 10 años, al diagnóstico, es un factor de buen pronóstico. El seguimiento molecular realizado en el Protocolo GATLA LLA Ph<sup>+</sup>2011 demuestra que la cuantificación del *BCR-ABL1* es un buen indicador para evaluar la respuesta al tratamiento. Los transcritos *BCR-ABL1* se redujeron a niveles indetectables en 76% (13/17) de los casos respondedores en las etapas finales del tratamiento.

La evidencia acumulada indica que imatinib aumenta la capacidad de generar más remisiones completas, permitiendo que más pacientes puedan llegar a un TMO alogénico. Los datos presentados muestran la importancia del seguimiento molecular en esta patología de alto riesgo, dado que el estudio del nivel de los transcritos *BCR-ABL1* constituye una herramienta indispensable para evaluar la enfermedad mínima residual y respuesta al tratamiento.

## **7. Conclusiones**

## 7. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos y discutidos en el presente trabajo se enumeran las siguientes conclusiones:

- En la población argentina con LMC resistente a los ITKs de segunda y tercera generación, el 49% de los casos presentó mutaciones en dominio kinasa del *BCR-ABL1*. El mayor porcentaje de mutaciones se detectó en el dominio *ATP-binding*. Las mutaciones más frecuentes fueron la T315I (22%), F317L (16,7%) y V299L (16,7%).
- El método de HRM resultó ser altamente confiable para el *screening* de mutaciones en el dominio kinasa del *BCR-ABL1*.
- La combinatoria de HRM/ARMS-qPCR demostró ser un método efectivo en la identificación temprana de mutaciones, incrementando en un 16% la detección de las mismas respecto de la secuenciación directa.
- El monitoreo por HRM/ARMS-qPCR en los pacientes con pérdida o falta de RMMa permitió identificar mutaciones en un 34% de los casos, con una sensibilidad del 1%.
- La mayor sensibilidad de detección y posterior cuantificación del clon mutado indican que HRM/ARMS-qPCR sería más conveniente para el seguimiento de pacientes con signos clínico-genético de resistencia a los ITKs.
- El análisis de la dinámica del clon mutado y de los transcritos *BCR-ABL1* permitió:
  - a- Definir el rol de la mutación en la resistencia.
  - b- Seleccionar el ITK adecuado.
  - c- Evaluar la respuesta al tratamiento.
- El análisis de la relación *LYN/PTEN* en población resistente a imatinib o nilotinib y ausencia de mutaciones, permitió asociar la falta de respuesta al tratamiento a la expresión alterada de *LYN* y *PTEN* en el 23% de los pacientes en fase crónica y el 33% en fase acelerada.

- La cuantificación de los transcritos *BCR-ABL1*<sup>P190</sup> en pacientes LLAPh<sup>+</sup> demostró ser una herramienta importante para evaluar la respuesta al tratamiento y definir EMR previo al trasplante.

## **8. Bibliografía**



- Abelson, H. T., Rabstein, L. S. (1970). "Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice." *Cancer Res* **30**(8): 2213-2222.
- Allan, N. C., Richards, S. M., Shepherd, P. C. (1995). "UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia." *Lancet* **345**(8962): 1392-1397.
- Apperley, J. F. (2007). "Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia." *Lancet Oncol* **8**(12): 1116-1128.
- Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., Saglio, G., Apperley, J., Cervantes, F., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Hochhaus, A., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Radich, J., Simonsson, B., Silver, R. T., Goldman, J., Hehlmann, R. (2009). "Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet." *J Clin Oncol* **27**(35): 6041-6051.
- Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., Cervantes, F., Clark, R. E., Cortes, J. E., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T. P., Kantarjian, H. M., Kim, D. W., Larson, R. A., Lipton, J. H., Mahon, F. X., Martinelli, G., et al. (2013). "European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013." *Blood* **122**(6): 872-884.
- Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Niederwieser, D., Silver, R., Hehlmann, R. (2006). "Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet." *Blood* **108**(6): 1809-1820.
- Bengi o, R. M., Riva ME, Moiraghi B, Lanari E, Milone J, Ventriglia V, Bullorsky E, Tezanos Pinto Md, Murro H, Bianchini M, Larripa I. (2011). "Clinical outcome of chronic myeloid leukemia imatinib-resistant patients: do BCR-ABL kinase domain mutations affect patient survival? First multicenter Argentinean study." *Leuk Lymphoma* **52**(9): 1720-1726.
- Bernt, K. M., Hunger, S. P. (2014). "Current Concepts in Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia." *Front Oncol* **4**: 54.
- Borgmann, A. v. S., A.; Hartmann, R.; Ebell, W.; Klingebiel, T.; Peters, C.; Henze, G.; Berlin-Frankfurt-Münster Relapse Study Group. (2003). "Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched-pair analysis." *Blood* **101**(10): 3835-3839.
- Bose, P., Park H, Al-Khafaji J, Grant S. (2013). "Strategies to circumvent the T315I gatekeeper mutation in the Bcr-Abl tyrosine kinase." *Leuk Res Rep* **2**(1): 18-20.
- Branford, S., Hughes, T. (2006). "Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate." *Methods Mol Med* **125**: 93-106.
- Branford, S., Melo, J. V, Hughes, T. P. (2009). "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* **114**(27): 5426-5435.
- Branford, S., Rudzki Z, Parkinson I, Grigg A, Taylor K, Seymour JF, Durrant S, Browett P, Schwarer AP, Arthur C, Catalano J, Leahy MF, Filshie R, Bradstock

- K, Herrmann R, Joske D, Lynch K, Hughes T. (2004). "Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations." Blood **2926-32**(104): 9.
- Branford, S., Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP, Hughes TP. (2002). "High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance." Blood. **99**(9): 3472-3475.
- Branford, S., Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes (2003). "Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis." Blood **102**(1): 276-283.
- Burke, M. J., Trotz B, Luo X, Baker KS, Weisdorf DJ, Wagner JE, Verneris MR. (2009). "Allo-hematopoietic cell transplantation for Ph chromosome-positive ALL: impact of imatinib on relapse and survival." Bone Marrow Transplant **43**(2): 107-113.
- Cahill, M. A., Janknecht, R., Nordheim, A. (1996). "Signalling pathways: jack of all cascades." Curr Biol **6**(1): 16-19.
- Campana, D. (2010). " 2010;2010:7-12. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.7. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. ." Hematology Am Soc Hematol Educ Program.: 7-12.
- Cang, S., Liu D. (2008). "P-loop mutations and novel therapeutic approaches for imatinib failures in chronic myeloid leukemia." J Hematol Oncol. **1**(15).
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Matter, A. (2002). "Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug." Nat Rev Drug Discov **1**(7): 493-502.
- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y. W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M. H., Blanchard, K. L., Thomas, J. E. (2007). "A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer." Nature **448**(7152): 439-444.
- Clayton, S. J., Scott FM , Walker J, Callaghan K, , Haque K, Liloglou T, Xinarianos G, Shawcross S, Ceuppens P, Field JK, Fox JC. (2000). "K-ras point mutation detection in lung cancer: comparison of two approaches to somatic mutation detection using ARMS allele-specific amplification." Clin Chem **46**(12): 1929-1938.
- Clift, R. A., Buckner, C. D., homas, E. D., Bryant, E., Anasetti, C., Bensinger, W. I., Bowden, R., Deeg, H. J., Doney, K. C., Fisher, L. D., et al. (1994). "Marrow transplantation for patients in accelerated phase of chronic myeloid leukemia." Blood **84**(12): 4368-4373.
- Collins, C. H. (1979). "Laboratory safety." Lancet. **2**(8154): 1244.
- Cortes, J. E., Kantarjian, H., Shah, N. P., Bixby, D., Mauro, M. J., Flinn, I., O'Hare, T., Hu, S., Narasimhan, N. I., Rivera, V. M., Clackson, T., Turner, C. D., Haluska, F. G., Druker, B. J., Deininger, M. W., Talpaz, M. (2012). "Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias." N Engl J Med **367**(22): 2075-2088.

- Cortes, J. E., Kim, D. W., Pinilla-Ibarz, J., le Coutre, P., Paquette, R., Chuah, C., Nicolini, F. E., Apperley, J. F., Khoury, H. J., Talpaz, M., DiPersio, J., DeAngelo, D. J., Abruzzese, E., Rea, D., Baccarani, M., Muller, M. C., Gambacorti-Passerini, C., Wong, S., Lustgarten, S., et al. (2013). "A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias." *N Engl J Med* **369**(19): 1783-1796.
- Cross, N. C., White, H. E., Muller, M. C., Saglio, G., Hochhaus, A. (2012). "Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia." *Leukemia* **26**(10): 2172-2175.
- Crossman, L. C., Druker, B. J., Deininger, M. W., Pirmohamed, M., Wang, L., Clark, R. E. (2005). "hOCT 1 and resistance to imatinib." *Blood* **106**(3): 1133-1134; author reply 1134.
- Chalandon, Y., Jiang, X., Christ, O., Loutet, S., Thanopoulou, E., Eaves, A., Eaves, C. (2005). "BCR-ABL-transduced human cord blood cells produce abnormal populations in immunodeficient mice." *Leukemia* **19**(3): 442-448.
- Chasseriau, J., Rivet, J., Bilan, F., Chomel, J. C., Guilhot, F., Bourmeyster, N., Kitzis, A. (2004). "Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR." *J Mol Diagn* **6**(4): 343-347.
- Chen, S. J., Flandrin, G., Daniel, M. T., Valensi, F., Baranger, L., Grausz, D., Bernheim, A., Chen, Z., Sigaux, F., Berger, R. (1988). "Philadelphia-positive acute leukemia: lineage promiscuity and inconsistently rearranged breakpoint cluster region." *Leukemia* **2**(5): 261-273.
- Dai, Y., Rahmani, M., Corey, S.J., Dent, P., Grant, S. (2004). "A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2." *J Biol Chem* **279**(33): 34227-34239.
- Daley, G. Q., Van Etten, R. A., Baltimore, D. (1990). "Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome." *Science* **247**(4944): 824-830.
- Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B. J., Emmerich, B., Hallek, M. (1996). "Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells." *Cancer Res* **56**(15): 3589-3596.
- Deininger, M. W., Goldman, J. M., Melo, J. V. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." *Blood* **96**(10): 3343-3356.
- Denhardt, D. T. (1996). "Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling." *Biochem J* **318** ( Pt 3): 729-747.
- Doi, Y., Sasaki, D., Terada, C., Mori, S., Tsuruda, K., Matsuo, E., Miyazaki, Y., Nagai, K., Hasegawa, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Kamihira, S. (2009). "High-resolution melting analysis for a reliable and two-step scanning of mutations in the tyrosine kinase domain of the chimerical bcr-abl gene." *Int J Hematol* **90**(1): 37-43.
- Donato, N. J., Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, Talpaz M. (2003). "BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571." *Blood* **101**(2): 690-698.
- Donato, N. J., Wu, J. Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., Talpaz, M. (2003). "BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571." *Blood* **101**(2): 690-698.

- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., et al. (2006). "Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia." N Engl J Med **355**(23): 2408-2417.
- Druker, B. J., Lydon, N. B. (2000). "Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia." J Clin Invest **105**(1): 3-7.
- Druker, B. J., Sawyers, C. L., Capdeville, R., Ford, J. M., Baccarani, M., Goldman, J. M. (2001). "Chronic myelogenous leukemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 87-112.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C. L. (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." N Engl J Med **344**(14): 1031-1037.
- Emilia, L. M., Marasca R, Torelli G. (1997). "Relationship between BCR/ABL fusion proteins and leukemia phenotype." Blood **89**(10): 3889.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H. M. (1999). "The biology of chronic myeloid leukemia." N Engl J Med **341**(3): 164-172.
- Fainstein, E., Marcelle, C., Rosner, A., Canaani, E., Gale, R. P., Drezzen, O., Smith, S. D., Croce, C. M. (1987). "A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia." Nature **330**(6146): 386-388.
- Frame, D. (2007). "New strategies in controlling drug resistance." J Manag Care Pharm **13**(8 Suppl A): 13-17.
- Fromm, M. (2004). "Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers." Trends Pharmacol Sci **25**(8): 423-429.
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V.H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J.M., Cavé, H., Pane, F., Aerts, J.L., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., González, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G., van Dongen, J.J. (2003). "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. **17**(12): 2318-2357.
- Gao, J., Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz (2013). "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal." Sci Signal **6**.
- Golas, J. M., Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, Gibbons J, Frost P, Ye F, Boschelli DH, Boschelli F. (2003). "SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice." Cancer Res. **63**(2): 375-381.
- Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., Sawyers, C. L. (2001). "Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification." Science **293**(5531): 876-880.
- Goss, V. L., Lee, K. A., Moritz, A., Nardone, J., Spek, E. J., MacNeill, J., Rush, J., Comb, M. J., Polakiewicz, R. D. (2006). "A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase." Blood **107**(12): 4888-4897.

- Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., Saxena, K. (2004). "The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain." *Mol Cell* **13**(2): 169-178.
- Groffen, J., Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. (1984). "Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22." *Cell* **36**(1): 93-99.
- Grosso, S., Puissant A, Dufies M, Colosetti P, Jacquel A, Lebrigand K, Barbry P, Deckert M, Cassuto JP, Mari B, Auberger P. (2009). "Gene expression profiling of imatinib and PD166326-resistant CML cell lines identifies Fyn as a gene associated with resistance to BCR-ABL inhibitors." *Mol Cancer Ther* **8**(7): 1924-1933.
- Gruber, F. X., Ernst, T., Kiselev, Y., Hochhaus, A., Mikkola, I. (2010). "Detection of drug-resistant clones in chronic myelogenous leukemia patients during dasatinib and nilotinib treatment." *Clin Chem* **56**(3): 469-473.
- Hagop Kantarjian, S. O. b. (2006). *The Chronic Leukemias. Cecil Medicine*. G. a. D. A. Ausiello. Maryland Heights, USA, Elsevier.
- Hartel, N., Klag, T., Hanfstein, B., Mueller, M. C., Schenk, T., Erben, P., Hochhaus, A., La Rosee, P. (2012). "Enhanced ABL-inhibitor-induced MAPK-activation in T315I-BCR-ABL-expressing cells: a potential mechanism of altered leukemogenicity." *J Cancer Res Clin Oncol* **138**(2): 203-212.
- Hasford, J., Baccarani, M., Hoffmann, V., Guilhot, J., Saussele, S., Rosti, G., Guilhot, F., Porkka, K., Ossenkoppele, G., Lindoerfer, D., Simonsson, B., Pffirmann, M., Hehlmann, R. (2011). "Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score." *Blood* **118**(3): 686-692.
- Hasford, J., Pffirmann, M., Hehlmann, R., Allan, N. C., Baccarani, M., Kluin-Nelemans, J. C., Alimena, G., Steegmann, J. L., Ansari, H. (1998). "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* **90**(11): 850-858.
- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., Grosveld, G. (1985). "Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation." *Nature* **315**(6022): 758-761.
- Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., Groffen, J., Hansen, P. F., de Klein, A., Bartram, C. R., Grosveld, G. (1983). "Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia." *Nature* **306**(5940): 239-242.
- Hematología, S. A. d. (2013). "Guías de Diagnóstico y Tratamiento, LLA." *Guías de Diagnóstico y Tratamiento, SAH*.
- Hirsch-Ginsberg, C., Childs, C., Chang, K. S., Beran, M., Cork, A., Reuben, J., Freireich, E. J., Chang, L. C., Bollum, F. J., Trujillo, J., et al. (1988). "Phenotypic and molecular heterogeneity in Philadelphia chromosome-positive acute leukemia." *Blood* **71**(1): 186-195.
- Hochhaus, A. (2003). "Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib." *Semin Hematol* **40**(2 Suppl 2): 69-79.
- Hopkins, B. D., Hodakoski C, Barrows D, Mense SM, Parsons RE. (2014). "PTEN function: the long and the short of it." *Trends Biochem Sci* **39** (4): 183-190.
- Horita, M., Andreu, E. J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., Fernandez-Luna, J. L. (2000). "Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces



- apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL." *J Exp Med* **191**(6): 977-984.
- Hoy, S. M. (2014). "Ponatinib: a review of its use in adults with chronic myeloid leukaemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia." *Drugs* **74**(7): 793-806.
- Hu, Y., Liu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Warmuth M, Fabbro D, Hallek M, Van Etten RA, Li S. (2004). "Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia." *Nat Genet* **36**(5): 453-461.
- Hughes, T., Branford, S. (2006). "Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia." *Blood Reviews* **20**: 29 - 41.
- Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N. C., Druker, B. J., Gabert, J., Grimwade, D., Hehlmann, R., Kamel-Reid, S., Lipton, J. H., Longtine, J., Martinelli, G., Saglio, G., Soverini, S., Stock, W., Goldman, J. M. (2006). "Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results." *Blood* **108**(1): 28-37.
- Hughes, T. P., Hochhaus, A., Branford, S., Muller, M. C., Kaeda, J. S., Feroni, L., Druker, B. J., Guilhot, F., Larson, R. A., O'Brien, S. G., Rudoltz, M. S., Mone, M., Wehrle, E., Modur, V., Goldman, J. M., Radich, J. P. (2010). "Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS)." *Blood* **116**(19): 3758-3765.
- Hughes, T. P., Kaeda, J., Branford, S., Rudzki, Z., Hochhaus, A., Hensley, M. L., Gathmann, I., Bolton, A. E., van Hoomissen, I. C., Goldman, J. M., Radich, J. P. (2003). "Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia." *N Engl J Med* **349**(15): 1423-1432.
- Iaria, R. L., Jr., Van Etten, R. A. (1996). "P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members." *J Biol Chem* **271**(49): 31704-31710.
- Jacqy, C., Delepaut B, Van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, Vermylen C, Cornu G, Martiat P. (1997). "A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse." *British journal of haematology*. **98**(1): 140-146.
- Jamshid, S., Khorashad, Todd W. Kelley, Philippe Szankasi, Clinton C. Mason, Simona Soverini, Lauren T. Adrian, Christopher A. Eide, Matthew S. Zabriskie, Thoralf Lange, Johanna C. Estrada, Anthony D. Pomicter, Anna M. Eiring, Ira L. Kraft, David J. Anderson, Zhimin Gu, Mary Alikian, Alistair G. Reid, Letizia Feroni, David Marin, Brian J. Druker, Thomas O'Hare, and Michael W. Deininger. (2013). "BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships." *Blood* **121**(3): 489-498.
- Johansson, B., Fioretos, T., Mitelman, F. (2002). "Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia." *Acta Haematol* **107**(2): 76-94.

- Jørgensen, H. G., Elliott MA, Allan EK, Carr CE, Holyoake TL, Smith KD (2002). "Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571." Blood **99**(2): 713-715.
- Jorgensen, H. G., Holyoake, T. L. (2001). "A comparison of normal and leukemic stem cell biology in Chronic Myeloid Leukemia." Hematol Oncol **19**(3): 89-106.
- Kantarjian, H., Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG. (2006). "Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL." The New England journal of medicine **354**(24): 2542-2551.
- Kantarjian, H., Talpaz, M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Verstovsek, S., Giles, F., Rios, M. B., Shan, J., Letvak, L., Thomas, D., Faderl, S., Ferrajoli, A., Cortes, J. (2004). "High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia." Blood **103**(8): 2873-2878.
- Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Cortes, J. E., Smith, T. L., Rios, M. B., Shan, J., Yang, Y., Giles, F. J., Thomas, D. A., Faderl, S., Garcia, Manero, G., Jeha, S., Wierda, W., Issa, J. P., Kornblau, S. M., Keating, M., Resta, D., Capdeville, R., Talpaz, M. (2002). "Treatment of philadelphia chromosome-positive, accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate." Clin Cancer Res **8**(7): 2167-2176.
- Kernan, N. A., Bartsch, G., Ash, R. C., Beatty, P. G., Champlin, R., Filipovich, A., Gajewski, J., Hansen, J. A., Henslee-Downey, J., McCullough, J., et al., (1993). "Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program." N Engl J Med **328**(9): 593-602.
- Khorashad JS, A. M., Marin D, Saunders S, Al-Jabary T, Iqbal A, Margerison S, Melo JV, Goldman JM, Apperley JF, Kaeda J. (2006). "The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib." Leukemia.(20): 658-663.
- Krause, D. S., Van Etten, R. A. (2005). "Tyrosine kinases as targets for cancer therapy." N Engl J Med **353**(2): 172-187.
- Lahaye, T., Riehm, B., Berger, U., Paschka, P., Muller, M. C., Kreil, S., Merx, K., Schwindel, U., Schoch, C., Hehlmann, R., Hochhaus, A. (2005). "Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up." Cancer **103**(8): 1659-1669.
- Lange, T., Gunther, C., Kohler, T., Krahl, R., Musiol, S., Leiblein, S., Al-Ali, H. K., van Hoomissen, I., Niederwieser, D., Deininger, M. W. (2003). "High levels of BAX, low levels of MRP-1, and high platelets are independent predictors of response to imatinib in myeloid blast crisis of CML." Blood **101**(6): 2152-2155.
- Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., Kurzrock, R. (2001). "The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis." Cancer Res **61**(6): 2343-2355.
- le Coutre, P., Kreuzer, K. A., Na, I. K., Lupberger, J., Holdhoff, M., Appelt, C., Schwarz, M., Muller, C., Gambacorti-Passerini, C., Platzbecker, U., Bonnet, R., Ehninger, G., Schmidt, C. A. (2002). "Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Ph+ chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571." Blood Cells Mol Dis **28**(1): 75-85.

- Lee KH, L. J., Choi SJ, Lee JH, Seol M, Lee YS, Kim WK, Lee JS, Seo EJ, Jang S, Park CJ, Chi HS. (2005). "Clinical effect of imatinib added to intensive combination chemotherapy for newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia*. **19**(9): 1509-1516.
- Lee, S., Kim DW, Cho B, Kim YJ, Kim YL, Hwang JY, Park YH, Shin HJ, Park CY, Min WS, Kim HK, Kim CC (2003). "Risk factors for adults with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in remission treated with allogeneic bone marrow transplantation: the potential of real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction." *Br J Haematol* **120**(1): 145-153.
- Leung, W., Pui CH, Coustan-Smith E, Yang J, Pei D, Gan K, Srinivasan A, Hartford C, Triplett BM, Dallas M, Pillai A, Shook D, Rubnitz JE, Sandlund JT, Jeha S, Inaba H, Ribeiro RC, Handgretinger R, Laver JH, Campana D. (2012). "Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia." *Blood* **120**(2): 468-472.
- Lewis, J. M., Schwartz, M. A. (1998). "Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl." *J Biol Chem* **273**(23): 14225-14230.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., Parsons, R. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." *Science* **275**(5308): 1943-1947.
- Li, S., R. L. Ilaria, Jr., et al. (1999). "The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity." *J Exp Med* **189**(9): 1399-1412.
- Lionberger, J. M., Wilson MB, Smithgall TE (2000). "Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck." *J Biol Chem* **275**(24): 18581-18585.
- Lozzio, C. B. L., B.B. (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood*. **45**(3): 321-334.
- Ma G, L. D., Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. (1997). "Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2." *Oncogene*. **14**(19): 2367-2372.
- Mahon, F. X., Deininger, M. W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J. M., Melo, J. V. (2000). "Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance." *Blood* **96**(3): 1070-1079.
- Mahon, F. X., Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Hugué F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P. (2010). "Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial." *Lancet Oncol* **11**(11): 1029-1035.
- Makiya, M. (2013). "Tratamiento de la Leucemia Linfoblástica Aguda Pediátrica Recaída." *HEMATOLOGÍA* **17**: 82 -88.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Marshall, C. J. (1995). "Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation." *Embo J* **14**(13): 3136-3145.



- Marin, D., Ibrahim, A. R., Goldman, J. M. (2011). "European Treatment and Outcome Study (EUTOS) score for chronic myeloid leukemia still requires more confirmation." *J Clin Oncol* **29**(29): 3944-3945.
- Martinelli, G., Terragna, C., Amabile, M., Montefusco, V., Testoni, N., Ottaviani, E., de Vivo, A., Mianulli, A., Saglio, G., Tura, S. (2000). "Alu and translin recognition site sequences flanking translocation sites in a novel type of chimeric bcr-abl transcript suggest a possible general mechanism for bcr-abl breakpoints." *Haematologica* **85**(1): 40-46.
- Mathisen, M. S., Kantarjian, H. M., Cortes, J., Jabbour, E. (2011). "Mutant BCR-ABL clones in chronic myeloid leukemia." *Haematologica* **96**(3): 347-349.
- McWhirter, J. R., Wang, J. Y. (1993). "An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias." *Embo J* **12**(4): 1533-1546.
- Melo, J. V. (1996). "The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype." *Blood* **88**(7): 2375-2384.
- Melo, J. V., Deininger, M. W. (2004). "Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation." *Hematol Oncol Clin North Am* **18**(3): 545-568, vii-viii.
- Melo, J. V., Myint, H., Galton, D. A., Goldman, J. M. (1994). "P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia?" *Leukemia* **8**(1): 208-211.
- Meyn, M. A., Wilson, M. B. Abdi, F. A., Fahey, N., Schiavone, A. P., Wu, J., Hochrein, J. M., Engen, J. R., Smithgall, T. E. (2006). "Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity." *J Biol Chem* **281**(41): 30907-30916.
- Milone, J. H. B., J.; Etchegoyen, O.; Napal, J.; Prates, M.V.; Morales, V.H. (1999). "Bone marrow transplantation in chronic myeloid leukemia." *Medicina (B Aires)* **59**(1): 1-10.
- Mitsudomi, T., Yatabe, Y. (2010). "Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer." *Febs J* **277**(2): 301-308.
- Mittre, H., Leymarie, P., Macro, M., Leporrier, M. (1997). "A new case of chronic myeloid leukemia with c3/a2 BCR/ABL junction. Is it really a distinct disease?" *Blood* **89**(11): 4239-4241.
- Moloney, W. C. (1987). "Radiogenic leukemia revisited." *Blood* **70**(4): 905-908.
- Mondal, B. C., Majumdar, S., Dasgupta, U. B., Chaudhuri, U., Chakrabarti, P., Bhattacharyya, S. (2006). "e19a2 BCR-ABL fusion transcript in typical chronic myeloid leukaemia: a report of two cases." *J Clin Pathol* **59**(10): 1102-1103.
- Montaner S, P. R., Saniger L, Lacal JC. (1998). "Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases." *J Biol Chem*. **273**(21): 12779-12785.
- Nies, A. T., Schaeffeler E, van der Kuip H, Cascorbi I, Bruhn O, Kneba M, Pott C, Hofmann U, Volk C, Hu S, Baker SD, Sparreboom A, Ruth P, Koepsell H, Schwab M. (2014). "Cellular uptake of imatinib into leukemic cells is independent of human organic cation transporter 1 (OCT1)." *Clin Cancer Res*. **20**(4): 985.
- Nowell, P. C., Hungerford, D. A. (1960). "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes." *J Natl Cancer Inst* **25**: 85-109.

- O'Brien, C. (2005). "Reproducibility of the cold-induced vasodilation response in the human finger." *J Appl Physiol* (1985) **98**(4): 1334-1340.
- O'Hare T, W. D., Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ. (2005). "In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants." *Cancer Res.* **65**(11): 4500-4505.
- Olofsson, T., Odeberg, H, Olsson, I. (1976). "Granulocyte function in chronic granulocytic leukemia. II. Bactericidal capacity, phagocytic rate, oxygen consumption, and granule protein composition in isolated granulocytes." *Blood* **48**(4): 581-593.
- Olsson-Strömberg, U., Hermansson M, Lundán T, Ohm AC, Engdahl I, Höglund M, Simonsson B, Porkka K, Barbany G. (2010). "Molecular monitoring and mutation analysis of patients with advanced phase CML and Ph+ ALL receiving dasatinib." *Eur J Haematol.* **85**(5): 399-404.
- Ottmann, O., Dombret H, Martinelli G, Simonsson B, Guilhot F, Larson RA, Rege-Cambrin G, Radich J, Hochhaus A, Apanovitch AM, Gollerkeri A, Coutre S. (2007). "Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study." *Blood* **110**(7): 2309-2315.
- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., Rotoli, B. (1996). "Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction)." *Blood* **88**(7): 2410-2414.
- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Salcini, A. E., Romano, A., Mele, S., Grazia Borrello, M., Segatto, O., Di Fiore, P. P., Pelicci, P. G. (1995). "Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors." *Oncogene* **11**(5): 899-907.
- Peng, C., Chen Y, Yang Z, Zhang H, Osterby L, Rosmarin AG, Li S. (2010). "PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice." *Blood* **115**(3): 626-635.
- Pfeifer, H., Wassmann B, Pavlova A, Wunderle L, Oldenburg J, Binckebanck A, Lange T, Hochhaus A, Wystub S, Brück P, Hoelzer D, Ottmann OG. (2007). "Kinase domain mutations of BCR-ABL frequently precede imatinib-based therapy and give rise to relapse in patients with de novo Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL)." *Blood* **110**(2): 727-734.
- Polakova, K. M., Lopotova, T., Klamova, H., Moravcova, J. (2008). "High-resolution melt curve analysis: initial screening for mutations in BCR-ABL kinase domain." *Leuk Res* **32**(8): 1236-1243.
- Puttini, M., Coluccia, A. M., Boschelli, F., Cleris, L., Marchesi, E., Donella-Deana, A., Ahmed, S., Redaelli, S., Piazza, R., Magistroni, V., Andreoni, F., Scapozza, L., Formelli, F., Gambacorti-Passerini, C. (2006). "In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells." *Cancer Res* **66**(23): 11314-11322.
- Raitano, A. B., Halpern, J. R., Hambuch, T. M., Sawyers, C. L. (1995). "The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(25): 11746-11750.
- Ravandi, F., Jorgensen JL, Thomas DA, O'Brien S, Garris R, Faderl S, Huang X, Wen S, Burger JA, Ferrajoli A, Kebriaei P, Champlin RE, Estrov Z, Challagundla P, Wang SA, Luthra R, Cortes JE, Kantarjian HM. ( 2013). "Detection of MRD

- may predict the outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive ALL treated with tyrosine kinase inhibitors plus chemotherapy." Blood. **122**(7): 1214-1221.
- Ravandi, F., Kebriaei P. (2009 ). "Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia." Hematol Oncol Clin North Am. **23**(5): 1043-1063.
- Ravandi, F., O'Brien S, Thomas D, Faderl S, Jones D, Garris R, Dara S, Jorgensen J, Kebriaei P, Champlin R, Borthakur G, Burger J, Ferrajoli A, Garcia-Manero G, Wierda W, Cortes J, Kantarjian H. (2010). "First report of phase 2 study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia." Blood **116**(12): 2070-2077.
- Redaelli, S., Piazza, R., Rostagno, R., Magistroni, V., Perini, P., Marega, M., Gambacorti-Passerini, C., Boschelli, F. (2009). "Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants." J Clin Oncol **27**(3): 469-471.
- Roginskaya, V., Zuo S, Caudell E, Nambudiri G, Kraker AJ, Corey SJ. (1999). "Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth." Leukemia. **13**(6): 855-861.
- Roginskaya, V., Zuo, S., Caudell, E., Nambudiri, G., Kraker, A. J., Corey, S. J. (1999). "Therapeutic targeting of Src-kinase Lyn in myeloid leukemic cell growth." Leukemia **13**(6): 855-861.
- Ronaghi (2000). "Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein." Anal Biochem. **286**(2): 282-288.
- Ronaghi, M., Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. (1996). "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." Anal Biochem **242**(1): 84-89.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P. (1998). "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." Science **281**(5375): 363, 365.
- Rowley, J. D. (1973). "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." Nature **243**(5405): 290-293.
- Saglio, G., Guerrasio, A., Rosso, C., Zaccaria, A., Tassinari, A., Serra, A., Rege-Cambrin, G., Mazza, U., Gavosto, F. (1990). "New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia." Blood **76**(9): 1819-1824.
- Saglio, G., Kim, D. W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R. E., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Gallagher, N., Hoenekopp, A., Dong, M., Haque, A., Larson, R. A., Kantarjian, H. M. (2010). "Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia." N Engl J Med **362**(24): 2251-2259.
- Salgia, R., Pisick, E., Sattler, M., Li, J. L., Uemura, N., Wong, W. K., Burky, S. A., Hirai, H., Chen, L. B., Griffin, J. D. (1996). "p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene." J Biol Chem **271**(41): 25198-25203.
- Sattler, M., Griffin, J. D. (2001). "Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene." Int J Hematol **73**(3): 278-291.
- Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H.,

- Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R. A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette, R. L., Druker, B. J. (2002). "Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study." *Blood* **99**(10): 3530-3539.
- Sawyers, C. L., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M., Witte, O. (1994). "The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth." *Cell* **77**(1): 121-131.
- Schaefer-Rego, K., Arlin, Z., Shapiro, L. G., Mears, J. G., Leibowitz, D. (1988). "Molecular heterogeneity of adult Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia." *Cancer Res* **48**(4): 866-869.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* **103**(2): 211-225.
- Schultz, K. R., W. P. Bowman, et al. (2009). "Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study." *J Clin Oncol* **27**(31): 5175-5181.
- Schultz, K. R., Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, Wang C, Davies SM, Gaynon PS, Trigg M, Rutledge R, Burden L, Jorstad D, Carroll A, Heerema NA, Winick N, Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll WL, Camitta B. (2009). "Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study." *Journal of clinical oncology* **27**(31): 5175-5181.
- Selleri, v. L. M., Hermans A, Meijer D, Torelli G, Grosveld G. (1990). "Chronic myeloid leukemia may be associated with several bcr-abl transcripts including the acute lymphoid leukemia-type 7 kb transcript." *Blood* **75**(5): 1146-1153.
- Sinclair, P. B., Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green AR. (2000). "Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia." *Blood* **95**(3): 738-743.
- Skorski, T. (2002). "BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability." *Oncogene* **21**(56): 8591-8604.
- Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M. Z., Wen, S. C., Zon, G., Gewirtz, A. M., Perussia, B., Calabretta, B. (1995). "Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells." *Blood* **86**(2): 726-736.
- Smith, K. M., Yacobi, R., Van Etten, R. A. (2003). "Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain." *Molecular cell*. **12**(1): 27-37.
- Sokal, J. E., Cox, E. B., Baccarani, M., Tura, S., Gomez, G. A., Robertson, J. E., Tso, C. Y., Braun, T. J., Clarkson, B. D., Cervantes, F., et al. (1984). "Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia." *Blood* **63**(4): 789-799.
- Soverini, S., Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, Iacobucci I, Amabile M, Abruzzese E, Orlandi E, Radaelli F, Ciccone F, Tiribelli M, di Lorenzo R, Caracciolo C, Izzo B, Pane F, Saglio G, Baccarani M, Martinelli G; GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. (2006). "Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of

- Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia." *Clin Cancer Res* **12**(24): 7374-7379.
- Soverini, S., De Benedittis C, Papayannidis C, Paolini S, Venturi C, Iacobucci I, Luppi M, Bresciani P, Salvucci M, Russo D, Sica S, Orlandi E, Intermesoli T, Gozzini A, Bonifacio M, Rigolin GM, Pane F, Baccarani M, Cavo M, Martinelli G. (2014). "Drug resistance and BCR-ABL kinase domain mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia from the imatinib to the second-generation tyrosine kinase inhibitor era: The main changes are in the type of mutations, but not in the frequency of mutation involvement." *Cancer* **120**(7): 1002-1009.
- Soverini, S., Martinelli, G., Amabile, M., Poerio, A., Bianchini, M., Rosti, G., Pane, F., Saglio, G., Baccarani, M. (2004). "Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib." *Clin Chem* **50**(7): 1205-1213.
- Sparreboom, A., Danesi, R., Ando, Y., Chan, J., Figg, W. D. (2003). "Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy." *Drug Resist Updat* **6**(2): 71-84.
- Sureda, A., Carrasco, M., de Miguel, M., Martinez, J. A., Conde, E., Sanz, M. A., Diaz-Mediavilla, J., Sierra, J. (2003). "Imatinib mesylate as treatment for blastic transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia." *Haematologica* **88**(11): 1213-1220.
- Szczylik, C., Skorski, T., Nicolaidis, N. C., Manzella, L., Malaguarnera, L., Venturelli, D., Gewirtz, A. M., Calabretta, B. (1991). "Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides." *Science* **253**(5019): 562-565.
- Talpaz, M., Kantarjian, H. M., McCredie, K. B., Keating, M. J., Trujillo, J., Gutterman, J. (1987). "Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia." *Blood* **69**(5): 1280-1288.
- Talpaz, M., McCredie, K. B., Mavligit, G. M., Gutterman, J. U. (1983). "Leukocyte interferon-induced myeloid cyto-reduction in chronic myelogenous leukemia." *Blood* **62**(3): 689-692.
- Talpaz, M., Silver, R. T., Druker, B. J., Goldman, J. M., Gambacorti-Passerini, C., Guilhot, F., Schiffer, C. A., Fischer, T., Deininger, M. W., Lennard, A. L., Hochhaus, A., Ottmann, O. G., Gratwohl, A., Baccarani, M., Stone, R., Tura, S., Mahon, F. X., Fernandes-Reese, S., Gathmann, I., Capdeville, R., Kantarjian, H. M., Sawyers, C. L. (2002). "Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study." *Blood* **99**(6): 1928-1937.
- Thomas, J., Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. (2004). "Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance." *Blood* **104**(12): 3739-3745.
- Tokarski, J. S., Newitt, J. A., Chang, C. Y., Cheng, J. D., Wittekind, M., Kiefer, S. E., Kish, K., Lee, F. Y., Borzilleri, R., Lombardo, L. J., Xie, D., Zhang, Y., Klei, H. E. (2006). "The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants." *Cancer Res* **66**(11): 5790-5797.
- Uemura, N., Griffin, J. D. (1999). "The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration." *J Biol Chem* **274**(53): 37525-37532.



- Urbano-Ispizua, A., Cervantes, F., Matutes, E., Villamor, N., Pujades, A., Sierra, J., Feliu, E., Vives, J., Corrons, J. L., Montserrat, E., Rozman, C. (1993). "Immunophenotypic characteristics of blast crisis of chronic myeloid leukaemia: correlations with clinico-biological features and survival." *Leukemia* **7**(9): 1349-1354.
- Van Etten, R. A. (1993). "The molecular pathogenesis of the Philadelphia-positive leukemias: implications for diagnosis and therapy." *Cancer Treat Res* **64**: 295-325.
- Van Etten, R. A. (1999). "Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl." *Trends Cell Biol.* **5**: 179-186.
- Van Etten, R. A. (2003). "c-Abl regulation: a tail of two lipids." *Curr Biol* **13**(15): R608-610.
- van Rhee, F., Marks DI, Lin F, Szydlo RM, Hochhaus A, Treleaven J, Delord C, Cross NC, Goldman JM. (1995). "Quantification of residual disease in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of blood and bone marrow." *Leukemia*. **9**(2): 329-335.
- Warmuth, M., Bergmann, M., Priess, A., Hauslmann, K., Emmerich, B., Hallek, M. (1997). "The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr." *J Biol Chem* **272**(52): 33260-33270.
- Wassmann, B., Pfeifer H, Goekbuget N, Beelen DW, Beck J, Stelljes M, Bornhäuser M, Reichle A, Perz J, Haas R, Ganser A, Schmid M, Kanz L, Lenz G, Kaufmann M, Binckebanck A, Brück P, Reutzel R, Gschaidmeier H, Schwartz S, Hoelzer D, Ottmann OG. (2006). "Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL)." *Blood* **108**(5): 1469-1477.
- Watanabe, K., Minami Y, Ozawa Y, Miyamura K, Naoe T. (2012). "T315I mutation in Ph-positive acute lymphoblastic leukemia is associated with a highly aggressive disease phenotype: three case reports." *Anticancer research* **32**(5): 1779-1783.
- Wei, G., Rafiyath, S., Liu, D. (2010). "First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib." *J Hematol Oncol* **3**: 47.
- Weisberg, E., Griffin, J. D. (2000). "Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines." *Blood* **95**(11): 3498-3505.
- Weisberg, E., P. Manley, et al. (2006). "AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL." *Br J Cancer* **94**(12): 1765-1769.
- Weisberg, E., P. W. Manley, et al. (2005). "Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl." *Cancer Cell* **7**(2): 129-141.
- Weisberg, E., Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Hochhaus, A., Griffin, J. D. (2007). "Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia." *Nat Rev Cancer* **7**(5): 345-356.
- Wetzler, M., Talpaz, M., Yee, G., Stass, S. A., Van Etten, R. A., Andreeff, M., Goodacre, A. M., Kleine, H. D., Mahadevia, R. K., Kurzrock, R. (1995). "Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3488-3492.
- Wilson, M. B., Schreiner, S. J., Choi, H. J., Kamens, J., Smithgall, T. E. (2002). "Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family

- kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis." Oncogene **21**(53): 8075-8088.
- Wiley-Blackwell, T. F., Bertil J (2009). Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. . United States, Wiley.
- Wu, J., Meng F, Kong LY, Peng Z, Ying Y, Bornmann WG, Darnay BG, Lamothe B, Sun H, Talpaz M, Donato NJ. (2008). " Association between imatinib-resistant BCR-ABL mutation-negative leukemia and persistent activation of LYN kinase." J Natl Cancer Inst. **100**(13): 926-939.