

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leucemia Mieloide Crónica

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo clonal de células madre hematopoyéticas pluripotenciales relacionado con la presencia del Cromosoma Filadelfia (CrPh) (Goldman JM 2004, Mughal TI 2006, Rodak FB 2007, Wei Y 2007). También es llamada leucemia granulocítica crónica debido a un aumento de granulocitos en la sangre. Sin embargo, debido a que se pueden encontrar anomalías en otras células derivadas de la estirpe mieloide como eritrocitos y plaquetas, algunos autores consideran más apropiado el término Leucemia Mieloide Crónica (Goldman JM 2004, Olavarria E 2005).

La incidencia mundial de LMC es de aproximadamente 1-1.3 por cada 100 000 individuos cada año (Goldman JM 2004, Marcucci G 2003). Se puede presentar a cualquier edad, sin embargo, su incidencia en pacientes pediátricos es sólo del 3% (Ruiz Argüelles GJ 2007). Predomina entre los 40 y los 50 años, aunque el riesgo es mayor al aumentar la edad complicándose después de los 60 (Cervero CE 2003, Ruiz Argüelles GJ 2007). Es más frecuente en varones que en mujeres con una relación de 3:2 (Rodak FB 2007, Ruiz Argüelles GJ 2007). Constituye el 20% de todas las leucemias y el 15% de las leucemias en el adulto (Goldman JM 2004, Rodak FB 2007). En México es menos común que la leucemia mieloide aguda (LMA) pero más frecuente que la leucemia linfocítica crónica (LLC), contrario a países anglosajones donde esta última tiene mayor incidencia (Ruiz Argüelles GJ 2007).

La etiología exacta de LMC es desconocida. Se sabe que está asociada al CrPh pero no se sabe con certeza qué es lo que hace aparecer al propio CrPh y la consiguiente expresión de

oncogenes (Ruiz Argüelles GJ 2007). Se han correlacionado casos de LMC con exposiciones repetidas a radiación ionizante como rayos X y rayos gamma (Lichtman MA 2008). De hecho, pacientes que han padecido linfomas o cáncer de pecho tienen mayor riesgo de presentar LMC por la radioterapia que pueden recibir para tratar los primeros tipos de cáncer (Goldman JM 2004).

También se han hecho estudios sobre la relación entre exposición a quimioterapéuticos como agentes alquilantes. Sin embargo, no se tienen resultados contundentes de si una exposición excesiva a éstos aumenta de forma inminente el riesgo de padecer LMC como en el caso de las leucemias agudas. La predisposición hereditaria para LMC hasta ahora se ha descartado (Lichtman MA 2008, Ruiz Argüelles GJ 2007).

El curso de la enfermedad se desarrolla generalmente en tres fases denominadas fase crónica, fase acelerada y fase blástica. Algunos pacientes sólo presentan dos y pueden pasar directamente de la fase crónica a la fase blástica (Cervero CE 2003, Marcucci G 2003, Vargas VP 2003, Wei Y 2007). A continuación se detalla cada fase:

- ▶ Fase crónica. Esta fase puede durar de 3 a 6 años dependiendo de si la detección fue oportuna. El 85% de los pacientes con LMC son diagnosticados en los inicios de esta etapa quienes deben iniciar el tratamiento inmediatamente. Los síntomas más comunes son pérdida de peso, sudoración excesiva, fatiga, esplenomegalia con consecuentes dolores abdominales y anorexia (Goldman J 2004, Wei Y 2007). Cerca del 40% de los pacientes son asintomáticos en esta etapa y suelen ser diagnosticados fortuitamente en estudios de sangre (Kabarowski JH 2000).

- ▶ Fase acelerada. Tiene una duración aproximada de 6 a 24 meses dependiendo del tiempo de tratamiento y de la evolución del paciente. Durante esta etapa los síntomas suelen empeorar presentándose sangrados e infiltración ósea que resulta en dolor óseo profundo (Goldman JM 2004, Wei Y 2007). La angiogénesis empieza a ser mayor conforme avanza la enfermedad, principalmente en la médula ósea (Cortés J 2003). No todos los pacientes pasan por esta etapa, los no tratados a tiempo en la fase crónica suelen progresar rápidamente a la fase blástica. También durante esta fase es común la resistencia a la farmacoterapia (Goldman JM 2004). Resulta interesante que conforme avanza la enfermedad, aparecen anormalidades citogenéticas diferentes al CrPh, algunos autores llaman a este proceso evolución clonal (Vargas VP 2003). Las más comunes son trisomía 8 y 19; isocromosoma 17q y doble CrPh. Estas alteraciones son un indicio de la progresión inminente de la enfermedad. Las células inmaduras aumentan conforme avanza la enfermedad (Mughal TI 2006, Vargas VP 2003).

- ▶ Fase de crisis blástica terminal. Etapa de corta duración (alrededor de 6 meses). Los blastos constituyen poco más del 30% de las células de la sangre y de la médula ósea. La resistencia a fármacos es mucho mayor. Los síntomas también se ven incrementados presentándose fiebre y caquexia generalizada. Las posibilidades de sobrevivencia son mínimas una vez que se ha iniciado esta fase. La mayoría de los pacientes muere por complicaciones provocadas por sangrados o infecciones (Goldman J 2004, Wei Y 2007).

El mecanismo exacto por el cual la enfermedad evoluciona a la fase blástica de forma tan rápida se desconoce. Una hipótesis plausible explica que durante el inicio de esta

fase ocurre una sobreexpresión de BCR-ABL1 lo cual puede provocar la aparición de anomalías moleculares y genéticas que contribuyan a la expansión de la población celular CrPh⁺ acentuándose la capacidad de proliferación, resistencia a la apoptosis y pérdida de la capacidad de diferenciación. Lo anterior podría contribuir a la ineficacia de la farmacoterapia característica de esta fase. Durante esta etapa aparecen otras translocaciones además de la t(9;22), destacan t(3;21)(q26;q22) y t(7;11)(p15;p15) (Calabretta B 2004).

Otra explicación posible es la formación de subclonas más agresivas formadas por un proceso denominado inestabilidad genética. La actividad de BCR-ABL1 sobre algunas proteínas de reparación del DNA como RAD51, DSB, DNA-PKcs, provoca una disfunción de éstas lo que podría explicar la llamada inestabilidad genética. Por otra parte se ha concluido que durante esta fase ocurren mutaciones en el gen que codifica a p53, un gen supresor de tumores cuya proteína está implicada en la regulación de la proliferación, supervivencia celular y angiogénesis. Estas mutaciones, provocan una inactivación genética o funcional de p53 lo cual podría estar relacionado con la rápida evolución de la fase blástica (Calabretta B 2004, Mughal TI 2006).

1.1.1 Diagnóstico

El diagnóstico de la LCM se puede hacer a diferentes niveles:

- ▶ Hematológico. La citometría hemática constituye un parámetro de importancia diagnóstica en la fase crónica de LMC presentando aumento de plaquetas y leucocitos totales ($> 10^6/\text{mm}^3$), en especial basofilia, neutrofilia y eosinofilia. Los mieloblastos

constituyen poco menos del 10% de los leucocitos circulantes. También se pueden encontrar eritrocitos nucleados los cuales pueden estar en cantidades normales o disminuidas (Rodak FB 2007, Wei Y 2007).

- ▶ Bioquímico. La fosfatasa alcalina leucocitaria se encuentra disminuida prácticamente a niveles cercanos a cero (Rodak FB 2007, Wei Y 2007).
- ▶ Biopsia de médula ósea. Aumento de los procesos de granulopoyesis y megacariopoyesis que se ve reflejado en un incremento de las células que se forman en los respectivos procesos; los macrófagos están presentes en gran cantidad y las células adiposas disminuidas. La reticulina se encuentra aumentada lo cual favorece la mielofibrosis (Rodak FB 2007, Wei Y 2007).
- ▶ Citogenético. Permite la detección e identificación del CrPh mediante cariotipo por tinción de bandas G o identificación por FISH (Rodak FB 2007, Wei Y 2007), (una descripción más detallada sobre el CrPh se encuentra en la sección 1.1.2).
- ▶ Diagnóstico Molecular. Permite la detección de la oncoproteína BCR-ABL1 mediante diferentes métodos basados en PCR (Deininger MWN 2000, Wei Y 2007).

Para un diagnóstico certero es necesario hacer varios estudios de laboratorio y correlacionar los resultados con los síntomas del paciente (Ruiz Argüelles GJ 2007).

1.1.2 Cromosoma Filadelfia

El CrPh está presente en aproximadamente el 95% de los pacientes con LMC de manera que constituye un marcador diagnóstico para la enfermedad (Druker BJ 2008). A estos pacientes

con LMC se les denomina CrPh⁺, mientras que el 5% restante lo constituyen pacientes con LMC CrPh⁻ (Druker BJ 2008, Prochi M 2003).

Esta alteración cromosómica resulta de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 designada como t(9,22) (q34; q11) (Druker BJ 2008, Hurtado MR 2006). El resultado molecular de esta translocación es el oncogén *bcr-abl1* que codifica para la proteína quimérica homónima BCR-ABL1. El oncogén se origina al unirse el extremo 3' del segmento del gen *abl1* ubicado en el locus q34 del cromosoma 9 con el extremo 5' del segmento de *bcr* ubicado en el locus q11 del cromosoma 22 (Wei Y 2007). El resultado es un cromosoma 22 mucho más corto llamado CrPh con el oncogén *bcr-abl1* (Fig. 1.1).

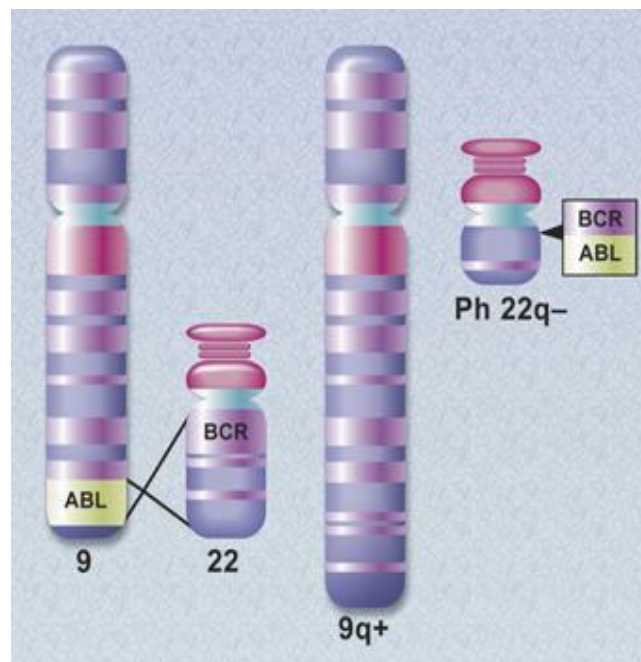


Fig 1.1. Translocación cromosómica t(9,22) (q34; q11). En la imagen se observa que el resultado de este intercambio recíproco de material genético genera un cromosoma 9 más largo expresado como 9q+ y el cromosoma 22 resultante es más corto que el normal expresado como 22q⁻. Este cromosoma 22 se denomina CrPh y contiene el gen híbrido *bcr-abl1* (Druker BJ 2008).

Esta anomalía cromosómica también se encuentra presente en cerca del 20% de los pacientes adultos con LLA y en el 5% de los pacientes pediátricos con esta misma patología. Es muy rara su presencia en pacientes con LMA (Laurent E 2001). Se han encontrado niveles muy bajos de BCR-ABL1 en pacientes normales cuyas concentraciones no son suficientes para desencadenar LMC. Esto puede deberse a que se expresa en células incapaces de expansión clonal o bien las células que lo expresan son atacadas por el sistema inmune y eliminadas antes de que aparezca la leucemia (Mughal TI 2006).

ABL1 es una enzima con actividad de tirosina-quinasa con un peso molecular de 145 kDa (Smith K 2003). El gen correspondiente *abl1*, se encuentra en el cromosoma 9 y posee 11 exones y 11 intrones (Fig. 1.2).

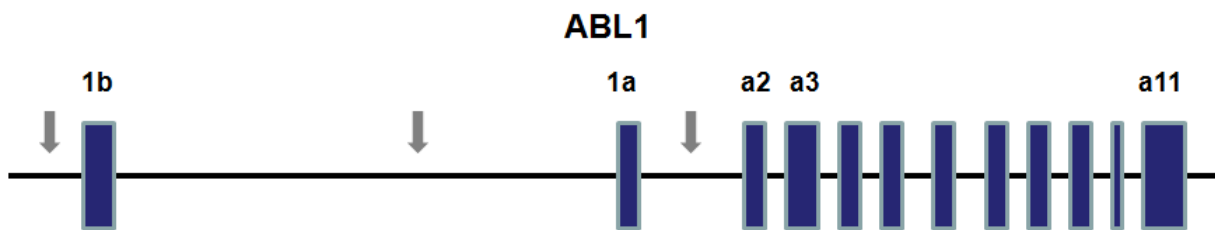


Fig. 1.2. Mapa del gen *abl1* en el que se observan los 11 exones que lo constituyen. Posee dos exones 1 alternativos (1a y 1b). Los exones del 2 al 11 se nombran como a2- a11. Las flechas indican los posibles puntos de ruptura durante la formación del oncogén *bcr-abl1*. La ruptura ocurre principalmente entre los exones 1a y a2 (Modificado de Deininger MWN 2000).

La proteína posee tres dominios importantes llamados SH1, SH2 y SH3. En el dominio SH1 se encuentra la región catalítica que constituye el dominio quinasa, el cual abarca del aminoácido 235 al 509 (Smith K 2003, Wei Y 2007). Los dominios SH2 y SH3 están implicados en procesos de regulación, ayudan a mediar las interacciones proteína-proteína y

modulan la activación de transducción de señales. SH3 es crucial para la autorregulación permitiendo una correcta actividad quinasa. Sin embargo, cuando se forma la proteína híbrida se pierde la función de SH3 lo que resulta en una actividad quinasa incrementada (Marcucci G, 2003).

ABL1 posee dos isoformas, ABL-a y ABL-b, obtenidos por splicing alternativo del primer exón (exones 1a y 1b) (Fig. 1.2). La isoforma ABL-a está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma; la segunda sólo está en el citoplasma (Beissert T 2006, Wei Y 2007). La isoforma ABL-a se denomina con el nombre p145^{ABL} el cual indica su peso molecular en kDa (Smith K, 2003). Esta proteína, en condiciones normales, está involucrada en diversos procesos celulares (Mughal TI, 2006):

- Inhibición del ciclo celular.
- Proceso de diferenciación celular.
- Transducción de señales implicadas en la adhesión celular.
- Respuesta a estrés.

Por su parte, BCR es el producto del gen homónimo *bcr*. Este gen de 130 kb está formado por 23 exones que codifican para una proteína de 160 kDa denominada p160^{BCR} (Laurent E 2001). Los exones 1 y 2 poseen exones alternativos (e1' y e2') (Fig. 1.3) lo cual produce una proteína más ligera p130^{BCR}.

BCR es una proteína compleja con varios dominios funcionales. Posee actividad de serina-treonina quinasa cuyo dominio se encuentra en el exón 1. Se sabe que se autofosforila y fosforila histonas *in vitro*. También posee un dominio para la oligomerización lo que le

permite formar homotetrámeros (Laurent E 2001). Posee otros dominios importantes para los procesos de la activación de proteínas GTPasas como RAS y RHO (Marcucci G 2003).

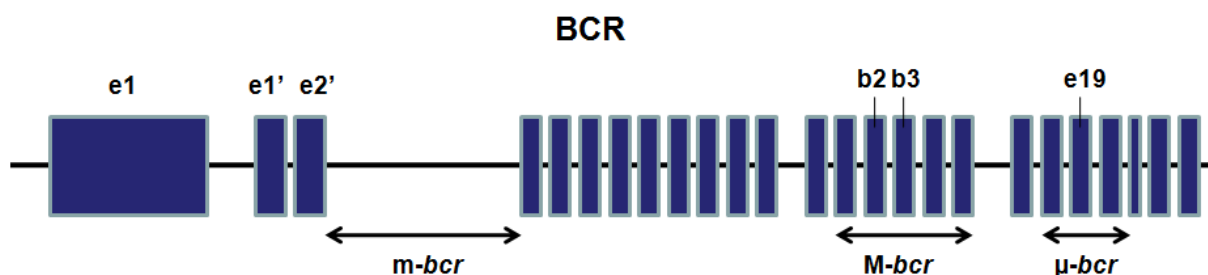


Fig. 1.3. Mapa del gen bcr. Están señaladas las regiones m-bcr, M-bcr y μ -bcr. Como se puede observar la región m-bcr está ubicada en un intrón y cuando la ruptura ocurre en este sitio se produce una proteína BCR-ABL1 de 190 kDa. La región M-bcr contiene a los exones denominados b2 y b3 que corresponden a los exones 13 y 14 respectivamente implicados en BCR-ABL1 de 210 kDa. Cuando la ruptura ocurre en la región μ -bcr el exón implicado es e19 y se forma el transcrito para una proteína más grande de 230 kDa (Modificado de Deininger MWN 2000, Laurent E 2001).

En el punto de ruptura de ab11 para formar bcr-ab11, los exones 2 al 11 de ab1 (también llamados a2- a11) están yuxtapuestos al extremo 5' de bcr. La región M-bcr en el cromosoma 22 está ubicada entre los exones e12 y e16 de bcr (llamados también b1- b5) (Fig. 1.3). Las fusiones más importantes de bcr-ab11 son e13a2 y e14a2 (b2a2 y b3a2, respectivamente). La proteína codificada tiene un peso de 210 kDa, denominada p210^{BCR-ABL1} localizada en el citoplasma (Laurent E 2001). En el 95% de pacientes BCR-ABL1 positivos con LMC las células leucémicas poseen tanto b2a2 como b3a2. Las características clínicas, respuesta al tratamiento y pronóstico son similares en pacientes con b2a2 o b3a2, excepto por la presencia de mayor trombocitosis en pacientes con b3a2. Otros puntos de ruptura en bcr localizados en regiones llamadas m-bcr y μ -bcr fusionados con ab11 dan como resultado las proteínas

p190^{BCR-ABL1} (producto del transcrito e1a2) y p230^{BCR-ABL1} (producto del transcrito e19a2) respectivamente (Fig. 1.4) (Laurent E 2001, Mughal TI 2006, Wei Y 2007).

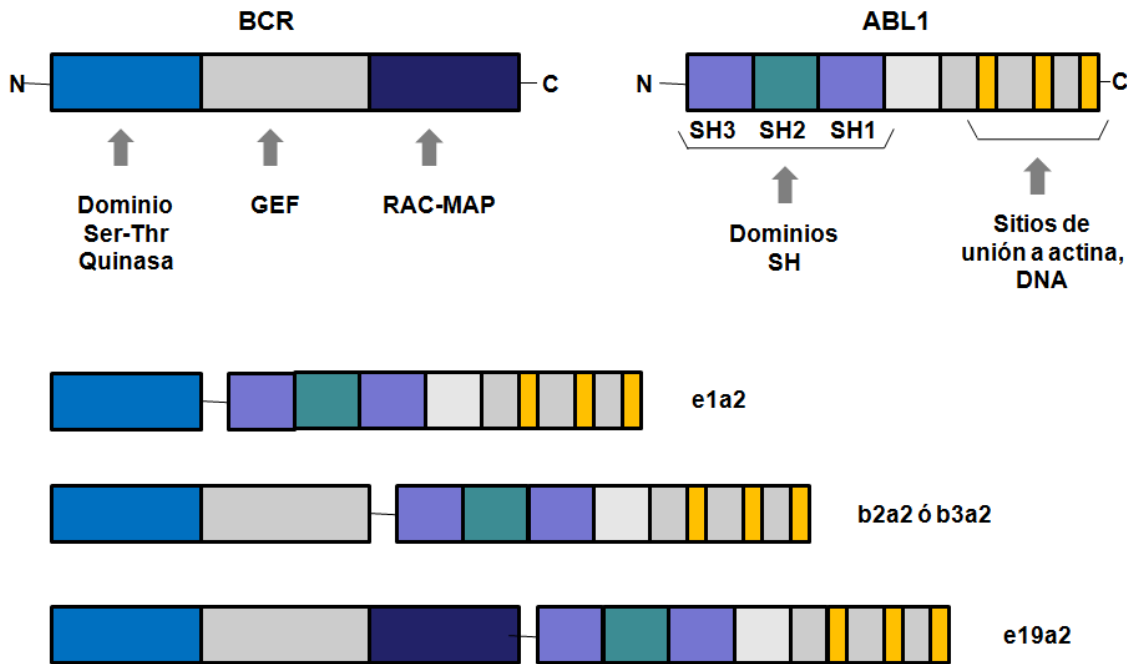


Fig. 1.4. Imagen en la que se resaltan los puntos de ruptura y los dominios involucrados en la fusión bcr-abl1. En la parte inferior se muestran las fusiones e1a2, b2a2, b3a2 y e19a2. En bcr destacan el dominio serina-treonina quinasa, el dominio para el factor de intercambio GDP-GTP (GEF) y el dominio de unión de GTPasa homóloga a RAS (RAC) y de GAP (Proteína de activación de guanosina trifosfatasa). En abl1 destacan los dominios SH1, SH2 y SH3 así como otros involucrados en unión al ADN y diversas proteínas (Modificado de Wei Y 2007).

BCR-ABL1 posee una actividad quinasa aumentada e incontrolada que provoca en las células una desregulación en el ciclo celular, en la proliferación, así como una notable inhibición de la apoptosis. Por otra parte, la adhesión de las células leucémicas a las células del estroma de la médula ósea disminuye permitiendo su salida a la circulación sanguínea (Mughal TI 2006, Smith KM 2003). La estructura de p210^{BCR-ABL1} permite múltiples interacciones proteína-proteína las cuales están involucradas en varias vías de señalización intracelular (Fig.1.5).

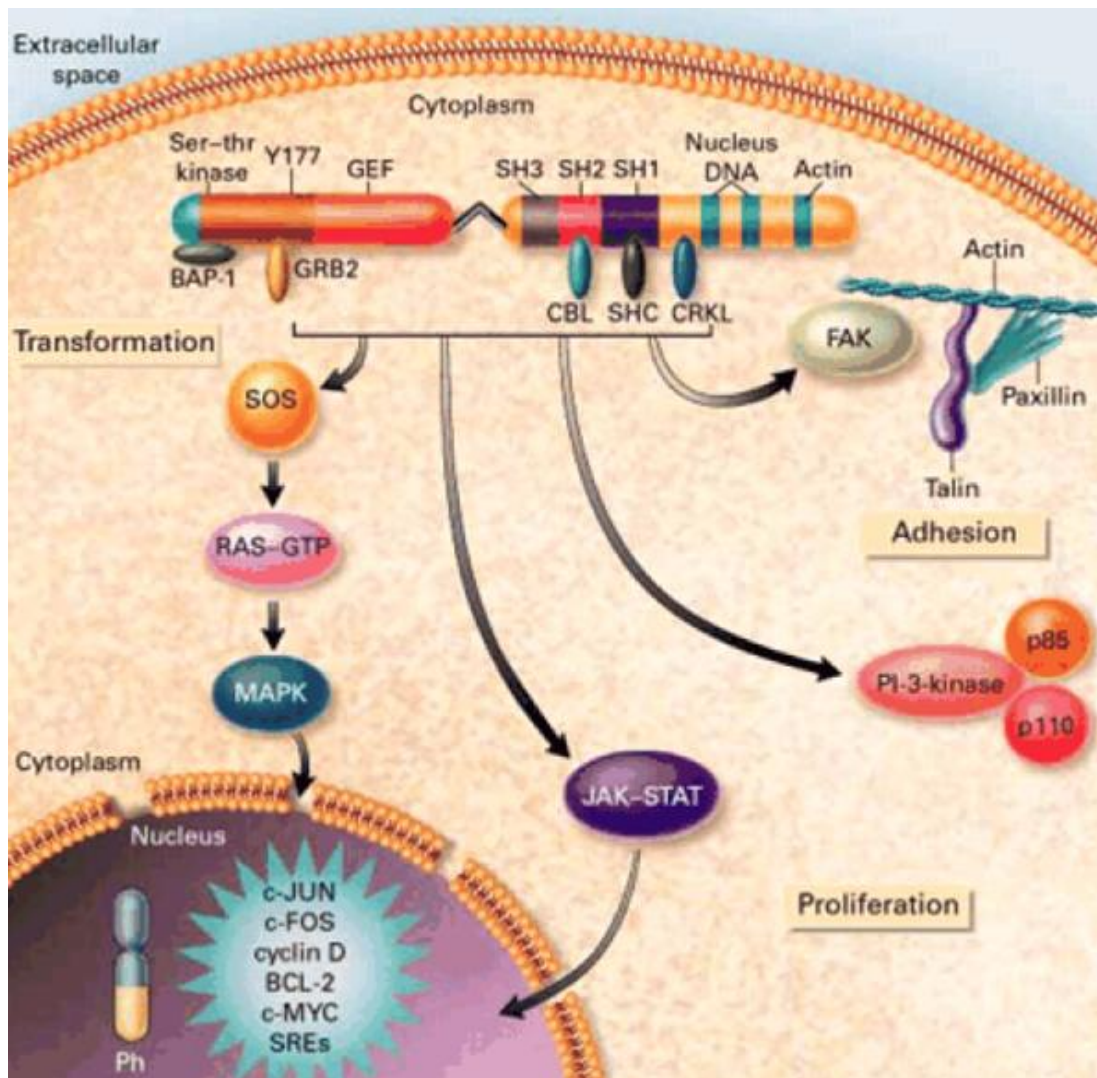


Fig. 1.5 Vías de señalización relacionadas con $p210^{\text{BCR-ABL1}}$. La activación de RAS desencadena una serie de acontecimientos que constituyen la médula de la actividad de BCR-ABL1. La activación de RAS está mediada por una serie de proteínas adaptadoras como BAP-1, GRB2, CBL, SHC y CRKL. Estas proteínas conectan la actividad de $p210^{\text{BCR-ABL1}}$ a complejos de adhesión focal, PI-3K y otros como JAK-STAT quinasas, de esta manera se alteran procesos de diferenciación, proliferación y adhesión celular. (BAP-1: Proteína asociada a BCR 1, GRB2: Proteína receptora de factor de crecimiento 2, FAK: Quinasa de adhesión focal, SOS: proteína “son of sevenless”, SRE: Elemento de respuesta a estímulo) (Wei Y 2007).

BCR-ABL1 puede activar a GRB2, CBL (proteína pro-oncogén de linfoma de células B) y RAS con la que se inician una serie de acontecimientos que finalmente provocan la expresión

de varios genes que codifican a c-JUN, c-FOS, ciclina D, BCL-2, c-MYC y SREs los cuales están involucrados en la diferenciación, en el ciclo celular alterándolo e inhibiendo la apoptosis (Zou X 1999) (Fig.1.5). La vía JAK/STAT5 puede ser fosforilada directamente por BCR-ABL1 independientemente de la vía RAS la cual promueve la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-XL presente en la membrana externa de la mitocondria (Druker BJ 2008, Kabarowski JH 2000, Laurent E 2001, Zou X 1999).

Otros substratos incluyen la proteína FAK y Paxillina. Esto tiene como consecuencia una disminución de la adhesión de las células leucémicas a la matriz extracelular vía integrinas (Fig. 1.5) (Laurent E 2001, Zheng X 2006, Zou X 1999). La vía de PI-3K (Fosfatidilinositol-3 quinasa) también puede ser activada por BCR-ABL1 cuyas subunidades funcionales p85 y p110 están involucradas en su propia regulación. Cuando éstas están sobre-estimuladas provocan la disminución de la regulación de p27, un inhibidor de las ciclinas dependientes de quinasa originando un aumento en la degradación de p53 lo cual podría provocar una evolución hacia la crisis blástica de LMC (Kharas MG 2005, Calabretta B 2004).

1.1.2.1 Detección de CrPh

El CrPh puede identificarse por medio de técnicas de Citogenética. También es posible su detección mediante técnicas de Biología Molecular debido a que la consecuencia de t(9,22) es la oncoproteína BCR-ABL1, lo cual casi siempre equivale a identificar al propio CrPh. Una técnica convencional es la tinción de bandas G para la obtención de un cariotipo en la que usualmente se examinan 25-30 células en metafase. Esta técnica permite la detección del CrPh en 95% de los pacientes (Wei Y 2007).

Un procedimiento más sensible en Citogenética Molecular es la “hibridación *in situ* con fluorescencia” (FISH) (Nussbaum RL 2007). El fundamento de la técnica consiste en la hibridación *in situ* de una sonda con alguna región de DNA a la cual sea complementaria, aunque también están disponibles técnicas de FISH para RNA (Braziel RM 2003). Las sondas pueden estar marcadas con biotina o digoxigenina y ser detectados con anticuerpos conjugados con fluorocromos o ser marcados directamente con algún fluorocromo. La sonda hibridada emite luz fluorescente cuando se observan los cromosomas a una longitud de onda que excita los electrones del fluorocromo. De esta manera se pueden identificar genes específicos o loci de cromosomas en particular (Braziel RM 2003, Nussbaum RL 2007).

La técnica de FISH tiene una amplia variedad de aplicaciones en diferentes áreas biológicas y médicas que incluyen la oncología (Prochi M 2007). Esta técnica es complementaria a las de citogenética convencional y en ocasiones provee información adicional que no es detectada mediante el cariotipo. Gracias a que se puede analizar una gran cantidad de células en interfase, permite la detección de enfermedades residuales así como la evaluación de la remisión citogenética y de recurrencias (Nussbaum RL 2007, Prochi M 2003). También se puede emplear como análisis cuantitativo para monitorear la respuesta hematológica en LMC (Prochi M 2003).

La FISH para detectar CrPh es típicamente una co-hibridación de una sonda para bcr y otra para abl1 sobre los cromosomas desnaturalizados en metafase o en interfase. La FISH tradicional (denominada S-FISH o dual-FISH) es una técnica basada en dos colores en la que una sonda de fluorescencia complementaria al extremo 5' de bcr y otra para el extremo 3' de abl1 son utilizadas con colores contrastantes para detectar la posición de los respectivos

genes. La superposición al asar de las dos sondas fluorescentes en núcleos en interfase, puede provocar resultados falsos positivos. La frecuencia de falsos positivos puede ser tan alta como de 3-10% (Wei Y 2007).

Por otra parte, la FISH de triple sonda (o de triple color) incrementa la sensibilidad en comparación al S-FISH al introducir una tercera sonda que abarca los puntos de ruptura tanto de bcr como de abl1. Cada sonda es marcada con un fluorocromo diferente. En las células CrPh⁺, debido a la señal producida por la fusión de abl1 y bcr, la señal de la tercera sonda es nula. El proceso de verificación en dos pasos permite incrementar la sensibilidad para la detección de células CrPh⁺ con un porcentaje de falsos positivos de 0.065-0.27% (Wei Y 2007).

La doble FISH (D-FISH) emplea cuatro sondas; dos son empleadas como en S-FISH, la que se une al extremo 3' de bcr y la que hibrida en 5' de abl1. Las dos sondas adicionales abarcan los puntos de ruptura de los cromosomas 9 y 22. La presencia de la fusión bcr-abl1 en D-FISH resulta en una señal doble debido a que las cuatro sondas se fijan a sus respectivos loci bcr-abl1 y abl1-bcr. Esto reduce la frecuencia tanto de falsos negativos como de falsos positivos comparado con S-FISH (Wei Y 2007).

En cuanto a las técnicas de Biología Molecular que permiten la detección del CrPh se encuentran RT-PCR, PCR multiplex y PCR anidado cuyo blanco es amplificar el oncogén bcr-abl o el mRNA correspondiente. Estas técnicas ofrecen una sensibilidad elevada para poder detectar la presencia de BCR-ABL1 ya sea para diagnosticar o para monitorizar a los pacientes bajo tratamiento (Wei Y 2007).

Durante la última década, se han establecido ensayos mediante RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) para medir los niveles de transcritos de BCR-ABL en la sangre o en la médula ósea, lo que permite evaluar la dinámica de la enfermedad residual a través del tiempo (Wei Y 2007).

Una técnica común de qRT-PCR empleada en el monitoreo de la LMC hace uso de sondas con secuencias específicas como TaqMan®. Esta sonda con una secuencia complementaria a bcr-abl1 de cDNA es doblemente marcada. El espectro de emisión de un fluoróforo es inhibido por un segundo fluoróforo. Una vez que se une de manera específica a la secuencia complementaria, la sonda es degradada por la actividad exonucleasa de Taq polimerasa durante la reacción de PCR lo cual separa las sondas resultando una emisión fluorescente. Durante el curso de la PCR, la intensidad de la fluorescencia aumenta en forma paralela con la cantidad de producto de PCR por lo que puede ser detectada en “tiempo real” (Braziel RM 2003, Wei Y 2007).

1.1.3 Tratamiento

El tratamiento debe iniciarse lo antes posible una vez que se ha diagnosticado LMC. De acuerdo a la especificidad de los fármacos empleados, la farmacoterapia se puede clasificar en convencional y específica (Vallejos G 2007, Wei Y 2007).

El tratamiento convencional incluye busulfán, hidroxiurea, 6-mercaptopurina, citarabina e interferón- α (INF- α). Sin embargo, en la actualidad el tratamiento específico es el de elección conformado por los inhibidores de la tirosina-quinasa BCR-ABL1 (ITK) como imatinib, dasatinib y nilotinib (Olavarria E 2005, Shah NP 2005).

En México aún se sigue empleando extensamente el tratamiento convencional debido a los altos costos de los ITK (Ruiz Argüelles GJ 2007).

El INF- α es una glucoproteína que posee propiedades antivirales y antiproliferativas. Se emplea a dosis de 5×10^6 unidades /m²/día. Sin embargo, es costoso y sus efectos colaterales incluyen fiebre, astenia, cefalea y dolor óseo, los cuales pocos pacientes toleran (Ruiz Argüelles GJ 2007).

El mecanismo de acción de los ITK consiste en inhibir la actividad de BCR-ABL1, causante molecular de la LMC. El imatinib cuyo nombre de investigación STI571, fue el primer inhibidor de tirosina-quinasa. Actualmente está en el mercado con el nombre comercial Gleevec® en América y Glivec® en Europa, fabricado por la compañía farmacéutica Novartis y cuya fórmula es mesilato de imatinib (Kantarjian H 2004, Shah NP 2005). Fue aprobado por la FDA en 2001 (Vallejos G 2007). Este fármaco es un derivado de la 2-fenilaminopirimidina (Fig. 1.6) cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la actividad quinasa de ABL1 presente en el híbrido p120^{BCR-ABL1} uniéndose a los aminoácidos adyacentes donde se une el ATP en el sitio activo. La inhibición de su actividad permite en última instancia la disminución de la proliferación celular así como la inducción de la apoptosis (Cervera CE 2003, Kantarjian H 2002, Kantarjian H 2004, Shah NP 2005).

Las dosis habituales son de 400 mg/día (Olavarria E 2005 Vallejos G 2007). Sin embargo la dosis puede elevarse a 600 mg/día para mejores resultados sin exceder 800 mg diarios ya que a esta dosis los efectos adversos se incrementan (Kantarjian H 2004).

Se ha informado que el tratamiento con mesilato de imatinib es generalmente bien tolerado y el riesgo de efectos adversos severos es bajo a dosis adecuadas (Vallejos G 2007). Entre los más comúnmente observados se incluyen edema leve a moderado, náuseas y vómito, diarrea, calambres musculares y reacciones cutáneas observadas generalmente en pacientes que reciben 600 mg diarios. El espectro de estas manifestaciones varía desde erupciones hasta carcinoma cutáneo. Si aparece mielosupresión y artralgia extrema, se recomienda abandonar el tratamiento con imatinib y sustituirlo (Micromedex 2009, Vallejos G 2007).

A pesar de que en la actualidad constituye el tratamiento de elección por ser un fármaco específico, muchas veces los pacientes reciben INF- α previo a la administración de imatinib. Lo anterior sólo se recomienda si la LMC fue diagnosticada en forma muy oportuna (Kantarjian H 2002). Es importante destacar que el tratamiento con imatinib resulta más costoso que el tratamiento con antineoplásicos convencionales, pero en muchos casos es preferible por su mejor respuesta y menor severidad de reacciones adversas (Gordois A 2003).

Otros ITK disponibles incluyen nilotinib y dasatinib con los nombres comerciales de Tasigna® (Novartis) y Sprycel® (Bristol-Myers Squibb) respectivamente (Talpaz M 2006). Estos fármacos de segunda generación difieren del imatinib en varios aspectos. En primer lugar ambos son más potentes, es decir, se requieren dosis menores para obtener el mismo efecto terapéutico. Se recomiendan 200- 400 mg diarios para nilotinib y 100 mg diarios para dasatinib, siendo este último más potente aun que imatinib y nilotinib. Estas dosis se deben ajustar a las necesidades de cada paciente (Talpaz M 2006).

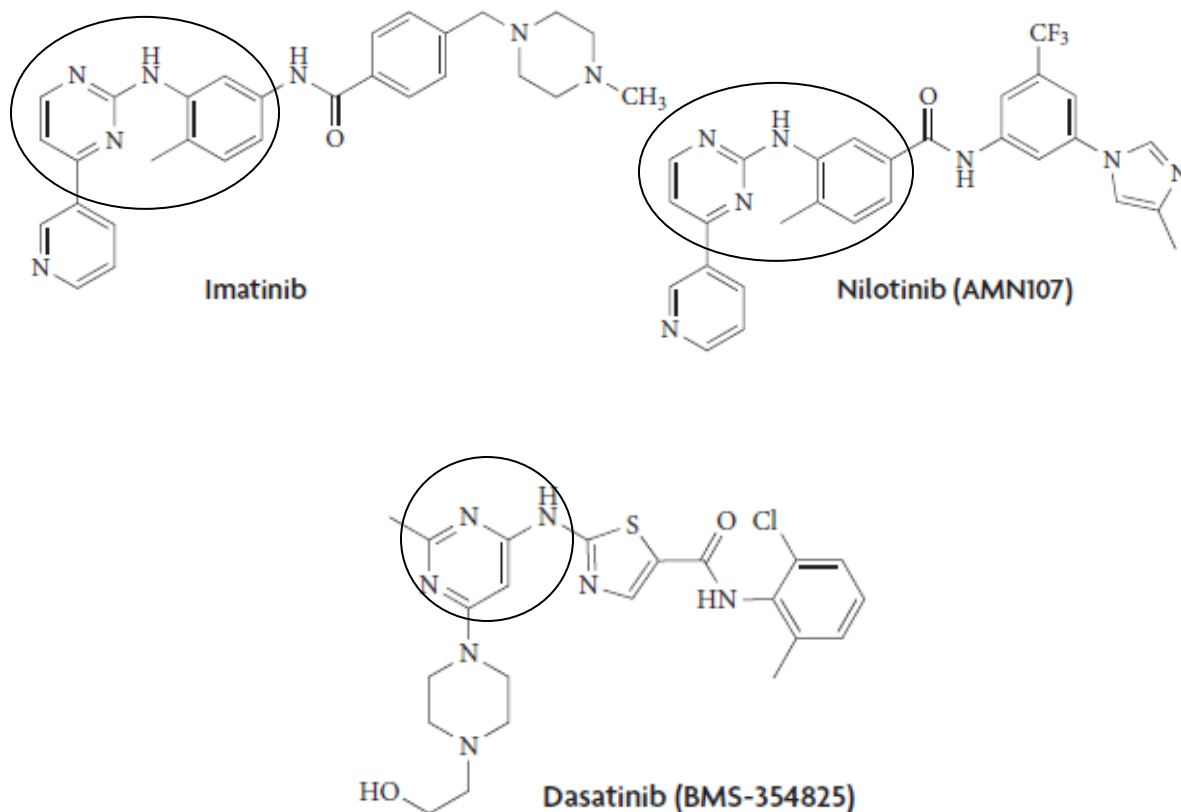


Fig. 1.6. Fórmulas estructurales de los ITK. Entre paréntesis aparecen los nombres empleados durante las fases de investigación de nilotinib y dasatinib. La región que comparten imatinib y nilotinib se encuentra encerrada en una elipse (2-fenilaminopirimidina). La región señalada en la estructura de dasatinib constituye el farmacóforo que incluye sólo la amino-pirimidina (Modificado de Weisberg E 2007).

Por otra parte imatinib y nilotinib se unen únicamente a la conformación inactiva de BCR-ABL1, mientras que dasatinib inhibe tanto a la conformación activa como a la inactiva proporcionándole un espectro más amplio de actividad (Shah NP 2005, Weisberg E 2007).

Algunos de los efectos adversos más comunes bajo el tratamiento con nilotinib incluyen: edema periférica, alopecia (1-10% de los casos), sequedad de piel, prurito y eritema (25%), diarrea, náuseas y vómito moderados, mialgias y dolor óseo (11-13%) (Micromedex 2009).

Por otra parte las reacciones adversas más comunes con dasatinib abarcan edema, efusión pleural, eritema (22%), dolor abdominal, constipación, náuseas y vómito (15%) (Micromedex 2009, Weisberg E 2007).

Estos fármacos se han empleado como monoterapia con la que se obtienen buenos resultados en la mayoría de los casos. Sin embargo, pueden presentarse remisiones en las que se recomiendan combinaciones de ellos o bien, administrarlos con INF- α y citarabina concomitantemente (Talpez M 2007, Wei Y 2007).

Otra opción terapéutica es el trasplante alogénico de células madre de médula ósea, el cual constituye realmente la única opción curativa para la LMC (Ruiz Argüelles GJ 2007, Wei Y 2007). El resultado de este procedimiento depende de una serie de factores de riesgo, el más importante de ellos es la edad del paciente y la fase de la enfermedad. Para pacientes menores de 40 años en la fase crónica sometidos a trasplante después de un año de haber sido diagnosticados, se han reportado sobrevivencias en períodos más largos en un 70-80% de los casos.

Desafortunadamente, más de un tercio de los pacientes con LMC son mayores de 60 años, para quienes el trasplante alogénico de células madre no es recomendable por el alto riesgo de mortalidad. Otro obstáculo es la disponibilidad de donadores con un HLA idéntico. Por lo tanto, para muchos pacientes con LMC, el trasplante no es una opción factible (Raza S 2008, Wei Y 2007).

Es interesante mencionar que el trasplante constituía la primera opción para tratar LMC en países desarrollados. Sin embargo, tras la aparición de los ITK éstos se convirtieron en el

tratamiento de elección debido a que presentan menos complicaciones inmediatas a diferencia del trasplante cuyas complicaciones incluyen elevado riesgo de infecciones fúngicas y bacterianas severas y alta mortalidad. Por su parte, en países en desarrollo el tratamiento con ITK resulta más costoso que el trasplante (Gratwhol A 2007, Raza S 2008). Sin embargo, debido a la relativa seguridad de los ITK o de otros quimioterapéuticos convencionales, éstos se prefieren al trasplante de médula ósea. Existe una modalidad denominada “trasplante no mieloablativo” que es aún más barato que el trasplante convencional y con el que obtienen resultados similares en pacientes muy adultos o debilitados (Ruiz Argüelles GJ 2007).

Debido al problema intrínseco con el trasplante de médula ósea, algunos estudios están enfocados a buscar nuevas alternativas terapéuticas para LMC sin recurrir a la quimioterapia. Volpe et al, (2007) sugieren la posibilidad de vacunación para tratar la LMC. En su estudio demuestran que además de las proteínas principales producidas por el CrPh que son p210^{BCR-ABL1}, p190^{BCR-ABL1} y p230^{BCR-ABL1}, en casi todos los pacientes con LMC se producen pequeñas cantidades pero medibles de polipéptidos derivados de transcritos formados por splicing alternativos que incluyen regiones fuera del marco de lectura de BCR-ABL1. Debido a que estos polipéptidos se expresan exclusivamente en células CrPh⁺, no poseen homología con otras proteínas humanas conocidas en células normales.

Desde el punto de vista inmunológico estas proteínas podrían considerarse un blanco para un grupo de antígenos específicos anti-células leucémicas. Consecuentemente muchos pacientes se verían beneficiados independientemente de su genotipo HLA. Sin embargo, esta propuesta necesita ser más estudiada (Volpe G 2007).

1.2 Resistencia a fármacos en la LMC

A pesar de que el tratamiento con ITK resulta ser efectivo en aproximadamente el 80% de los pacientes con LMC en cualquier etapa, el 20% restante puede no responder al mismo (Vallejos G 2007, Wei Y 2007).

Los criterios de respuesta al tratamiento en la LMC son:

- ▶ Respuesta hematológica. Completa: leucocitos totales $< 10 \times 10^9/L$, blastos \leq a 1%. Respuesta parcial: leucocitos totales $10-20 \times 10^9/L$, $> 1\%$ de blastos (Ramírez P 2008).
- ▶ Respuesta citogenética: Completa: CrPh+ 0%. Respuesta parcial: CrPh+ 1-35%. Respuesta incompleta: CrPh+ 36 - 95% (Ramírez P 2008).
- ▶ Respuesta molecular: Completa: no se detecta BCR-ABL1, proporción BCR-ABL1/ABL1 $< 0.001\%$. Respuesta Incompleta: proporción BCR-ABL1/ABL1 $< 0.10\%$ (Ramírez P 2008).

Se dice que hay resistencia farmacológica cuando la respuesta hematológica es parcial y las respuestas citogenética y molecular son incompletas (Bathe C 2001, Ramírez P 2008). En general se considera que hay dos tipos de mecanismos de resistencia principales:

- ▶ Resistencia primaria: falla del efecto terapéutico durante la fase crónica de la LMC sin evolución clonal, ocurre en menos del 10% de los casos (Cervera CE 2003, Marcucci G 2003, Ramírez P 2008, Román J 2007).
- ▶ Resistencia adquirida: pérdida de la respuesta obtenida inicialmente. Se presenta principalmente en la fase acelerada (40-50%) y en la blástica (80%) (Cervera CE 2003, Marcucci G 2003, Vallejos G 2007).

Los mecanismos de la resistencia primaria no son bien conocidos. Por otra parte, algunos autores prefieren emplear dos posibles categorías de mecanismos moleculares de resistencia adquirida: las BCR-ABL1 dependientes y las independientes (Ramírez P 2008):

- ▶ Resistencia BCR-ABL1 independiente: en esta categoría cambios oncogénicos secundarios pueden ocurrir en las células leucémicas y provocar proliferación independientemente de la presencia de BCR-ABL1. En esta situación, BCR-ABL1 resulta no ser relevante e incluso el inhibidor más ideal podría no ser efectivo. Sin embargo estos mecanismos BCR-ABL1 independientes son poco frecuentes (Ramírez P 2008, Wei Y 2007).
- ▶ Resistencia BCR-ABL1 dependiente: en esta categoría los cambios pueden deberse al paciente (mediado por hospedero) o a la clona leucémica (intrínseco a la célula) (Ramírez P 2008, Talpaz M 2007). La resistencia mediada por el paciente puede ocurrir mediante modificación enzimática por el citocromo P-450 o por la producción de proteínas plasmáticas como α 1-glicoproteína ácida, la cual une al fármaco mediante interacciones inespecíficas suficientes para evitar que circule libremente y pueda llegar al interior de las células en concentraciones óptimas (Wei Y 2007). La resistencia intrínseca a la célula puede ocurrir por la sobreexpresión de BCR-ABL1 o por mutaciones puntuales en el dominio quinasa (Gorre ME 2001, Ramírez P 2008). También puede haber mayor expresión de los genes de resistencia a multi-fármacos (MDR) cuyos productos incluyen a la glicoproteína-P que tiene como función sacar a fármacos u otras moléculas de las células tumorales (Ramírez P 2008). Las mutaciones

en el dominio quinasa de BCR-ABL1 han sido los mecanismos de resistencia más estudiados (Wei Y 2007).

Casi 90 mutaciones diferentes en el dominio quinasa de ABL1 han sido reportadas hasta el momento (Ferrari G 2007, Ramírez P 2008). Muchas de estas mutaciones ocasionan un cambio en algún aminoácido lo cual a su vez ocasiona un cambio en la conformación o bien una modificación en el sitio de unión. De acuerdo a la distribución tridimensional, las mutaciones de ABL1 pueden agruparse en cuatro categorías principales (Fig. 1.7) (Ferrari G 2007, Román J 2007, Wei Y 2007):

- ▶ El primer grupo incluye mutaciones de aminoácidos correspondientes al bucle cercano al sitio de unión del ATP, conocido como P-loop (O'Hare T 2007, Wei Y 2007).
- ▶ El segundo grupo se encuentran en la región denominada "sitio de unión a imatinib", el cual está inmediatamente adyacente al sitio de unión del ATP (O'Hare T 2007, 2008, Wei Y 2007).
- ▶ El tercer grupo de mutaciones se encuentra en la región de activación llamada A-loop. Estas mutaciones provocan la transición de la proteína inactiva a la conformación siempre activa a la cual imatinib y nilotinib no se pueden unir (O'Hare T 2007, Ramírez P 2008, Wei Y 2007).
- ▶ El cuarto grupo incluye aminoácidos distantes al sitio de unión a imatinib ubicados hacia el extremo carboxilo terminal, los cuales al plegarse forman una región hidrofóbica entre las hélices E, F e I de la enzima (O'Hare T 2007, Ramírez P 2008, Wei Y 2007).

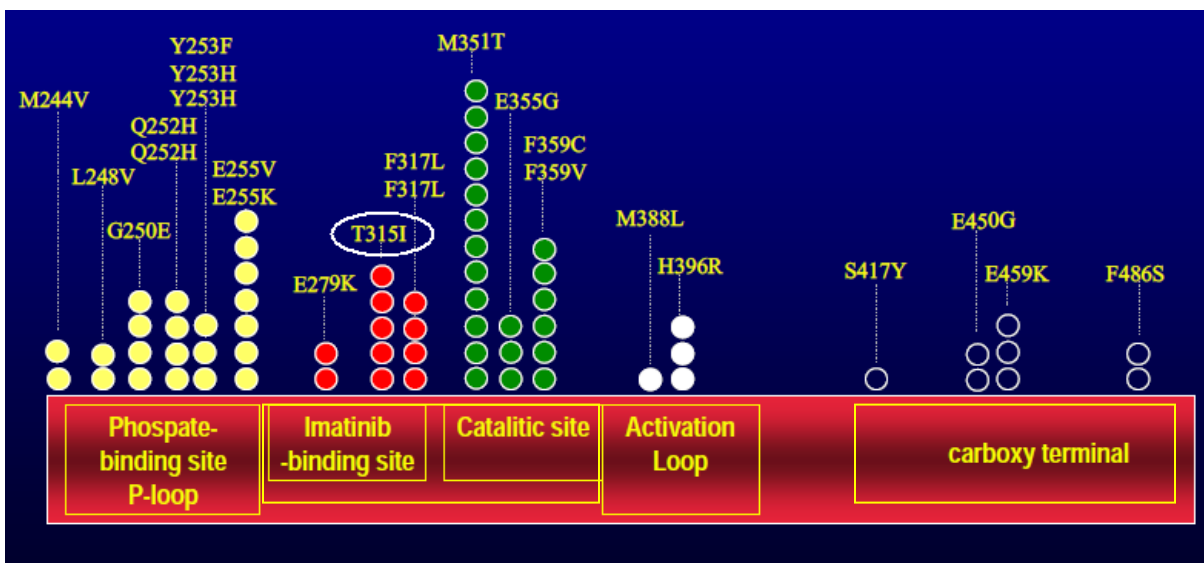


Fig. 1.7. Esquema de una sección del dominio quinasa de ABL1 en el que se encuentran agrupadas diversas mutaciones de acuerdo a su ubicación en la enzima. De izquierda a derecha: P-loop (sitio de unión al ATP), Sitio de unión a imatinib, A-loop y el extremo carboxilo terminal. En la conformación nativa, las regiones de P-loop, sitio de unión a imatinib y A-loop se pliegan formando en su conjunto el sitio activo de la enzima. Se proporcionan ejemplos de mutaciones conocidas para cada región. Se destaca en un óvalo la mutación T315I (Modificado de Román J 2007).

De 33 mutaciones presentes en BCR-ABL1 que se sabe confieren resistencia a imatinib, 32 no confieren resistencia a nilotinib a excepción de una mutación. Por su parte dasatinib es eficaz con cualquier mutación de resistencia a imatinib y nilotinib juntos, excepto la mutación T315I (Weisberg E 2007).

1.3 Mutación T315I de ABL1

La mutación que origina la sustitución de T por I en la posición 315 de ABL1 se encuentra ubicada en el exón 6 de la porción de *abl1* presente en $p210^{BCR-ABL}$. A su vez este exón forma parte del dominio SH1 el cual posee la actividad quinasa (Fig. 1.8) (O'Hare T 2007).

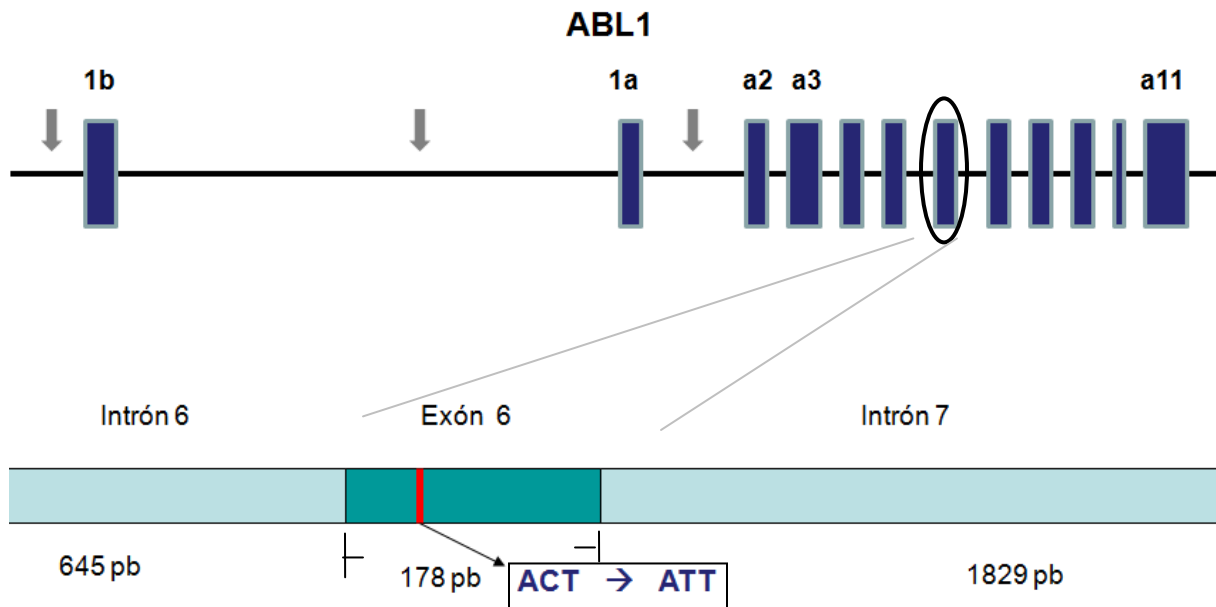


Fig.1.8. Esquema del gen *abl1* en el que se resalta el exón 6. En la parte inferior se encuentra una ampliación del exón 6 donde se produce la transición de C→T en el nucleótido 37 de este exón. Esta mutación produce un cambio en el codón correspondiente de ACT por ATT lo cual resulta en la sustitución de Treonina por Isoleucina (Modificado de Deininger MWN 2000).

Esta mutación es generada por una transición de C → T en la segunda base del codón ACT que codifica para Treonina, lo cual resulta en el codón ATT correspondiente a Isoleucina. Esta transición ocurre en el nucleótido 964 del mRNA de *abl1* que a su vez ocupa el lugar 37 del exón 6 (GenBank 2008).

La consecuencia de esta mutación es fatal desde el punto de vista terapéutico en la LMC, ya que esta mutación es la única conocida hasta el momento que confiere resistencia a los 3 ITK existentes en el mercado actualmente (Deininger MWN 2004 a, Deininger MWN 2004 b, Ferrari G 2007, Jane Abraham 2007, Ramírez P 2008, Román J 2007, Talpaz M 2006).

La mayoría de las mutaciones puntuales de *abl1* ocasiona un cambio en varios aminoácidos que impiden una adecuada interacción entre el fármaco y la enzima. El fundamento de resistencia de la mutación T315I a imatinib, nilotinib y dasatinib consiste en la pérdida de la capacidad de unión a ABL1. La Treonina en posición 315 es crucial para la unión de los ITK mediante un puente de hidrógeno. Si T se cambia por Isoleuceína, el puente de hidrógeno no se forma, por lo que disminuye la afinidad y consiguientemente no hay unión a la enzima. De esta forma se presenta la resistencia (Weisberg E 2007).

1.4 ARMS-PCR en el diagnóstico clínico

La detección de mutaciones puntuales hoy en día es de gran relevancia debido a diversas razones entre las que destacan:

- Esclarecimiento de relaciones evolutivas entre especies.
- Entendimiento del mecanismo de acción de sustancias mutagénicas.
- Elucidación de los mecanismos moleculares de enfermedades.
- Detección de enfermedades relacionadas con defectos genéticos.
- Investigación de los rasgos patogénicos de ciertos agentes infecciosos.
- Comprensión de las bases moleculares de resistencia contra agentes terapéuticos, siendo estos últimos de gran importancia clínica (Lodish H 2005, Rolfs A 1992).

Una de las técnicas más empleadas para la detección de mutaciones es la de RFLP. Sin embargo, desde el punto de vista clínico es un procedimiento relativamente lento y sólo permite la detección de un número limitado de mutaciones, además el uso de enzimas de

restricción eleva su costo. Por su parte, ARMS-PCR permite la detección de cualquier mutación puntual (Chen Q 2007, Gupta V 2003, Newton CR 1989, Steensma DP 2006).

Entre sus ventajas destacan:

- Es un método relativamente sencillo, rápido y confiable.
- No requiere equipo especial, sólo termocicladores para PCR.
- Distingue entre homocigotos y heterocigotos para un locus específico.
- No requiere digestión ni secuenciación posterior a la reacción.
- Las mezclas de reacción se pueden analizar inmediatamente después del término de la amplificación mediante gel de poliacrilamida o de agarosa.

Esta técnica requiere del diseño y construcción de oligonucleótidos alelo-específicos a los cuales se les añade intencionalmente una mutación en los primeros nucleótidos del extremo 3' para crear "mismatches" que constituyen desajustes o errores de apareamiento entre bases no complementarias de Watson y Crick (Gupta V 2003, Karhukorpi J 2001, Li B 1999, Rolfs A 1992 Steensma DP 2006).

La presencia de cambios intencionales de nucleótidos en el extremo 3' de los primers para crear desajustes entre bases de oligonucleótidos y DNA permite una mayor especificidad y discriminación por parte de la Taq DNA-polimerasa. Lo anterior funciona al aprovechar la ausencia de la capacidad de corrección exonucleolítica-3' asociada con esta enzima (Gupta V 2003, Karhukorpi J 2001, Newton CR 1989, Suthanthiran M 2000, Steensma DP 2006).

Para el ARMS-PCR convencional se requieren de tres primers. Un primer es inespecífico ya que es complementario para los dos alelos en cuestión, mientras que los otros dos primers son alelo-específicos. De manera que el oligonucleótido “normal” permite sólo la polimerización sobre el DNA del alelo normal, pero no sobre el DNA mutado. Por su parte el oligonucleótido específico para el alelo mutado es refractario (no se logra la polimerización) para el DNA normal pero sí hay polimerización para el mutado bajo condiciones normales para PCR (Gupta V 2003, Steensma DP 2006) (Fig. 1.9).

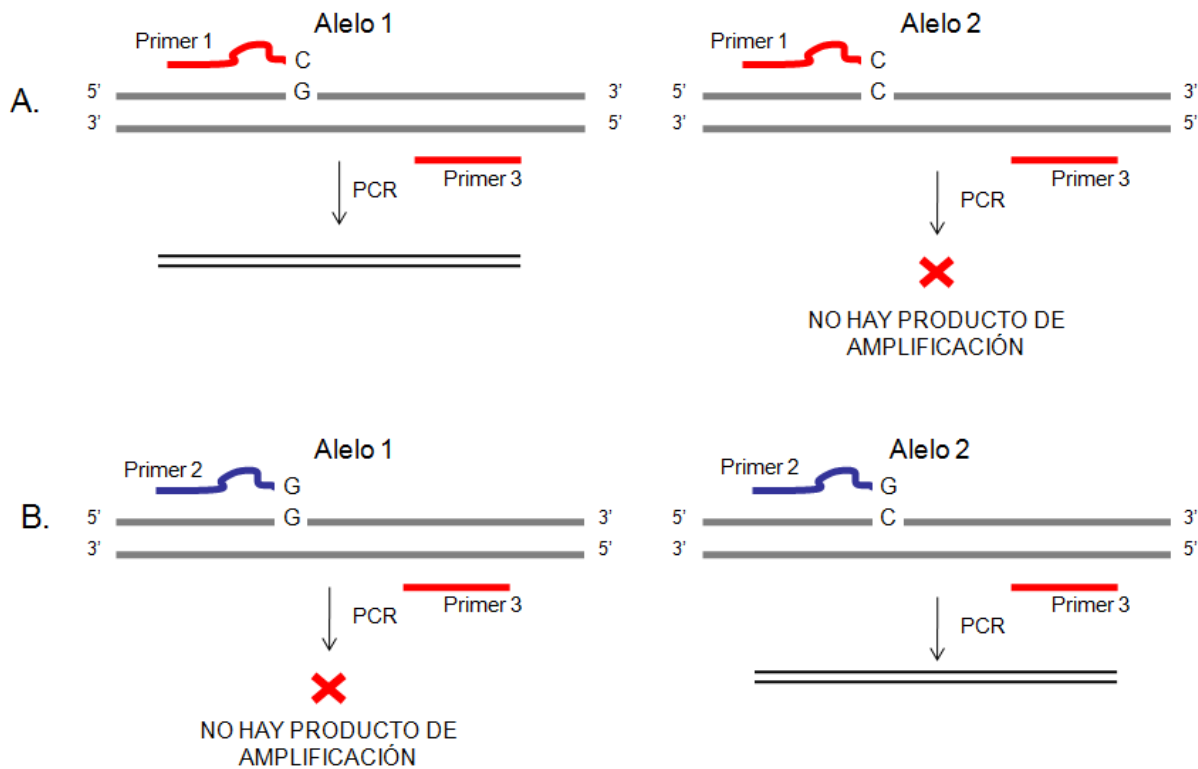


Fig. 1.9. Fundamento de ARMS-PCR. Se preparan dos mezclas de reacción separadas para PCR, una para cada mezcla de primers (Mezcla 1: primer 1 y 3; Mezcla 2: primer 2 y primer 3). Los primers 1 y 2 son específicos, el 3 no lo es. En A se observa que el primer 1 sólo detecta al alelo 1 pero no al alelo 2. En B el primer 2 sólo detecta al alelo 2 pero no al alelo 1. Los primers 1 y 2 presentan simbólicamente una curvatura cercana a su extremo 3' lo que indica la presencia de algún desajuste de bases en esa región lo que aumenta su especificidad a la amplificación por Taq DNA-polimerasa (Modificado de Gupta V 2003).

El procedimiento del método consiste en preparar dos mezclas de reacción para PCR separadas cada una con las mezclas de oligonucleótidos correspondientes (mezcla para el alelo mutado y para el normal). De manera que los resultados que se obtienen de la reacción son dos productos de amplificación para un paciente heterocigoto, mientras que si el paciente es homocigoto para un alelo, sólo se observará un producto de amplificación (Gupta V 2003, Newton CR 1989, Rolfs A 1992).

Una desventaja de ARMS-PCR consiste en que sólo es posible detectar mutaciones puntuales conocidas. El método sólo proporcionará la información de la presencia o ausencia de la mutación previamente conocida para la cual se diseñan los primers correspondientes.

Sin embargo, para la identificación y caracterización de mutaciones no documentadas será pertinente la aplicación de técnicas como secuenciación directa, pirosecuenciación o polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP por sus siglas en inglés) (Baig SM 2005, Chen Q 2007, Gupta V 2003, Rolfs A 1992, Steensma DP 2006).

También existe un ARMS-PCR tetraprimer, que como su nombre lo indica emplea cuatro oligonucleótidos. El fundamento es el mismo que en ARMS convencional sólo que se obtienen tres productos de amplificación (Fig. 1.10).

Debido a que la mezcla de los primers generalmente se coloca en el mismo microtubo, la sensibilidad de ARMS-tetrapimer puede resultar baja por la competencia de reacciones de PCR dentro del microtubo (Chen Q 2007, Jones A 2005, Ye Shu 2001).

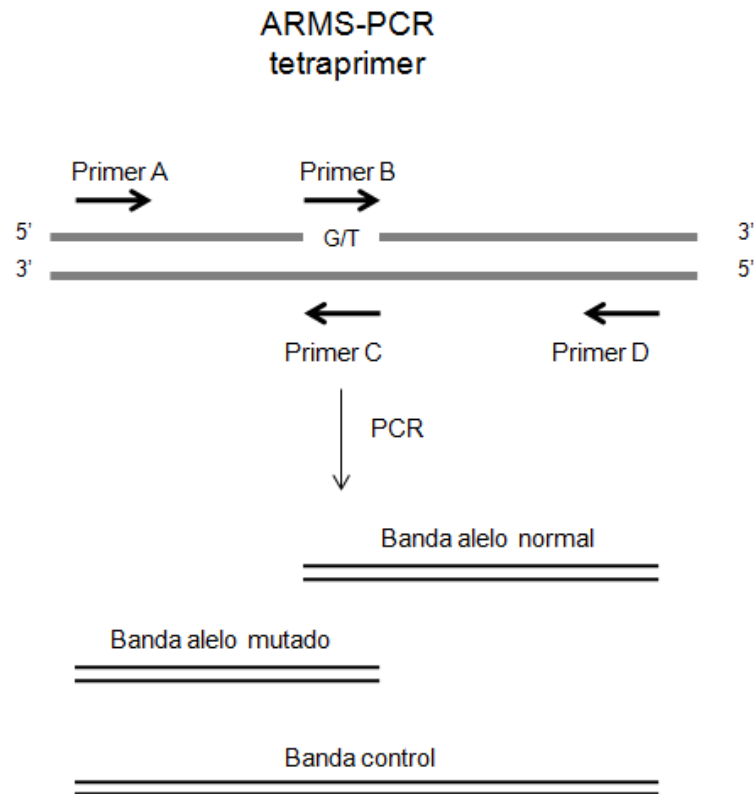


Fig. 1.10. Fundamento de ARMS-PCR tetra-primer. Se emplean cuatro oligonucleótidos en una misma mezcla de reacción, en este esquema los primers son: A, B, C y D. En la parte inferior aparecen los tres productos de amplificación esperados con la mezcla de esos primers. La mutación en este caso está ejemplificada como G→T. Los primers B y D permiten la amplificación del alelo normal, los primers A y C amplifican al mutado y A y D amplifican una banda control. Un paciente homocigoto presentaría dos bandas, mientras que uno heterocigoto tres. (Modificado de Chen Q 2007).