



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO  
FARMACOBIOLOGÍA**

**“Desarrollo de una prueba molecular para la  
identificación de mutaciones asociadas a resistencia al  
tratamiento en pacientes con leucemia mieloide crónica”**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

Francisco Alejandro Lagunas Rangel

**DIRECTOR DE TESIS:**

Doctor en Biología Celular Carlos Cortés Penagos

**COMITÉ SINODAL:**

M. en C. Eloy Pérez Rivera

M. en C. Víctor Alfredo Pérez Contreras

M. en C. Gabino Estévez Delgado

E. B. C. Virginia Campos Cabrera

E. H. D. L. Judith Esmeralda Prieto Sierra

**Morelia, Michoacán, Enero del 2014**

*EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE LA DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR. IGNACIO CHÁVEZ” DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO EN COLABORACIÓN CON LABORATORIOS MENDEL®*

## AGRADECIMIENTOS

*“La gratitud le da sentido a nuestro pasado, trae paz al presente y crea una visión para el futuro”*

**Melody Beattie**

Por ello quiero dar gracias en primer lugar a “Dios” por todas las bendiciones que me ha brindado a lo largo de mi vida, siendo la principal de todas estas mi familia, quienes me motivan día con día para seguirme esforzando y continuar creciendo hasta alcanzar mis sueños.

A mis amigos que a lo largo de mi vida han estado presentes en diferentes etapas y que me han brindado una amistad sincera. Por todos aquellos momento buenos y malos que pasaron conmigo y por enseñarme que la vida es más que solo ciencia.

Al D.C. Carlos Cortes Penagos quien me brindo su confianza, conocimientos y tiempo para poder desarrollar esta tesis, así como mostrarme el extraordinario mundo de la biología molecular.

A los Maestros en Ciencias Luis José Flores Álvarez, Víctor Alfredo Pérez Contreras y Llanelli Galindo Jiménez quienes me brindaron sus enseñanzas, consejos y apoyo durante todo este tiempo en el laboratorio.

Finalmente quiero agradecer por todas las críticas constructivas, consejos y tiempo que me brindo mi comité de sinodales:

M. en C. Eloy Pérez Rivera

M. en C. Víctor Alfredo Pérez Contreras

M. en C. Gabino Estévez Delgado

E. B. C. Virginia Campos Cabrera

E. H. D. L. Judith Esmeralda Prieto Sierra

# ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. ABSTRACT</b>	2
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	3
1. Hematopoyesis	3
2. Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas (MPN)	5
2.1. <i>Clasificación de la OMS para MPN (2001)</i>	5
2.2. <i>Clasificación de la OMS para MPN (2008)</i>	6
3. Leucemia Mieloide Crónica, BCR-ABL1 positivo (CML)	7
3.1. <i>Epidemiología</i>	7
3.2. <i>Características Clínicas</i>	8
3.3. <i>Cromosoma Filadelfia (Ph)</i>	8
3.4. <i>ABL1 (Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1)</i>	8
3.5. <i>BCR (Breakpoint Cluster Región)</i>	11
3.6. <i>BCR-ABL1</i>	11
3.7. <i>Características funcionales de BCR-ABL1</i>	13
4. Imatinib Mesylate	15
4.1. <i>Antecedentes</i>	15
4.2. <i>Imatinib Mesylate, primer inhibidor de la actividad Tirosina Cinasa</i>	17
5. Respuesta al Tratamiento	17
5.1. <i>Ensayos de Laboratorio para Diagnóstico y Monitoreo del Tratamiento</i>	19
5.1.1. <i>Citometría Hemática</i>	19
5.1.2. <i>Citometría de Flujo</i>	20
5.1.3. <i>Citogenética convencional</i>	21
5.1.4. <i>FISH (Hibridación Fluorescente in situ)</i>	22
5.1.5. <i>RT-PCR</i>	23
6. Resistencia a Imatinib	25
6.1. <i>Mecanismos de Resistencia</i>	25

6.2.	<i>Mutaciones en el Dominio Cinasa de ABL1</i>	26
6.3.	<i>p. T315I</i>	30
6.4.	<i>Métodos de detección de la Mutación p. T315I</i>	31
6.4.1.	<i>Secuenciación directa</i>	31
6.4.2.	<i>PCR-RFLP</i>	33
6.4.3.	<i>AS-PCR</i>	33
7.	Diseño de experimentos basados en Metodología Taguchi	35
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	40
<b>V.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	41
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	41
<b>VII.</b>	<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	42
<b>VIII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
1.	Muestras biológicas	43
2.	Extracción de RNA	43
3.	Cuantificación y Análisis de Integridad del RNA	43
4.	Transcripción Reversa (RT)	44
5.	Determinación de variantes de BCR-ABL1	45
6.	Diseño de oligonucleótidos para detección de mutación T315I en ABL1	45
7.	Optimización de PCR acoplado a transcripción reversa para detección de mutación T315I en ABL1	46
8.	Análisis de resultados para la metodología Taguchi	47
9.	Purificación del control interno para el gen ABL1 amplificado por PCR	47
10.	Secuenciación	48
<b>IX.</b>	<b>RESULTADOS</b>	50
1.	Análisis de Integridad del RNA	50
2.	Determinación de variantes de BCR-ABL1	50
3.	Optimización de PCR acoplado a transcripción reversa para detección de mutación T315I en ABL1 por metodología Taguchi	51
4.	Purificación del control interno para el gen ABL1 amplificado por PCR	55
5.	Análisis de Secuenciación	55
6.	Aplicación de la prueba optimizada para detectar la mutación T315I	57
<b>X.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	61
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	68
<b>XII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	69

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general de la hematopoyesis	4
Figura 2. Incidencia de Leucemia Mieloide Crónica (CML) por edad	7
Figura 3. Cromosoma Filadelfia, t(9;22)(q34;q11)	9
Figura 4. Motivos estructurales presentes en p160 <sup>BCR</sup> , p145 <sup>ABL1</sup> y la proteína de fusión p210 <sup>BCR-ABL1</sup>	12
Figura 5. Proteínas codificadas por diferentes variantes del gen BCR-ABL1	13
Figura 6. Sistema de bioseñalización relacionado con BCR-ABL1 en CML	15
Figura 7. Mecanismo de acción de Imatinib con la proteína BCR-ABL1	18
Figura 8. Respuesta al tratamiento en pacientes con CML	19
Figura 9. Características hematológicas presentes en CML	20
Figura 10. Principio del ensayo por citometría de flujo para detección de la proteína BCR-ABL1	21
Figura 11. FISH con sondas de doble fusión para detectar la t(9;22) (q34;q11)	23
Figura 12. Principios de la metodología qRT-PCR	24
Figura 13. Mecanismos de Resistencia a Imatinib	26
Figura 14. Mapa de mutaciones en el dominio cinasa de BCR-ABL1 asociadas a resistencia a Imatinib	27
Figura 15. Incidencia de las mutaciones asociadas a resistencia a Imatinib	28

Figura 16. Sensibilidad a inhibidores de la actividad tirosina cinasa que presentan algunas mutaciones en el dominio cinasa de BCR-ABL1	29
Figura 17. Mutación p. T315I asociada a resistencia a Imatinib	30
Figura 18. Principio del método de secuenciación de Sanger	32
Figura 19. Principio de la metodología AS-PCR	34
Figura 20. Comparación de un arreglo ortogonal $L_8$ contra un factorial $2^7$	37
Figura 21. Diseño de oligonucleótidos para detección de mutación T315I	46
Figura 22. Análisis electroforético de la integridad del RNA	50
Figura 23. Análisis de las variantes del gen de fusión BCR-ABL1	51
Figura 24. Electroforesis de los ensayos efectuados con la matriz del arreglo $L_4$ utilizando el oligonucleótido para detectar la mutación T315I sin mismatch	52
Figura 25. Electroforesis de los ensayos efectuados con la matriz del arreglo $L_4$ utilizando el oligonucleótido para detectar la mutación T315I con mismatch	54
Figura 26. Comparación de las condiciones óptimas con las condiciones iniciales utilizadas para la prueba de detección de la mutación T315I	54
Figura 27. Productos de PCR purificados del control interno diseñado para ABL1	55
Figura 28. Análisis de la secuencia del control interno de ABL1	56
Figura 29. Identificación de presencia de la mutación Q252H	58
Figura 30. Identificación de presencia de la mutación E275K	59
Figura 31. Prueba para detección de la mutación T315I con condiciones óptimas	60
Figura 32. Distribución de mutaciones y polimorfismos identificados en la región del control interno ABL1	66

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las Neoplasias Mieloides de acuerdo al esquema de clasificación de la OMS en el 2008	6
Tabla 2. Oligonucleótidos para detección del gen de fusión BCR-ABL1	45
Tabla 3. Oligonucleótidos para detección de mutación T315I	45
Tabla 4. Variables analizadas en la detección de la mutación T315I en ABL1	47
Tabla 5. Arreglo ortogonal L <sub>4</sub>	47
Tabla 6. Fórmulas utilizadas para el análisis ANOVA	48
Tabla 7. Concentración de DNA amplificado en cada ensayo del AO L <sub>4</sub> con el oligonucleótido T315I sin mismatch	52
Tabla 8. Contribución de las variables analizadas en el L <sub>4</sub> mediante el empleo de un control negativo para T315I	52
Tabla 9. Concentración de DNA amplificado en cada ensayo del AO L <sub>4</sub> con el oligonucleótido T315I con mismatch	53
Tabla 10. Contribución de las variables analizadas en el L <sub>4</sub> mediante el empleo de un control negativo para T315I	53
Tabla 11. Condiciones óptimas establecidas en el arreglo ortogonal L <sub>4</sub> para la prueba de identificación de la mutación T315I	54
Tabla 12. Polimorfismos de Nucleótido Único identificados en secuenciación	57
Tabla 13. Mutaciones identificadas asociadas a resistencia a Imatinib Mesylate	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

aCML	Leucemia Mieloide Crónica Atípica, BCR-ABL1 negativo
ALL	Leucemia Linfoblástica Aguda
AML	Leucemia Mieloide Aguda
ANOVA	Análisis de Varianza
AO	Arreglo Ortogonal
AP	Fase Acelerada
AS-PCR	PCR alelo específico
BC	Crisis Blástica
CMML	Leucemia Mielomonocítica Crónica
CEL/HES	Leucemia Eosinofílica Crónica/Síndrome Hipereosinofílico
CEL-NOS	Leucemia Eosinofílica Crónica sin otra clasificación
CCyR	Respuesta Citogenética Completa
CGH	Células Germinativas Hematopoyéticas
CHR	Remisión Hematológica
CML	Leucemia Mieloide Crónica
CMPD's	Enfermedades Mieloproliferativas Crónicas
CNL	Leucemia Neutrofílica Crónica
CP	Fase Crónica
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
ddNTP	Didesoxinucleósido Trifosfato

dNTP	Desoxinucleósido Trifosfato
ET	Trombocitemia Esencial
FISH	Hibridación Fluorescente in situ
HES	Síndrome Hipereosinofílico
IRIS	International Randomized Study of Interferon versus STI571
ISO	Organización Internacional de Estandarización
JMML	Leucemia Mielomonocítica Juvenil
$\mu$ -bcr	Región de Ruptura Micro
m-bcr	Región de Ruptura Menor
M-bcr	Región de Ruptura Mayor
MCD	Enfermedad de Células Mastocíticas
MDS's	Síndromes Mielodisplásicos
MMR	Respuesta Molecular Mayor
MPD	Desordenes Mieloproliferativos
MPN	Neoplasias Mieloproliferativas
MRD	Enfermedad Mínima Residual
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR-RFLP	PCR-Polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción
PCyR	Respuesta Citogenética Parcial
Ph	Cromosoma Filadelfia
PMF	Mielofibrosis Primaria
PV	Policitemia Vera

## I. RESUMEN

**Palabras Clave:** Neoplasia, Cromosoma Filadelfia, Imatinib, BCR-ABL1, RT-PCR

La Leucemia Mieloide Crónica (CML) es un desorden hematológico clonal caracterizado por la presencia de la proteína de fusión BCR-ABL1, resultado de la translocación entre el cromosoma 9 y 22. BCR-ABL1 es una proteína tirosina cinasa constitutivamente activa, la cual induce múltiples vías de señalización celular que promueven una anormal proliferación celular, diferenciación, inhibición de la apoptosis, disminución en la adhesión al estroma e incrementada motilidad.

El tratamiento de elección para los pacientes así diagnosticados incluye al inhibidor de tirosina cinasas Imatinib Mesylate (Gleevec®). La eficacia de Imatinib en el tratamiento de la CML es remarcable, pero el desarrollo de ciertas formas de resistencia y la persistencia de enfermedad mínima residual han disminuido el entusiasmo inicial que provocó. El más frecuente mecanismo de resistencia identificado es la presencia de mutaciones puntuales en el dominio cinasa de ABL1. Se han reportado al menos 73 mutaciones puntuales diferentes, que conducen a la sustitución de 50 aminoácidos, las cuales ocurren con diferentes frecuencias y confieren diferentes niveles de resistencia a Imatinib.

La mutación T315I fue la primer mutación identificada en pacientes resistentes, esta se sitúa en una posición que regula la unión a inhibidores de la actividad tirosina cinasa, por lo que sugiere un peor pronóstico clínico y su identificación oportuna es de gran importancia para evitar los tratamientos inadecuados que permitan la progresión de la enfermedad.

En este trabajo se presenta una estrategia basada en la técnica de AS-PCR para la detección de la mutación T315I y su optimización a través de la metodología Taguchi. Mediante un arreglo ortogonal  $L_4$  analizando 3 variables de la reacción de PCR para la detección de la mutación T315I ( $T_m$ , tiempo de alineamiento y número de ciclos) a 2 niveles, determinando el porcentaje de contribución de cada factor. El análisis de datos predijo un ensayo óptimo. Por otra parte, la secuenciación del dominio de cinasa amplificado de muestras positivas para BCR-ABL1, reveló la presencia de algunos polimorfismos de nucleótido único. Así, la aplicación de un arreglo ortogonal  $L_4$  permitió establecer las condiciones óptimas para la detección molecular de la mutación T315I.

## II. ABSTRAC

**Keywords:** Neoplasm, Philadelphia Chromosome, Imatinib, BCR-ABL1 RT-PCR

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a clonal hematological disorder characterized by the presence of the fusion protein BCR-ABL1 which occurs as result of the translocation between chromosome 9 and 22. BCR-ABL1 has tyrosine kinase activity constitutively activated, which activates multiple cellular signaling pathways that promote abnormal cell proliferation, differentiation, apoptosis inhibition, decreased adhesion to stroma and increased motility.

The treatment of choice for patients thus diagnosed includes tyrosine kinase inhibitor Imatinib mesylate (Gleevec®). The efficacy of imatinib in the treatment of CML is remarkable, but the development of certain forms of resistance and persistence of minimal residual disease have decreased the initial excitement caused. The most common resistance mechanism is the presence of mutations in the kinase domain of ABL1. Have been reported at least 73 different mutations, which lead to the replacement of 50 amino acids, which occur at different frequencies and conferred different levels of resistance to Imatinib.

T315I mutation was first mutation identified in patients resistant, which is located at a position that regulates the binding inhibitors tyrosine kinase activity, by suggesting a poor clinical outcome and timely identification is extremely important to avoid inadequate treatments that allow the progression of the disease.

In this paper we present a strategy based on AS- PCR technique for detection of the T315I mutation and optimization by Taguchi methodology.  $L_4$  orthogonal array by analyzing three variables of the PCR reaction for the detection of mutation T315I ( $T_m$ , time alignment, and number of cycles) to 2 levels, determining the percentage contribution of each factor. Data analysis predicted an optimal test. Moreover, the sequence corresponding to the amplified kinase domain revealed the presence of some single nucleotide polymorphisms. Thus, the application of an orthogonal array  $L_4$  allowed to establish the optimal conditions for the molecular detection of the T315I mutation.

### III. INTRODUCCIÓN

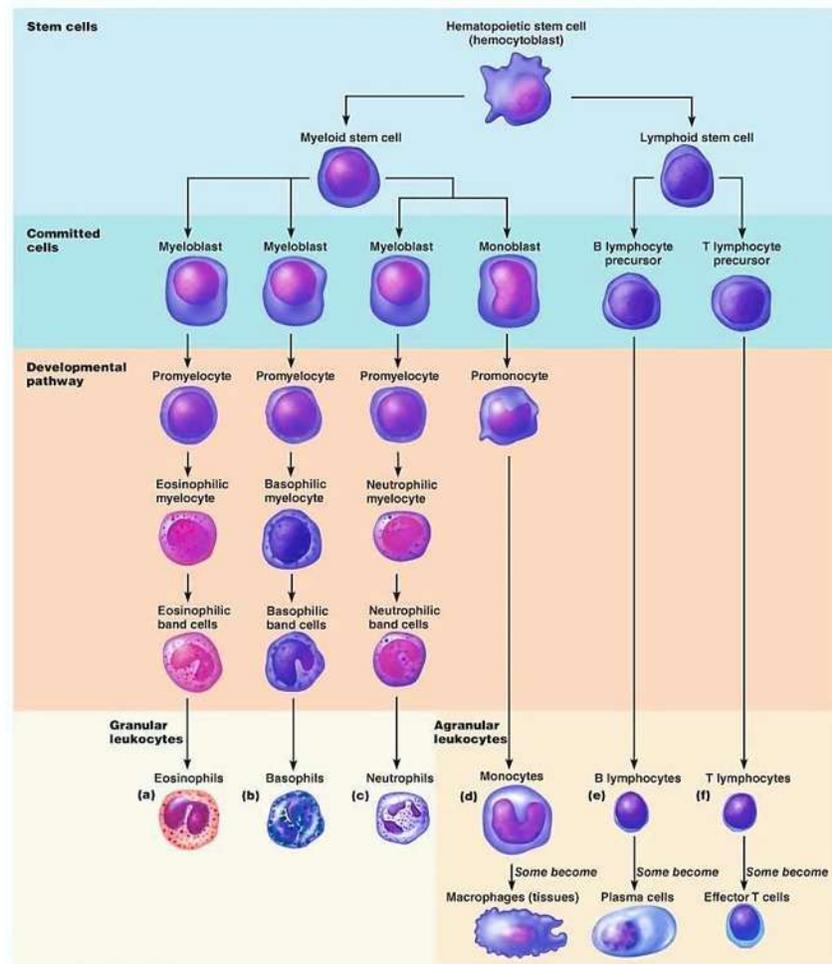
#### 1. Hematopoyesis

La producción de células sanguíneas—Hematopoyesis— es un proceso complejo a través del cual células germinativas hematopoyéticas (CGH) proliferan y se diferencian dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos) (Mayani, Flores-Figueroa, & Pelayo, 2007). Los progenitores de las células sanguíneas aparecen por primera vez durante la tercera semana del desarrollo embrionario en el saco vitelino, pero se cree que las CGH definitivas surgen varias semanas más tarde en el mesodermo intraembrionario de la región aórtica-gonadal-mesonéfrica. Durante el tercer mes de embriogenia, las CGH migran hacia el hígado, que se convierte en el lugar principal de formación de las células sanguíneas hasta poco antes del parto. Hacia el cuarto mes de desarrollo, las CGH comienzan a cambiar de localización de nuevo, esta vez hacia la médula ósea. Para el nacimiento, la médula de todo el esqueleto es hematopoyéticamente activa y la hematopoyesis hepática se reduce hasta un goteo que persiste sólo en focos dispersos, que quedarán inactivos poco después del nacimiento. Hasta la pubertad, la médula hematopoyéticamente activa se distribuye en todo el esqueleto, pero poco después se limita al esqueleto axial. Por lo tanto, en los adultos normales sólo la mitad del espacio medular es hematopoyéticamente activo.

Las CGH tienen dos propiedades esenciales que se requieren para el mantenimiento de la hematopoyesis. La pluripotencialidad y la capacidad de autorrenovación. La pluripotencialidad se refiere a la capacidad de una sola CGH para generar todas las células hematopoyéticas maduras. Cuando una CGH se divide, al menos una de las células hija debe autorrenovarse para evitar la depleción de las células germinativas. Las divisiones de la autorrenovación parecen producirse en el marco de un nicho medular especializado, en el que las células del estroma y los factores segregados nutren y mantienen de algún modo las CGH (Kumar, Abbas, Fausto, & Aster, 2009).

Las CGH dan origen a células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de autorrenovación, pero conservan su potencial proliferativo. Estas pueden ser multipotenciales, o bien, pueden estar restringidas a dos o a un solo linaje. Las CPH dan lugar a las células precursoras reconocibles por su morfología a pesar de

ser inmaduras. Y finalmente los precursores hematopoyéticos al madurar, generan las células sanguíneas circulantes (Figura 1) (Mayani et al., 2007).



**Figura 1. Diagrama general de la hematopoyesis.**

<http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio211/chap17/chap17.htm>

Los tumores de origen hematopoyético se asocian a menudo a mutaciones que bloquean la maduración de la célula progenitora o que anulan su dependencia a factores de crecimiento. El efecto neto de estas perturbaciones es una expansión clonal no regulada de los elementos hematopoyéticos, que reemplazan los progenitores medulares normales y se diseminan hacia otros tejidos hematopoyéticos. En algunos casos, esos tumores se originan desde las CGH transformadas, que retienen la capacidad de diferenciarse siguiendo varios linajes, mientras que, en otros casos, el origen es un progenitor más diferenciado que ha adquirido una capacidad de autorrenovación alterada (Kumar et al., 2009).

Las leucemias son un ejemplo de enfermedades asociadas a un aumento en la producción de las células hematopoyéticas debido a que se originan a partir de alteraciones presentes en las CGH y CPH. Los cuatro principales tipos de leucemia son la leucemia mieloide aguda, la leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica. La leucemia aguda es una enfermedad de progresión rápida que produce células que no están completamente desarrolladas es decir son inmaduras y por ende no pueden llevar a cabo sus funciones normales. La leucemia crónica es usualmente de progresión lenta y los pacientes tienen un gran número de células maduras (Galindo Jiménez, 2013).

## **2. Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas (MPN)**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió como neoplasia mieloproliferativa a un conjunto de padecimientos en los cuales ocurre una alteración genética en una CGH que conduce a la proliferación de uno o más linajes hematopoyéticos (Granulocítico, Eritroide, Megacariocítico o Mastocítico) (Navarro Vázquez, 2010).

La historia de las MPN se remonta a 1951 cuando William Dameshek describió el concepto de “Desordenes Mieloproliferativos (MPD)”, esta categoría clínico patológica incluía a la Leucemia Mieloide Crónica (CML), la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (ET), la Mielofibrosis Primaria (PMF) y la Eritroleucemia (Síndrome de Di Guglielmo). Con los años la Eritroleucemia fue redefinida como Leucemia Eritroide Aguda y sus variantes, mientras que los otros continúan siendo referidos como MPD's clásicos.

Dameshek resalto la similaridad en la clínica e histología de estos trastornos, reconociendo una generalizada proliferación en la medula ósea distintiva en todos ellos. Estos criterios, continúan siendo utilizados actualmente en la última revisión del sistema de clasificación de la OMS para el diagnóstico de MPN, los cuales se complementan con la utilización de herramientas actuales como marcadores citogenéticos y moleculares, así como criterios biológicamente menores para confirmar la impresión histológica (Tefferi, Thiele, & Vardiman, 2009).

### *2.1. Clasificación de la OMS para MPN (2001)*

En el 2001, el sistema de clasificación de la OMS reconoció cuatro categorías dentro de las Neoplasias Mieloides Crónicas: las Enfermedades Mieloproliferativas Crónicas (CMPD's), los Síndromes Mielodisplásicos (MDS), MDS/MPD y la Enfermedad de Células

Mastocíticas (MCD). La categoría de CMPD's incluyó a los MPD definidos por Demeshek, y además se le añadieron la Leucemia Neutrofílica Crónica (CNL), la Leucemia Eosinofílica Crónica/Síndrome Hipereosinofílico (CEL/HES) y las CMPD's inclasificables.

## 2.2. Clasificación de la OMS para MPN (2008)

En el 2008, la revisión del sistema de clasificación de la OMS para las neoplasias mieloides crónicas reemplazo la palabra "enfermedad" en el contexto de CMPD y MDS/MPD por el de neoplasia (CMPD fue reemplazado por Neoplasias Mieloproliferativas (MPN) y MDS/MPD fue reemplazado por MDS/MPN). Se adicióno a la categoría de MPN la MCD y se reorganizo CEL/HES en HES, CEL sin otra clasificación (CEL-NOS) y Neoplasias Mieloides asociadas con Eosinofilia y anormalidades en PDGFRA, PDGFRB y FGFR1, donde este último fue asignado a una nueva categoría (Tabla 1) (Tefferi & Vardiman, 2008).

**Tabla 1. Clasificación de las Neoplasias Mieloides de acuerdo al esquema de clasificación de la OMS en el 2008**

<ul style="list-style-type: none"><li><b>1. Leucemia Mieloide Aguda (AML)</b></li><li><b>2. Síndromes Mielodisplásicos (MDS)</b></li><li><b>3. Neoplasia Mieloproliferativas (MPN)</b><ul style="list-style-type: none"><li>3.1 Leucemia Mieloide Crónica, BCR-ABL1 positivo (CML)</li><li>3.2 Policitemia Vera (PV)</li><li>3.3 Trombocitemia Esencial (ET)</li><li>3.4 Mielofibrosis Primaria (PMF)</li><li>3.5 Leucemia Neutrofílica Crónica (CNL)</li><li>3.6 Leucemia Eosinofílica Crónica sin otra especificación (CEL-NOS)</li><li>3.7 Síndrome Hipereosinofílico (HES)</li><li>3.8 Enfermedad de Células Mastocíticas (MCD)</li><li>3.9 MPN's, inclasificables</li></ul></li><li><b>4. MDS/MPN</b><ul style="list-style-type: none"><li>4.1 Leucemia Mielomonocítica Crónica (CMML)</li><li>4.2 Leucemia Mielomonocítica Juvenil (JMML)</li><li>4.3 Leucemia Mieloide Crónica Atípica, BCR-ABL1 negativo (aCML)</li><li>4.4 MDS/MPN inclasificables</li></ul></li><li><b>5. Neoplasias Mieloides o Linfoides con Eosinofilia y anormalidades en PDGFRA, PDGFRB y FGFR1</b><ul style="list-style-type: none"><li>5.1 Neoplasias Mieloides asociadas con rearrreglos en PDGFRA</li><li>5.2 Neoplasias Mieloides asociadas con rearrreglos en PDGFRB</li><li>5.3 Neoplasias Mieloides asociadas con rearrreglos en FGFR1</li></ul></li></ul>
---

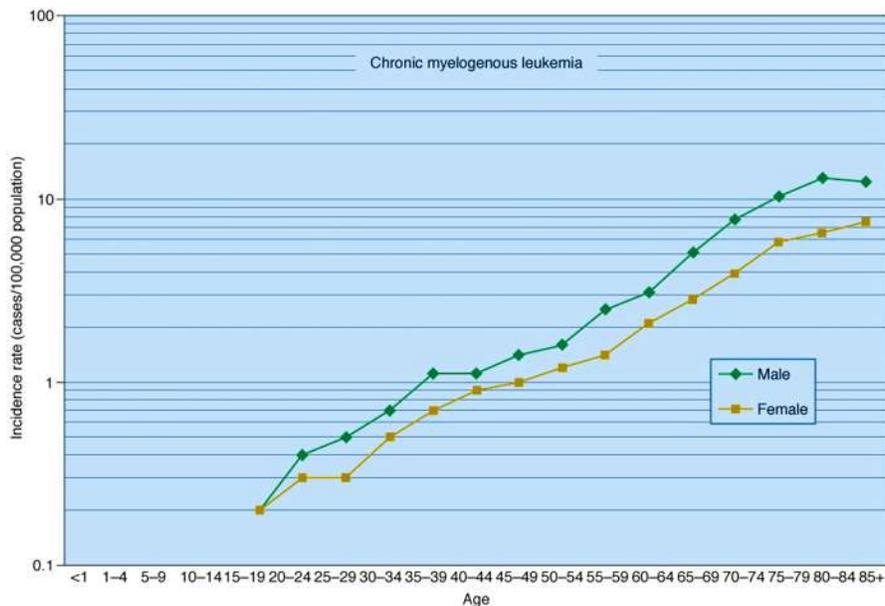
Fuente: Tefferi & Vardiman (2008)

### 3. Leucemia Mieloide Crónica, BCR-ABL1 positivo (CML)

La leucemia mieloide crónica (CML) es un desorden hematológico crónico ocasionado por una alteración en una CGH, la cual se identifica por una extensa proliferación y supervivencia de las células de la estirpe mieloide en varios estados de diferenciación y maduración. La principal característica de la CML es la presencia de un cromosoma anómalo denominado como cromosoma Filadelfia (Ph), el cual se presenta en aproximadamente un 95% de los pacientes con CML y arriba del 20% de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) (Hochhaus et al., 2000; von Bubnoff, Peschel, & Duyster, 2003; Wongboonma, Thongnoppakhun, & Auewarakul, 2011).

#### 3.1. Epidemiología

Se estima que se presentan 4,500 casos nuevos de CML cada año en USA, es una enfermedad principalmente de adultos, pero también se presenta en niños y adolescentes. Respecto del sexo, se registran 2 casos por cada 100,000 personas en hombres y 1.1 casos por cada 100,000 personas en mujeres. La tasa de incidencia incrementa logarítmicamente con la edad, de aproximadamente 0.2 por cada 100,000 personas menores de 20 años a aproximadamente 10 por cada 100,000 personas con 80 años. La incidencia máxima se presenta entre la quinta y sexta décadas de la vida y solo el 10% de los casos ocurren en personas entre 1 y 20 años de edad (Figura 2).



**Figura 2. Incidencia de Leucemia Mieloide Crónica (CML) por edad.** Distribución del número de casos de CML/100,000 personas por edad y género (Kaushansky et al., 2010).

### 3.2. Características Clínicas

El inicio es insidioso, la anemia leve o moderada y el hipermetabolismo debido al aumento del metabolismo celular provocan fatiga, debilidad, pérdida de peso y anorexia. En ocasiones, el primer síntoma es una sensación de estorbo en el abdomen causada por la esplenomegalia o el inicio de un dolor agudo en el cuadrante superior izquierdo debido a un infarto esplénico. La CML se caracteriza por presentar diferentes fases de variable duración, comenzando con una fase crónica inicial (CP), que incluso sin tratamiento tiene una supervivencia media de 3 años, seguida por una progresión a la fase acelerada (AP), marcada por el aumento de la anemia y la trombocitopenia, acompañado por el aumento del número de basófilos en sangre. A menudo aparecen anomalías citogenéticas clónales, como trisomía 8, isocromosoma 17q o duplicación del cromosoma Ph. En un plazo de 6-12 meses, la fase acelerada termina en un cuadro que se parece a la leucemia aguda denominada crisis blástica (BC). (Kumar et al., 2009).

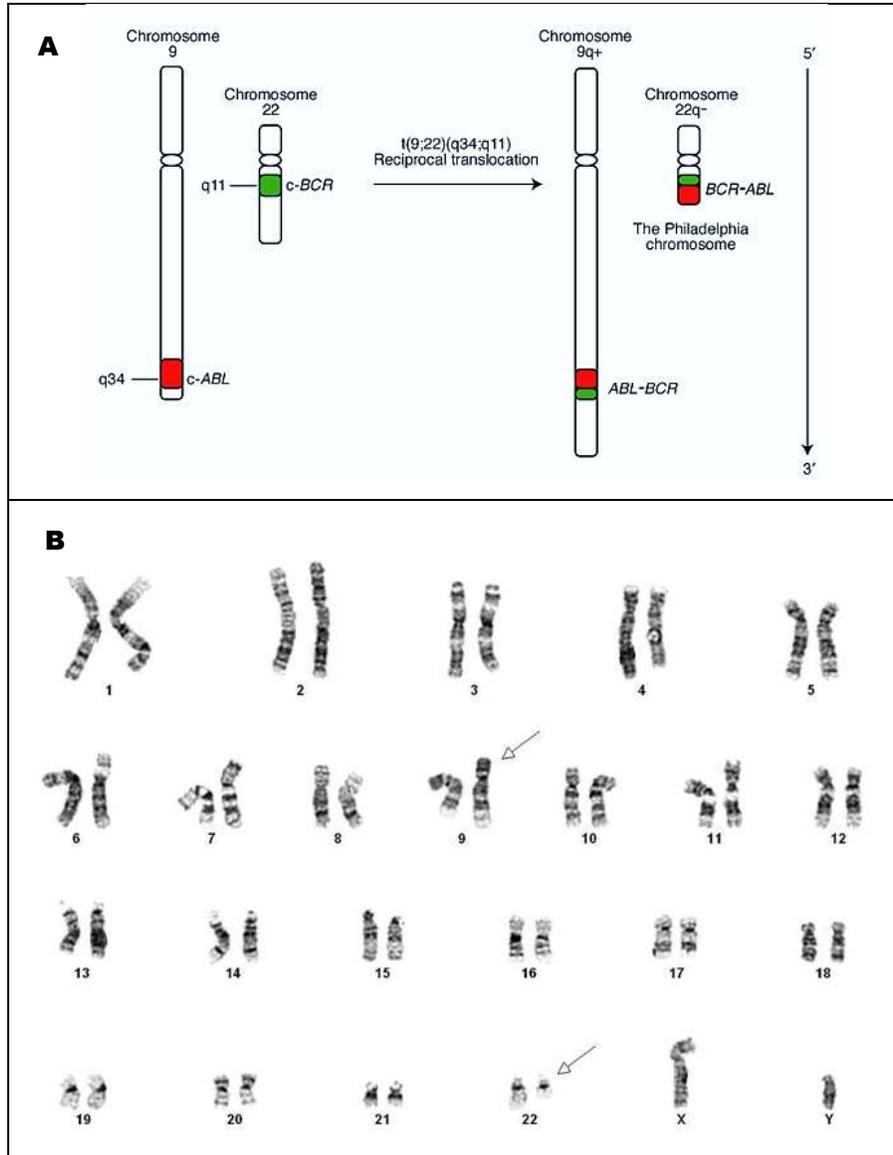
### 3.3. Cromosoma Filadelfia (Ph)

En 1960, Peter Nowell y David Hungerford descubren un cromosoma 22 acortado característico en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (CML) que posteriormente fue nombrado como “Cromosoma Filadelfia”, en honor a la ciudad en la cual fue identificado. En 1973, Janet Rowley mostró que el cromosoma Filadelfia era resultado de una translocación recíproca que involucra los brazos largos de los cromosomas 22 y 9,  $t(9;22)(q34;q11)$ . Esta translocación provoca la fusión de los genes *ABL1* proveniente del cromosoma 9 y el gen *BCR* resultante del cromosoma 22, produciendo un gen híbrido conocido como *BCR-ABL1* (Figura 3). El gen de fusión *BCR-ABL1* codifica una proteína tirosina cinasa constitutivamente activa que promueve la proliferación y supervivencia de células de la serie mieloide sin bloquear su diferenciación. *BCR-ABL1* es capaz de producir la fase crónica de CML, pero con el tiempo ocurren otros eventos genéticos que permiten que la enfermedad progrese a la crisis blástica (Patel, Suthar, Patel, & Singh, 2010; Walz & Sattler, 2006).

### 3.4. *ABL1* (Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1)

*ABL1* es un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 9 en la banda q34, el cual codifica una proteína de 145 KDa con el mismo nombre. Consiste de 11 exones, presentando dos primeros exones alternativos conocidos como 1a y 1b, por lo que genera dos diferentes mRNA que difieren en la secuencia del extremo amino terminal. La variante

1b de ABL1 codifica una proteína que contiene un grupo miristato unido al amino terminal y además presenta 19 aminoácidos más que la proteína codificada por la variante 1a (Pane, Intrieri, Quintarelli, & Izzo, 2002).



**Figura 3. Cromosoma Filadelfia, t(9;22)(q34;q11).** A) Los cromosomas normales 9 y 22 contienen los genes *c-ABL1* y *c-BCR* respectivamente. El resultado de la translocación entre estos dos cromosomas es la formación de un cromosoma 22 acortado (cromosoma Filadelfia) que contiene el gen híbrido *BCR-ABL1*. B) Cariotipo de paciente masculino con t(9;22)(q34;q11) (“CSI Laboratories - Testing,” 2013).

La proteína ABL1 se encuentra localizada en diversos sitios celulares, incluyendo el núcleo, el citoplasma, la mitocondria, el retículo endoplasmático y la corteza celular,

donde interactúa con una gran cantidad de proteínas celulares incluyendo adaptadores de la bioseñalización, cinasas, fosfatasa, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto. Así, ABL1 ha sido implicada en una gran cantidad de procesos celulares, incluyendo la regulación de crecimiento celular y sobrevivencia, stress oxidativo y respuesta al daño en el DNA, división y migración celular entre otros. Ambas variantes de la proteína contienen en su estructura un dominio tirosina cinasa, el cual es precedido por un dominio SH2 y otro SH3. Estos tres dominios son altamente conservados, no solo en términos de secuencia, sino también en su disposición y separación. En contraste, las regiones localizadas río arriba del dominio SH3 y río abajo del dominio cinasa son muy diversas.

El dominio cinasa de ABL1 es el sitio donde la proteína efectúa las funciones de autofosforilación y de fosforilación de los sustratos, el residuo más importante en este dominio para la activación de ABL1 es Y412, el cual después de sufrir fosforilación induce a su vez la fosforilación del residuo Y242, acción que produce un cambio en la conformación de la proteína que origina que esta sea activada. Cuando la proteína no está fosforilada, el loop de activación del dominio cinasa de ABL1 impide la unión del ATP y los sustratos al sitio activo. Así mismo, el dominio cinasa puede ser inactivado por un único cambio en la conformación de la base del loop de activación debido al movimiento de la posición del aspartato y la fenilalanina dentro del motivo DFG (Aspartato-Fenilalanina-Glicina), lo que retira un residuo que es esencial para la coordinación del posicionamiento del ATP a partir del sitio activo (Hantschel & Superti-Furga, 2004; Nagar et al., 2003). El dominio SH2 actúa como regulador positivo y media la interacción proteína-proteína por unirse fuertemente a los residuos de tirosina fosforilados. El dominio SH3 actúa como regulador negativo y media la interacción proteína-proteína a través del reconocimiento de secuencias específicas ricas en prolina (Wandless, 1996).

El extremo amino terminal consiste en una región conocida como Cap, la cual es importante para la autoinhibición de la proteína. El extremo carboxilo terminal o también conocido como región del último exón contiene sitios de interacción proteína-proteína y es responsable de permitir a ABL1 ubicarse en una diversidad de localizaciones subcelulares y varias de sus funciones. Presenta tres regiones con señales de localización nuclear y una región con señal de exportación nuclear, lo que le permite moverse entre el núcleo y el citoplasma en respuesta a señales del entorno. Además, contiene motivos ricos en prolina que funcionan como sitios de unión para los dominios SH3 de proteínas

adaptadoras (CRK, GRB2, NCK 1) y supresores tumorales (p53, RB), el dominio carboxilo terminal de la RNA polimerasa II, el DNA, y también a actina globular y filamentosa (Figura 4) (Hantschel & Superti-Furga, 2004).

### 3.5. *BCR (Breakpoint Cluster Región)*

*BCR* es un gen situado en el brazo largo del cromosoma 22 en la banda q11. Este gen contiene 23 exones que presentan varias formas de splicing, codificando principalmente dos variantes con pesos moleculares de 160 KDa y 130 KDa (Kurzrock, Kantarjian, Druker, & Talpaz, 2003). La proteína *BCR* reside tanto en el núcleo como en el citoplasma, sin embargo, en algunas líneas celulares la variante de 130 KDa predomina en el núcleo y la de 160 KDa en el citoplasma. Interactúa principalmente con proteínas adaptadoras de la bioseñalización, reguladores del ciclo celular y proteínas reparadoras del daño en el DNA.

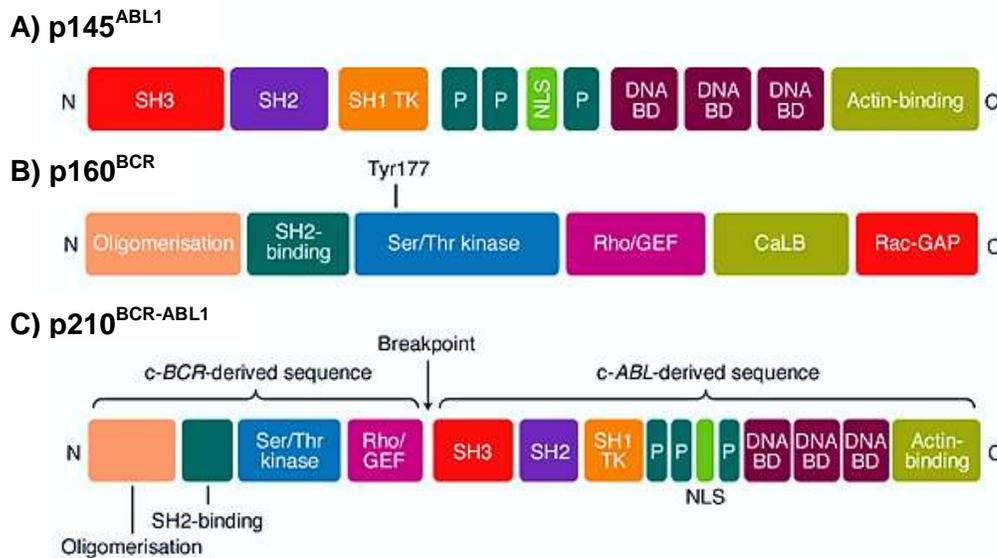
Dentro de la región codificada por el primer exón de *BCR* se ubican un dominio serina/treonina cinasa, dos cajas ricas en serina con sitios de unión a dominios SH2 y un dominio de oligomerización. El dominio serina/treonina cinasa contiene una secuencia de unión al ATP y una subregión de fosfotransferencia, Las dos cajas de unión a dominios SH2 contienen fosfoaminoácidos serina, treonina o tirosina, lo que permite que se unan los dominios SH2 de otras proteínas. El dominio de oligomerización tiene una estructura en coiled-coil caracterizada por presentar siete aminoácidos hidrófobos (hxxhcx) que permiten la dimerización y/o tetramerización.

La región central de *BCR* interactúa y regula la acción de proteínas G como RHO, RAC y CDC42 mediante el dominio GEF, el cual activa estas proteínas favoreciendo el intercambio de GDP por GTP. La región del extremo carboxilo terminal también está involucrada en la regulación de la actividad de proteínas G debido a que presenta un dominio GAP que, al contrario que GEF, inactiva estas proteínas ya que acelera la actividad GTPasa. En medio de estos dos dominios se encuentra presente un sitio de unión a lípidos dependiente de iones calcio denominado CaLB (Figura 4) (Laurent, Talpaz, Kantarjian, & Kurzrock, 2001).

### 3.6. *BCR-ABL1*

El producto de la translocación t(9;22)(q34;q11) es el gen de fusión *BCR-ABL1* en el cromosoma 22 y un recíproco *ABL1-BCR* en el cromosoma 9. Este último aunque

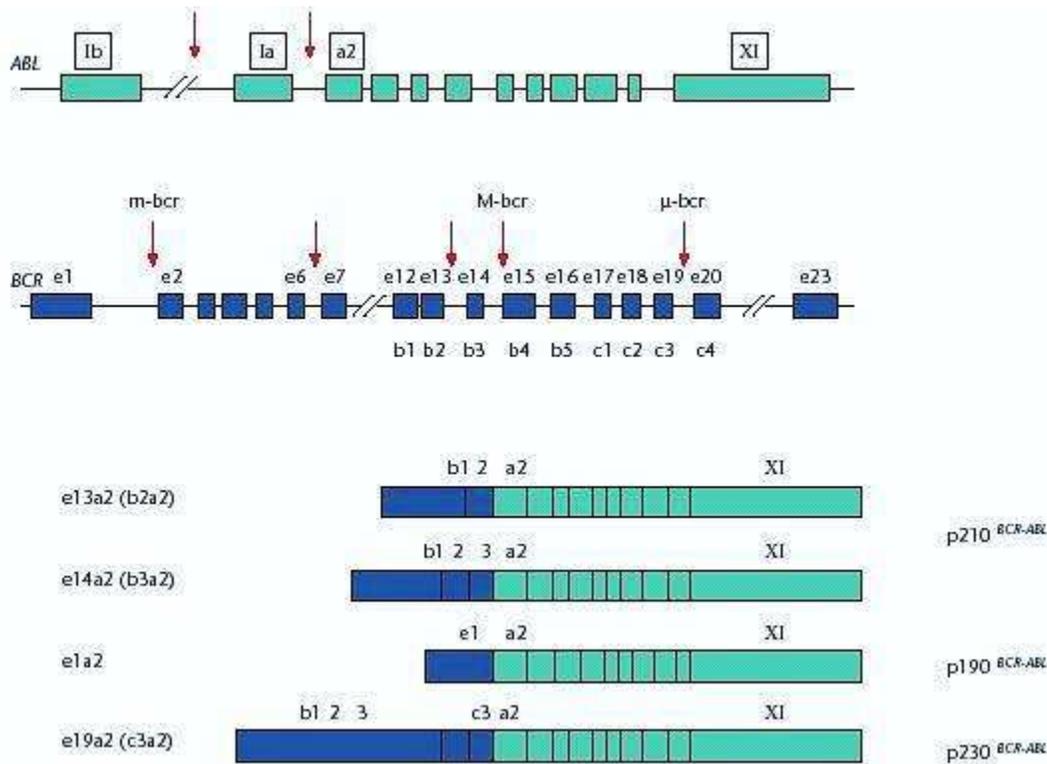
transcripcionalmente activo, no parece codificar ninguna proteína ni tener algún papel en el desarrollo de la CML (Salesse & Verfaillie, 2002).



**Figura 4. Motivos estructurales presentes en p160<sup>BCR</sup>, p145<sup>ABL1</sup> y la proteína de fusión p210<sup>BCR-ABL1</sup>.** A) ABL1 comprende un dominio SH3 y SH2, un dominio tirosina quinasa SH1 (TK), varios dominios ricos en prolina (P), una señal de localización nuclear (NLS), varios dominios de unión a ADN (ADN BD) y un dominio de unión a actina. B) BCR comprende un dominio de oligomerización, una región de unión a dominios Src homología 2 (SH2) de otras proteínas, un dominio serina/treonina cinasa, una región con homología con el factor de intercambio de nucleótidos de guanosina Rho (Rho/GEF), una región para facilitar la unión de lípidos dependiente de iones calcio (CALB) y una región que muestra homología con la proteína GTPasa Rac (Rac-GAP). C) La proteína de fusión BCR-ABL comprende los primeros cuatro dominios de BCR y todos los dominios de ABL1, excepto el dominio N-terminal de SH3 (Smith et al., 2003).

Existen diferentes regiones de ruptura tanto en el gen *ABL1* como en el gen *BCR* dando lugar a diferentes variantes del gen de fusión *BCR-ABL1*. En *ABL1* el punto de corte puede ocurrir en cualquier sitio hacia el extremo 5', pudiendo ser río arriba del primer exón alternativo Ib, río abajo del segundo exón alternativo la o más frecuentemente entre ambos. El gen *BCR* presenta varios puntos de ruptura que se han dividido en tres regiones bien definidas. La primera, nombrada como región de ruptura mayor (M-bcr), abarca los exones 12 a 16 (nombrados b1 a b5). En esta región ocurre la ruptura del gen *BCR* en un 95% de los casos de CML y en un 30% de los casos de ALL. En CML las variantes más comunes son b2a2 y b3a2 que fusionan el exón 13 (b2) o 14 (b3) de *BCR* al exón 2 (a2) de *ABL1*, codificando una proteína de peso molecular de 210 KDa. La segunda región, denominada como región de ruptura menor (m-bcr), se sitúa entre dos

exones alternativos e2' y e2, este sitio de corte se encuentra en un 70 a 80% de pacientes con ALL y raramente en pacientes con CML. En ALL con Ph positivo se produce una proteína de 190 KDa por la fusión del primer exón de *BCR* (e1a2). El tercer punto de ruptura, llamado región de ruptura micro ( $\mu$ -bcr) fue encontrado río abajo del exón 19. Este tercer punto de fusión (e19a2) fue asociado a una rara leucemia neutrofílica crónica que codifica una proteína de 230 KDa. Las diferentes variantes de BCR-ABL1 no solo es reflejo de los diferentes puntos de ruptura y fusión sino también del splicing alternativo (Figura 5). (Pane et al., 2002; Salesse & Verfaillie, 2002; Walz & Sattler, 2006).



**Figura 5. Proteínas codificadas por diferentes variantes del gen *BCR-ABL1*.** Existen diferentes regiones de ruptura tanto en el gen *ABL1* como en el gen *BCR* dando lugar a diferentes variantes del gen de fusión *BCR-ABL1*. Los transcritos de fusión generan principalmente 4 proteínas que varían en su peso molecular (190, 210 y ,230kDa (Focosi, 2013).

### 3.7. Características funcionales de *BCR-ABL1*

*BCR-ABL1* es una proteína con actividad tirosina cinasa constitutivamente activa, debido a que el dominio cinasa de la fracción de *ABL1* es activado mediante la dimerización y/o tetramerización de *BCR-ABL1* mediante el dominio coiled-coil de la fracción amino

terminal de BCR (Hantschel & Superti-Furga, 2004), este proceso permite la autofosforilación de diferentes residuos, incluyendo Y1127 (Y242 en ABL1) provocando su activación. BCR-ABL1 tiene la capacidad de activar una gran variedad de vías de bioseñalización y blancos río abajo como RAS, STAT, PI3K, MAPK, producción de especies reactivas de oxígeno y otros vías que generalmente son activadas por factores de crecimiento, lo que da lugar a una anormal proliferación celular e inhibición de la apoptosis (Walz & Sattler, 2006).

La señalización molecular en CML es altamente compleja y las vías de traducción de la señal han sido extensamente estudiadas. La localización citoplasmática de la oncoproteína BCR-ABL1 permite el acceso de muchos sustratos celulares determinando la activación de las vías que inducen proliferación, evasión de la apoptosis y la alteración en la adhesión al estroma de la medula ósea (Melo & Barnes, 2007; Thielen, Ossenkoppele, Schuurhuis, & Janssen, 2011).

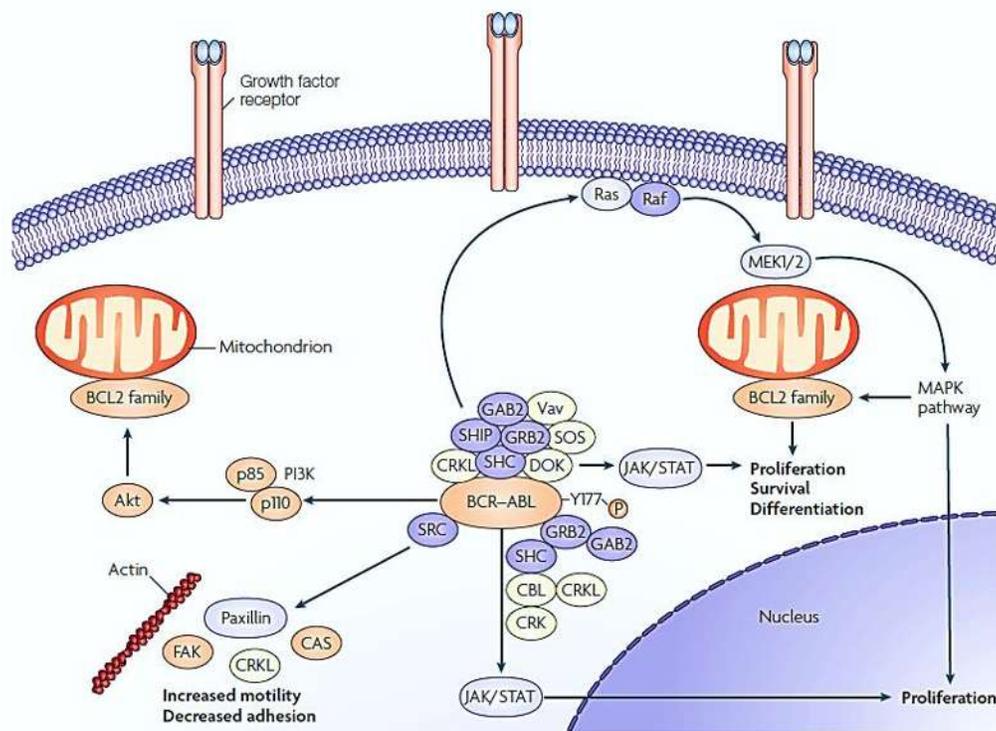
La vía de señalización JAK-STAT es una de los principales mecanismos de señalización activados por BCR-ABL1, debido a la activación constitutiva que provoca de JAK 2 por fosforilación, la cual a vez está activa a la familia de factores de transcripción STAT. La familia de factores de transcripción STAT participa en diversos procesos, incluyendo crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, inflamación y respuesta inmune. La familia STAT inicia la vía de señalización por fosforilación, que induce dimerización y subsecuente migración al núcleo, donde regula la transcripción de genes que están envueltos en la proliferación celular y evasión de la apoptosis como ciclina D1, ciclina D2, Bcl-2, Bcl-xL, c-Myc y NFκB (Patel et al., 2010; Thielen et al., 2011).

Con la ayuda de varias proteínas mediadoras, BCR-ABL1 se asocia con RAS y estimula su activación. BCR-ABL1 posteriormente de la autofosforilación del residuo Y177 interactúa con la proteína adaptadora GRB 2 a través de su región de unión a dominios SH2. GRB 2 unida a BCR-ABL1 interactúa con la proteína SOS, y a su vez este complejo proteínico activa a RAS, la cual activa a Raf, uniendo esta vía con la ruta de señalización de las MAPK, que cataliza la fosforilación de MEK y a su vez de ERK, provocando su activación. CRKL y SHC también pueden mediar la activación de RAS. De esta manera BCR-ABL1 estimula la dependencia de factores de crecimiento y proliferación.

BCR-ABL1 también se asocia y activa la vía PI3K, suprimiendo el programa de muerte celular e incrementando la supervivencia celular, además de afectar el metabolismo, la

adhesión, la motilidad y la diferenciación celular. BCR-ABL1 fosforila a PI3K provocando su activación, a su vez PI3K fosforila a PIP2 y forma PIP3, el cual induce la activación de varias cinasas, principalmente PDK 1 y PDK 2, a través de los cuales media la activación de PKB que fosforila entonces residuos serina y treonina de sus diversas proteínas diana.

BCR-ABL1 está asociada a componentes implicados en la adhesión como actina, paxilina, vinculina, talina y FAK, provocando una disminución en la adhesión celular al estroma y aumentando la movilidad debido al bloqueo de señalización mediada por  $\beta$ -Integrina (Figura 6) (Weisberg, Manley, Cowan-Jacob, Hochhaus, & Griffin, 2007).



**Figura 6. Sistema de bioseñalización relacionado con BCR-ABL1 en CML.** BCR-ABL1 tiene la capacidad de activar una gran variedad de vías de bioseñalización como RAS, STAT, PI3K y MAPK, así como interactuar con proteínas involucradas en la adhesión celular lo que da lugar a una anormal proliferación celular, diferenciación, inhibición de la apoptosis, disminución en la adhesión al estroma e incrementada motilidad (Weisberg et al., 2007).

## 4. Imatinib Mesylate

### 4.1. Antecedentes

El primer tratamiento efectivo para la CML fue la solución Fowler, la cual contenía arsénico como componente activo principal, siendo utilizado a principios del siglo XX.

Después en 1920, con el advenimiento de la radioterapia, la irradiación del bazo fue la principal opción terapéutica, ya que ofrecía a los pacientes la disminución de la sintomatología, aunque no prolongaba la vida. En 1953, el agente alquilante Busulfán fue introducido en la práctica clínica. Debido a su alta toxicidad para la CGH, esta sustancia rápidamente fue una opción para el tratamiento para CML basado en su superioridad comparada con la radioterapia, sin embargo, fue asociada a diversos efectos adversos incluyendo infertilidad, aplasia de la médula ósea, y fibrosis pulmonar, hepática y cardíaca. Posteriormente, el Busulfán fue sustituido por compuestos menos tóxicos como la Hidroxiurea y la Citarabina, opciones terapéuticas introducidas en 1960, la cual induce una mejoría sintomática y hematológica en la fase crónica y permite prolongar la supervivencia. Su efecto principal es bloquear la proliferación, actuando específicamente en la fase de síntesis del ciclo celular. El principal defecto en ambas sustancias fue la incapacidad de producir una remisión citogenética. En 1980, se comenzó a utilizar al Interferón  $\alpha$ , el cual fue capaz de inducir remisión citogenética completa y extender la supervivencia de los pacientes. Este compuesto fue el primer tratamiento farmacológico que significativamente afectó el curso natural de la enfermedad. Desde el punto de vista biológico y molecular el Interferón  $\alpha$  puede generar toxicidad selectiva contra la clona leucémica, incrementar la regulación inmune y modular la hematopoyesis a través del microambiente hematopoyético. Sin embargo, los efectos secundarios que incluían fatiga, mialgias, artralgias, dolor de cabeza, pérdida de peso, depresión, diarrea, síntomas neurológicos, cambios de memoria, adelgazamiento del pelo, enfermedades autoinmunes y cardiomiopatías limitaron la utilidad clínica del Interferón  $\alpha$ , (Chávez-González, 2009; Henkes, Van der Kuip, & Aulitzky, 2008).

La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la CML abrió el camino para el desarrollo de terapias dirigidas más específicas. Un proyecto médico-químico enfocado en la proteína cinasa C (PKC) como blanco, condujo a la síntesis del compuesto 2-Fenilaminopirimidina, el cual tiene bajo potencial y pobre especificidad como inhibidor de serina/treonina o tirosina cinasas, sin embargo de este punto de inicio, una serie de derivados fueron sintetizados. La adición de un grupo 3'-Piridil en la posición 3' de la pirimidina mejoró la actividad celular de los derivados. La actividad contra tirosinas cinasas fue optimizada por introducción de un grupo benzamido en el anillo fenilo. La unión de un grupo metil en posición orto del anillo de diaminofenil redujo fuertemente la actividad contra la PKC. Finalmente, la adición de una N-metilpiperazina aumentó la solubilidad en agua y la biodisponibilidad oral. Así, Imatinib

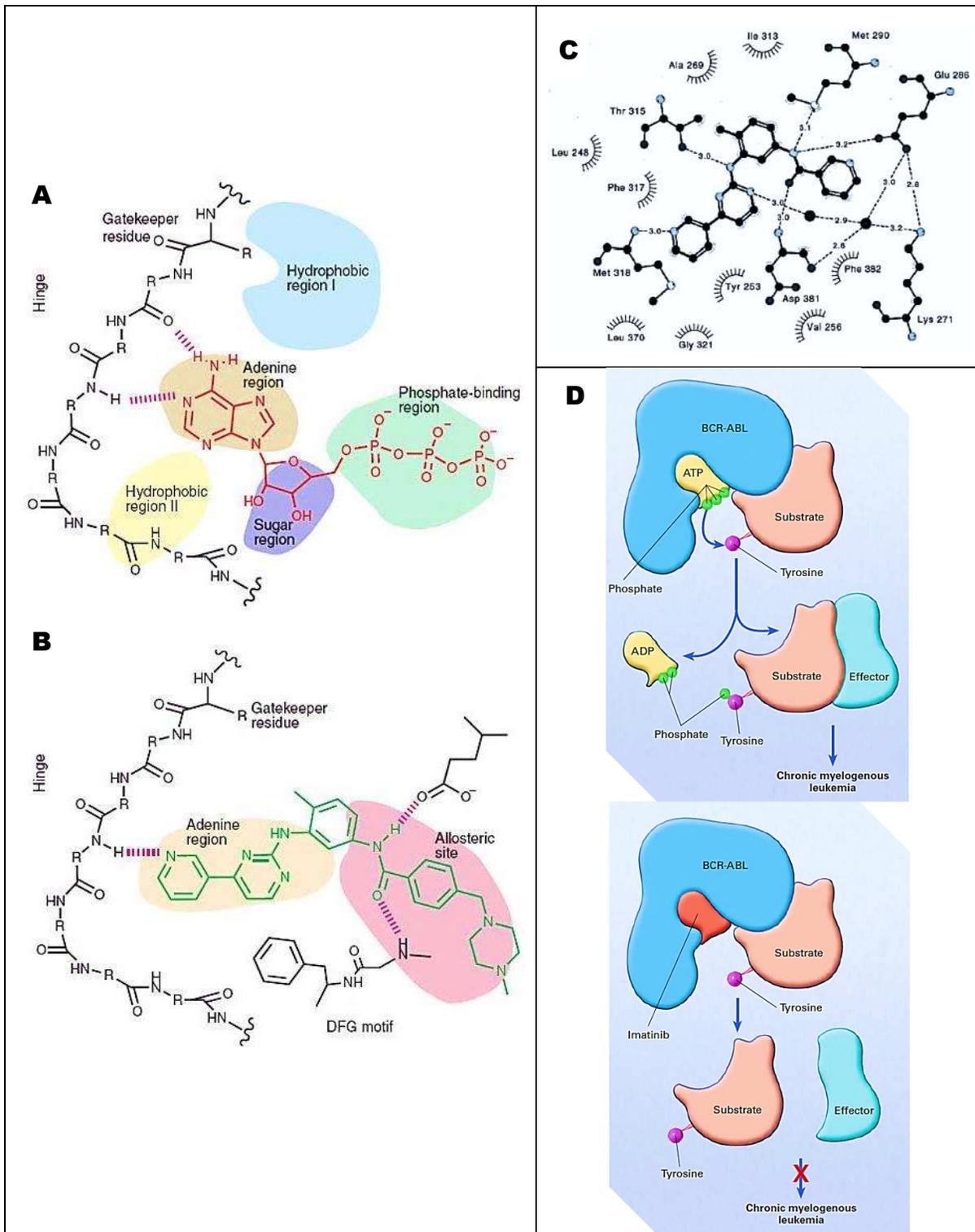
surgió como el compuesto más prometedor para el desarrollo clínico, con una alta selectividad y eficacia para inhibir tirosina cinasas (Patel et al., 2010).

#### *4.2. Imatinib Mesylate, primer inhibidor de la actividad Tirosina Cinasa*

En 1996, Brian J. Druker y su equipo, en colaboración con Novartis Pharmaceuticals, desarrollaron la droga experimental CGP57148B, la cual es hoy conocida como Imatinib Mesylate (Imatinib, STI571, Gleevec®/Glivec®). Imatinib Mesylate es un inhibidor de la actividad tirosina cinasa perteneciente a la familia de compuestos derivados de la 2-Fenilaminopirimidina, el cual actúa impidiendo la autofosforilación de BCR-ABL1 y/o la fosforilación de sus sustratos debido a que ocupa el sitio de unión al ATP. Imatinib estabiliza la forma inactiva de BCR-ABL1, impidiendo que todas las vías de bioseñalización que conducen al desarrollo de la CML se activen (Figura 7). Gracias a la alta eficacia y baja toxicidad, Imatinib ha reemplazado al interferón  $\alpha$  como primer línea en el tratamiento de CML (Apperley, 2007; Melo & Chuah, 2007; Walz & Sattler, 2006).

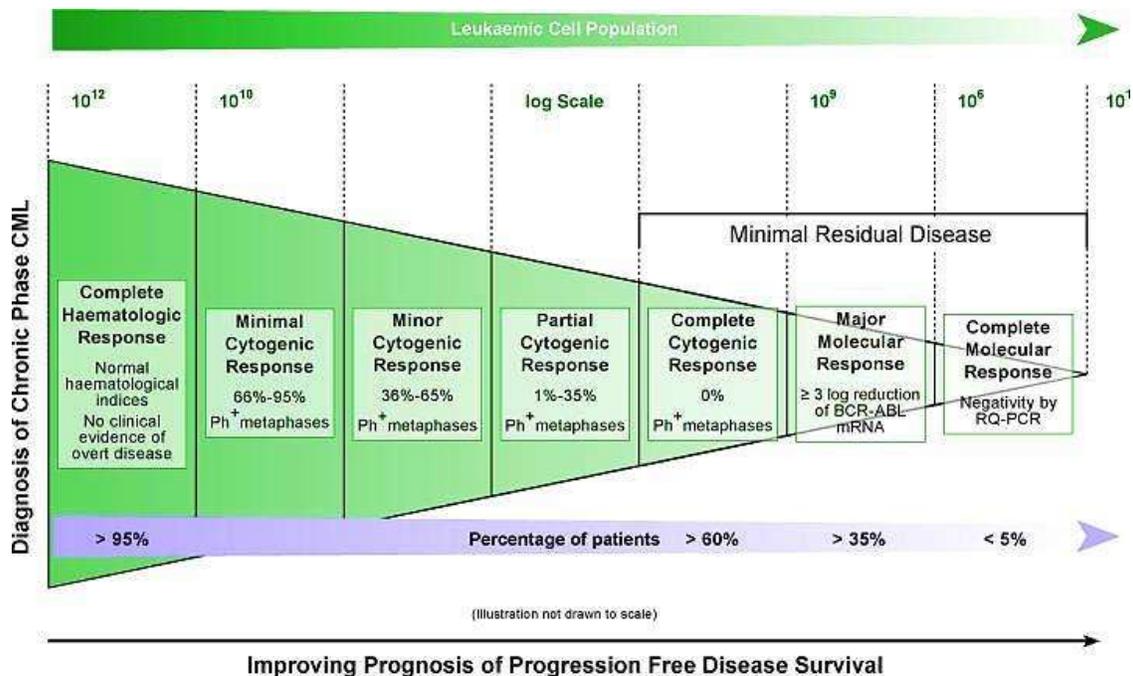
### **5. Respuesta al Tratamiento**

Históricamente, antes de 1980, la remisión hematológica (CHR, normalización de la cuenta y diferenciación celular en sangre periférica, así como el tamaño del bazo) fue la única respuesta terapéutica documentada en pacientes con CML. Después, el tratamiento con Interferón  $\alpha$  permitió observar respuestas citogenéticas parciales (PCyR, 1-34% de metafases observadas con cromosoma Ph positivo) o respuestas citogenéticas completas (CCyR, No presencia del cromosoma Ph en la totalidad de metafases observadas de células de la medula ósea), lo que se correlacionó con la mejora significativa de la sobrevivencia. Debido a esto, se resalta la importancia del monitoreo a la respuesta al tratamiento en pacientes con CML. La asociación entre la respuesta citogenética y la sobrevivencia en los pacientes, permitió que esta fuera considerada como el standard de oro de la repuesta al tratamiento. Además, junto con la introducción de los inhibidores de actividad tirosina cinasa (TKI) como primera línea de tratamiento, aparecieron ensayos de monitoreo más sensibles, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales mostraron que en un estado de CCyR pueden existir aún más de  $2.5 \times 10^7$  células leucémicas en circulación. A partir de estos descubrimientos, se definió un tercer nivel de respuesta, la respuesta molecular, basado en ensayos moleculares para detectar células leucémicas residuales (Figura 8) (Tohami, Nagler, & Amariglio, 2012).



**Figura 7. Mecanismo de acción de Imatinib con la proteína BCR-ABL1.** A) Sitio de unión al ATP dividido en subregiones, B) Sitio de unión al ATP ocupado por Imatinib (Liu & Gray, 2006), C) Interacciones de la cinasa de ABL1 con Imatinib, indicando residuos que forman puentes de hidrogeno e interacciones de Van der Waals (Schindler, 2000), D) Mecanismo de acción efectuado por Imatinib para impedir la autofosforilación de BCR-ABL1 y/o fosforilación de sus sustratos, evitando la progresión de la CML (Savage & Antman, 2002).

El monitoreo molecular y la evaluación de enfermedad mínima residual (MRD) juega un importante rol en el manejo de CML. MRD es definida como nivel de enfermedad molecularmente detectable que presenta un paciente, en ausencia de indicios morfológicos de esta (Greer et al., 2009). La definición de respuesta molecular está basada en el cálculo de la reducción logarítmica de transcritos de BCR-ABL1 identificados por RQ-PCR. En el 2005, un panel de expertos definió un valor de referencia estándar mediante el procesamiento de 30 muestras de pacientes con CML recién diagnosticados (antes del tratamiento) en tres laboratorios centrales del International Randomized Study of Interferon versus STI571 (IRIS). En pacientes tratados con Imatinib, una reducción logarítmica de 3 niveles del valor de referencia estándar está asociada a una alta probabilidad de respuesta a largo plazo al tratamiento y mejor tasa de supervivencia. Por esta razón, este valor es considerado como respuesta molecular mayor (MMR) (Tohami et al., 2012).



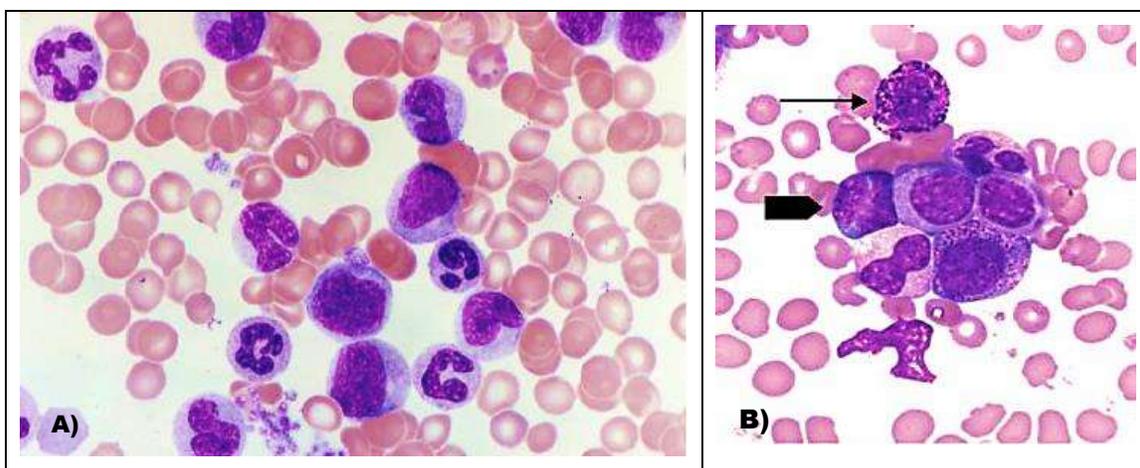
**Figura 8. Respuesta al tratamiento en pacientes con CML.** El monitoreo de la respuesta al tratamiento en pacientes con CML se correlaciona con la supervivencia que estos presentan, valorándose a varios niveles que involucran la respuesta hematológica, citogenética y molecular, debido que cada uno de estos permite conocer un aproximado del número de células leucémicas residuales (Frazer, Irvine, & McMullin, 2007).

## 5.1. Ensayos de Laboratorio para Diagnóstico y Monitoreo del Tratamiento

### 5.1.1. Citometría Hemática

El diagnóstico presuntivo de CML puede realizarse a partir de los resultados obtenidos del recuento de células sanguíneas y la examinación del frotis de sangre. La

concentración de la hemoglobina en la sangre esta disminuida en muchos pacientes al momento del diagnóstico. Los eritrocitos usualmente son normales o ligeramente alterados, con un incremento en la variación del tamaño y solo ocasionalmente deformes (elípticos o irregulares). Comúnmente existe una pequeña cantidad de eritrocitos nucleados. La cuenta de reticulocitos es normal o ligeramente elevada, pero clínicamente la hemólisis es rara. La cuenta total de leucocitos esta siempre elevada, generalmente mayor de 25,000/ $\mu$ L, pudiéndose encontrar recuentos de hasta 100,000/ $\mu$ L (Kaushansky et al., 2010). En la CP existe una marcada granulocitosis, en todos los estados de maduración y con una apariencia generalmente normal. Existe una predominancia por neutrófilos maduros, pero también se incrementa el número de mielocitos (Figura 9). Los mieloblastos usualmente no exceden el 3% del total de leucocitos. Muchos pacientes también demostraron eosinofilia y basofilia. También puede existir un incremento en el número de monocitos, aunque este no representa más del 3% de las células nucleadas. El recuento total de linfocitos esta incrementado. Las plaquetas tienden a ser normales, pero incrementan en número y ocasionalmente pueden exceder el millón, sin que esto implique complicaciones trombohemorrágicas (Greer et al., 2009)

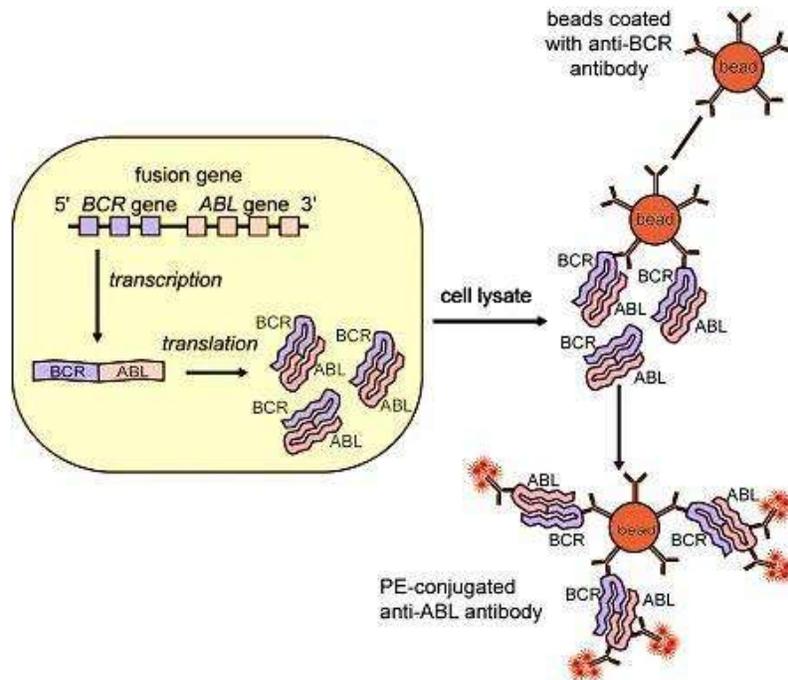


**Figura 9. Características hematológicas presentes en CML.** Frotis de sangre periférica teñido con colorante Wright, A) Presencia de formas inmaduras (mielocitos, metamielocitos y formas en banda) y maduras de neutrófilos, recuento de plaquetas elevado (Kaushansky et al., 2010). B) Ocasionalmente puede haber basofilia (Flecha) y extrañas formas blásticas (Punta de Flecha) (Greer et al., 2009)

### 5.1.2. Citometría de Flujo

La citometría de flujo es ahora un método ampliamente utilizado para el análisis de la superficie celular y las moléculas intracelulares, permite caracterizar diferentes tipos de poblaciones celulares, evaluar la pureza de las subpoblaciones aisladas, así como realizar un análisis del tamaño y el volumen de la célula. Principalmente, esta técnica

utiliza anticuerpos marcados con fluoróforos para detectar proteínas o ligandos específicos presentes en las células a analizar. En CML, la citometría de flujo permite realizar una prueba de escrutinio rápida para detectar la presencia de las variantes más frecuentes de la proteína BCR-ABL1 (p190, p210 y p230). El principio de esta prueba se basa en la utilización de un anticuerpo específico para BCR unido a una perla de captura y otro anticuerpo dirigido contra ABL1 el cual se encuentra conjugado con ficoeritrina (PE). La presencia de la proteína BCR-ABL1 resulta en la formación de un complejo en sándwich compuesto de la perla de captura y el fluoróforo de detección, ambos detectables por citometría de flujo (Figura 10) (Lucas et al., 2011). La citometría de flujo también puede ser útil para determinar el linaje de los blastos incrementados cuando la enfermedad progresa a AP o BP.



**Figura 10. Principio del ensayo por citometría de flujo para detección de la proteína BCR-ABL1.** El principio de la prueba se basa en la utilización de un anticuerpo dirigido contra BCR unido a una inmunoesfera y otro anticuerpo conjugado con un fluoróforo dirigido contra ABL1 (Dekking et al., 2010).

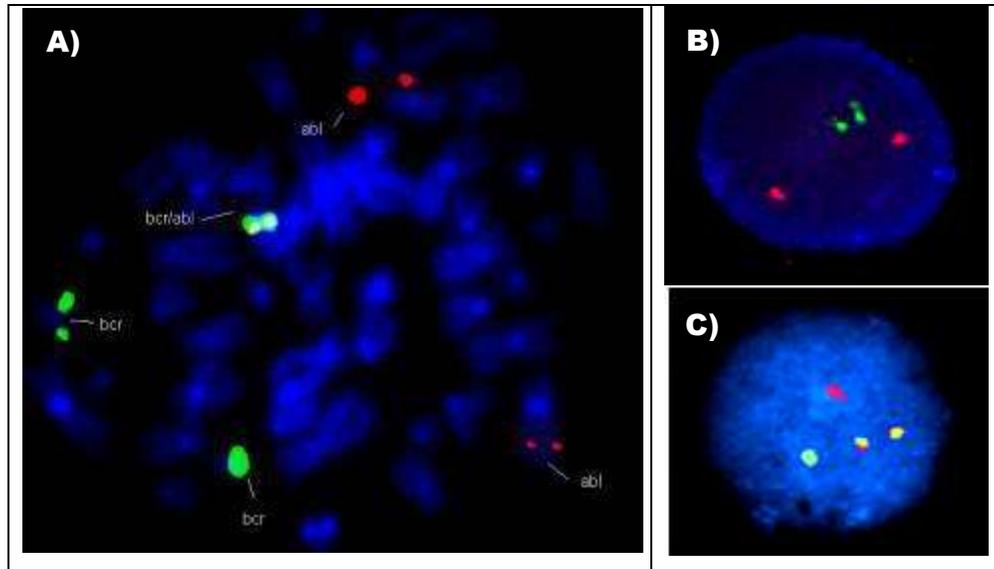
### 5.1.3. Citogenética convencional

La citogenética es considerada como el estándar de oro para detectar la presencia del cromosoma Ph y monitorear la respuesta citogenética. Esta también es importante para

detectar otras anormalidades cromosómicas asociadas como isocromosoma 17q, trisomía del cromosoma 8 o 19, especialmente en caso de evolución clonal, la cual puede progresar en raros casos a síndrome mielodisplásico o a leucemia mieloide aguda. Un cariotipo es un perfil de organización de los cromosomas de una persona. En un cariotipo, los cromosomas se disponen y numeran por tamaño, de mayor a menor. Este sistema ayuda a los científicos a identificar rápidamente las alteraciones cromosómicas que pueden resultar en un trastorno genético (“Make a Karyotype,” 2013). La citogenética convencional puede llevarse a cabo utilizando sangre periférica y células de médula ósea, aunque aproximadamente 5% de los casos existe falla en los estudios en sangre periférica. El cariotipo permite identificar el número de metafases con presencia del cromosoma Ph y estimar la proporción existente entre estas y las metafases normales. La desventaja de esta metodología es su baja sensibilidad, la cual está limitada a 1-5% de células positivas en el cultivo muestreado y la necesidad de células viables en mitosis (Figura 3b) (Greer et al., 2009; Tohami et al., 2012).

#### 5.1.4. FISH (*Hibridación Fluorescente in situ*)

El método de FISH involucra el uso de sondas específicas de DNA marcadas con fluoróforos que reconocen secuencias específicas frente a regiones particulares del cromosoma. Estas sondas se aplican sobre extensiones de metafases o núcleos en interfaz, donde se hibrida con su secuencia genómica homóloga y de este modo marca una región cromosómica específica, que se puede visualizar con el microscopio de fluorescencia. Existen muchas ventajas en esta técnica, incluyendo rápidos resultados (~24 horas), el uso de células en interfase, alta sensibilidad en detectar la anomalía en comparación con la citogenética convencional, así como la capacidad de examinar más células. La desventaja del FISH es que la información diagnóstica que se obtiene es relacionada a una pregunta específica realizada. Actualmente, el método de FISH para CML utiliza un color dual para detectar los puntos de ruptura de ABL1 y BCR. Generalmente, el gen BCR es marcado con un fluoróforo verde y ABL1 con un fluoróforo rojo, si el verde y el rojo se superponen se observa un color amarillo en el microscopio que es significativo de la fusión de ambos genes (Figura 11) (Greer et al., 2009). En la práctica, el límite de detección para células con presencia del cromosoma Ph es de 1-5% y depende en parte de las sondas utilizadas, el tamaño de los núcleos y el punto preciso de ruptura y fusión del gene ABL1 y BCR (Hochhaus et al., 2000).



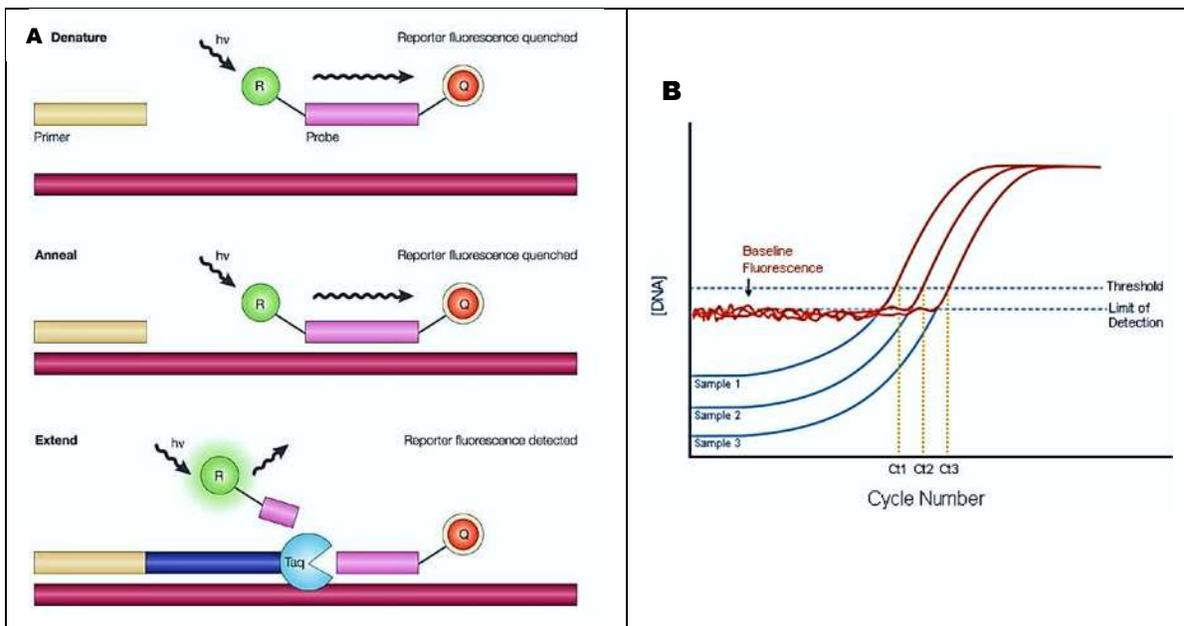
**Figura 11. FISH con sondas de doble fusión para detectar la t(9;22) (q34;q11).** La sonda de color rojo marca selectivamente al gen ABL1 y la sonda verde al gen BCR. Cuando existe la translocación, ambas sondas se traslapan produciendo un color amarillo. A) FISH en metafase de una muestra positiva, B) FISH en interfase de una muestra control negativo y C) FISH en interfase de una muestra positiva (“Agilent SureFISH : Translocation,” 2013).

#### 5.1.5. RT-PCR

RT-PCR es la técnica más sensible para la detección y cuantificación de mRNA disponible en la actualidad. Debido a la utilización de mRNA, la RT-PCR permite detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de los genes de interés a través de la creación de ADN complementario (cDNA). En el caso de CML, la técnica cualitativa permite detectar la presencia de los diferentes transcritos del gen de fusión BCR-ABL1 con una sensibilidad de 1 célula positiva en 100,000 negativas, la cual es útil para el diagnóstico, pero no lo suficiente para el monitoreo de la respuesta molecular durante el tratamiento, en la que es más útil la técnica cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El RNA puede obtenerse a partir de sangre periférica o médula ósea, al cual se transforma en cDNA por una transcripción reversa, que es sujeto a amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para las diferentes regiones de los exones de BCR y ABL1. El set de oligonucleótidos es designado para identificar los diferentes productos de fusión, así como para amplificar una región del gen BCR o ABL1 que no esté envuelta en la translocación, que constituya el control interno de la reacción.

El qRT-PCR permite cuantificar un transcrito específico del gen de fusión BCR-ABL1, que originalmente fue identificado para el diagnóstico, mediante dos reacciones, una con los

oligonucleótidos específicos para la variante de BCR-ABL1, y otra con los oligonucleótidos del control interno. En este caso generalmente se utilizan sondas con tecnología TaqMan®, es decir, en su estructura se une al extremo 5' un fluoróforo y en el extremo 3' un quencher, así en caso de no existir amplificación, la proximidad del quencher suprime la fluorescencia del fluoróforo. En caso contrario, si existe amplificación en la muestra, la actividad de exonucleasa de la Taq polimerasa realiza la lisis de la sonda, lo cual permite la emisión de fluorescencia.



**Figura 12. Principios de la metodología qRT-PCR.** A) La actividad exonucleasa de la Taq polimerasa escinde las sondas Taqman® durante la etapa de extensión del amplicón, separando el fluoróforo (R) del quencher (Q) permitiendo su detección. La fluorescencia emitida cuando el fluoróforo es excitado por luz externa en cada ciclo del PCR es proporcional a la cantidad de producto formado (Koch, 2004). B) El Ct es inversamente proporcional al número inicial de transcritos. Un número inicial de transcritos alto, se correlaciona con valores de Ct más bajos

El resultado de una qRT-PCR se visualiza en un gráfico de amplificación, donde se expresa la fluorescencia (DNA producto) medida por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos en el eje de las abscisas. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona donde inicia el aumento exponencial de la señal. El punto de inserción de una curva de amplificación con el umbral se denomina umbral de ciclo (Ct). La Ct se define como la cantidad de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce la señal umbral. Así, el nivel de Ct es

inversamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra, ya que una cantidad mayor de este amplificara una cantidad superior de transcritos, los cuales producirán un mayor registro de fluorescencia, requiriendo menos ciclos para sobrepasar la señal umbral (Figura 12) (Hochhaus et al., 2000; Tohami et al., 2012).

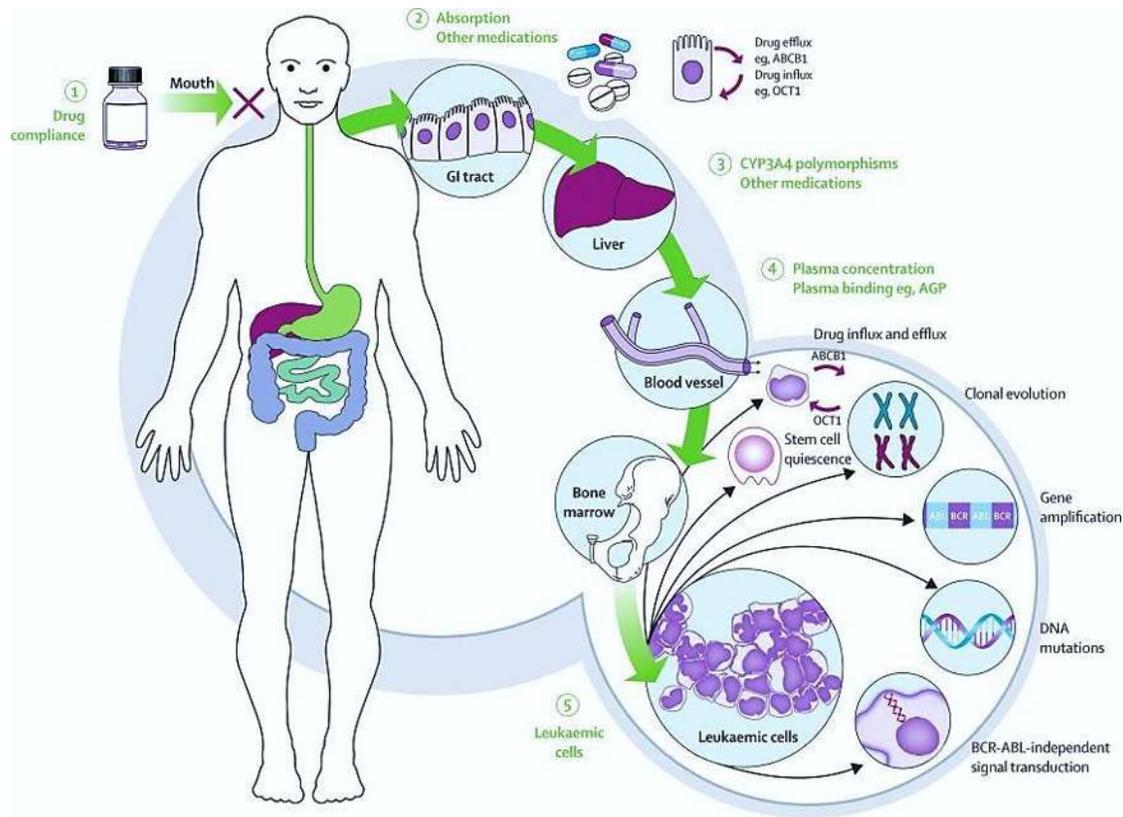
## **6. Resistencia a Imatinib**

La eficacia de Imatinib en el tratamiento de la CML es remarcable, pero el desarrollo de ciertas formas de resistencia y la persistencia de enfermedad mínima residual han disminuido el entusiasmo inicial que provoco (Melo & Chuah, 2007). La resistencia a Imatinib puede definirse como la falta de respuesta hematológica completa en pacientes con enfermedad en fase crónica o como una falta de retorno a la fase crónica para los pacientes en fase aguda o en crisis blástica. Dependiendo del tiempo de identificación se distinguen dos tipos de resistencia: si no existe respuesta después del tratamiento inicial, la resistencia es descrita como primaria. En contraste, la resistencia secundaria o adquirida se presenta si la resistencia se desarrolla después de una respuesta inicial a la droga (Apperley, 2007; Walz & Sattler, 2006).

El desarrollo de resistencia a Imatinib en fases avanzadas es frecuente, donde arriba del 70% de los pacientes con fase blástica adquieren resistencia dentro de los primeros 6 meses de tratamiento. Opuesto a esto, en pacientes en fase crónica resulto excepcional su recaída después de conseguir la respuesta citogenética completa (Apperley, 2007; Walz & Sattler, 2006).

### *6.1. Mecanismos de Resistencia*

Los mecanismos de resistencia a Imatinib identificados son multifactoriales e incluyen variaciones en la absorción gastrointestinal, cambios en el proceso de eliminación de primer paso, unión a proteínas plasmáticas, inactivación enzimática y otras cuestiones farmacológicas, así como defectos en la apoptosis, senescencia o mecanismos de reparación del ADN, sobreexpresión de BCR-ABL1 asociada con amplificación de esta misma, sobreexpresión del gen MDR 1 y su producto la glicoproteína P, y desarrollo de vías alternativas de traducción de la señal. Sin embargo, el mecanismo más frecuente asociado a resistencia es la presencia de mutaciones puntuales en el dominio cinasa de ABL1 (Figura 13) (Apperley, 2007).



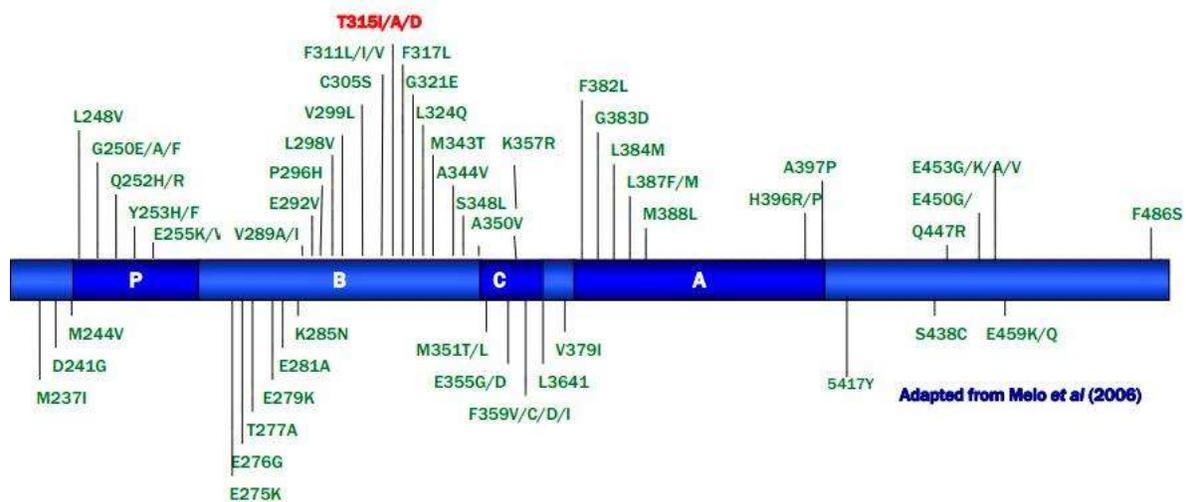
**Figura 13. Mecanismos de Resistencia a Imatinib.** ABCB1: Competidor B1 de unión al ATP. OCT1: Transportador de cationes orgánicos 1. CYP3A4: Isoenzima 4A del citocromo P450. AGP: Glicoproteína acida  $\alpha$ 1 (Apperley, 2007).

## 6.2. Mutaciones en el Dominio Cinasa de ABL1

La emergencia y selección de clones que exhiben mutaciones puntuales en el dominio cinasa de ABL1 es el más frecuente mecanismo de resistencia identificado en pacientes tratados con Imatinib (40-90% dependiendo del método de detección, la naturaleza de la resistencia y la fase de la enfermedad). Las mutaciones puntuales pueden influir directamente en las propiedades de unión de Imatinib a BCR-ABL1, o bien provocar cambios en la conformación de la proteína, afectando la unión de manera indirecta. Estas mutaciones no son inducidas por Imatinib, sino más bien, igual que la resistencia a antibióticos en bacterias, surgen a través de un proceso donde la droga en sí selecciona clones mutantes preexistentes, que superan poco a poco las células sensibles a fármacos (Melo & Chuah, 2007; Walz & Sattler, 2006; Weisberg et al., 2007). Se han reportado al menos 73 diferentes mutaciones puntuales diferentes, las cuales conducen a la sustitución de 50 aminoácidos (Figura 14), las cuales ocurren con diferentes frecuencias y confieren diferentes niveles de resistencia a Imatinib (Figura 15 y 16) (Melo & Chuah,

2007). La sustitución de 15 aminoácidos produce el 85% de las mutaciones, y las mutaciones responsables del 66% de los casos reportados ocurren en siete posiciones solamente (G250, Y253, E255, T315, M351, F359 y H396), aunque diferentes mutaciones pueden ocurrir en el mismo residuo. Así mismo, se observó que estas mutaciones son más frecuentes en pacientes con resistencia adquirida que en pacientes con resistencia primaria, así como en fase acelerada y crisis blástica que en la fase crónica de la enfermedad (Apperley, 2007).

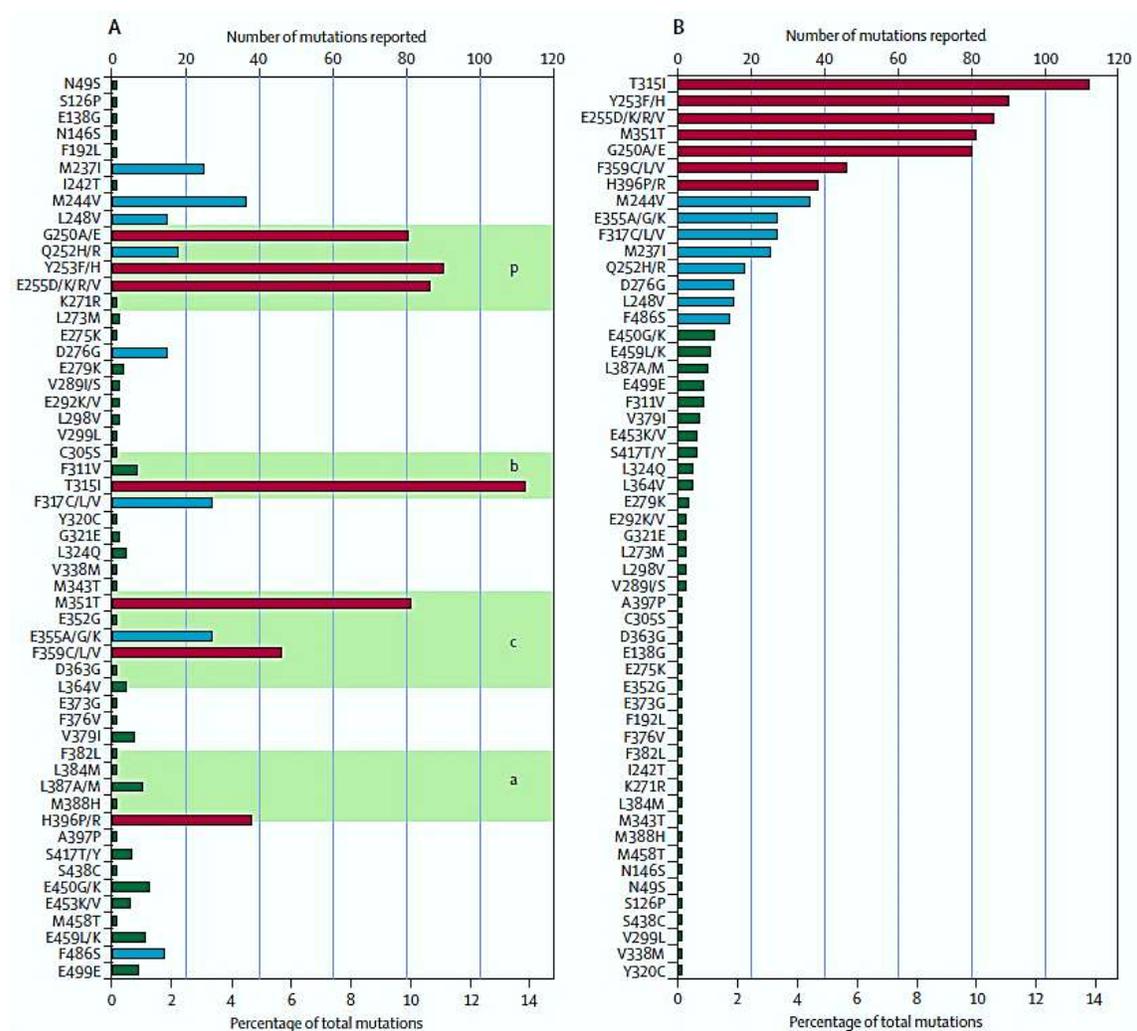
Las mutaciones pueden clasificarse en cuatro grupos: 1) Aquellas que impiden directamente la unión de Imatinib, 2) Aquellas dentro del sitio de unión al ATP (P-loop), 3) Aquellas dentro del loop de activación (A-loop), previniendo que la cinasa adquiera la conformación requerida para la unión con Imatinib y 4) Aquellas dentro del dominio catalítico (Melo & Chuah, 2007).



**Figura 14. Mapa de mutaciones en el dominio cinasa de BCR-ABL1 asociadas a resistencia a Imatinib.** P: P-loop, B: Sitio de unión a Imatinib, C: Dominio catalítico, A: A-loop (Melo & Chuah, 2007).

El sitio de unión al ATP (P-loop) es un dominio altamente conservado con una secuencia rica en glicina que se extiende del aminoácido 248 a 256 e interactúa con Imatinib mediante puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals. Las mutaciones en esta región modifican la flexibilidad del P-loop y desestabilizan la conformación requerida para la unión de Imatinib. Además de la insensibilidad a Imatinib, se ha sugerido que las mutaciones en el P-loop tienen un peor pronóstico clínico que aquellas en otras posiciones (Melo & Chuah, 2007; Walz & Sattler, 2006). Los sitios más comúnmente

afectados del dominio P-loop son Y253 y E255, las cuales ocurren en un 30% de todas las mutaciones clínicamente detectables asociadas a resistencia. Regularmente la Y253 es cambiada por histidina o fenilalanina, y la E255 por lisina o valina. La conversión de Y253 a una histidina o fenilalanina conduce a una interacción menos favorable entre la cadena lateral y el anillo de pirimidina en Imatinib, además de evitar la formación de un puente de hidrogeno con el residuo N322 del dominio catalítico, resultando en una conformación distorsionada del P-loop. En el caso de la modificación del residuo E255, el cual no hace contacto con Imatinib, por lisina o valina provoca una desestabilización en el P-loop. Otras mutaciones importantes en esta región son p. G250E y p. Q252H (Krishnamurty & Maly, 2010).



**Figura 15. Incidencia de las mutaciones asociadas a resistencia a Imatinib.** A) Incidencia de las mutaciones dentro del dominio cinasa por número absoluto reportado y por porcentaje del total. B) Incidencia de las mutaciones en orden de frecuencia. De mayor a menor frecuencia se marcan rojo, azul y verde (Apperley, 2007).

Algunas mutaciones ocurren en el dominio catalítico, las cuales involucran los residuos 351 a 359. Este dominio guarda una estrecha relación con la base del A-loop y por esta razón pueden influenciar la unión de Imatinib. Mutaciones comunes en esta región son p. M351T, p. E355G y p. F359V. Interesantemente la mutación p. M351T resultan en una significativa disminución de la actividad cinasa (Melo & Chuah, 2007; Walz & Sattler, 2006).

Ba/F3 cellular proliferation IC<sub>50</sub> values

	imatinib (nM)	nilotinib (nM)	dasatinib (nM)
Native Bcr-Abl	260	13	0.8
244M>V	2000	38	1.3
250G>E	1350	48	1.8
252Q>H	1325	70	3.4
253Y>F	3475	125	1.4
253Y>H	>6400	450	1.3
255E>K	5200	200	5.6
255E>V	>6400	430	11
299V>L	540 <sup>†</sup>	nd	18 <sup>†</sup>
311F>L	480	23	1.3
315T>A	971	61	125 <sup>†</sup>
315T>I	>6400	>2000	>200
317F>L	1050	50	7.4
317F>V	350 <sup>†</sup>	nd	53 <sup>†</sup>
315M>T	880	15	1.1
355E>G	2300 <sup>‡</sup>	nd	1.8 <sup>§</sup>
359F>V	1825	175	2.2
379V>I	1630	51	0.8
387L>M	1000	49	2
396H>P	850	41	0.6
396H>R	1750	41	1.3

■ Sensitive    ■ Intermediate sensitivity    ■ Insensitive

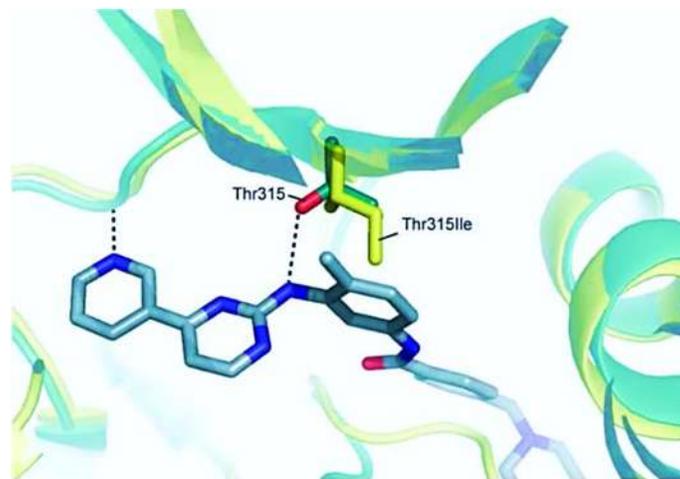
**Figura 16. Sensibilidad a inhibidores de la actividad tirosina cinasa que presentan algunas mutaciones en el dominio cinasa de BCR-ABL1.** IC<sub>50</sub>: Concentración del inhibidor que produce una reducción al 50% de la viabilidad celular (O'Hare, Eide, & Deininger, 2007)

El dominio de activación (A-loop) de la cinasa de ABL1 ocupa los aminoácidos 381 a 402, posee un dominio altamente conservado de tres aminoácidos (aspartato-fenilalanina-glicina, DFG). Esta región de la cinasa puede adoptar una forma cerrada (inactivo) o abierta (activa). Mutaciones en el A-loop pueden perturbar el balance energético requerido

para estabilizar la forma cerrada del dominio y así favorecen a la conformación abierta y activa. Mutaciones frecuentes de residuos localizados en esta región son p. H396R, p. V379I y L378M (Melo & Chuah, 2007; Walz & Sattler, 2006).

### 6.3. p. T315I

La sustitución del aminoácido treonina por una isoleucina en la posición 315 de la proteína ABL1 (p. T315I) debido al cambio de una citosina por una timina en el nucleótido 944, fue la primera mutación detectada en pacientes resistentes. El residuo T315 está localizado en la periferia del sitio de unión al ATP de la proteína, el cual participa a través de su cadena lateral con la formación de un crucial puente de hidrogeno entre Imatinib y la proteína. Este aminoácido es conocido también como residuo gatekeeper debido que sus propiedades (tamaño, carga, e hidrofobicidad) regulan la unión a inhibidores de la actividad tirosina cinasa (Weisberg et al., 2007). Basados en la estructura cristalizada del dominio catalítico de ABL1, se predijo que esta sustitución reduce la afinidad al fármaco por dos razones. Primero, el átomo de oxígeno de la cadena lateral de la treonina 315 no está presente, esto evita la formación de un puente de hidrogeno con el grupo amino secundario de Imatinib. Segundo, la isoleucina contiene un grupo hidrocarburo extra en su cadena lateral, la cual inhibe estéricamente la unión del inhibidor (Figura 17) (Melo & Chuah, 2007). La presencia de la mutación T315I en el dominio cinasa de ABL1 sugiere un peor pronóstico clínico y su identificación conlleva al tratamiento con inhibidores tirosina cinasa de 3a generación (Bosutinib, Ponatinib).



**Figura 17. Mutación p. T315I asociada a resistencia a Imatinib.** El cambio de la treonina 315 por una isoleucina evita la formación de un puente de hidrogeno con el grupo amino secundario de Imatinib, así como inhibe estéricamente la unión del inhibidor (Krishnamurty & Maly, 2010).

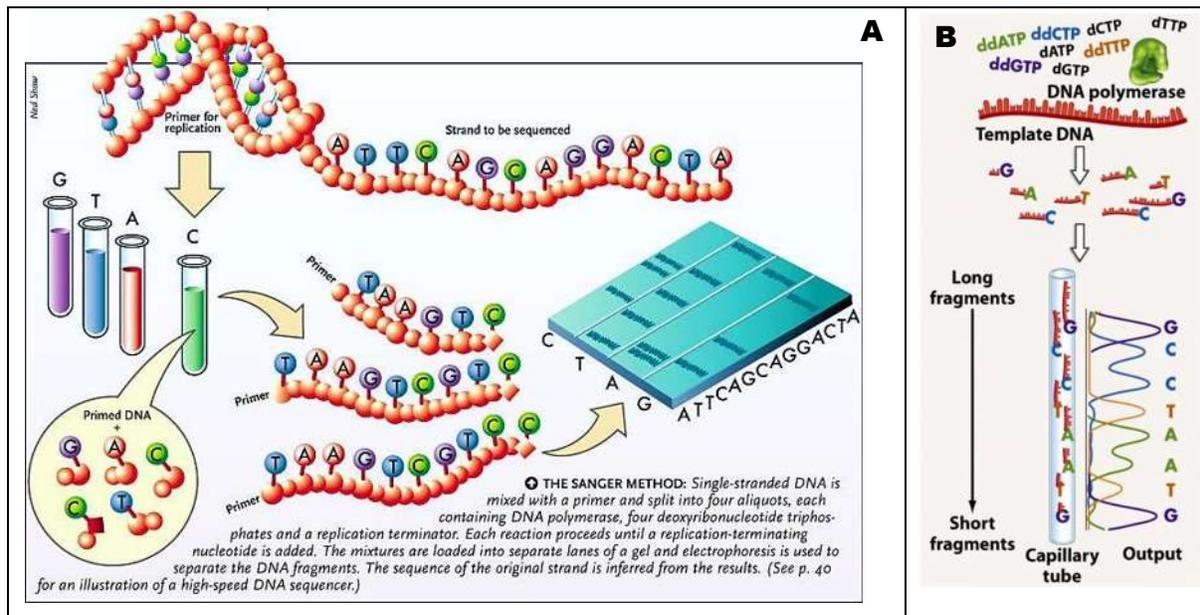
#### *6.4. Métodos de detección de la Mutación p. T315I*

Debido a las implicaciones clínicas y la alta incidencia que involucra a la mutación p. T315I, se han desarrollado distintas técnicas de laboratorio para su identificación, entre las que destacan la secuenciación directa, PCR-Polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y PCR alelo específico (AS-PCR) (Franck Emmanuel Nicolini et al., 2011)

##### *6.4.1. Secuenciación directa*

La secuenciación directa del dominio cinasa de ABL1 es la metodología más comúnmente utilizada para identificar la mutación p. T315I, la principal ventaja de esta metodología es que permite no solo identificar esta mutación sino también otras asociadas a resistencia a Imatinib. La secuenciación del ADN se considera como el patrón de oro y se mantiene como el procedimiento definitivo para la detección de mutaciones puntuales (Nollau & Wagener, 1997). Este método utiliza el mecanismo de síntesis de DNA por la DNA polimerasa. La DNA polimerasa requiere a la vez de un oligonucleótido al que se le añaden los nucleótidos y una hebra de DNA molde que dirige la selección de cada uno de los nuevos nucleótidos. En las células el grupo hidroxilo en el extremo 3' del oligonucleótido reacciona con el desoxinucleósido trifosfato (dNTP) entrante, formando un nuevo enlace fosfodiéster. El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza análogos del tipo didesoxinucleósido trifosfato (ddNTP) para interrumpir la síntesis de DNA. Cuando se inserta un ddNTP en lugar de un dNTP se detiene la elongación de la cadena a causa de la ausencia del hidroxilo en 3' en el análogo, necesario para la siguiente reacción. El DNA a secuenciar se utiliza como hebra molde y se hibrida con un oligonucleótido corto marcado con radioactividad o con fluorescencia. Mediante la adición de pequeñas cantidades de un único ddNTP, por ejemplo ddCTP (didesoxicitosina trifosfato), a una reacción por lo demás normal, las hebras sintetizadas detendrán prematuramente su crecimiento en las posiciones en las que normalmente se encuentre la desoxicitosina (dC). A consecuencia de la mayor cantidad de dCTP en relación con ddCTP, la probabilidad de que se incorpore el análogo en los casos en que deba incorporarse dC es pequeña. Sin embargo, la cantidad de ddCTP es suficientemente grande para asegurar que cada hebra nueva sintetizada incorpore al menos un ddCTP en algún punto durante la síntesis. El resultado es una disolución que contiene una mezcla de fragmentos marcados acabados en un residuo Citosina (C). Cada residuo C en la secuencia genera un conjunto de fragmentos de una longitud determinada, de forma que el tamaño de los

fragmentos, separados por electroforesis, indica la localización de los residuos C en la secuencia. Este procedimiento se repite separadamente para cada uno de los ddNTP y la secuencia puede leerse directamente de una autorradiografía del gel. Los fragmentos de DNA más cortos migran a mayor velocidad, de manera que los más cercanos al extremo inferior del gel representan las posiciones de los oligonucleótidos más cercanos al oligonucleótido inicial (extremo 5') y la secuencia se lee de abajo hacia arriba (dirección 5' a 3'). La secuencia obtenida corresponde a la hebra complementaria de aquella que está siendo analizada.



**Figura 18. Principio del método de secuenciación de Sanger.** A) El procedimiento de secuenciación de Sanger utiliza ddNTP's para interrumpir la síntesis de DNA, produciendo fragmentos de diferentes tamaños que finalizan el nucleótido correspondiente al ddNTP utilizado. Este procedimiento se repite separadamente para cada uno de los ddNTP y la secuencia se lee directamente de la autorradiografía del gel. B) La automatización del procedimiento utiliza una molécula fluorescente diferente para cada ddNTP que confiere a todos los fragmentos terminados en este nucleótido un color determinado. Los fragmentos se separan mediante electroforesis capilar y el color asociado se detecta utilizando un rayo láser.

Una estrategia para la automatización de este procedimiento es que cada ddNTP utilizado puede unirse a una molécula fluorescente que confiere a todos los fragmentos terminados en este nucleótido un color determinado. Los cuatro ddNTP's se añaden a un único tubo. Los fragmentos de DNA coloreado resultantes se separan a continuación por tamaño mediante electroforesis en un único gel contenido en un tubo capilar (modalidad electroforética que permite separaciones más rápidas). Todos los fragmentos de una

longitud determinada migran a través del gel capilar en un solo pico y el color asociado a cada uno de ellos se detecta utilizando un rayo láser. La secuencia del DNA se lee a partir de la secuencia de los colores de los picos a medida que van pasando por el detector, y la información obtenida se pasa directamente a un ordenador que determina la secuencia (Figura 18) (Nelson & Cox, 2008).

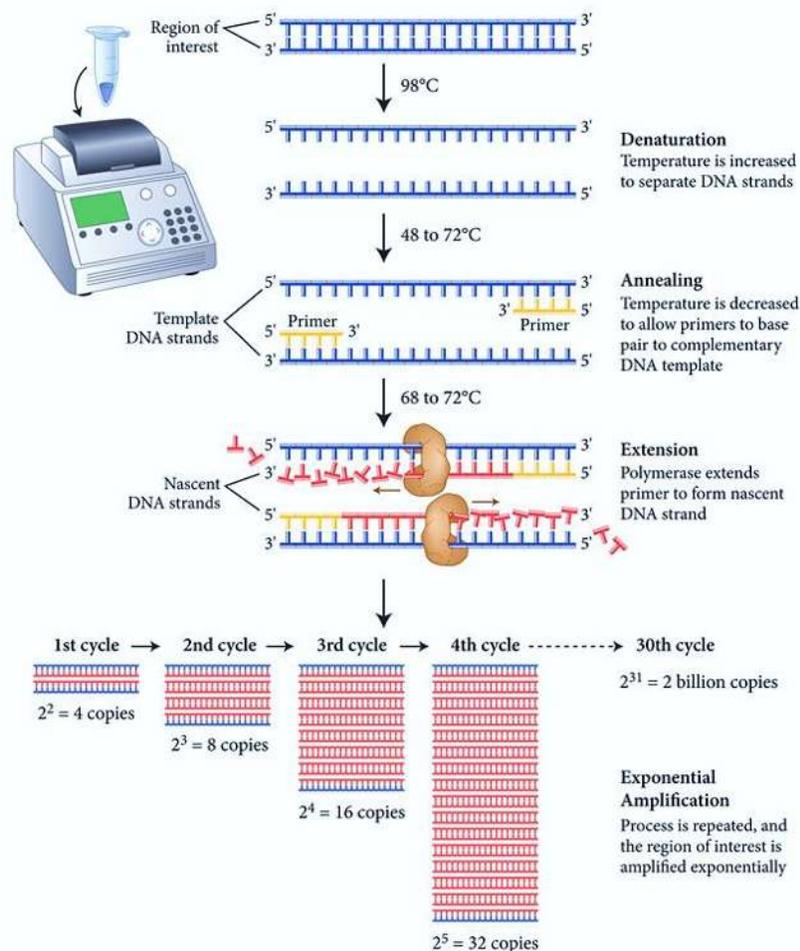
#### 6.4.2. PCR-RFLP

Otra técnica útil para identificar la mutación T315I en el dominio cinasa de ABL1 es el análisis por PCR-RFLP, el cual muestra una excelente sensibilidad mediante la detección de una célula mutada entre 1000 células (Kang, Hwang, Kim, & Goh, 2006). El análisis por PCR-RFLP se efectúa mediante la amplificación del fragmento que contiene la mutación, seguido por el tratamiento con la enzima de restricción adecuada. Entonces la presencia o ausencia de sitios de reconocimiento para la enzima resulta en la formación de fragmentos de diferentes tamaños que pueden resolverse por electroforesis (Rasmussen, 2012). En el caso de la mutación T315I, la enzima utilizada es Ddel, la cual en caso de estar presente la mutación, evita el reconocimiento de un sitio de corte (Al-Achkar, Wafa, Moassass, & Othman, 2012).

#### 6.4.3. AS-PCR

Actualmente, la metodología utilizada preferentemente para detectar la mutación T315I es AS-PCR, debido a que esta es una prueba rápida y altamente específica (Dhahi, Matti, & Fadel, 2013). La AS-PCR es un método alternativo para detección de mutaciones en el cual solo el apareamiento completo del oligonucleótido alelo específico hace posible que este actúe como primer para la amplificación. En esta técnica el oligonucleótido alelo específico es diseñado para ser complementario a la secuencia mutante, colocando en su extremo 3' las bases correspondientes a la mutación. Así, debido a que la DNA polimerasa carece de actividad exonucleasa 3', no puede reparar el mismatch de una base entre el oligonucleótido y el DNA molde en el extremo 3', impidiendo la amplificación a menos de que esté presente la mutación (Figura 19). (Green, 2002). Sin embargo, para lograr que la reacción de PCR sea un éxito se deben determinar los niveles adecuados de los reactivos con los que se trabajara como lo son; la cantidad de la polimerasa, la concentración de magnesio, la concentración de los primers y la cantidad de DNA o cDNA a utilizar; así como también las condiciones de temperatura de alineamiento, tiempo de alineamiento y número de ciclos; la determinación de los niveles de todas estas variables

que influyen en el PCR se realiza monitoreándolas, para lo que se realiza un diseño para el análisis del experimento, este diseño tradicionalmente se realiza analizando experimentalmente los niveles teóricos y variándolos de acuerdo a los resultados obtenidos, el análisis generalmente se realiza utilizando el diseño factorial, el cual analiza todas las combinaciones posibles de las variables involucradas a sus diferentes niveles de interés (Galindo Jiménez, 2013). Recientemente se ha empezado a utilizar en diferentes ámbitos una herramienta de diseño experimental basada en la metodología Taguchi, esta surgió como una alternativa económica y rápida para el análisis simultáneo de las variables que influyen en un proceso o desarrollo de un producto (Rao, Kumar, Prakasham, & Hobbs, 2008).



**Figura 19. Principio de la metodología AS-PCR.** La AS-PCR es un método alternativo para detección de mutaciones en el cual solo el apareamiento completo del oligonucleótido alelo específico hace posible que este actúe como primer para la amplificación (New England Biolabs, 2013).

## 7. Diseño de experimentos basados en Metodología Taguchi

La calidad no es un tema nuevo, ya que desde los tiempos de reyes, faraones y emperadores han existido argumentos y parámetros de calidad. Actualmente la Organización Internacional de Estandarización (ISO) ha definido la calidad como "Grado en que un conjunto de características inherentes cumplen con los requisitos", es decir, cual es el grado en que las características de un producto cumplen con las características preestablecidas (Dan Reid & Sanders, 2013). Conducidos por la necesidad de competir en precio, rendimiento y rentabilidad, los fabricantes están cada vez más conscientes de la necesidad de optimizar productos y procesos. La calidad lograda mediante el diseño de experimentos es para muchos costo-efectiva, ya que les permite ganar y mantener una posición competitiva en el mercado mundial. Los modelos de diseño de experimentos son modelos estadísticos basados en la experimentación, cuyo objetivo es identificar y cuantificar los efectos de múltiples variables simultáneamente. La metodología del diseño de experimentos estudia como variar las condiciones habituales en que se realiza un proceso empírico, aumentando la probabilidad de obtener mejores rendimientos, detectando cambios significativos en la respuesta y conociendo mejor su comportamiento (Roy, 1990).

El Dr. Genichi Taguchi fue un ingeniero que investigó extensamente el diseño de técnicas de experimentación durante la década de 1940. Taguchi estimó que alrededor del 80% de los defectos en un producto se deben a un mal diseño realizado de este. Debido a esto, su principal objetivo fue hacer un diseño de gran alcance y experimentalmente fácil de utilizar, en busca de mejorar la calidad de los productos. Taguchi propuso varios nuevos enfoques para el diseño experimental que ahora son conocidos como "Método Taguchi". El método se basa en el desarrollo de un diseño robusto que permita efectuar el proceso sobre una amplia gama de condiciones. Para este método, Taguchi hace hincapié en que las empresas deben centrar sus esfuerzos de calidad a la fase de diseño, ya que es mucho más barato y permite realizar cambios más fácilmente que durante el proceso de producción. En sus prácticas de mejoramiento de la calidad, Taguchi esencialmente utiliza las herramientas estadísticas convencionales, pero las simplifica mediante la identificación de un set de lineamientos estrictos para el diseño de experimentos y el análisis de resultados. Recientemente las industrias occidentales han empezado a reconocer al método Taguchi como una herramienta sencilla pero altamente efectiva para mejorar la

calidad de procesos y productos (Dan Reid & Sanders, 2013; Rao et al., 2008; Roy, 1990).

Taguchi adoptó una excelente filosofía para el control de calidad basada en 3 conceptos o principios muy simples y fundamentales.

1. La calidad debe ser diseñada sobre el producto y no inspeccionada sobre él.
2. La calidad se mejora minimizando la desviación de un objetivo. El producto debe diseñarse como inmune a los factores ambientales incontrolables.
3. El costo de la calidad debe ser medida en función de la desviación del estándar y las pérdidas deben ser medidas a lo largo de todo el sistema.

El primer principio se basa en la idea de que el mejoramiento de la calidad no puede realizarse por la inspección del proceso, detección y rescate, sino más bien por el diseño y construcción de la calidad en el producto, para prevenir en lugar de arreglar. El segundo concepto se refiere a que la calidad está directamente relacionada a la desviación existente del valor objetivo, así que entre más pequeña esta sea, el proceso obtendrá mejores resultados. El tercer concepto dice que el costo de los productos dependerá de la desviación del valor objetivo, debido a que esta puede provocar que se incluyan el costo de los reprocesos, inspecciones, servicios de garantía y remplazo del producto entre otros.

Para lograr la calidad de un producto deseable mediante el diseño de experimentos, el Dr. Taguchi recomienda un proceso de 3 etapas.

1. Diseño de sistemas
2. Diseño de parámetros
3. Diseño de tolerancia

La fase de diseño de sistema es determinar los niveles adecuados de trabajo de los factores del diseño. Esto incluye diseñar y probar un sistema basado en el juicio del ingeniero (experto) de los parámetros del proceso o producto, partes y materiales seleccionados basados en la tecnología actual. A menudo esto involucra conocimiento e innovación de los campos aplicables de la ciencia y tecnología. Mientras el diseño del sistema ayuda a identificar los niveles de trabajo de los factores del diseño; el diseño de parámetros busca determinar los niveles del factor que produce el mejor rendimiento del proceso o producto bajo estudio. La condición óptima es seleccionada de modo que la

influencia de los factores incontrolables causa una variación mínima del rendimiento del sistema. El diseño de tolerancia es un paso usado para afinar los resultados del diseño de parámetros por endurecimiento de la tolerancia de los factores con influencia significativa sobre el producto.

Taguchi construyó un set especial de arreglos ortogonales para diseñar sus experimentos que pueden ser utilizados por numerosas situaciones experimentales. Un arreglo ortogonal (AO) común para el análisis de factores a dos niveles se muestra en la Figura 20. Este arreglo, designado por el símbolo  $L_8$ , es usado para el diseño de experimentos donde se debe analizar hasta 7 factores a dos niveles cada uno. El arreglo tiene 8 filas y 7 columnas. Cada fila representa una condición a ensayar con los niveles de los factores indicados por los números en la fila. Las columnas verticales corresponden a los factores específicos en el estudio.

**B. Factorial  $2^7 = 128$  ensayos**

**A. Arreglo Ortogonal  $L_8$**

Variable	1	2	3	4	5	6	7
Ensayo	A	B	C	D	E	F	G
T1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	2	2	2	2
T3	1	2	2	1	1	2	2
T4	1	2	2	2	2	1	1
T5	2	1	2	1	2	1	2
T6	2	1	2	2	1	2	1
T7	2	2	1	1	2	2	1
T8	2	2	1	2	1	1	2

EXPERIMENTO FACTORIAL COMPLETO				A1				A2			
				B1		B2		B3		B4	
				C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
D 1	E1	F1	G1	T1							
			G2								
		F2	G1								
			G2			T3					
	E2	F1	G1								
			G2					T5			
		F2	G1						T7		
			G2								
D 2	E1	F1	G1								
			G2						T8		
		F2	G1					T6			
			G2								
	E2	F1	G1			T4					
			G2								
		F2	G1								
			G2	T2							

**Figura 20. Comparación de un arreglo ortogonal  $L_8$  contra un factorial  $2^7$ .** A) AO  $L_8$  corridas necesarias para el análisis de un experimento que involucre 7 variables a 2 niveles cada una. B) Ensayos necesarios en un diseño factorial completo  $2^7$ , se muestra la distribución que corresponde a los ensayos del arreglo ortogonal  $L_8$ .

Cada columna tiene 4 condiciones al nivel 1 y 4 condiciones al nivel 2 para el factor asignado a la columna. Dos factores en 2 niveles se combinan en 4 posibles formas,

como lo son (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Cuando 2 columnas de un arreglo forman estas combinaciones el mismo número de veces, se dice que las columnas están balanceadas o que son ortogonales. De modo que cualquier par de columnas de un arreglo ortogonal  $L_8 (2^7)$  tiene el mismo número de combinaciones (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Por lo tanto, todas las 7 columnas de un  $L_8$  son ortogonales una con otra.

Los AO's facilitan el proceso de diseño de experimentos. Para diseñar un experimento se debe seleccionar el arreglo ortogonal más adecuado, asignar los factores a las columnas apropiadas, y finalmente, describir las combinaciones de los experimentos individuales llamadas condiciones de ensayo. Así que en un AO  $L_8$ , cada fila representa cada uno de los ensayos necesarios que se tienen que llevar a cabo para completar el experimento. Las descripciones de cada experimento están determinadas por los números 1 y 2 que aparecen en las filas de las corridas de prueba. Un experimento factorial requeriría de  $2^7$  o 128 corridas, pero no proporcionaría información más relevante a la obtenida por el AO  $L_8$ . El arreglo obliga a todos los experimentadores a diseñar experimentos idénticos. Los experimentadores pueden seleccionar designaciones diferentes para las columnas pero para las 8 corridas de prueba incluirán todas las combinaciones independientes de cada columna definida. Así los arreglos ortogonales aseguran consistencia en el diseño por diferentes experimentadores.

En la metodología Taguchi los resultados de los experimentos son analizados para lograr uno o más de los siguientes objetivos:

1. Establecer la mejor condición óptima para un producto o proceso.
2. Estimar la contribución de los factores individuales.
3. Estimar la respuesta bajo las condiciones óptimas.

La condición óptima es identificada por el estudio de los efectos principales de cada uno de los factores. El proceso involucra manipulación aritmética menor de los resultados numéricos y usualmente pueden realizarse con la ayuda de una simple calculadora. Los efectos principales indican la tendencia general de la influencia de los factores. Conociendo la característica, por ejemplo; se puede saber si un valor más bajo o más alto produce el resultado preferido; los niveles de los factores los cuales son esperados para producir el mejor resultado pueden ser predichos.

El conocimiento de la contribución de cada factor individual es una clave para decidir la naturaleza del control que se tiene que establecer en una producción o proceso. El

análisis de varianza (ANOVA) es la herramienta estadística comúnmente aplicada a los resultados del experimento para determinar el porcentaje de contribución de cada factor. El estudio de la tabla ANOVA para un análisis dado ayuda a determinar cuáles de los factores necesitan control y cuáles no.

Para determinar la condición óptima mediante el análisis de los resultados de los experimentos, es necesario establecer cuál será la característica a optimizar. Cada producto está diseñado para realizar alguna función destinada. Alguna característica medible, generalmente referida como una característica de calidad es usada para expresar que también un producto está llevando a cabo su función. En una mayoría de casos, la característica de calidad puede ser una sola cantidad medible tal como el peso, la longitud, las horas, etc. Para algunos productos medidas subjetivas como bueno, malo, bajo y alto pueden ser usadas. No importa como la calidad del producto sea medida, ya sea por un solo criterio o por combinación de múltiples criterios, la medida tendrá una de las siguientes 3 características:

1. El mayor es mejor
2. El menor es mejor
3. El nominal es el mejor

Ya elegida uno o varias de las características mencionadas, se tomarán en cuenta para determinar el mejor diseño de parámetros y cumplir con el objetivo de optimizar el proceso o producto.

Una vez determinada la condición óptima, es usualmente una buena práctica realizar un experimento de confirmación. Cabe señalar que la condición óptima puede no necesariamente estar entre los muchos experimentos llevados a cabo ya, debido a que el AO representa solo una pequeña fracción de todas las posibilidades (Roy, 1990).

Dado que la técnica de la metodología Taguchi resulta fácil y sencilla, su utilización ha resultado atractiva para ser aplicada en diversas áreas biológicas o biotecnológicas como lo son: en el procesamiento de alimentos, fermentaciones microbiológicas, medicina, biología molecular, tratamiento de aguas residuales y bioremediación, su empleo en la estandarización de técnicas diagnósticas para la identificación de marcadores moleculares ha sido utilizada en contados casos por lo que resulta una metodología muy atractiva para comprobarse si es efectiva en este campo del análisis (Rao et al., 2008).

## IV. JUSTIFICACIÓN

Imatinib Mesylate, un inhibidor de la actividad tirosina cinasa, es el fármaco de elección utilizado en el tratamiento de Leucemia Mieloide Crónica debido a su alto índice de eficacia y baja toxicidad. Sin embargo, la aparición de formas de resistencia ha traído consigo severas complicaciones para estos pacientes, que en muchos casos, incluso con la creación de inhibidores de segunda generación como Nilotinib y Desatinib, no han podido solucionarse. La mutación T315I en el dominio cinasa de ABL1 es una de las principales causas de resistencia debido a su alta incidencia y al mal pronóstico que determina ya que está situada en una posición crucial que regula la unión de la proteína BCR-ABL1 a diversos inhibidores, permitiendo la progresión de la enfermedad (Apperley, 2007; Melo & Chuah, 2007; Walz & Sattler, 2006; Weisberg et al., 2007). Debido a esto es importante la creación de nuevas pruebas genético-moleculares optimizadas y estandarizadas para la identificación de esta mutación, la cuales permitan el adecuado manejo y tratamiento de los pacientes.

El diseño de experimentos basados en la metodología Taguchi abre una alternativa en la búsqueda de parámetros adecuados para cada condición que altera el proceso, con el fin de lograr la optimización de la prueba, que además también tiene como objetivo reducir costos y tiempo de investigación (Rao et al., 2008). De esta manera, la aplicación de esta metodología permitirá obtener el ensayo óptimo para efectuar la detección de la mutación T315I de una manera rápida y confiable.

## V. HIPOTESIS

El desarrollo de una prueba molecular basada en AS-PCR y su optimización mediante metodología Taguchi permitirá la detección rápida y oportuna de la mutación T315I en el dominio cinasa de ABL1 en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica que presentan resistencia a Imatinib Mesylate.

## VI. OBJETIVOS

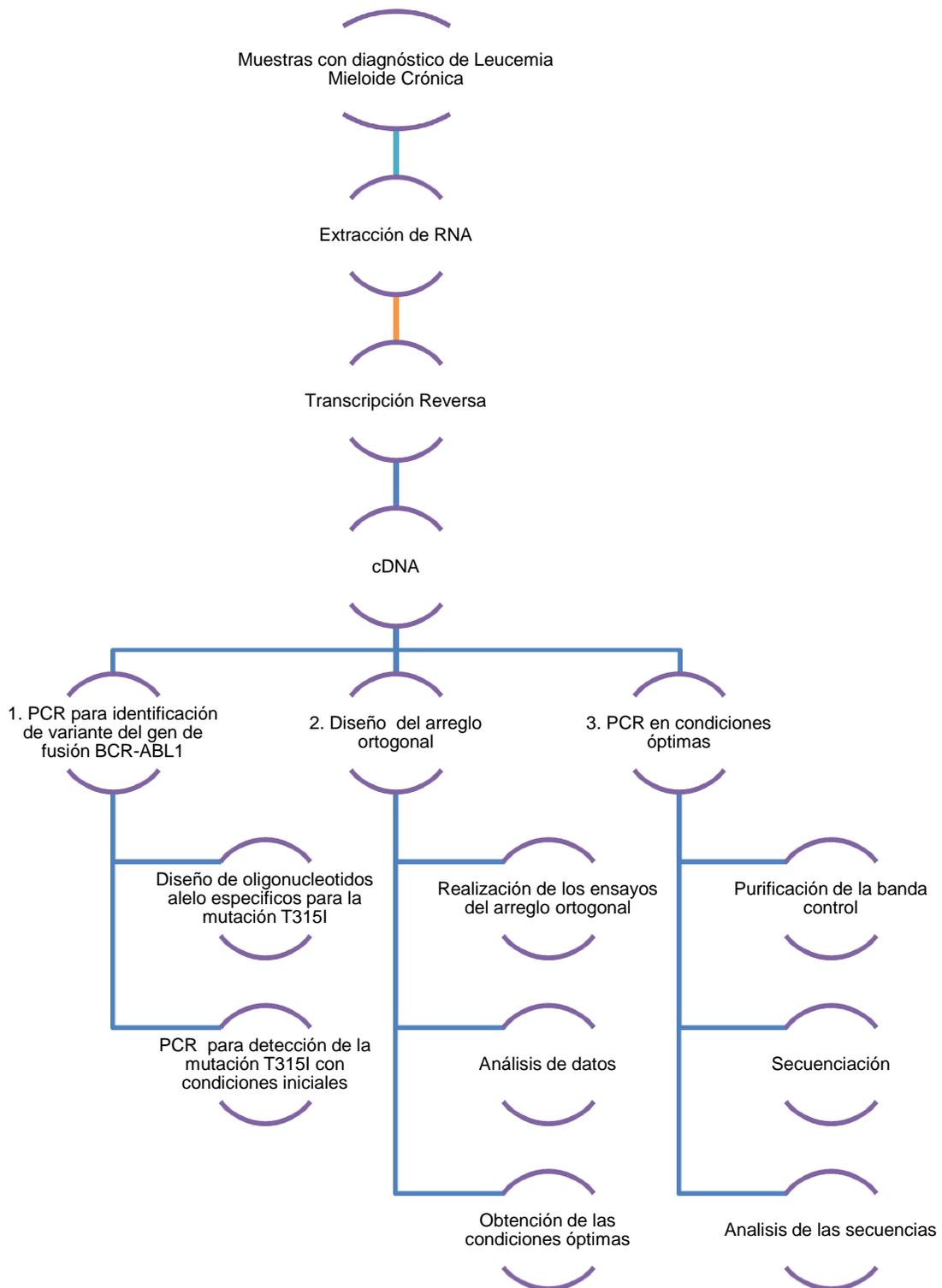
### 🌀 *Objetivo General*

Desarrollar una prueba molecular basada en AS-PCR para detectar la mutación asociada a resistencia a Imatinib T315I en el dominio cinasa de ABL1 en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica

### 🌀 *Objetivos Específicos*

- ⊕ Diseñar el ensayo para la detección de la mutación T315I mediante AS-PCR.
- ⊕ Optimizar la prueba AS-PCR mediante metodología Taguchi basado en arreglos ortogonales

## VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Muestras biológicas

Las muestras de sangre venosa utilizadas para el trabajo de esta tesis fueron proporcionadas por Laboratorios Mendel<sup>®</sup> con consentimiento informado, provenientes de pacientes anónimos con diagnóstico confirmado de CML, las cuales fueron colectadas en tubos con EDTA como anticoagulante.

### 2. Extracción de RNA

Se realizó la extracción del RNA de las muestras utilizadas mediante el empleo del kit comercial QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>), donde el proveedor establece en la metodología que primeramente se separen los leucocitos de los eritrocitos mediante la lisis selectiva de estos últimos con la utilización de un buffer hipotónico nombrado como EL en una proporción de cinco volúmenes por un volumen de muestra. Posteriormente se recuperan los leucocitos por centrifugación y se procede a realizar su lisis, para liberar el RNA, al exponerlos a un medio altamente degradante de proteínas debido a la mezcla de  $\beta$ -Mercaptoetanol y el buffer RLT que contiene tiocianato de guanidina, que además inactivan RNasas inmediatamente. El lisado se hace pasar por la columna QIAshredder<sup>®</sup> para eliminar restos celulares y homogenizar el RNA, el cual después es precipitado al agregar etanol frío al 70% libre de RNasas. Finalmente, la solución anterior es transferida a la columna QIAamp<sup>®</sup> para unir el RNA a la membrana de sílica por centrifugación, en la que los contaminantes son eliminados mediante lavados con el buffer RW1 y el DNA residual es digerido con DNasa durante 15 minutos. La DNasa se elimina con un nuevo lavado con buffer RW1 y se realizan dos lavados con buffer RPE. Finalmente se eluye el RNA en 30  $\mu$ L agua libre de nucleasas. Durante toda la extracción, las muestras se mantuvieron a bajas temperaturas mediante el empleo de hielo, para reducir la posibilidad de degradación del RNA.

### 3. Cuantificación y Análisis de Integridad del RNA

El RNA obtenido de cada extracción se cuantificó realizando una dilución 1:50 con agua libre de nucleasas y realizando la lectura utilizando un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf<sup>®</sup>), que realiza lecturas a diferentes longitudes de onda (230, 260, 280 y

320nm), con un ancho de banda espectral de 5 nm. Los ácidos nucleicos (DNA o RNA) tienen una absorbancia máxima a 260 nm debido a que en su estructura contiene bases aromáticas nitrogenadas, por lo que dicha lectura nos proporciona una correlación directa de la concentración presente en cada muestra. Para la cuantificación del RNA total se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Concentración de RNA} = \frac{(40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})(\text{Abs}_{260})(\text{Factor de Dilución})}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Donde 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  es la cantidad estándar de RNA por cada unidad de absorbancia registrada a 260 nm en una trayectoria de la luz de 1 cm.

Se determinó la pureza de RNA al correlacionar la lectura a 260 nm con las hechas a 230 nm que se ve influenciada por la cantidad de sales y a 280 nm debido a la absorbancia máxima a esta longitud de onda de los aminoácidos aromáticos que conforman las proteínas, manteniendo dichas relaciones en un intervalo entre 1.5 y 2.

Además se comprobó la integridad del RNA mediante la electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen®) al 1.8% en buffer TBE (Invitrogen®) 1X tratado con dietilpirocarbonato (DEPC) y revelado con solución de bromuro de etidio (Promega®) al 0.01%. Las muestras se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

#### 4. Transcripción Reversa (RT)

A todos los RNA que se extrajeron se les realizó una transcripción reversa con el empleo del kit comercial Omniscript RT Kit (QIAGEN®), en la que los lineamientos que el proveedor brinda determinan la elaboración de una mezcla que contenga buffer RT (1X), dNTP's (0.5 mM por cada dNTP), random nonamers (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich®), inhibidor de RNasas (10 unidades por 20  $\mu\text{L}$  de reacción), la enzima Omniscript Reverse Transcriptase (4 unidades por 20  $\mu\text{L}$  de reacción), el RNA molde en una cantidad de 50 ng y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para conseguir las concentraciones necesarias de los otros reactivos. Dicha mezcla se incubo a 37 °C durante 60 minutos para permitir que ocurriera la reacción y obtener el cDNA de cada una de las muestras, los cuales se almacenaron a -20 °C.

Todas las reacciones de RT y PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador Corbett Research®, así como las fotografías expuestas fueron tomadas con un foto-documentador ChemiDoc® (Bio-Rad®)

## 5. Determinación de variantes de BCR-ABL1

Mediante la realización de PCR acoplada a transcripción reversa se determinó la variante que presentaba cada una de las muestras del gen de fusión *BCR-ABL1*, para lo cual se utilizó el kit comercial QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN®), los oligonucleótidos que aparecen en la tabla 2 y el programa de las condiciones de reacción diseñado en el trabajo de Pérez-Contreras, VA (2012).

**Tabla 2. Oligonucleótidos para detección del gen de fusión BCR-ABL1**

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Bases	Tm	Alineamiento
B2M F	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT	24	63.3	Exón 2 Gen B2M
B2M R	TGCCAGCCCTCCTAGAGCTACC	22	63.0	Exón 4 Gen B2M
BC-B1A	GAAAGTGTTCAGAAGCTTCTCC	22	53.6	Exón 12 Gen BCR
BC-E1A	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	21	56.0	Exón 1 Gen BCR
AB-A3B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	21	56.9	Exón 3 Gen ABL1
Oligonucleótidos analizados con OligoAnalyzer 3.1 y CLC Sequence Viewer 6.				

## 6. Diseño de oligonucleótidos para detección de mutación T315I en ABL1

A partir de la secuencia del mRNA del gen *ABL1* obtenida de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se diseñaron los oligonucleótidos para desarrollar un control interno que flanqueara el sitio donde ocurre la mutación y dos oligonucleótidos para detectar la mutación T315I que se diferencian el uno del otro por contener o no un mismatch (Figura 21). Cada uno de los oligonucleótidos diseñados (Tabla 3) fue analizado con los programas OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) y CLC Sequence Viewer 6. La síntesis de los oligonucleótidos se solicitó a la compañía Eurofins MWG Operon's®.

**Tabla 3. Oligonucleótidos para detección de mutación T315I**

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Bases	Tm	Alineamiento
ABL F/IC 1	AACACCCTGGCCGAGTTGGTTC	22	66.4	Exón 4 Gen ABL1
ABL R	GCGCTCCATGCGGTAGTCCTTCT	23	68.1	Exón 8 Gen ABL1
T315I F1	GCCCCGTTCTATATCATCAT	21	60.6	Exón 6 Gen ABL1
T315I F2	GCCCCGTTCTATATCATAAT	21	58.7	Exón 6 Gen ABL1
Oligonucleótidos diseñados y analizados con OligoAnalyzer 3.1 y CLC Sequence Viewer 6				

914	CTCTACGTCTCCTCCGAGAGCCGCTT	CAACACCC	TGGCCGAGTTGGTTC	ATCATCATTCA
974	ACGGTGGCCGACGGGCTCATCACCACGCTCCATTATCCAGCCCCAAAGCGCAACAAGCCC			
1034	ACTGTCTATGGTGTGTCCCCAACTACGACAAGTGGGAGATGGAACGCACGGACATCACC			
1094	ATGAAGCACAAGCTGGGCGGGGCCAGT	ACGGGG	GAGGTGTACGAGGGCGTGTGGAAGAAA	
1154	TACAGCCTGACGGTGGCCGTGAAGACCTTGAAGGAGGA	CACCAT	TGGAGGTGGAAGAGTTC	
1214	TTGAAAGAAGCTGCAGTCATGAAAGAGATCAAAC	CCCTAAC	CTG	TGCAGCTCCTTGGG
1274	GTCTGCACCCGGGAG	CCCCCGTTCTATATCAT	CAC	TGAGTT
1334	CTGGACTACCTGAGGGAGTGCAACCGGCAGGAGGTGAACGCCGTGGTGTCTGTACATG			
1394	GCCACTCAGATCTCGTCAGCCAT	TGGAGTACCTGGA	GAAGAAAAACT	TTCATCCACAGAGAT
1454	CTTGCTGCCCGAAACTGCCTGGTAGGGGAGAACC	ACTTGGTGAAG	G	TAGCTGATTTTGGC
1514	CTGAGCAGGTTGATGACAGGGGACACCTACACAGCCC	ATGCTGGA	GC	CAAGTTCCCCATC
1574	AAATGGACTGCACCCGAGAGCCTGGCCTACAACAAGTTCT	C	CATCAAGTCCGACGT	CATT
1634	TGGAGTATTGCTTTGGGAAATTGCT	TACCTATGGCATGTCCCCTT	ACCCGGGAATTGACCT	
1694	GTCCCAGGTGTATGAGCTGCTAC	AGAAGGACTACCGCATGGAGCGC		CCAGAAGGCTGCC
1754	AGAGAAGGTCTATGAACTCATGCGAGCAT			

Anotación	Oligonucleotido	Posición
	ABL F/IC 1	940-961
	ABL R	1717-1739
	T315I F1 T315I F2	1288-1308

**Figura 21. Diseño de oligonucleótidos para detección de mutación T315I.** Secuencia de *ABL1* del exón 4 al exón 8. Las flechas verdes señalan las posiciones de los oligonucleótidos diseñados como control interno que amplifican un fragmento de 804 pb. La flecha azul señala la posición de los oligonucleótidos que identifican la mutación T315I en *ABL1*, los cuales junto con el control interno reverso amplifican un fragmento de 457 pb. Las letras rojas señalan nucleótidos donde se han identificado mutaciones asociadas con resistencia a Imatinib. La citosina marcada de verde indica la posición donde al oligonucleótido diseñado T315I F2 se le agregó un mismatch, colocando en su lugar una adenina, con intención de aumentar la discriminación realizada por el oligonucleótido.

## 7. Optimización de PCR acoplado a transcripción reversa para detección de mutación T315I en *ABL1*

Con el oligonucleótido diseñado para detectar la mutación T315I en *ABL1* sin el mismatch (Tabla 3), se creó un programa de PCR acoplada a transcripción reversa que posteriormente se intentó optimizar mediante la metodología Taguchi, analizando las diferentes variables que aparecen en la tabla 4, con la aplicación de matrices establecidas para el arreglo ortogonal (AO)  $L_4$  (Tabla 5).

Posteriormente se utilizó el mismo arreglo, analizando las mismas variables y valor de cada nivel para optimizar la prueba pero ahora con el oligonucleótido diseñado para detectar la mutación T315I con el mismatch.

**Tabla 4. Variables analizadas en la detección de la mutación T315I en ABL1**

Clave	A	B	C
Variables	Tm	Tiempo de Alineamiento	Ciclos
Nivel Bajo (1)	58 °C	35 s	30
Nivel Alto (2)	60 °C	50 s	35

**Tabla 5. Arreglo ortogonal L<sub>4</sub>**

Variable	A	B	C
Ensayo			
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

Para cada uno de los ensayos de cada arreglo ortogonal se realizó la cuantificación del producto de PCR mediante espectrofotometría con un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf®), utilizando estos datos para realizar el análisis de los resultados para cada arreglo.

### **8. Análisis de resultados para la metodología Taguchi**

Los resultados obtenidos de cada ensayo se analizaron mediante una herramienta estadística denominada ANOVA (Analyze of Variance) resuelto por mínimos cuadrados. La matriz del experimento se obtuvo descargando las variables y los niveles de estudio a las matrices del arreglo ortogonal L<sub>4</sub>. Las fórmulas utilizadas para realizar los cálculos necesarios para el análisis se muestran en la tabla 6.

A partir de estos datos se determinó la contribución que tiene cada una de las variables analizadas en la reacción, y se seleccionaron las condiciones óptimas para obtener el mejor producto de la característica de respuesta.

### **9. Purificación del control interno para el gen ABL1 amplificado por PCR**

Se purificó el amplificado de los oligonucleótidos diseñados como control interno de cada una de las muestras, con el fin de realizar la secuenciación de este producto. Para realizar

la purificación se utilizó QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®), en donde el proveedor establece primero agregar buffer PB en una proporción de cinco volúmenes por cada volumen de producto de PCR. Transferir la mezcla a la columna QIAquick® y por centrifugación unir el DNA a la membrana de sílica. Las impurezas se eliminaron mediante lavados con el buffer EB y por último el DNA es eluido en 50 µL de agua libre de RNasas para su uso posterior. Los productos de purificación se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

**Tabla 6. Fórmulas utilizadas para el análisis ANOVA**

Formula	Descripción
$F_{i1} = \sum Y_1 \quad F_{i2} = \sum Y_2$	Sumatoria de la "característica de calidad" (Y) de cada factor (Fi) en sus diferentes niveles (1 y 2)
$\overline{F_{i1}} = \frac{(\sum Y_{i1})}{N_1} \quad \overline{F_{i2}} = \frac{(\sum Y_{i2})}{N_2}$	Promedio de los factores, se usa para obtener el promedio de cada factor (Fi) mediante la sumatoria de su "característica de calidad" (Y) en sus diferentes niveles (1 y 2).
$SSFi = \frac{(F_{i1} - F_{i2})^2}{(N_1 + N_2)}$	Suma de cuadrados.
$gl_{Fi} = \text{Numero de niveles de } Fi - 1$	Grados de libertad.
$MS = \frac{SSFi}{gl}$	Cuadrado medio (Varianza).
$FO = \frac{MSi}{MS_{error}}$	F calculada (Ratio de la varianza), se utiliza para obtener la significancia de cada factor y representa el índice de variación respecto al error.
$S'_{Fi} = SS_{Fi} - gl_{Fi} \times V_e$	Suma Pura de cuadrados.
$P_{Fi} = S'_{Fi} \times \frac{100}{S_T}$	Porcentaje de contribución de cada factor.
$Y_{opt} = \bar{Y} + \sum EfFi$	Y óptima (Yopt), indica la predicción de Y con los valores considerados como óptimos para cada variable.

## 10. Secuenciación

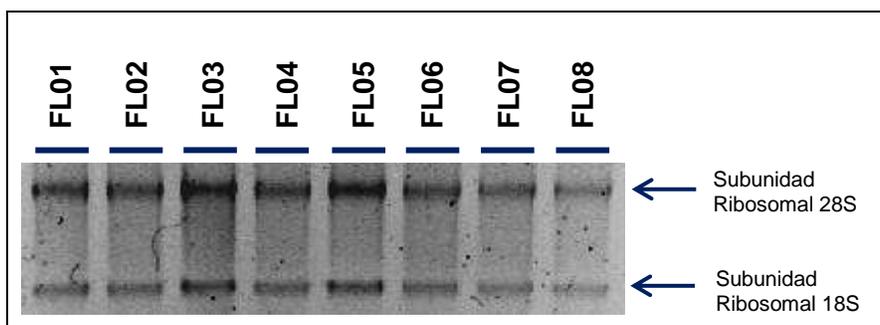
Los productos de PCR purificados de cada una de las muestras se secuenciaron por el método de Sanger en el departamento de servicios genómicos Cinvestav-Langebio, en

Irapuato, Guanajuato. Se realizó el análisis de cada una de las secuenciaciones en busca de la mutación T315I en ABL1 y/o otras mutaciones asociadas a resistencia a Imatinib, para lo cual se utilizaron los programas Finch TV 1.5 y CLC Sequence Viewer 6.

## IX. RESULTADOS

### 1. Análisis de Integridad del RNA

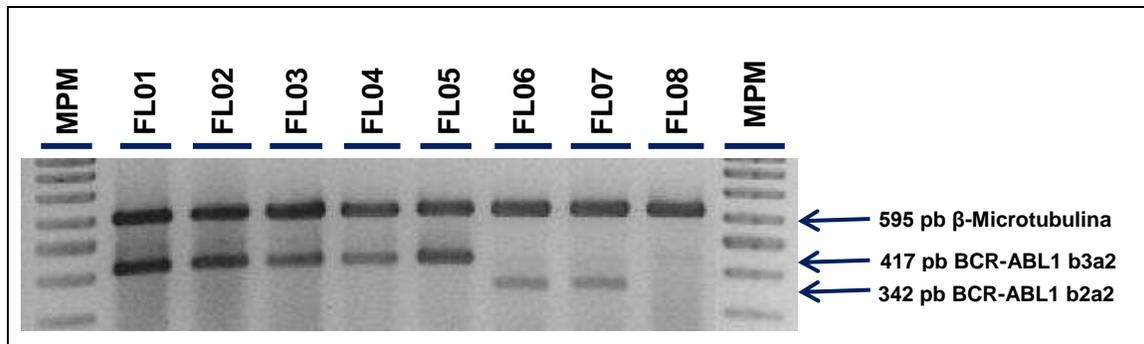
Se efectuó un análisis de la integridad del RNA extraído de cada una de las muestras mediante la electroforesis de los productos obtenidos, identificando para cada una de las muestras las bandas correspondientes a las unidades ribosomales 28S y 18S (Figura 22).



**Figura 22. Análisis electroforético de la integridad de RNA.** La integridad del RNA extraído se observó a través de la identificación de la banda correspondiente a la subunidad ribosomal 28S (superior) y la subunidad ribosomal 18S (inferior). La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.8% a un voltaje de 80V durante 90 minutos.

### 2. Determinación de variantes de BCR-ABL1

El gen de fusión *BCR-ABL1* es el marcador molecular patognomónico de la leucemia mieloide crónica, el cual puede generar varios transcritos dependiendo el sitio de ruptura y fusión de los genes *BCR* y *ABL1*. Por esta razón, se realizó PCR acoplada a transcripción reversa para determinar el tipo de variante del gen de fusión *BCR-ABL1* presentaba cada una de las siete muestras utilizadas. Además se incluyó una muestra control negativo. Todas las muestras amplificaron el producto control interno de 595 pb que corresponde a  $\beta$ -Microtubulina, cinco de las muestras produjeron un fragmento de 417 pb correspondientes a la variante b3a2 y dos muestras dieron un amplificado de 342 pb característico de la variante b2a2 (Figura 23).



**Figura 23. Análisis de las variantes del gen de fusión BCR-ABL1.** Análisis electroforético de productos de PCR acoplada a transcripción reversa para determinar el tipo de variante del gen de fusión *BCR-ABL1*. Se aprecia en todas las muestras la banda del control interno a 595 pb correspondiente a  $\beta$ -Microtubulina. En las muestras FL01 a FL05 se distingue la banda de la variante b3a2 de BCR-ABL1 a 417 pb. En las muestras FL06 y FL07 se logra ver la banda de la variante b2a2 a 342 pb de BCR-ABL1. La muestra FL08 es el control negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.8% a un voltaje de 80V durante 90 minutos. Marcador de peso molecular de 100 pb.

### 3. Optimización de PCR acoplado a transcripción reversa para detección de mutación T315I en ABL1 por metodología Taguchi

La mutación en el dominio cinasa de ABL1 en la posición 315 con el cambio de una treonina por una isoleucina (p. T315I) es la causa más común de resistencia a Imatinib Mesylate y su identificación conlleva al tratamiento con inhibidores tirosina cinasa de tercera generación. Debido a esto, con los oligonucleótidos diseñados se analizaron cuales variables o factores podían influir de manera importante en la detección de esta mutación por la técnica de RT-PCR. Las variables que se consideraron importantes fueron la temperatura de alineamiento, el tiempo de alineamiento y el número de ciclos. Una vez establecidas estas variables se decidió optimizar la prueba por medio de la metodología Taguchi mediante arreglos ortogonales, siendo el que mejor se adecuaba a nuestras necesidades el  $L_4$ . Se optó porque nuestra variable de respuesta fuera la cuantificación del DNA amplificado en la reacción de PCR y con esta realizar los cálculos para determinar los índices de contribución de cada variable.

Primeramente se intentó optimizar la prueba utilizando los oligonucleótidos diseñados como controles y el oligonucleótido alelo específico para la mutación T315I que no contenía el mismatch. Se utilizó un control negativo para realizar cada uno de los ensayos, esperando encontrar solamente amplificado de la banda control y no de la

mutación. Las variables analizadas fueron tres a dos niveles cada una. La cuantificación de DNA amplificado en cada uno de los ensayos se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Concentración de DNA amplificado en cada ensayo del AO L<sub>4</sub> con el oligonucleótido T315I sin mismatch**

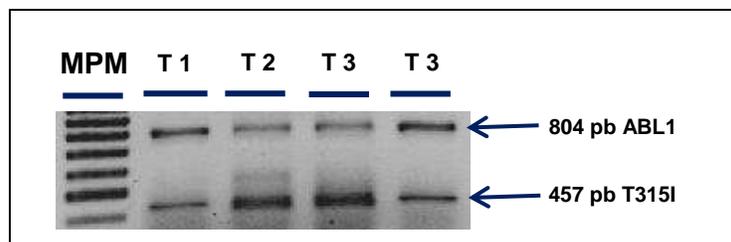
Ensayo	T1	T2	T3	T4
<b>DNA (ng/μL)</b>	9.9	18.3	17.1	11.8
T=Ensayo (Trial)				

Los porcentajes de contribución, el ratio de la varianza o F estadístico de cada variable y el error experimental se obtuvieron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y se enlistan en la Tabla 8.

**Tabla 8. Contribución de las variables analizadas en el AO L<sub>4</sub> mediante el empleo de un control negativo para T315I**

Clave	Variable	F <sup>b</sup>	% Contribución
<b>A</b>	Tm	1.0	Pooled
<b>B</b>	Tiempo de Alineamiento	19.612	4.858
<b>C</b>	Ciclos	383.04	94.893
	Error	1.0 <sup>a</sup>	0.247
a) Grado de confianza de la prueba, b) Índice de Variación, Pooled (Combinado): Variable asignada al error por no ser significativa.			

El análisis electroforético de cada uno de los ensayos revelo que en todos estos se había amplificado la banda control a 804 pb, pero además se produjo una banda a 457 pb correspondiente a la mutación (Figura 24), lo cual represento una inespecificidad para la prueba. Debido a esto se decidió utilizar el oligonucleótido con el mismatch para detectar la mutación T315I.



**Figura 24. Electroforesis de los ensayos efectuados con la matriz del AO L<sub>4</sub> utilizando el oligonucleótido para detectar la mutación T315I sin mismatch.** Análisis electroforético de los ensayos efectuados para el arreglo L<sub>4</sub>, donde se observa en todos los ensayos la banda del control interno a 804 pb y la banda de inespecificidad a 457 pb correspondiente a la mutación. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% a 80 V durante 70 minutos. Marcador de peso molecular de 100 pb. T=Ensayo (Trial)

Se realizó un nuevo arreglo ortogonal L<sub>4</sub> pero ahora se utilizaron los oligonucleótidos controles y el oligonucleótido para detectar la mutación T315I con mismatch para aumentar la capacidad de discriminación del oligonucleótido. Se analizaron las mismas variables a los mismos niveles que en caso anterior y se utilizó la misma muestra control negativo, obteniendo los amplificadores que aparecen en la tabla 9 para cada uno de los ensayos.

**Tabla 9. Concentración de DNA amplificado en cada ensayo del AO L<sub>4</sub> con el oligonucleótido T315I con mismatch**

Ensayo	T1	T2	T3	T4
<b>DNA (ng/μL)</b>	21.9	20.7	23.0	18.4
T=Ensayo (Trial)				

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) obtuvimos los porcentajes de contribución de cada variable, el ratio de la varianza y el error experimental que aparecen en la tabla 10.

**Tabla 10. Contribución de las variables analizadas en el AO L<sub>4</sub> mediante el empleo de un control negativo para T315I**

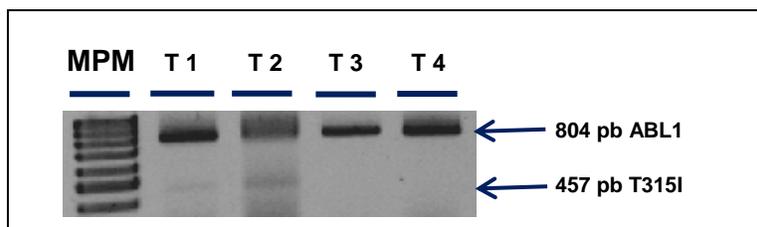
Clave	Variable	F <sup>b</sup>	% Contribución
<b>A</b>	Tm	1.0	Pooled
<b>B</b>	Tiempo de Alineamiento	23.361	72.126
<b>C</b>	Ciclos	8.027	24.785
	Error	1.0 <sup>a</sup>	3.087
a) Grado de confianza de la prueba, b) Índice de Variación, Pooled (Combinado): Variable asignada al error por no ser significativa.			

En la electroforesis de los productos obtenidos de cada uno de los ensayos de este segundo arreglo ortogonal L<sub>4</sub> se reveló la presencia de la banda del control interno a 804 pb bajo todas las condiciones, pero ahora la banda de inespecificidad a 457 pb solo aparece en las dos primeras condiciones y se elimina en las demás (Figura 25).

A partir de aquí se establecieron las condiciones óptimas para desarrollar la prueba de identificación de la mutación T315I en el dominio cinasa de ABL1, las cuales aparecen en la tabla 11.

Se efectuó un RT-PCR utilizando las condiciones óptimas que se establecieron para la prueba de detección de la mutación T315I utilizando la misma muestra control negativo y se comparó con los resultados obtenidos con las condiciones utilizadas inicialmente. Se

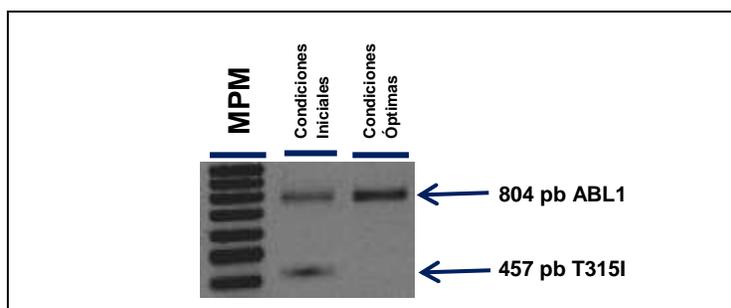
observó un aumento en el amplificado de la banda control y eliminación de la inespecificidad (Figura 26).



**Figura 25. Electroforesis de los ensayos efectuados con la matriz del AO L<sub>4</sub> utilizando el oligonucleótido para detectar la mutación T315I con mismatch.** Análisis electroforético de los ensayos efectuados en el arreglo L<sub>4</sub>, donde se observa en todos los ensayos la banda del control interno a 804 pb y solo en los dos primeros la banda de inespecificidad a 457 pb correspondiente a la mutación. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% a 80 V durante 60 minutos. Marcador de peso molecular de 100 pb. T=Ensayo (Trial).

**Tabla 11. Condiciones óptimas establecidas en el arreglo ortogonal L<sub>4</sub> para la prueba de identificación de la mutación T315I.**

Variable	Condición Óptima
Tm	60 °C
Tiempo de Alineamiento	35 segundos
Ciclos	35 ciclos

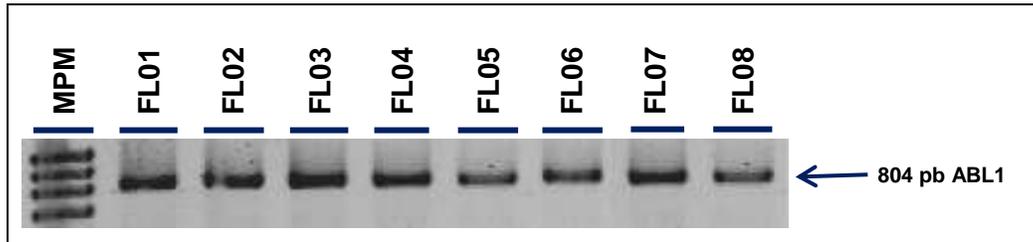


**Figura 26. Comparación de las condiciones óptimas con las condiciones iniciales utilizadas para la detección de la mutación T315I.** Electroforesis en gel de agarosa a 1.8% a 80 V durante 60 minutos. Marcador de peso molecular de 100 pb.

#### 4. Purificación del control interno para el gen *ABL1* amplificado por PCR

Para tratar de encontrar alguna muestra positiva para la mutación T315I y/o alguna otra mutación en el dominio cinasa de ABL1 asociada a resistencia a Imatinib, se realizó un PCR acoplado a transcripción reversa para cada muestra, utilizando únicamente los oligonucleótidos diseñados como controles internos, así posteriormente estos productos

de PCR se purificaron para eliminar aquellos compuestos utilizados en la reacción que pudieran afectar su secuenciación por método de Sanger. Para corroborar la adecuada purificación y la presencia de un solo amplificado en las muestras, de los productos obtenidos se realizó electroforesis para revelar las bandas correspondientes al control interno con un tamaño de 804 pb (Figura 27).



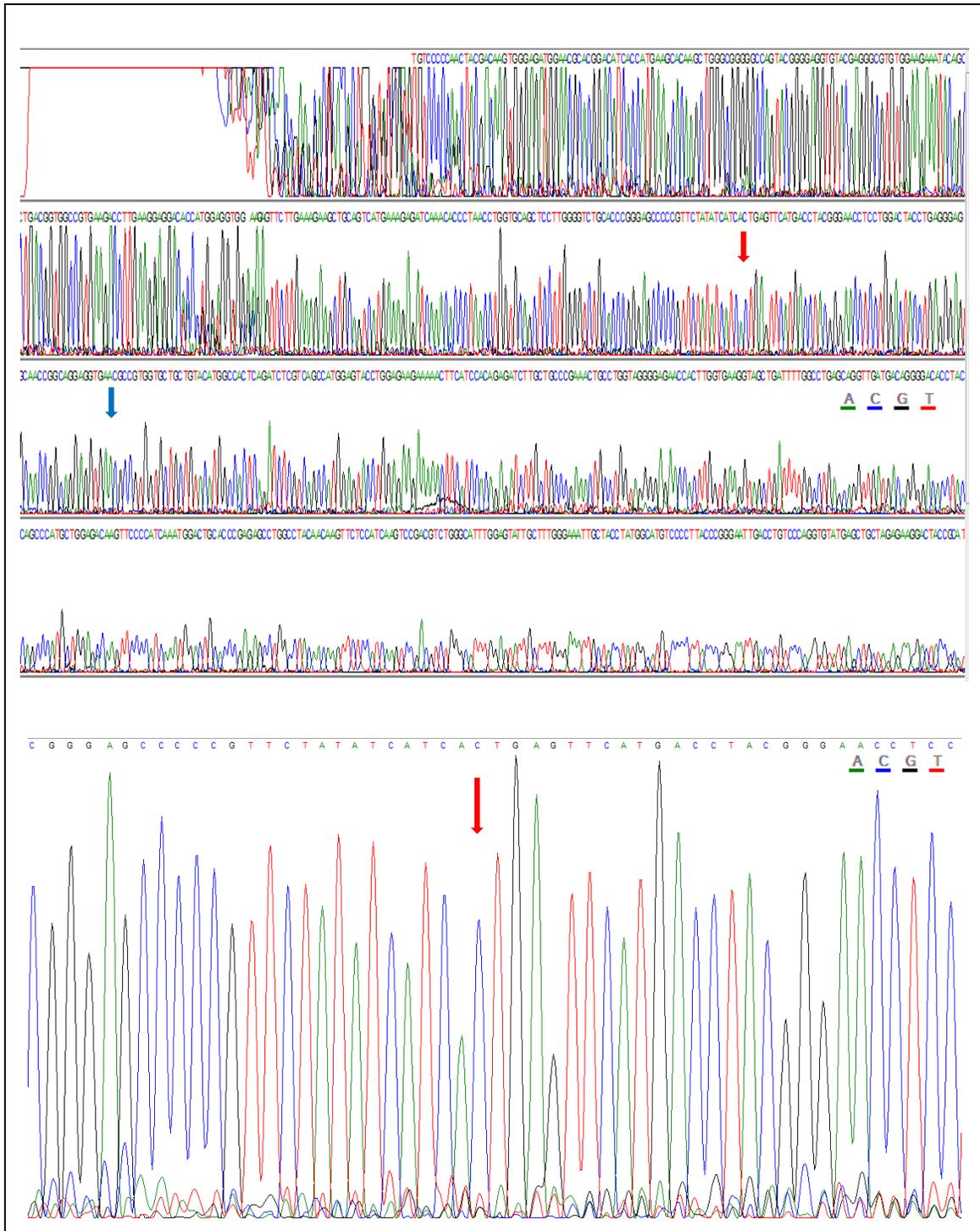
**Figura 27. Productos de PCR purificados del control interno ABL1.** Análisis electroforético del producto obtenido de la purificación del PCR para amplificar el control interno de ABL1 de 804 pb para cada una de las muestras. La electroforesis se efectuó en gel de agarosa al 1.8% a 80 V durante 60 minutos. Marcador de peso molecular de 100 pb.

## 5. Análisis de Secuenciación

Una vez realizada la secuenciación del control interno de *ABL1* para cada una de las muestras se comenzó con su análisis, primero comparándolas con la secuencia de referencia obtenida de la base de datos del NCBI para detectar cambios, y posteriormente de cada uno de los cambios, se buscaron reportes que los relacionaran con alguna clase de resistencia al fármaco Imatinib Mesylate (Figura 28).

En el análisis se identificó que ninguna de las muestras presentaba la mutación T315I causada por c. 944C>T (“CCDS Report for Consensus CDS,”), sin embargo se encontraron algunos polimorfismos de nucleótido único presentes de manera heterocigota en cinco de las ocho muestras que se secuenciaron, como son los que aparecen en la tabla 12.

Además se observaron dos mutaciones asociadas a resistencia a Imatinib Mesylate en dos muestras, también de manera heterocigota que se muestran en la tabla 13 y en la figura 29 y 30.



**Figura 28. Análisis de la secuencia del control interno ABL1.** Análisis del electroferograma efectuada con el programa Finch TV 1.5. Se comparó la secuencia obtenida por método de Sanger de cada una de las muestras con la secuencia de referencia extraída del NCBI para identificar mutaciones que se relacionaran con resistencia a Imatinib Mesylate. La flecha roja señala la posición donde ocurre la mutación T315I, la cual no se encuentra presente. La flecha azul señala un polimorfismo de nucleótido único donde se realiza el cambio de una citosina por una adenina.

**Tabla 12. Polimorfismos de Nucleótido Único identificados en secuenciación.**

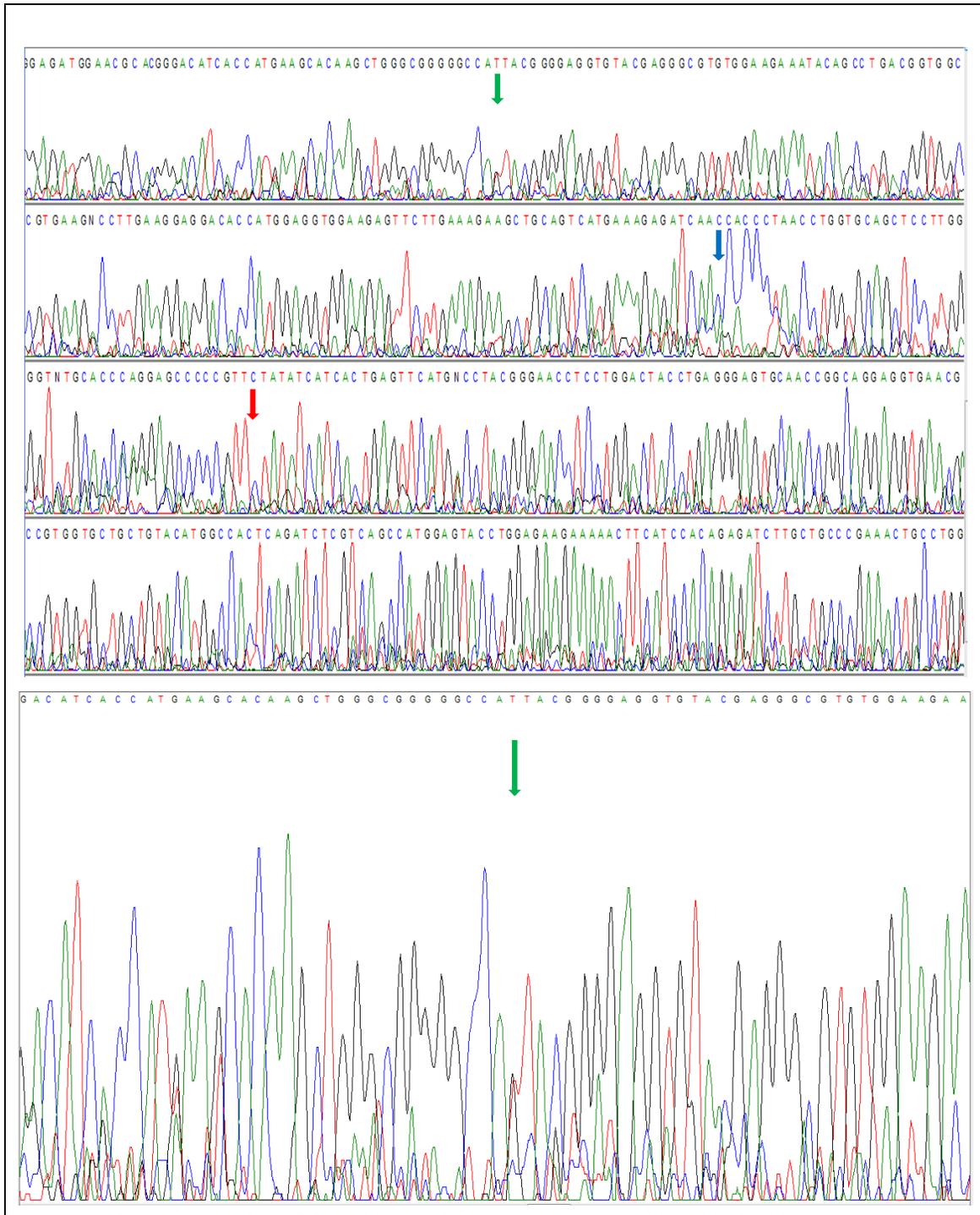
Cambio en el RNA <sup>a</sup>	Cambio en Aminoácido <sup>a</sup>	N
c. 668C>T	p. P223L	1
c. 675C>T	p. V225V	1
c. 710T>A	p.M237L	2
c. 783A>C	p. K294N	1
c. 829A>T	p. T277S	1
c.830C>A	p. T277N	1
c. 832A>C	p. M278L	1
c. 833T>G	p. M278R	1
c. 839T>A	p. V280E	1
c. 843A>C	p. E281D	1
c. 844G>A	p. E282K	1
c. 883G>A	p. R307Q	1
c. 1073A>G	p. N358S	1
c. 1196C>A	p. A399D	1
<sup>a</sup> Posición de acuerdo a CCDS Datebase con número de acceso 35166.1. N: Numero de muestras con la mutación		

**Tabla 13. Mutaciones identificadas asociadas a resistencia a Imatinib Mesylate**

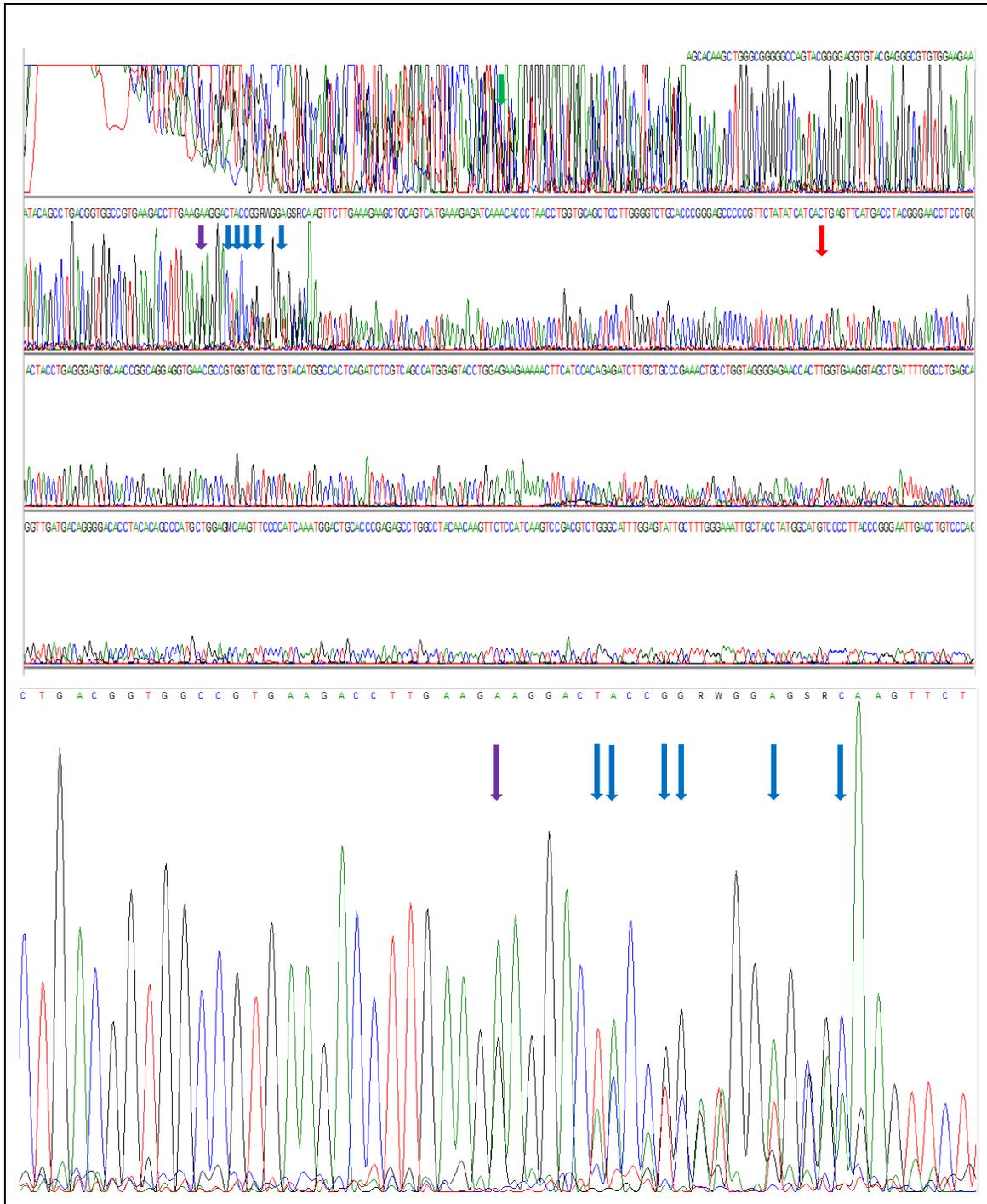
Cambio en el RNA <sup>a</sup>	Cambio en Aminoácido <sup>a</sup>	N
c. 757G>T	p. Q252H	1
c. 823G>A	p. E275K	1
<sup>a</sup> Posición de acuerdo a CCDS Datebase con número de acceso 35166.1. N: Numero de muestras con la mutación		

## 6. Aplicación de la prueba optimizada para detectar la mutación T315I

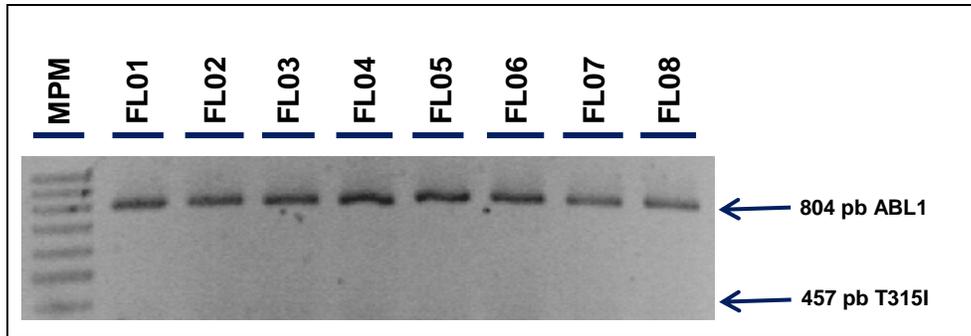
A partir de las condiciones óptimas que se determinaron al realizar los cálculos del análisis de resultados por metodología Taguchi se realizó la prueba para cada una de las muestras positivas del gen de fusión *BCR-ABL1* con sus diferentes variantes que habíamos identificado por secuenciación que carecían de la mutación T315I. Al realizar el análisis electroforético se identificó en todas estas solamente la banda del control interno (Figura 31).



**Figura 29. Análisis de la secuencia e identificación de presencia de la mutación Q252H.** Se identificó la mutación Q252H asociada a resistencia a Imatinib Mesylate (Flecha verde), la cual es ocasionada por el cambio de una guanina por una timina. Se determinó heterocigiosidad debido a la presencia de un pico en la señal que indica guanina casi a la misma altura que la señal de timina. La flecha roja señala la posición donde ocurre la mutación T315I, la cual no se encuentra presente. La flecha azul señala un polimorfismo de nucleótido único donde se realiza el cambio de una guanina por una adenina.



**Figura 30. Análisis de la secuencia e identificación de la presencia de la mutación E275K.** Se identificó la mutación E275K asociada a resistencia a Imatinib Mesylate (Flecha morada), la cual es ocasionada por el cambio de una guanina por una adenina. Existe heterocigosidad por existir amplificado tanto de la adenina como de la guanina. La flecha roja señala la posición donde ocurre la mutación T315I, la cual no se encuentra presente. Las flechas azules señalan polimorfismos de nucleótido único, de izquierda a derecha, cambio de una adenina por una timina, cambio de una citosina por una adenina, cambio de una adenina por una citosina, cambio de una guanina por una timina, cambio de una timina por una adenina y cambio de una adenina por una guanina.



**Figura 31. Detección de la mutación T315I con las condiciones óptimas del AS-PCR.** Las muestras FL01 a FL05 presentan la variante b3a2 de BCR-ABL1. Las muestras FL06 y FL07 son portadoras de la variante b2a2 de BCR-ABL1. La muestra FL08 es el control negativo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1.8% a un voltaje de 80V durante 60 minutos. Marcador de peso molecular de 100 pb.

## X. DISCUSIÓN

El gen de fusión *BCR-ABL1* codifica una proteína con actividad tirosina cinasa constitutivamente activada que promueve la proliferación y supervivencia de la línea celular mieloide, siendo responsable de producir Leucemia Mieloide Crónica. Imatinib Mesylate, un inhibidor de la actividad tirosina cinasa, es el fármaco de elección utilizado en el tratamiento de pacientes con CML. Sin embargo, estudios recientes en pacientes tratados con Imatinib en busca de enfermedad mínima residual han permitido identificar la presencia de ciertas formas de resistencia hacia este fármaco. El más frecuente mecanismo de cambio en la sensibilidad a Imatinib en células transformadas por *BCR-ABL1* son mutaciones puntuales dentro del dominio cinasa de *ABL1* (Walz & Sattler, 2006). La mutación T315I es el cambio más frecuentemente encontrado asociado a resistencia a Imatinib, además de implicar un peor pronóstico clínico y requerir tratamiento con inhibidores tirosina cinasa de tercera generación (Bosutinib, Ponatinib) (Jabbour et al., 2008). Debido a esta razón la determinación de este marcador molecular es de suma importancia para el adecuado y oportuno tratamiento de pacientes con CML.

Existen diferentes regiones de ruptura tanto en el gen *ABL1* como en el gen *BCR* dando lugar a diferentes variantes del gen de fusión *BCR-ABL1* (Pane et al., 2002). En CML las variantes más comunes son b2a2 y b3a2 que fusionan el exón 13 (b2) o 14 (b3) de *BCR* al exón 2 (a2) de *ABL1*, codifican una proteína de peso molecular de 210 KDa (Walz & Sattler, 2006). La primera parte de la fase experimental consistió en determinar el tipo de variante del gen de fusión *BCR-ABL1* que presentaba cada una de las muestras utilizadas (Figura 23), obteniendo que un 71.5% presentaba la variante b3a2 y un 28.5% la variante b2a2, lo que concuerda con los resultados que reportan Iqbal et al. (2011) donde especifican que la frecuencia de la variante b3a2 es aproximadamente dos veces más alta que la que presenta la variante b2a2.

Posteriormente se diseñaron mediante el uso de herramientas bioinformáticas los oligonucleótidos alelo específicos que se utilizarían como primers para determinar la presencia de la mutación T315I, tomando como base las características que expone Dieffenbach et al. (1993) y algunas modificaciones que presenta QIAGEN® ("PCR Protocols & Applications"). Un oligonucleótido alelo específico es un oligonucleótido que introduce en su estructura una o varias bases correspondiente a una mutación, para que

de esta manera, únicamente se unan y amplifiquen aquellos alelos que presentan dicha mutación en su secuencia. Se consideró amplificar un fragmento alrededor de la zona donde ocurre la mutación en el dominio cinasa de ABL1 y que además tuviera en su estructura la mayor cantidad de residuos con reportes de mutaciones asociadas a resistencia a Imatinib. De esta manera se decidió crear un par de oligonucleótidos, directo y reverso, que amplificaran un fragmento de 804 pb, el cual se extiende del exón 4 al exón 8 en ABL1, que además sirve como control interno de la reacción de PCR debido a que se produce independientemente de presentar o no la mutación T315I. Para el diseño del oligonucleótido alelo específico para la mutación T315I se identificó el nucleótido 944, sitio donde se ha reportado que ocurre la mutación, efectuándose el cambio de una citosina por una timina, colocando este último nucleótido en el extremo 3' del primer, debido a que este extremo se reporta que actúa como regulador del apareamiento porque de no estar presente la mutación, la unión del oligonucleótido con el cDNA se complica por no ser estable y se separa fácilmente, evitando que la DNA polimerasa se una y amplifique. Se diseñó otro oligonucleótido alelo específico para la mutación T315I que fuera homólogo del anterior pero que además presentara un mismatch, es decir una base apareada no idéntica a dos nucleótidos río arriba del sitio de la mutación, colocando una adenina en lugar de una citosina. La idea de utilizar un mismatch para mejorar la capacidad de discriminación del oligonucleótido en la prueba se basan en los resultados obtenidos por Jones et al. (2005) en la detección de la mutación p. V617F de JAK 2, así como su diseño se realizó de acuerdo a los criterios que maneja Kwok et al. (1994). Se optó por cambiar por una adenina para evitar la formación de homodímeros, heterodímeros y estructuras en horquilla que con algún otro nucleótido se verían más favorecidos. El mismatch permite que la prueba sea más específica ya que obliga a que este presente la mutación o de lo contrario, debido a la inestabilidad ocasionada por la diferencia entre el primer y el cDNA por el nucleótido de la mutación y la base adicional, es más difícil que estos se apareen (Figura 21).

Se efectuó la optimización de la prueba de RT-PCR para detección de la mutación T315I mediante metodología Taguchi, tomando como antecedente los trabajos efectuados por Thanakiatkrai y Welch (2012), Pérez-Contreras (2012) y Galindo-Jiménez (2013). La metodología Taguchi permite conocer de manera rápida, económica y reproducible las condiciones óptimas para un ensayo en comparación con la clásica metodología factorial, al realizar algunos experimentos de prueba con pequeñas variaciones que permitan conocer aquellas variables que afectan más la reacción. Se tomó como característica de

calidad para realizar los cálculos especificados en la metodología Taguchi, la cuantificación del DNA después de la amplificación por RT-PCR, porque esta característica representa el grado en que se llevó a cabo la reacción, aunque de esta manera no se podía conocer si el amplificado era el adecuado o había presencia de inespecificidades, por lo que adicionalmente se complementó esta observación con el análisis electroforético de cada uno de los ensayos de prueba. Se comenzó por determinar que variables se consideraban importantes para hacer variar significativamente la prueba, para lo cual se consideró la  $T_m$ , el tiempo de alineamiento y el número de ciclos efectuados por el termociclador. La  $T_m$  determina la especificidad de la prueba para el alineamiento de los primers con el cDNA. El tiempo de alineamiento condiciona que cantidad de oligonucleótidos se alinea para ser amplificados por la DNA polimerasa. Finalmente, el número de ciclos debido a la amplificación exponencial de los fragmentos de DNA amplificados. Para cada uno de las variables se determinaron dos niveles, uno bajo y otro alto, en base a ensayos realizados previamente. Para la  $T_m$  se eligió como nivel bajo  $58^{\circ}\text{C}$  y como nivel alto  $60^{\circ}\text{C}$  tomando en cuenta la  $T_m$  que se calculó para el oligonucleótido alelo específico para la mutación T315I y para los primers para el control interno. Para el tiempo de alineamiento se tomó como nivel bajo 35 segundos y como nivel alto 50 segundos debido a experiencias previas con ensayos anteriores. El número de ciclos de acuerdo al margen que se establece en QIAGEN<sup>®</sup> Multiplex PCR Handbook (2010) se optó como nivel bajo 30 ciclos y como nivel alto 35 ciclos. El arreglo ortogonal utilizado para los experimentos fue un  $L_4$  que la forma más simple e ideal para experimentos de los que no se sabe el comportamiento de las variables, el cual analiza 3 variables a dos niveles con cuatro experimentos.

Primero se intentó optimizar la prueba utilizando el primer alelo específico para la mutación T315I sin el mismatch, para lo cual se efectuaron los ensayos establecidos en la matriz del  $L_4$  y posteriormente con el análisis de varianza (ANOVA) de cada uno de los resultados obtenidos de la característica de calidad, se observó que la variable que más influía era el número de ciclos con una contribución de 94.893% y después el tiempo de alineamiento con una contribución de 4.858, siendo la  $T_m$  irrelevante para determinar la cantidad de amplificado del ensayo, sin embargo al realizar el análisis electroforético de cada uno de los experimentos se observó que existía una inespecificidad en todos los ensayos debido a que se amplificó el fragmento correspondiente a la presencia de la mutación a 457 pb, lo cual se sabía que no debía de ocurrir gracias a la secuenciación (Figura 24). Debido a esta razón, se decidió cambiar la prueba y utilizar el oligonucleótido

alelo específico para la mutación T315I con el mismatch, pensando en que esto permitiera eliminar la inespecificidad observada en los ensayos anteriores y hacer específica la prueba. Nuevamente se realizaron los ensayos de la matriz del  $L_4$  y el análisis de varianza (ANOVA) obteniendo en este caso que la variable que más influía en la característica de calidad era el tiempo de alineamiento con una contribución de 72.126% y después el número de ciclos con un 24.785%, teniendo concordancia en que la  $T_m$  era la variable que menos afectaba la reacción. Sin embargo al complementar con el análisis electroforético de cada experimento se pudo ver que aquellos ensayos que tenían en común la  $T_m$  en el nivel bajo a 58 °C continuaban presentando la misma inespecificidad para el amplificado del fragmento correspondiente a la mutación, sin embargo aquellos experimentos con el nivel alto de la  $T_m$  a 60 °C tenían la especificidad buscada (Figura 25). Esto quiere decir que la  $T_m$  aunque no contribuye en gran medida en la cantidad de amplificado obtenido de cada reacción de RT-PCR si contribuye en la especificidad de la prueba.

Al final de todo puede verse claramente que la presencia del mismatch fue relevante en la reacción, ya que logra hacer la prueba sea más específica, lo que permitió que el primer ensayo, sin mismatch, no fuera el adecuado y presentara inespecificidades, pero sin embargo la segunda prueba, con mismatch, fuera satisfactoria.

El cálculo de la  $Y_{est}=23$  fue muy similar a los valores del DNA amplificado en los ensayos experimentales en el arreglo ortogonal  $L_4$  lo que refleja el comportamiento de la reacción en un 96.913% de acuerdo al grado de confianza de la prueba (Aportación del Error=3.087%). Con estos resultados se hizo la predicción del ensayo óptimo, el cual se realizó utilizando la variable que tuvo un porcentaje de contribución por debajo del error, en este caso la  $T_m$ , en el nivel donde hacía que la prueba fuera específica aunque tuvo una lectura menor, y en aquellas variables que estuvieron por arriba del error que fueron el tiempo de alineamientos y el número de ciclos se trabajaron siguiendo el criterio de que el nivel donde se tuvo la lectura mayor es el mejor. Así el ensayo óptimo se llevó a cabo con una  $T_m$  de 60 °C, un tiempo de alineamiento de 35 segundos y un número de ciclos de 35. Al cuantificar el ensayo óptimo se obtuvo una lectura de 23 ng/ $\mu$ L que es exactamente la cantidad predicha por el cálculo para la  $Y_{est}$ .

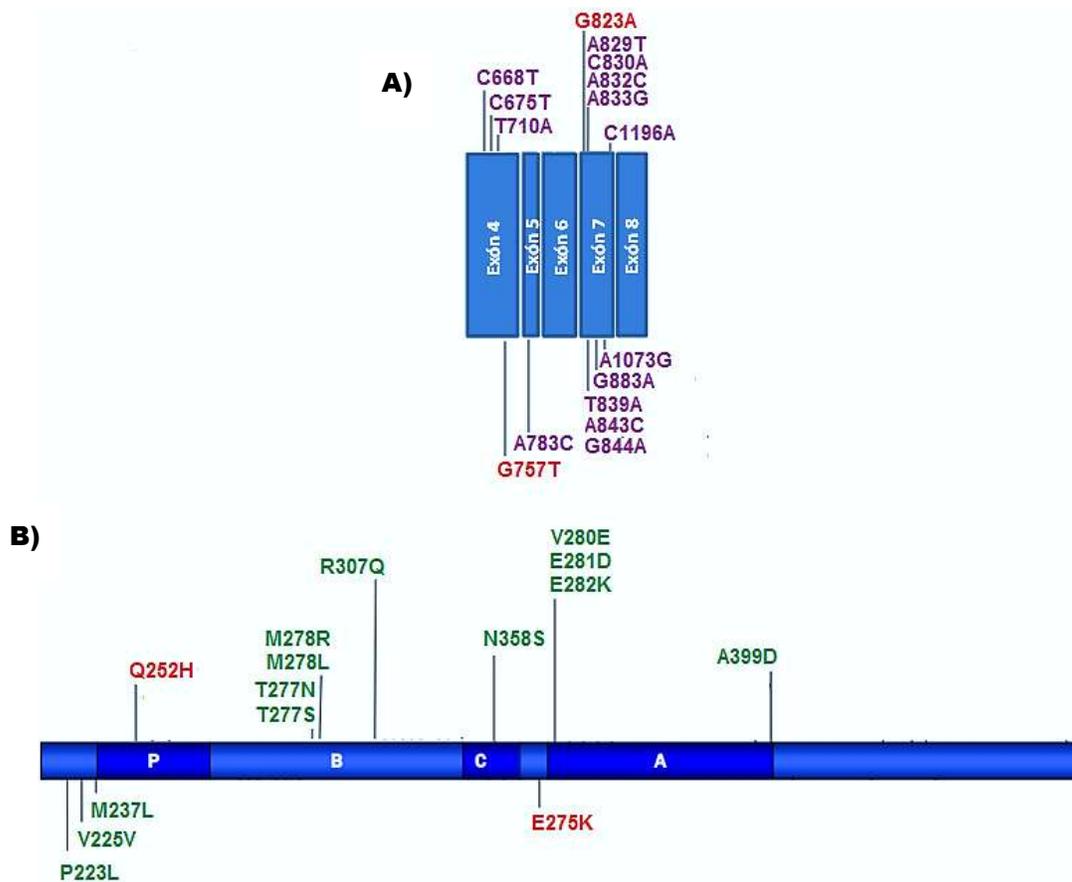
Se secuenció el fragmento utilizado como control interno de la reacción de PCR para cada una de las muestras, efectuando un análisis en busca de la mutación T315I y/o otras mutaciones asociadas a resistencia a Imatinib. La secuenciación se realizó utilizando los

primers directo y reverso del control interno, para así tener la secuencia del fragmento de cada muestra en ambos sentidos y con esto realizar el análisis con ambas secuencias corroborando resultados. Se identificaron algunos polimorfismos de nucleótido único en cinco muestras, de las cuales dos eran portadoras de la variante b3a2 del gen de fusión *BCR-ABL1*, otras dos eran portadoras de la variante b2a2, y por último el control negativo también presentó variaciones. Cada uno de estos polimorfismos se comparó con los que describe Ernst et al. (2008) no habiendo concordancia, siendo la posible causa de esto la diferencia en la población de estudio (Alemana contra Mexicana). Tres muestras con la variante b3a2 no presentaron ningún cambio en la secuencia al compararlo con la que se utilizó como referencia.

Ninguna de las muestras presentó la mutación T315I, la cual se describe como la mutación más frecuente que ocurre en el dominio cinasa de ABL1 con una frecuencia entre 2 y 20% (Franck E Nicolini et al., 2009). Esto permitió comprobar los resultados obtenidos en los ensayos para optimización de la prueba para detección de esta mutación. Sin embargo se identificaron otras dos mutaciones en muestras diferentes asociadas a resistencia a Imatinib, la mutación Q252H y la mutación E275K, las cuales están reportadas como la 12<sup>va</sup> y la 36<sup>va</sup> forma de mutación asociada a resistencia en orden de frecuencia (Apperley, 2007). La mutación Q252H se identificó en un paciente con la variante b2a2, que además presentaba 4 variaciones más, las cuales no se asociaban a alguna forma de resistencia. En esta muestra en particular, la presencia de este número considerable de variaciones puede indicar que el DNA de las células está sufriendo nuevos cambios, lo que sugiere a que probablemente este avanzando hacia la fase acelerada o incluso a la fase blástica. La mutación E275K se identificó en la muestra que se utilizó como control negativo del gen de fusión *BCR-ABL1*, además también presentó otros cinco polimorfismos no asociados a resistencia, sin embargo a diferencia de la muestra anterior, en este caso se presentaron de manera heterocigota con la secuencia de referencia, sugiriendo que se encuentra amortiguado el cambio en cierto grado. La presencia de una mutación asociada a resistencia a Imatinib en una muestra que no ha estado en contacto con el fármaco indica que estos cambios pueden estar presentes de manera intrínseca en el genoma independientemente de presentar el gen de fusión *BCR-ABL1* o no, es decir, como exponen Melo & Chuah (2007), las mutaciones asociadas a resistencia no son inducidas por Imatinib, sino que se encuentran previamente y lo único que hace el fármaco es seleccionar clones mutantes que superan poco a poco las células sensibles. La posible razón de encontrar otras mutaciones

asociadas a resistencia y no la que se reporta como la más común puede ser el pequeño grupo de pacientes con CML con las que se trabajó, lo cual limita las posibilidades de encontrar la mutación T315I y no refleja la distribución real en que se presentan dichos cambios en el DNA.

A partir de todos los datos recabados de la secuenciación se pudo identificar que las mutaciones, tanto asociadas a resistencia a Imatinib como polimorfismos de nucleótido único, se encuentran agrupadas en ciertas regiones. Del amplificado secuenciado, que abarca los exones 4 a 8 de ABL1, se observó que los exones 4 y 7 de las muestras analizadas presentaban un mayor polimorfismo que los otros exones, probablemente debido a ser de un tamaño mayor. Sin embargo, al ubicar las mutaciones dentro del dominio cinasa de ABL1 y sus diferentes regiones, las modificaciones fueron más homogéneas (Figura 32).



**Figura 32. Distribución de mutaciones y polimorfismos identificados en la región del control interno ABL1.** A) Distribución de mutaciones dentro del mRNA identificadas por secuenciación, con un polimorfismo mayor en los exones 4 y 7. B) Distribución de mutaciones dentro del dominio cinasa de ABL1

Para probar la prueba optimizada se efectuó el ensayo para cada una de las muestras, analizando la cantidad de amplificado generado al final de la reacción obteniendo las siguientes lecturas: 23.15 ng/ $\mu$ L, 22.9 ng/ $\mu$ L, 23.25 ng/ $\mu$ L, 22.65 ng/ $\mu$ L, 22.5 ng/ $\mu$ L, 23.5 ng/ $\mu$ L, 22.75 ng/ $\mu$ L y 23 ng/ $\mu$ L, las cuales son todas muy próximas a la  $Y_{est}$ , indicando que el ensayo es reproducible independientemente de la muestra (Figura 31).

## **XI. CONCLUSIONES**

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que la prueba desarrollada, basada en AS-PCR, es adecuada para la detección de la mutación T315I que se asocia a resistencia al tratamiento con Imatinib Mesylate de pacientes con leucemia mieloide crónica. Esta prueba puede ser una buena opción para efectuar un mejor manejo de estos pacientes y con esto evitar los tratamientos inadecuados que permitan la progresión de la enfermedad.

La optimización mediante el diseño de experimentos basados en la metodología Taguchi utilizando arreglos ortogonales permitió llegar a las condiciones óptimas de cada una de las variables que influyen de manera significativa en la prueba. Esta metodología generó un resultado de manera rápida, económica y confiable si se compara con otras metodologías de diseño de experimentos como el método factorial que aunque sería más descriptivo requeriría un mayor costo tanto en dinero como en tiempo debido al gran número de ensayos que implica.

Sin embargo, sería conveniente que la prueba fuera probada en un grupo de muestras mucho mayor y que se enfrentara a un control positivo de la mutación para garantizar su efectividad.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Agilent SureFISH : Translocation. (2013). Retrieved from <http://www.genomics.agilent.com/surefish-probes.jsp?probeType=Translocation>
- Al-Achkar, W., Wafa, A., Moassass, F., & Othman, M. A. K. (2012). A novel dic (17;18) (p13.1;q11.2) with loss of TP53 and BCR/ABL rearrangement in an Imatinib resistant chronic myeloid leukemia. *Molecular cytogenetics*, 5(1), 36. doi:10.1186/1755-8166-5-36
- Apperley, J. F. (2007). Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *The lancet oncology*, 8(11), 1018–29. doi:10.1016/S1470-2045(07)70342-X
- CCDS Report for Consensus CDS. (n.d.). Retrieved September 27, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=279440&BUILDS=CURRENTBUILDS>
- Chávez-González, M. (2009). La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de Investigación Clínica*, 61(3), 221–232. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2009/nn093f.pdf>
- CSI Laboratories - Testing. (2013). Retrieved from <http://www.csilaboratories.com/Testing/Cytogenetics.aspx>
- Dan Reid, R., & Sanders, N. (2013). Total Quality Management. In *Operations Management* (5a ed., pp. 136–170). Wiley.
- Dekking, E., van der Velden, V. H. J., Böttcher, S., Brüggemann, M., Sonneveld, E., Koning-Goedheer, A., ... van Dongen, J. J. M. (2010). Detection of fusion genes at the protein level in leukemia patients via the flow cytometric immunobead assay. *Best practice & research. Clinical haematology*, 23(3), 333–45. doi:10.1016/j.beha.2010.09.010
- Dhahi, M. A. R., Matti, B. F., & Fadel, S. (2013). Molecular Screening for T315I and F317L Resistance Mutations in Iraqi Chronic Myeloid Leukemia Non-Responders Patients to Imatinib. *Cancer and Clinical Oncology*, 2(2), 55–61. doi:10.5539/cco.v2n2p55
- Dieffenbach, C. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3), S30–S37. Retrieved from <http://genome.cshlp.org/content/3/3/S30.full.pdf>
- Ernst, T., Hoffmann, J., Erben, P., Hanfstein, B., Leitner, A., Hehlmann, R., ... Müller, M. C. (2008). ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 93(9), 1389–93. doi:10.3324/haematol.12964
- Focosi, D. (2013). Homo sapiens diseases - Myeloproliferative neoplasms (MPN). Retrieved from [http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular\\_immunology/pathohomotissueblood\\_MPD.html](http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/pathohomotissueblood_MPD.html)
- Frazer, R., Irvine, A. E., & McMullin, M. F. (2007). Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *The Ulster medical journal*, 76(1), 8–17. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1940291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Galindo Jiménez, L. (2013). *Desarrollo de un RT-PCR multiplex para el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de tipo B (LLA-B) basado en Metodología Taguchi*. UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.
- Green, E. K. (2002). Allele-specific oligonucleotide PCR. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 187, 47–50. doi:10.1385/1-59259-273-2:047
- Greer, J., Foerster, J., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D., & Means, R. (2009). Chronic Myeloid Leukemia. In K. Reichard, R. Larson, & I. Rabinowitz (Eds.), *Wintröbe's Clinical Hematology* (12va ed., pp. 2006–2030).
- Hantschel, O., & Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(1), 33–44. doi:10.1038/nrm1280
- Henkes, M., Van der Kuip, H., & Aulitzky, W. (2008). Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec®, Gleevec™). *Therapeutics and clinical risk management*, 4(1), 163–187. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2503652/>
- Hochhaus, A., Weisser, A., La Rosée, P., Emig, M., Müller, M. C., Saussele, S., ... Cross, N. C. (2000). Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, 14(6), 998–1005. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10865964>
- Iqbal, Z. (2011). Frequency of Bcr-Abl Fusion Oncogene Splice Variants Associated with Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Journal of Cancer Therapy*, 2(2), 176–180. doi:10.4236/jct.2011.22022
- Jabbour, E., Kantarjian, H., Jones, D., Breeden, M., Garcia-Manero, G., O'Brien, S., ... Cortes, J. (2008). Characteristics and outcomes of patients with chronic myeloid leukemia and T315I mutation following failure of imatinib mesylate therapy. *Blood*, 112(1), 53–5. doi:10.1182/blood-2007-11-123950
- Jones, A. V., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L., ... Cross, N. C. P. (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106(6), 2162–8. doi:10.1182/blood-2005-03-1320
- Kang, H., Hwang, J., Kim, S., & Goh, H. (2006). Comparison of allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction and direct sequencing for high throughput screening of ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 91(5), 659–662. Retrieved from <http://www.haematologica.com/content/91/5/659.short>
- Kaushansky, K., Beutler, E., Seligsohn, U., Lichtman, M., Kipps, T., & Prchal, J. (2010). *Williams hematology* (8va ed.).
- Koch, W. H. (2004). Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(9), 749–61. doi:10.1038/nrd1496
- Krishnamurthy, R., & Maly, D. (2010). Biochemical mechanisms of resistance to small-molecule protein kinase inhibitors. *ACS chemical biology*, 5(1), 121–138. doi:10.1021/cb9002656.Biochemical
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., & Aster, J. (2009). Diseases of White Blood Cells, Lymph Nodes, Spleen, and Thymus. In *Robbins & Cotran pathologic basis of disease* (8va ed., pp. 589–638). Barcelona: Elsevier Saunders.

- Kurzrock, R., Kantarjian, H., Druker, B., & Talpaz, M. (2003). Philadelphia chromosome–positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Annals of Internal Medicine*, 138(10), 819–831. Retrieved from <http://annals.org/article.aspx?articleid=716426>
- Kwok, S., Sninsky, J. J., & Wang, A. (1994). A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *Genome Research*, 3, S39–S47. Retrieved from <http://genome.cshlp.org/content/3/4/S39.full.pdf+html>
- Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., & Kurzrock, R. (2001). The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer research*, 61, 2343–2355. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/6/2343.short>
- Liu, Y., & Gray, N. S. (2006). Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature chemical biology*, 2(7), 358–64. doi:10.1038/nchembio799
- Lucas, C. M., Fagan, J. L., Carter, A., Swale, B., Evans, C., Clark, R. E., & Harris, R. J. (2011). Rapid diagnosis of chronic myeloid leukemia by flow cytometric detection of BCR-ABL1 protein. *Haematologica*, 96(7), 1077–8. doi:10.3324/haematol.2011.043166
- Make a Karyotype. (2013). Retrieved from <http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/traits/karyotype/>
- Mayani, H., Flores-Figueroa, E., & Pelayo, R. (2007). Hematopoiesis. *Cancerología*, 2, 95–107. Retrieved from <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1193426538.pdf>
- Melo, J. V., & Barnes, D. J. (2007). Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 7(6), 441–53. doi:10.1038/nrc2147
- Melo, J. V., & Chuah, C. (2007). Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer letters*, 249(2), 121–32. doi:10.1016/j.canlet.2006.07.010
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. a, Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., ... Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell*, 112(6), 859–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654251>
- Navarro Vázquez, M. (2010). Marcadores moleculares de los síndromes mieloproliferativos. *Revista de Hematología*, 11(2), 91–94. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2010/re103f.pdf>
- Nelson, D., & Cox, M. (2008). Nucleotides and nucleic acids. In *Lehninger. Principles of Biochemistry* (5a ed., pp. 271–302). Basingstoke: Omega.
- New England Biolabs. (2013). DNA Amplification & PCR | New England Biolabs. Retrieved from <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>
- Nicolini, Franck E, Mauro, M. J., Martinelli, G., Kim, D.-W., Soverini, S., Müller, M. C., ... Zhou, W. (2009). Epidemiologic study on survival of chronic myeloid leukemia and Ph(+) acute lymphoblastic leukemia patients with BCR-ABL T315I mutation. *Blood*, 114(26), 5271–8. doi:10.1182/blood-2009-04-219410

- Nicolini, Franck Emmanuel, Basak, G. W., Soverini, S., Martinelli, G., Mauro, M. J., Müller, M. C., ... Cortes, J. (2011). Allogeneic stem cell transplantation for patients harboring T315I BCR-ABL mutated leukemias. *Blood*, 118(20), 5697–700. doi:10.1182/blood-2011-07-367326
- Nollau, P., & Wagener, C. (1997). Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clinical Chemistry*, 43(7), 1114–1128. Retrieved from <http://www.clinchem.org/content/43/7/1114.short>
- O'Hare, T., Eide, C. a, & Deininger, M. W. N. (2007). Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 110(7), 2242–9. doi:10.1182/blood-2007-03-066936
- Pane, F., Intrieri, M., Quintarelli, C., & Izzo, B. (2002). BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*, 8652–8667. doi:10.1038/sj.onc.1206094
- Patel, D., Suthar, M., Patel, V., & Singh, R. (2010). BCR ABL kinase inhibitors for cancer therapy. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 2(2), 80–90. Retrieved from <http://www.ijpsdr.com/pdf/vol2-issue2/1.pdf>
- PCR Protocols & Applications. (n.d.). Retrieved September 27, 2013, from <http://www.qiagen.com/Knowledge-and-Support/Spotlight/Protocols-and-Applications-Guide/PCR/?Print=1&currenttab=0>
- Pérez Contreras, V. A. (2012). *Desarrollo y validación de un panel de pruebas moleculares para el diagnóstico por laboratorio de neoplasias mieloproliferativas clásicas*. UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.
- QIAGEN® Multiplex PCR Handbook. (2010). Retrieved from <http://www.qiagen.com/>
- Rao, R. S., Kumar, C. G., Prakasham, R. S., & Hobbs, P. J. (2008). The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnology journal*, 3(4), 510–23. doi:10.1002/biot.200700201
- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis—Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In S. Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis-Principles and Basics* (pp. 315–334). Intech. doi:10.5772/37724
- Roy, R. (1990). *A primer on the Taguchi Method* (1a ed., pp. 1–247). Dearborn: Society of Manufacturing Engineers.
- Salesse, S., & Verfaillie, C. M. (2002). BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*, 21(56), 8547–59. doi:10.1038/sj.onc.1206082
- Savage, D. G., & Antman, K. H. (2002). Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *The New England journal of medicine*, 346(9), 683–93. doi:10.1056/NEJMra013339
- Schindler, T. (2000). Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science*, 289(5486), 1938–1942. doi:10.1126/science.289.5486.1938

- Smith, D., Burthem, J., & Whetton, A. (2003). Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(25), 1–27. doi:<http://dx.doi.org/10.1017/S1462399403006835>
- Tefferi, A., Thiele, J., & Vardiman, J. W. (2009). The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer*, 115(17), 3842–7. doi:10.1002/cncr.24440
- Tefferi, A., & Vardiman, J. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, 22(1), 14–22. doi:10.1038/sj.leu.2404955
- Thanakiatkrai, P., & Welch, L. (2012). Using the Taguchi method for rapid quantitative PCR optimization with SYBR Green I. *International journal of legal medicine*, 126(1), 161–5. doi:10.1007/s00414-011-0558-5
- Thielen, N., Ossenkoppele, G. J., Schuurhuis, G.-J., & Janssen, J. J. W. M. (2011). New insights into the pathogenesis of chronic myeloid leukaemia: towards a path to cure. *The Netherlands journal of medicine*, 69(10), 430–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22058262>
- Tohami, T., Nagler, A., & Amariglio, N. (2012). Laboratory tools for diagnosis and monitoring response in patients with chronic myeloid leukemia. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*, 14(8), 501–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22977971>
- Von Bubnoff, N., Peschel, C., & Duyster, J. (2003). Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (ST1571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia*, 17(5), 829–38. doi:10.1038/sj.leu.2402889
- Walz, C., & Sattler, M. (2006). Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Critical reviews in oncology/hematology*, 57(2), 145–64. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.06.007
- Wandless, T. J. (1996). SH2 domains: a question of independence. *Current biology : CB*, 6(2), 125–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673454>
- 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. *Nature reviews. Cancer*, 7(5), 345–56. doi:10.1038/nrc2126
- Wongboonma, W., Thongnoppakhun, W., & Auewarakul, C. U. (2011). A single-tube allele specific-polymerase chain reaction to detect T315I resistant mutation in chronic myeloid leukemia patients. *Journal of hematology & oncology*, 4, 7. doi:10.1186/1756-8722-4-7