RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

González, Mariana Selene

Diseño y desarrollo de estrategias de análisis molecular de importancia diagnóstica y pronóstica en neoplasias mieloproliferativas crónicas

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
González, M. S. (2013). Diseño y desarrollo de estrategias de análisis molecular de importancia diagnóstica y pronóstica en neoplasias mieloproliferativas crónicas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/566

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

González, Mariana Selena, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Diciembre del 2013, 173 pp.,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Diseño y desarrollo de estrategias de análisis molecular de importancia diagnóstica y pronóstica en neoplasias mieloproliferativas crónicas

TESIS DOCTORAL

Mariana Selena González

marianag6@yahoo.com.ar

Resumen

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPs) son un grupo heterogéneo de patologías hematológicas que se caracterizan por la proliferación de alguno de los linajes mieloides: eritroide, megacariocítico o granulocítico.

Entre las neoplasias mieloproliferativas se encuentra la Leucemia Mieloide Crónica [LMC *BCR- ABL1 (+)*] y las neoplasias mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas clásicas [NMPs *BCR-ABL1* (-)] incluyendo: Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MP).

En este trabajo de Tesis se analizó el perfil de expresión de los genes *BCR-ABL1, BAX, BCL-XL, CAMKIIγ, KI-67, HSP70 y HSP90* en LMC con el objetivo de caracterizar el nivel de transcripción de los mismos y su asociación con resistencia al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa. La expresión de los genes mencionados se realizó a partir de muestras de leucocitos de sangre periférica de 101 pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad: Debut, Fase Crónica en Remisión (FC Rem), Fase Crónica No respondedora (FC No Resp), Fase Avanzada (FA) y en 20 individuos sanos.

Los niveles de transcriptos *BCR-ABL1/ABL1* correlacionan positivamente con las fases de la enfermedad.

Se observó que los pacientes con LMC al diagnóstico, en FC No Resp y en FA presentaban un perfil de expresión génica característico. Observándose que la relación *BAX/BCL-XL* era menor mientras que la expresión de los genes *CAMKIIγ, KI67*, *HSP70 y HSP90* era significativamente mayor al diagnóstico, en FC No Resp y en FA respecto de la FC Rem, indicando que el perfil de expresión de los genes mencionados se asociaría a respuesta al tratamiento y/o factores pronósticos.

Cuando los pacientes en FC No Resp y en FA fueron reagrupados en función de la presencia de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1,* el estudio del perfil transcripcional demostró un aumento de la expresión de los genes *CAMKIIγ* y *HSP70* y una disminución en el nivel de *HSP90* en el grupo de pacientes mutados (MT) respecto del grupo no mutado (WT), mientras que *BCR-ABL1*, *KI67* y la relación *BAX/BCL-XL* no presentaron diferencias. La expresión diferencial de los genes: *CAMKIIγ, HSP70 y HSP90* permitió diseñar un *score* según la fórmula [*CAMKIIγ+HSP70-HSP90*]. Se determinó un punto óptimo de corte (*cut-off: 1,1*) empleando curvas ROC (*receiver operating characteristic*). Valores mayores a 1,1 tienen 6 veces más probabilidades (OR (IC95%)) de presentar mutaciones que valores menores ($p<0.002$). El estudio de los niveles de expresión de los genes *CAMKIIγ*, *HSP70* y *HSP90* y la elaboración del *Score* permitieron realizar un *screening* de mutaciones en forma rápida, específica y costo- efectiva en pacientes resistentes al tratamiento con ITKs.

Respecto a las NMPs *BCR-ABL* (-), éstas se caracterizan por la presencia de una mutación somática adquirida en el exón 14 del gen *JAK2* la cual resulta en una sustitución del residuo valina por el de fenilalanina en la posición 617 (p.617). La mutación $JAK2^{V617F}$ involucra el dominio pseudoquinasa JH2, región que inhibe la actividad quinasa de JAK2 y como resultado, la proteína

JAK2 permanece constitutivamente fosforilada activando distintas vías de señalización. Se ha podido demostrar que debido a un mecanismo de recombinación mitótica se produce pérdida de heterocigosidad a nivel de 9q24 *(LOH*: *Loss: of Heterocygozity*), lo cual determina homocigosidad de la mutación determinando variaciones en la carga alélica. El análisis de la homo o heterocigosidad de la mutación aplicando métodos cuantitativos es un tema de relevancia por sus posibles implicancias clínicas. Por lo tanto el objetivo de este capítulo fué el desarrollo de un constructo molecular que posibilitó una mayor precisión en la cuantificación de la mutación *JAK2*^{V617F}. La utilización de los constructos MT: WT 1:1, permitió reducir los eventuales sesgos en el cálculo de la carga alélica (CAL) de la mutación V617F alrededor del 50%. Se estimó un valor límite (media + 2xDS), a partir de donantes sanos de 3,65% el cual detectó la presencia de la mutación JAK2^{V617F} en las NMPs con mayor sensibilidad que el método cualitativo ARMS-PCR (≥ 6,7%)
La qPCR empleando los constructos moleculares desarrollados, permitió una estimación rápida y precisa de la carga alélica y de la expresión de la mutación JAK2^{V617F} en 19 casos positivos para la mutación, detectando 13 casos con clones homocigotas [CALg ≥ 56,73% (media+SD)]. La carga alélica y el nivel de expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} mostraron una correlación significativa positiva (Spearman r=0,53, p=0,02) en la mayoría de los casos estudiados. Sin embargo en un 22% de los casos se observó un incremento en los transcriptos *JAK2*^{V617F} lo cual podría asociarse a una expresión aumentada o sobreexpresión de la mutación. Estos estudios permiten cuantificar la mutación a nivel genómico y transcripcional lo cual puede tener gran relevancia clínica en las NMPs.

Lugar de realización: Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina (IMEX, CONICET-ANM).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Universidad Nacional de Quilmes

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes.

Mención en Ciencias Básicas y Aplicadas.

"Diseño y desarrollo de estrategias de análisis molecular de importancia diagnóstica y pronóstica en neoplasias mieloproliferativas crónicas"

Licenciada Mariana Selena Gonzalez

Año 2013

Director: Dra. Irene Larripa

Codirectores: Dr. Carlos De Brasi

Dra. Giselle Ripoll

Lugar de realización: Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina (IMEX, CONICET-ANM).

A mis hijos, Violeta y Baltazar

A mi esposo, Nicolás

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo de tesis.

Epecialmente a la Dra. Irene Larripa, por su valiosa dirección que contribuyó a mi formación profesional y personal, por su dedicación y por trasmitirme su gran experiencia.

Al Dr. Carlos De Brasi por aceptar co-dirigir este trabajo de Tesis, por su invaluable e incondicional apoyo, por sus ideas y aportes que contribuyeron en el desarrollo de este trabajo.
A la Dra Giselle Ripoll por ser co-director de este trabajo.

Al Dr. Michele Bianchini por su desinteresada ayuda, por asistirme ante todas mis dudas.

A las Dras. Liliana Rossetti, Irma Slawusky, Ariela Fundia, Susana Acevedo y Marcela Gonzalez Cid por acompañarme en esta etapa de mi formación.

A mis compañeros del Laboratorio: Patricia G, Cristian, Flavia, Natalia, Martin, Marcelo, Alejandro, Ana, Patricia, Leandro, Fernanda, Analía, Jorge, Graciela, Vero, Mica, Jesica y Estela por todos los momentos compartidos, en especial a Juli y Pame por brindarme su amistad apoyándome y escuchándome siempre.

A mi familia, por estar siempre presente a pesar de la distancia, por trasmitirme sus valores y por todo su esfuerzo que hizo posible mi formación.

A mi esposo Nicolás, por acompañarme con amor en todo mometo, por apoyarme siempre y por conpartir su vida conmigo.

A mis hijos Viole y Balti que son la luz de mi vida……..

Agradezco al CONICET y a la ANPCyT, por la beca doctoral que posibilitó el desarrollo de esta tesis. A la UNQ por mi formación de grado y posgrado.

RESUMEN

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPs) son un grupo heterogéneo de patologías hematológicas que se caracterizan por la proliferación de alguno de los linajes mieloides: eritroide, megacariocítico o granulocítico.

Entre las neoplasias mieloproliferativas se encuentra la Leucemia Mieloide Crónica [LMC *BCR-ABL1 (+*)] y las neoplasias mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas clásicas [NMPs *BCR-ABL1* (-)] incluyendo: Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MP).

En este trabajo de Tesis se analizó el perfil de expresión de los genes *BCR-ABL1, BAX, BCL-XL, CAMKIIγ, KI-67, HSP70 y HSP90* en LMC con el objetivo de caracterizar el nivel de transcripción de los mismos y su asociación con resistencia al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa. La expresión de los genes mencionados se realizó a partir de muestras de leucocitos de sangre periférica de 101 pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad: Debut, Fase Crónica en Remisión (FC Rem), Fase Crónica No respondedora (FC No Resp), Fase Avanzada (FA) y en 20 individuos sanos.

Los niveles de transcriptos *BCR-ABL1/ABL1* correlacionan positivamente con las fases de la enfermedad.

Se observó que los pacientes con LMC al diagnóstico, en FC No Resp y en FA presentaban un perfil de expresión génica característico. Observándose que la relación *BAX/BCL-XL* era menor mientras que la expresión de los genes *CAMKIIγ, KI67*, *HSP70 y HSP90* era significativamente mayor al diagnóstico, en FC No Resp y en FA respecto de la FC Rem, indicando que el perfil de expresión de los genes mencionados se asociaría a respuesta al tratamiento y/o factores pronósticos.

Cuando los pacientes en FC No Resp y en FA fueron reagrupados en función de la presencia de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1,* el estudio del perfil transcripcional demostró un aumento de la expresión de los genes *CAMKIIγ* y *HSP70* y una disminución en el nivel de *HSP90* en el grupo de pacientes mutados (MT) respecto del grupo no mutado (WT), mientras que *BCR-ABL1*, *KI67* y la relación *BAX/BCL-XL* no presentaron diferencias. La expresión diferencial de los genes: *CAMKIIγ, HSP70 y HSP90* permitió diseñar un *score* según la fórmula [*CAMKIIγ+HSP70-HSP90*]. Se determinó un punto óptimo de corte (*cut-off: 1,1*) empleando curvas ROC (*receiver operating characteristic*). Valores mayores a 1,1 tienen 6 veces más probabilidades (OR (IC95%)) de presentar mutaciones que valores menores ($p<0.002$). El

estudio de los niveles de expresión de los genes *CAMKIIγ*, *HSP70* y *HSP90* y la elaboración del *Score* permitieron realizar un *screening* de mutaciones en forma rápida, específica y costo-efectiva en pacientes resistentes al tratamiento con ITKs.

Respecto a las NMPs *BCR-ABL* (-), éstas se caracterizan por la presencia de una mutación somática adquirida en el exón 14 del gen *JAK2* la cual resulta en una sustitución del residuo valina por el de fenilalanina en la posición 617 (p.617). La mutación *JAK2*^{V617F} involucra el dominio pseudoquinasa JH2, región que inhibe la actividad quinasa de JAK2 y como resultado, la proteína JAK2 permanece constitutivamente fosforilada activando distintas vías de señalización. Se ha podido demostrar que debido a un mecanismo de recombinación mitótica se produce pérdida de heterocigosidad a nivel de 9q24 *(LOH*: *Loss: of Heterocygozity*), lo cual determina homocigosidad de la mutación determinando variaciones en la carga alélica. El análisis de la homo o heterocigosidad de la mutación aplicando métodos cuantitativos es un tema de relevancia por sus posibles implicancias clínicas. Por lo tanto el objetivo de este capítulo fué el desarrollo de un constructo molecular que posibilitó una mayor precisión en la cuantificación de la mutación *JAK2*^{V617F}. La utilización de los constructos MT: WT 1:1, permitió reducir los eventuales sesgos en el cálculo de la carga alélica (CAL) de la mutación V617F alrededor del 50%. Se estimó un valor límite (media + 2xDS), a partir de donantes sanos de 3,65% el cual detectó la presencia de la mutación JAK2^{V617F} en las NMPs con mayor sensibilidad que el método cualitativo ARMS-PCR (≥ 6,7%)

La qPCR empleando los constructos moleculares desarrollados, permitió una estimación rápida y precisa de la carga alélica y de la expresión de la mutación JAK2^{V617F} en 19 casos positivos para la mutación, detectando 13 casos con clones homocigotas [CALg ≥ 56,73% (media+SD)]. La carga alélica y el nivel de expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} mostraron una correlación significativa positiva (Spearman r=0,53, p=0,02) en la mayoría de los casos estudiados. Sin embargo en un 22% de los casos se observó un incremento en los transcriptos *JAK2*^{V617F} lo cual podría asociarse a una expresión aumentada o sobreexpresión de la mutación. Estos estudios permiten cuantificar la mutación a nivel genómico y transcripcional lo cual puede tener gran relevancia clínica en las NMPs.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ORIGINADA DURANTE EL PERÍODO DE FORMACIÓN DOCTORAL.

Los resultados del presente trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

Publicaciones en revistas científicas:

Gonzalez M, De Brasi C, Ferri C, Bianchini M, Larripa I. CAMKIIγ, HSP70 and HSP90 transcripts are differentially expressed in resistant mutated patients with Chronic Myeloid Leukemia. Paper enviado a la revista Annals Hematology. **Estado**: en revisión.

Gonzalez M, De Brasi C, Bianchini M, Gargallo P, Stanganelli C, Larripa I. Improved diagnosis of the transition to JAK2 V617F homozygosis: the key feature to predict evolution of myeloproliferative neoplasms. Paper enviado a la revista PLOS ONE. **Decisión:** aceptado con correcciones.

Gonzalez M, De Brasi C, Bianchini M, Gargallo P, Moiraghi B, Bengió R, Larripa I. BAX/BCL-XL gene expression ratio inversely correlates with disease progression in chronic myeloid leukemia, Blood Cells Mol. Diseases 2010; 45(3):192-6.

Levy E, Sycz G, Arriaga J, Barrio M, von Euw E, Morales B, González M, Mordoh J, Bianchini M. Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. Innate Immun 2009; 15(2):91-100.

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

Presentaciones a congresos Nacionales:

Gonzalez M, De Brasi C, Bianchini M, Ferri C, Larripa I. Expresión génica de marcadores de resistencia en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC). XX Congreso Argentino de Hematologia, Mar del Plata, Buenos Aires, 18 a 22 de octubre de 2011. Mención al mejor Póster. (Hematologia 15:99,2011 PA203).

Gonzalez M, De Brasi C, Ferri, Bengió R, Bianchini M, Larripa I. Expresión diferencial de marcadores de proliferación celular en leucemia mieloide crónica (LMC). SAIC, Mar del Plata, Buenos Aires, Medicina vol. 70 supl. II-2010, pág. 195.

Ferri C, Cuello T, Bengió R, Gonzalez M, Bianchini M, Larripa I. Detección de mutaciones en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) aplicando High Resolution Melting (HRM)/ ARMS-QPCR. SAIC, Mar del Plata, Buenos Aires, Medicina vol. 70 supl. II-2010, pág. 197.

2°Simposio Latinoamericano de Leucemias Crónicas y Oncohematología pediátrica. 4-5 de noviembre de 2010, Buenos Aires, Argentina.

Gonzalez M, Gargallo P, Bianchini M, Sakman F, Moiraghi B, De Brasi C, Larripa I. Cuantificación de la mutación JAK2 ^{V617F} en pacientes con Sindromes Mieloproliferativos Crónicos *BCR-ABL* negativos. XIX Congreso Argentino de Hematología, Mar del Plata, Buenos Aires, 2009. Hematología vol. 13, número 3, pág. 133, exposición oral número 35.

Gonzalez M, Gargallo P, Bianchini M, Bengió R, De Brasi C, Larripa I. Medicion de la relacion de expresión de genes apoptóticos *BAX/BCL-XL* en pacientes con LMC. SAIC, Mar del Plata, Buenos Aires, Medicina vol. 68 supl. II-2008, pág. 110.

Gargallo P, Gonzalez M, Bianchini M, Mercado Guzmán V, Larripa I. Patrón de expresión de los genes *BMI1* y *PR3* el Leucemia Mieloide Crónica (LMC). SAIC, Mar del Plata, Buenos Aires, Medicina vol. 68 supl. II-2008, pág. 102.

Presentaciones a congresos internacionales:

Gonzalez M, Gargallo P, Bianchini P, De Brasi C, Larripa I. Implicancia pronóstica de los genes *BAX/BCL-XL* en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC). VI Congreso Cubano de Hematología, La Habana, Cuba, 2009.

Gonzalez M, De Brasi C, Bianchini M, Gargallo P, Ferri C, Bengió R, Larripa I. Inverse correlation between BAX/BCL-XL and *BCR-ABL* gene expression in Chronic Myeloid Leukemia. European School of Hematology, (ESH-ICMLF International Conference), 2010.

Subsidios obtenidos:

SUBSIDIO FUNDACION ALBERTO J. ROEMMERS 2009. "Medición de la relación de expresión de genes apoptóticos BAX/BCL-XL en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC)".

INDICE

1. *INTRODUCCIÓN* **1**

1.1. Neoplasia Mieloproliferativa *BCR-ABL1* positiva: Leucemia Mieloide Crónica (LMC) **2**

1.1. 1. Biología de la LMC **2**

1.1.2. Características clínicas de la LMC **3**

1.1.3. Patogénesis de la LMC **4**

1.1.4. Transformación maligna por *BCR-ABL1* **5**

1.1.5. Anatomía molecular de la translocación *BCR-ABL1* **7**

1.1.6. Mecanismos de transformación celular por *BCR-ABL1* **8**

1.1.7. Tirosinas quinasas como targets para la terapia contra el cáncer **11**

1.1.8. Tratamiento convencional de la LMC **13**

1.1.8.1. Terapias pre-imatinib **13**

1.1.8.2. Trasplante de médula ósea **14**

1.1.8.3. Terapias con inhibidores de tirosina quinasa **15**

1.1.9. Predictores de respuesta a Imatinib en pacientes con LMC *de-novo* **17**

1.1.9.1. Scores pronósticos Sokal y Hasford **17**

1.1.9.2. Deleciones del 9q+ **17**

1.1.9.3. Perfiles de expresión génica **18**

1.1.9.4. Sensibilidad intrínseca de los inhibidores de TK **18**

1.1.10. Indicadores de respuesta tempranos **19**

1.1.10.1. Respuesta hematológica **19**

1.1.10.2. Respuesta citogenética **19**

1.1.10.3. Respuesta molecular **19**

1.1.10.4. Estandarización internacional del monitoreo molecular **20**

1.1.11. Falla terapéutica y respuesta subóptima **21**

1.1.12. Resistencia al tratamiento con Imatinib **21**

1.1.13. Mecanismos de resistencia a imatinib dependientes de *BCR-ABL1* **22**

1.1.13.1. Mutaciones en el dominio quinasa de *BCR-ABL1* **22**

1.1.13.2. Amplificación génica de *BCR-ABL1* y sobreexpresión de proteína **24**

1.1.14. Mecanismos de resistencia independientes de *BCR-ABL1* **25**

1.1.14.1. Transportadores de drogas **25**

1.1.14.2. Evolución citogenética **26**

1.1.15. Inhibidores alternativos de *BCR-ABL1* **26**

1.1.16. Expansión desregulada del clon maligno en LMC **27**

1.2. Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1 (-)*] **34**

1.2.1. Policitemia Vera (PV) **35**
1.2.2. Trombocitemia Esencial (TE) **35**
1.2.3. Mielofibrosis Primaria **36**
1.2.4. Genética de las NMPs *BCR-ABL1 (-)* **37**
1.2.5. Otras mutaciones en NMPs *BCR-ABL1 (-)* **39**
1.2.6. Biología de las NMPs *BCR-ABL1 (-)* **40**
1.2.7. Nuevas terapias en MNPs *BCR-ABL1* (-) **43**
2. OBJETIVOS **45**
Capítulo I: Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos (LMC) **46**
Capítulo II: Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1* (-)] **46**
3. MATERIALES Y MÉTODOS **48**
3.1. Población estudiada **49**
3.1.1. Pacientes y controles **49**
3.1.2. Línea K562 ..... **50**
3.2. Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* positivas (LMC) **50**
3.2.1. Tratamientos *in vitro* **50**
3.2.2. Técnicas utilizadas **51**
3.2.2.1. Lisis Celular **51**
3.2.2.2. Extracción de ADN genómico **51**
3.2.2.3. Extracción de ARN total **52**
3.2.2.4. Reacción de retrotranscripción (RT-PCR) **52**
3.2.2.5. PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) **53**
3.2.2.6. Curvas estándar de calibración de los *primers* **54**
3.2.3. Efecto citotóxico de ITKs sobre la línea K562 mediante el ensayo MTT **55**
3.2.4. Detección de apoptosis mediante tinción con Anexina V **56**
3.2.5. Construcción de los plásmidos correspondientes al gen *ABL1* en su versión mutada (MT) y no mutada o *wildtype* (WT) **57**
3.2.5.1. Constructo de referencia *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT **57**
3.2.5.2 Constructo de referencia *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT **60**
3.2.6. Confirmación de la presencia del inserto *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT y *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT mediante análisis de restricción **63**
3.2.7. Confirmación de la presencia de mutaciones en el constructo *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4 MT y su contraparte *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT mediante secuenciación de ADN directa **63**
3.2.8. Detección de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* **63**

3.2.9. Determinación de la temperatura de annealing mediante PCR en gradiente 64
3.2.10. Determinación de la sensibilidad de la ASO-PCR 66
3.2.11. Análisis de mutaciones mediante PCR alelo específica (ASO-PCR) 66
3.3. Neoplasmas Mieloproliferativos *BCR-ABL1* negativos [NMPs *BCR-ABL1* (-)] 68
3.3.1. Construcción de plásmidos de referencia $JAK2^{V617F}$-$JAK2^{Wild\ Type}$ (JAK2MT-JAK2WT) 68
3.3.1.1. Constructo de referencia JAK2 ADNg 1:1 MT:WT 68
3.3.1.2. Constructo de referencia JAK2 ADNc 1:1 MT:WT 71
3.3.2. Clonado de los constructos correspondientes a los genes *ABL1* y *JAK2* 74
3.3.3. Confirmación de la presencia de la mutación $JAK2^{V617F}$ en ambos constructos de referencia, ADNg y ADNc mediante análisis de restricción y secuenciación directa 75
3.3.4. Especificidad de los plásmidos de referencia JAK2 ADNg- y ADNc-MT: WT 1:1 75
3.3.5. PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) 75
3.3.6. Estrategia de cuantificación, formulas y estimación de error 76
3.3.7. Determinación de la mutación V617F mediante ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System)* 77
3.3.8. Análisis estadístico 77
***4. CAPÍTULO I: RESULTADOS* 78**
Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos (LMC) 79
4.1. Optimización de los parámetros de la PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) 79
4.2. Eficiencia de la amplificación QPCR 79
4.3. Reproducibilidad de la PCR cuantitativa 81
4.4. Sensibilidad límite y especificidad de la QPCR 83
4.5. Estudios *in vivo* 85
4.5.1. Detección de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* 85
4.5.2. Expresión diferencial de genes involucrados en procesos de señalización activados por $P210^{BCR-ABL1}$ 86
4.5.3. Perfiles de expresión génica en pacientes con LMC resistentes al tratamiento con ITKs 91
4.6. Estudios *in vitro* 95
4.6.1. Citotoxicidad inducida por ITKs sobre células leucémicas Ph' positivas 95
4.6.2. Apoptosis inducida por ITKs sobre células leucémicas Ph' positivas 96
4.8. Diseño y armado de constructos de referencia correspondientes al gen *ABL1* 96
4.9. Detección de mutaciones en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1* 103
4.10. Determinación de la sensibilidad de la ASO-PCR 105
4.11. Análisis de pacientes mediantes ASO-PCR 107

5. CAPÍTULO I: DISCUSIÓN **..... 109**

Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos (LMC) 110

5.1 Análisis de expresión génica en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) 110

5.2 Búsqueda específica de mutaciones en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1* 119

6. CAPÍTULO II: RESULTADOS **..... 121**

Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1 (-)]*.....122

6.1. Diseño, ensamblado y amplificación de constructos de referencia *JAK2* 1:1 MT: WT para ADNg y ADNc 122

6.2. Especificidad de los plásmidos de referencia *JAK2* ADNg y ADNc MT:WT 1:1 reactividad cruzada de primers oligo-específicos 126

6.3. Estrategia para determinar la carga alélica de la mutación V617F en el gen *JAK2* empleando constructos de referencia 1:1 MT: WT.....127

6.4. Comparación de los resultados cuantitativos por QPCR con los resultados cualitativos por ARMS-PCR 130

6.5. Aplicación de la estrategia desarrollada para la cuantificación de la carga alélica y expresión de *JAK2*^{V617F} a partir de muestras de pacientes con NMPs *BCR-ABL1* (-).....132

7. CAPÍTULO II: DISCUSIÓN **..... 136**

Neoplasias Mieloproliferativos *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1 (-)].* 137

8. CONCLUSIONES **..... 140**

Capítulo I: Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos: Leucemia Mieloide Crónica (LMC) 141

Capítulo II: Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas (NMPs): Desarrollo de nuevos abordajes de cuantificación de la mutación *JAK2*^{V617F} 142

9. *BIBLIOGRAFÍA* 143

1. *Introducción*

Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas

Características generales

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPs) son un grupo heterogéneo de patologías hematológicas que se caracterizan por la proliferación de alguno de los linajes mieloides: eritroide, megacariocítico o granulocítico. La reciente denominación de NMPs (anteriormente denominados síndromes mieloproliferativos) implica que la mieloproliferación deriva de la transformación maligna de una *stem cell* hematopoyética.

La clasificación propuesta por la OMS (Vardiman *et al*, 2009) basada en criterios morfológicos, citoquimicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos, reconoce ocho subtipos de neoplasias mieloproliferativas: Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE), Mielofibrosis Primaria (MP), Leucemia Neutrofílica crónica (LNC), Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC), Mastocitosis Sistémica (MS) y un último grupo de NMPs no clasificables.

1.1. Neoplasia Mieloproliferativa *BCR-ABL1* positiva: Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

1.1. 1. Biología de la LMC

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad maligna con origen en una *stem cell* pluripotente común a las tres series hematopoyéticas: eritrocítica, granulocítica y megacariocítica. Esta patología presenta una expansión anormal de progenitores granulocíticos que si bien circulan prematuramente en sangre periférica (SP) poseen capacidad para madurar. La enfermedad se caracteriza por la presencia de una alteración citogenética denominada cromosoma Filadelfia (Ph') (Rowley *et al,* 1973). Dicha alteración es producto de una translocación balanceada y recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)], que da lugar a la formación de un gen híbrido *BCR-ABL1*, el cual desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad (Faderl *et al*, 1999). Sin embargo, hasta el momento se desconoce tanto el fenómeno mutagénico inicial como los mecanismos moleculares implicados en la aparición del cromosoma Ph'. El agente etiológico que más

claramente se ha relacionado con el desarrollo de las leucemias es la exposición a radiaciones ionizantes (Moloney *et al*, 1987).

La LMC representa el 7%-15% del total de las leucemias de los individuos adultos y su incidencia se estima en un caso nuevo por cada 100.000 habitantes/año. La edad media al debut de la enfermedad se encuentra entre los 50-60 años, con un ligero predominio de varones.

1.1.2. Características clínicas de la LMC

La LMC sigue típicamente un curso evolutivo trifásico: fase crónica (FC), fase acelerada (FAc) y crisis blástica (CB). La mayoría de los pacientes son diagnosticados en una FC estable, caracterizada por una expansión del compartimiento celular mieloide con mantenimiento de la función y diferenciación celular. Las manifestaciones derivadas de la mieloproliferación (leucocitosis, esplenomegalia) son fácilmente controlables con diferentes agentes citostáticos. Después de un tiempo variable, la enfermedad avanza a FAc donde los pacientes presentan un deterioro progresivo de su estado general, con aparición de síntomas constitucionales, dolores óseos persistentes, crecimiento progresivo del bazo y aumento en los recuentos leucocitarios a pesar del tratamiento. Finalmente la enfermedad progresa a la fase terminal o CB, presentando un cuadro de insuficiencia medular, semejante a una leucemia mieloide aguda (70%), o linfoide (25%), o con un fenotipo indiferenciado (5%) (Weisberg *et al,* 2000). En aproximadamente un 5% de los casos la LMC se encuentra en CB en el momento del diagnóstico, lo que sugiere la existencia de una FC subclínica que ha pasado desapercibida.

La CB presenta heterogeneidad clínico-hematológica y pronóstico desfavorable, dado que la supervivencia media desde el diagnóstico de esta fase, es de solo 4 a 5 meses. La crisis blástica se caracteriza por los siguientes síntomas: pérdida de peso, fiebre, sudoraciones nocturnos y dolores óseos. También se observa anemia, complicaciones infecciosas y trombocitopenia. Desde el punto de vista fenotípico, las células blásticas pueden expresar marcadores de cualquier linaje hematopoyético, lo que indica que el clon que da origen a la CB deriva de una célula madre pluripotente muy indiferenciada (Urbano-Ispizua *et al*, 1993).

Los criterios para definir la FAc y la CB propuestos por la organización mundial de la salud (OMS), (Lahaye *et al,* 2005) y por otros investigadores en trabajos previos (Baccarani *et al*, 2006), (Kantarjian *et al*, 2002), (Talpaz *et al*, 2002), (O´Brien *et al,* 2003), (Kantarjian *et al*, 2004), (Rosti *et al*, 2004), (Sawyers *et al*, 2002), (Sureda *et al*, 2003) están enumerados en la tabla 1.

***Tabla 1*.** Criterios propuestos por la OMS y otros investigadores para definir la FAc y CB.

	OMS	Otros criterios
Fase Acelerada (FAc)	*Blastos en SP o MO 10%-19%.	*Blastos en SP o MO 15%-29%; *Blastos más promielocitos en SP o MO >30% (con blastos < 30%).
	*Basófilos en SP ≥ 20%	*Basófilos en SP ≥ 20%
	*Trombocitopenia (plaquetas < $100x10^9$/L) no relacionada con la terapia.	*Trombocitopenia (plaquetas < $100x10^9$/L) no relacionada con la terapia.
	*Trombocitosis (plaquetas > $1000x10^9$/L) refractaria a la terapia.	*No incluido.
	*Incremento del tamaño del bazo y aumento de RGB refractarios a la terapia.	*RGB > $50x\ 10^9$/L, Hto < 25 y trombocitopenia <$100\ x\ 10^9$)/L no controlables con el tratamiento.
	*Evolución citogenética clonal (aparición de anormalidades genéticas adicionales ausentes al debut).	*No incluido.
Crisis Blástica (CB)	*Blastos en SP o MO ≥ 20%. *Proliferación extramedular de blastos. *Grandes focos de blastos en la biopsia de MO.	*Blastos en SP o MO ≥ 30%. *Proliferación extramedular de blastos.

SP: sangre periférica; MO: medula ósea; RGB: recuento de glóbulos blancos; Hto: hematocrito.

1.1.3. Patogénesis de la LMC

La LMC es probablemente la neoplasia hematológica más estudiada. El descubrimiento del cromosoma filadelfia (Ph') en 1960 (Nowell *et al*, 1960), marcó el comienzo de los estudios genéticos en oncohematología y un avance decisivo en el conocimiento de la etiopatogenia de la LMC. Trece años más tarde Rowley (1973) aplicando técnicas de bandeo cromosómico identificó al cromosoma Ph' como el resultado de una translocación balanceada y recíproca entre los cromosomas 9 y 22 [t(9; 22)(q34;q11)]. Diez años después se demostró que esta

translocación involucraba al proto-oncogén *ABL1*, ubicado en el cromosoma 9q34, y un gen, hasta ese momento desconocido, en el cromosoma 22q11, más tarde denominado *BCR* (Groffen *et al*, 1984). Esta translocación fusiona el gen *ABL1 downstream* del gen *BCR* en el cromosoma 22q11, generando un gen de fusión *BCR-ABL1*, que codifica una proteína oncogénica P210 $^{BCR\text{-}ABL1}$ (Bartram *et al*, 1983). Poco después se demostró que esta proteína presentaba actividad tirosina quinasa constitutiva, determinando la transformación celular y proporcionando el fundamento para el desarrollo de inhibidores de tirosina quinasa específicos de uso terapéutico (Anafi *et al*, 1992). Esfuerzos posteriores llevaron al descubrimiento del imatinib cuyo éxito ha cambiado radicalmente el manejo de la LMC y abre un nuevo paradigma en oncología.

1.1.4. Transformación maligna por *BCR-ABL1*

El gen *ABL1* es el homologo humano del oncogén *Abelson Murine Leukemia virus*, (v-abl), (Abelson *et al*, 1970), el cual codifica una tirosina quinasa (Laneuville *et al*, 1995) involucrada en múltiples procesos celulares como reparación del ADN, regulación del ciclo celular y transducción de señales de receptores de la superficie celular. El gen *ABL1* contiene 11 exones y codifica una proteína de 145 kDa que da lugar a dos isoformas como resultado de *splicing* alternativo del primer exón. Estructuralmente, el dominio amino-terminal del *ABL1* incluye dos dominios (SH2 y SH3) que regulan la acción de su dominio catalítico (SH1) (Figura 1). En el centro de la molécula existe una región rica en prolina que le permite interactuar con el dominio SH3 de otras proteínas tales como CRKL (Feller *et al*, 1994). En su extremo carboxi-terminal, se encuentran señales de localización nuclear y motivos de unión a ADN y de unión a actina (McWhirter *et al*, 1993).

La proteína normal ABL1 se localiza en el núcleo y en el citoplasma donde participa principalmente en el proceso de mielopoiesis, controla la respuesta celular al *estress* genotóxico y está involucrada en la trasmisión de información a traves de señales de integrinas (Lewis *et al*, 1998). La proteína ABL1 reúne señales de varias fuentes intra y extracelulares que regulan el ciclo celular y apoptosis (Sawyers *et al*, 1994).

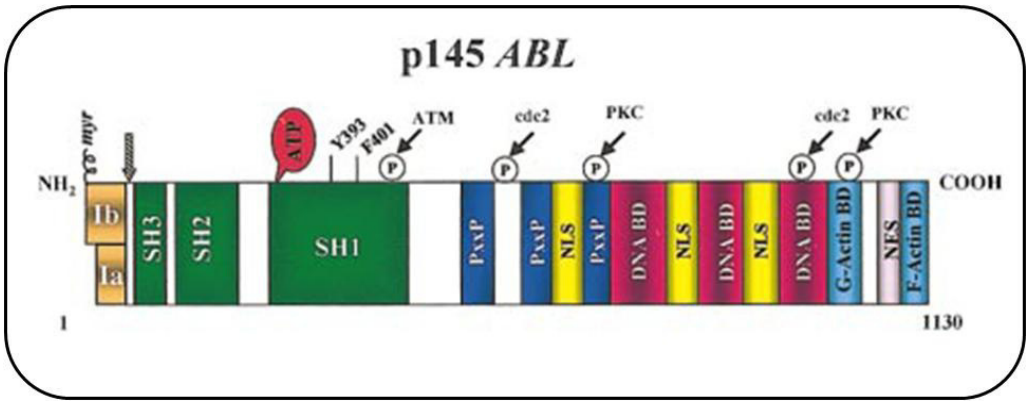


Figura 1. Estructura de la proteína ABL1. La isoforma 1a es ligeramente más corta que la isoforma 1b la cual contiene el sitio de unión a la membrana plasmática (myr). Y393 es el sitio de autofosforilación principal en el dominio quinasa, la fenilalanina 401 (F401) está altamente conservada en TKs que contienen dominios SH3. En la región media de la proteína existen regiones ricas en prolina (PXXP) capaces de unirse a dominios SH3, y contiene una de las tres señales de localización nuclear (NLS). La región carboxi-terminal contiene el dominio de unión a ADN, así como dominios de unión a G-actina y F-actina (Deininger *et al*, 2000).

Por su parte, el gen *BCR* se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11), comprende 23 exones y codifica la síntesis de una proteína de 160 kDa (Figura 2). La proteína BCR se expresa en múltiples tejidos humanos y el hecho que se localice en el citoplasma de células quiescentes o en el núcleo de células en mitosis sugiere su posible función en la regulación del ciclo celular (Wetzler *et al*, 1995).

El primer exón confiere la actividad serina treonina quinasa del *BCR*. Un dominio *de* oligomerización (DD) en el N-terminal permite la formación de dímeros proteicos *in vivo* (McWhirter *et al*, 1993). El centro de la molécula contiene una región con dominios que estimulan el intercambio de GTP por GDP.

El extremo carboxi-terminal contiene la actividad GTPasa para RAC, una pequeña molécula de la familia RAS, que regula la polimerización de actina y la actividad de NADH oxidasa en células fagocíticas (Diekmann *et al*, 1991, 1995). Además BCR puede ser fosforilado en varios residuos tirosina especialmente en la tirosina 177, la cual se une a GRB-2, una importante molécula adaptadora involucrada en la activación de la vía RAS (Ma *et al,* 1997).

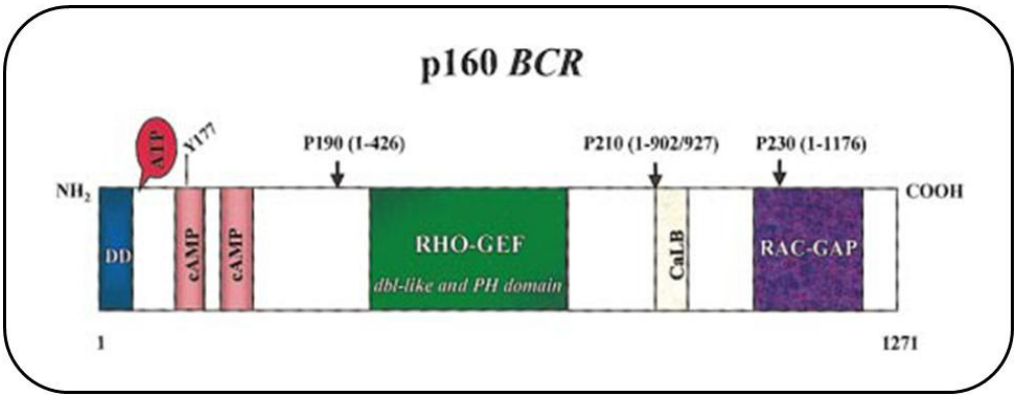


Figura 2. Estructura de la proteína BCR. En el extremo N-terminal se encuentran el dominio de dimerización (DD) y 2 dominios AMPcíclico. Y177 es el sitio de autofosforilación, crucial para la unión de GRB-2. El centro de la molécula contiene homología con el factor RHO de intercambio de nucleótidos guanina (RHO-GEF) además de dominios con homología a pleckstrina y DBL. En el extremo C-terminal existe un sitio de unión a lípidos dependiente de calcio (CaLB) y el dominio activador para RAC-GTPasa (RAC-GAP). Las flechas indican la posición de los *breakpoints* en la proteína de fusión BCR-ABL1. (Deininger *et al*, 2000).

1.1.5. Anatomía molecular de la translocación *BCR-ABL1*

La t (9; 22) (q34; q11.2) yuxtapone las secuencias 3´del gen *ABL1* (9q34) a la región 5´del gen *BCR* (22q11.2) (Groffen *et al*, 1984), (Heisterkamp *et al*, 1985). Este reordenamiento resulta en la formación de un gen híbrido *BCR-ABL1* que codifica una proteína quimérica anómala P210 BCR-ABL1.

El punto de ruptura del gen *ABL1* ocurre generalmente 5´(centromérico) al exón 2, de modo que los exones 2 a 11 (a2-a11) son transferidos a una región de 5,8 Kb del gen *BCR*, denominada *major breakpoint cluster region* (M-bcr), concretamente entre los exones 12 y 16 de *BCR* (también identificados como b1-b5) (Figura 3). De acuerdo al punto de ruptura ocurrido en el gen *BCR* se forman los genes de fusión b2a2 (e13a2) o b3a2 (e14a2), que a su vez transcriben un ARNm de 8,5 Kb que codifica la proteína $P210^{BCR\text{-}ABL1}$ (de 210 kDa). Los reordenamientos b2a2 y b3a2 se observan en más del 85% de los pacientes con diagnóstico de LMC. Una pequeña proporción de pacientes con LMC presentan reordenamientos *BCR-ABL1* con punto de ruptura en BCR entre los exones 1 y 2, en un área denominada *minor breakpoint cluster region (m-bcr*) (Melo *et al*, 1994) que da origen a un transcripto de tipo e1a2 que sintetiza una proteína de 190 kDa denominada $P190^{BCR\text{-}ABL1}$. Este tipo de reordenamiento es

infrecuente en LMC, pero se observa en un 60% de los casos de leucemia linfoblástica aguda Ph' positiva (Melo *et al*, 1996).

Una tercera región de ruptura del *BCR* fue identificada *downstream* del exón 19, dando lugar a un reordenamiento e19a2, denominada µ-bcr que codifica una proteína de 230 kDa ($P230^{BCR-ABL}$) que se asocia generalmente con Leucemia Neutrofílica Crónica Ph' positiva (Pane *et al*, 1996).

La primera evidencia que el cromosoma Ph´ es suficiente para iniciar la LMC, surge de experimentos en ratones, a los cuales previamente se les ha erradicado su propia médula ósea por irradiación y posteriormente se los ha transplantado con médula ósea transfectada con un retrovirus que lleva el reordenamiento *BCR-ABL1*. Los ratones luego de este procedimiento desarrollan una enfermedad mieloproliferativa muy similar a la LMC del humano (Daley *et al*, 1990), (Chalandon *et al*, 2005).

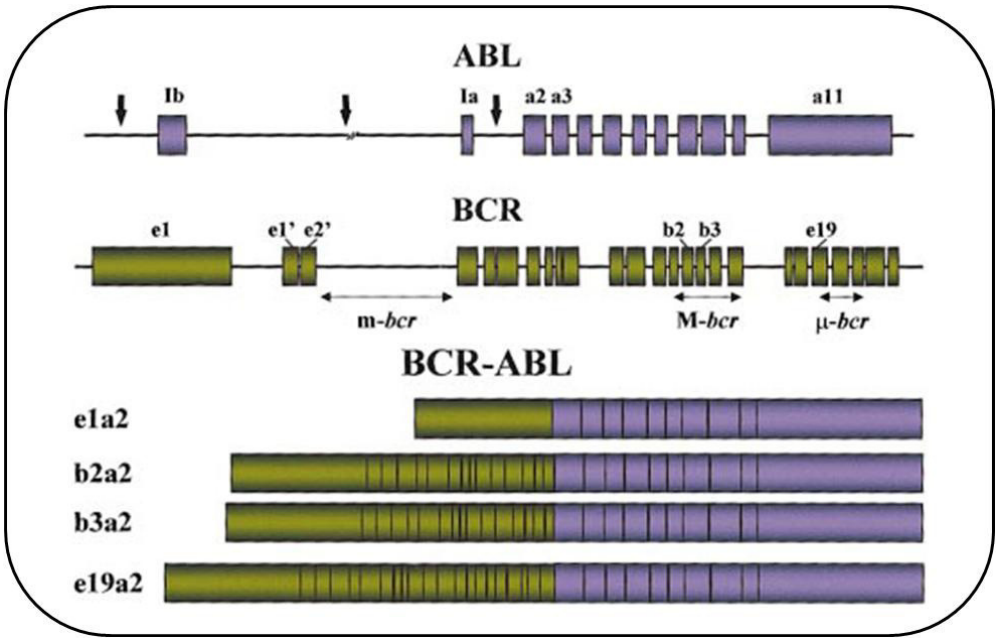


Figura 3. Localización de los puntos de ruptura (*breakpoints*) en los genes *ABL1* y *BCR*. Estructura de los mRNA derivados de las diferentes fusiones. (Deininger *et al*, 2000).

1.1.6. Mecanismos de transformación celular por *BCR-ABL1*

En células que expresan *BCR-ABL1* son fosforiladas múltiples tirosinas, incluyendo proteínas adaptadoras como SHC, proteínas del citoesqueleto como paxilina, tensina y factores de

transcripción como STAT5. La fosforilación constitutiva de los factores de transcripción STAT (STAT1 y STAT5) se ha reportado en varias líneas celulares *BCR-ABL1* positivas (Llaria *et al*, 1996), la activación de STAT5 contribuye a la transformación maligna. El efecto de STAT5 en células transformadas es principalmente antiapoptótico e involucra la activación transcripcional de *BCL-XL* (Horita *et al*, 2000).

La autofosforilación del propio BCR-ABL1 (Goss *et al*, 2006), genera sitios de unión en BCR-ABL1 que permiten la unión de proteínas adaptadoras como GRB2 y CRKL, que a su vez, reclutan otras moléculas como GAB2 y la subunidad regulatoria P85 de *phosphatidyl inositol 3 quinase* (PI3K). El resultado, es la formación de complejos de señalización multiméricos que son mantenidos principalmente por interacciones dependientes de fosfotirosinas. BCR-ABL1 activa múltiples vías tales como MAPK y PI3K/AKT/mTor (Melo *et al*, 2004). El resultado es la inhibición de la apoptosis, proliferación aumentada y perturbación de las propiedades de adhesión celular al estroma de la médula ósea y matriz extracelular (Deininger *et al*, 2005). Las β-integrinas poseen un importante rol en la interacción entre el estroma y las células progenitoras. Las células leucémicas expresan una variante β1 inhibitoria de la adhesión celular que no se encuentra en progenitores normales (Zhao *et al*, 1997). Tras la unión a sus receptores, las integrinas son capaces de iniciar una cascada de transducción de señales del exterior al interior de la célula (Lewis *et al*, 1996), en LMC la transferencia de señales que normalmente inhiben la proliferación está alterada.

CRKl es una de las principales tirosina fosforilada, está involucrada en la movilidad (Uemura *et al*, 1999) y en la adhesión celular mediada por integrinas (Sattler *et al*, 1996) vía su asociación con otras proteínas de adhesión focal tales como paxilina, FAK, P130CAS (Salgia *et al,* 1996) y HEF1 (Sattler *et al*, 1997). También existen evidencias de que la quinasa BCR-ABL1 afecta la reparación del ADN e induce inestabilidad genómica por una variedad de mecanismos (Skorski *et al*, 2002).

La actividad quinasa de PI3K es requerida para la proliferación de células BCR-ABL1 positivas (Skorski *et al*, 1995). BCR-ABL1 forma complejos multiméricos con la quinasa PI3K, CBL y las moléculas adaptadoras CRK y CRKL. El siguiente sustrato en esta cascada es la serina treonina quinasa AKT (Skorski *et al*, 1997). Existen evidencias que la proteína BAD podría ser un posible sustrato de AKT (del Peso *et al*, 1998).

La autofosforilación de la tirosina 177 provee un sitio para la molécula adaptadora GRB2, la cual luego de unirse a la proteína SOS, estabiliza RAS en su forma activa unida a GTP. Otras dos

moléculas adaptadoras, SHC y CRKL, también pueden activar RAS. Ambas son sustrato de BCR-ABL1 (Pelicci *et al*, 1995) y se unen a BCR-ABL1 por sus dominios SH2 (SHC) o SH3 (CRKL). La vía RAS está constitutivamente activada y no son necesarias mutaciones adicionales. La estimulación de receptores de citoquinas tales como IL-3, lleva a la activación de RAS y el subsecuente reclutamiento de la serina treonina RAF a la membrana celular (Marais *et al*, 1995). RAF inicia una cascada de señalización a través de la serina treonina MEK1/MEK2 y ERK, que desencadenan la transcripción (Cahill *et al*, 1996). La activación de la vía JNK/SAPK por BCR-ABL1 es necesaria para la transformación maligna (Raitano *et al*, 1995).

Estas vías de transducción de señales, operadas por BCR-ABL1, ofrecen potenciales *target* de drogas algunas de las cuales se están evaluando en ensayos clínicos. En la figura 4 se esquematizan las principales vías de señalización desencadenadas por BCR-ABL1.

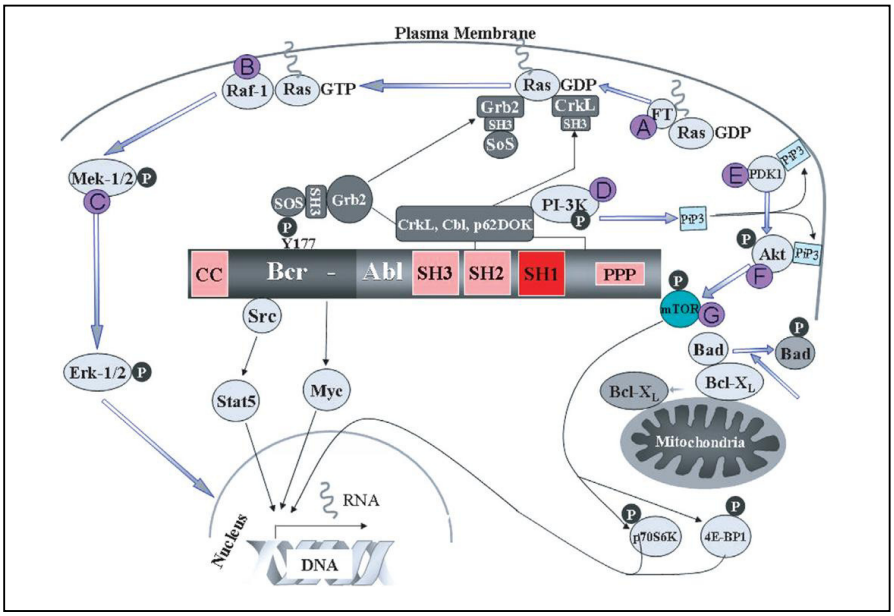


Figura 4. Vías de transducción de señales en células transformadas por *BCR-ABL1*. El dominio SH1 (quinasa) en ABL1 es esencial para la transformación. El dominio CC de BCR media la dimerización. Los dominios SH2, SH3 y la región rica en prolina (PPP) media la unión a proteínas adaptadoras incluyendo CRKL, P62DOK, entre otras, resultando en la formación de un complejo multiproteico. Muchas vías son activadas, incluyendo RAS/MAP quinasa, PI3K, STAT5 y MYC. El efecto final es la inhibición de la apoptosis, aumento de la proliferación, perturbación de las propiedades del estroma medular e inestabilidad genómica. Muchas de las moléculas implicadas son potenciales blancos de drogas. (A) Farnesil transferasas (FT) que media la unión de Ras a la membrana celular fundamental para la activación de RAF; (B) RAF, serina quinasa que activa la vía MAP quinasa; (C) MAP quinasa; (D) PI3K, produce 3,4,5 fosfatidil inositol (PiP3) requerido para la localización de AKT al interior de la membrana; (E) PDK1 activa AKT; (F) AKT activa mTOR; (G) mTOR fosforila y activa dos reguladores de la transcripción génica en respuesta a estímulos de crecimiento. (Deininger et al, 2004).

1.1.7. Tirosinas quinasas como targets para la terapia contra el cáncer

Las proteínas tirosina quinasas (TK) son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato del ATP a residuos tirosina en los polipéptidos. El genoma humano contiene alrededor de 90 genes de TK, cuyos productos regulan la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, función y movilidad.

Las TKs se dividen principalmente en dos grupos: receptoras y no receptoras. Las receptoras son proteínas transmembrana que poseen un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio quinasa catalítico intracelular, mientras que las no receptoras carecen de dominio transmembrana y se encuentran en el citosol, núcleo o en la superficie interna de la membrana plasmática. El dominio quinasa de todas las TKs tiene un lóbulo con un extremo N-terminal que une ATP y magnesio, un lóbulo C-terminal conteniendo el *loop* de activación, y una grieta entre ambos donde se unen los sustratos polipeptídicos.

En ausencia de ligando, las TKs receptoras se encuentran desfosforiladas y son monoméricas y la conformación de su dominio quinasa está inactiva. En algunos TKs receptoras la región juxtamembrana citoplasmática inhibe la enzima interactuando con el dominio quinasa (Griffith *et al*, 2004). Las TKs receptoras se activan por la unión del ligando al dominio extracelular, resultando en una oligomerización del receptor, disrupción de la interacción autoinhibitoria juxtamembrana y autofosforilación de la tirosina regulatoria dentro del *loop* de activación de la quinasa (figura 5). Estos cambios reorientan residuos de aminoácidos críticos, incrementando la actividad catalítica de la enzima. Luego de la activación, la autofosforilación genera sitios de unión para proteínas de señalización, reclutándolas a la membrana y activando múltiples vías de señalización (Schlessinger *et al*, 2000).

Las TK no receptoras, se mantienen en estado inactivo por lípidos y proteínas inhibitorias o a través de una autoinhibición intramolecular (Van Etten *et al*, 2003). Se activan por diversas señales intracelulares, como reclutamiento de receptores transmembrana (causando oligomerización y autofosforilación) o por *trans*-fosforilación de quinasas. La señalización por tirosinas quinasas es finalizada en parte, por acción de tirosinas fosfatasas que hidrolizan los fosfatos tyrosyl y por inducción de moléculas inhibitorias.

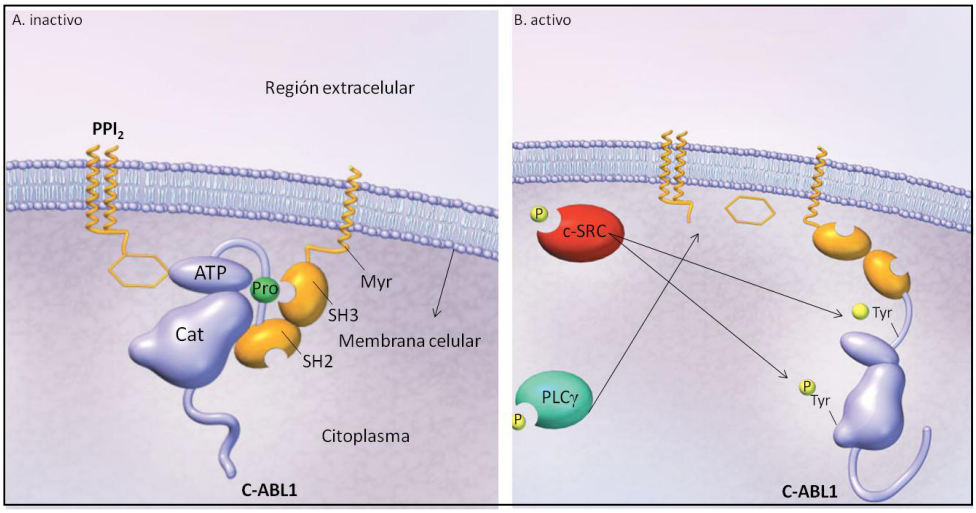


Figura 5. Mecanismo de activación de TKs normal. Típica TK no-receptora (c-ABL) con un dominio de unión a ATP y un dominio catalítico (Cat). Panel A, quinasa en su estado inactivo. El c-ABL1 inactivo se asocia con la membrana a través de su unión covalente a un grupo n-miristilo (Myr) y está inhibido por interacción intramolecular del dominio SH3 con un residuo prolina adyacente (Pro) y por interacción directa del dominio catalítico con un lípido de membrana inhibitorio, phosphatidylinositol-4,5-biphosphate o (PPI_2). Panel B. c-ABL1 es activado por la fosforilación de dos tirosinas regulatorias, una en el *loop* de activación y la otra cerca del dominio SH3, las cuales pueden ser fosforiladas por otras tirosina quinasas como c-SRC. Además la fosfolipasa Cγ (PLCγ) activada puede hidrolizar y destruir el lípido inhibidor PPI_2. (Krause et al, 2005).

Dado los múltiples niveles de regulación de las TKs, no es sorprendente que estén desreguladas en una célula tumoral. Un mecanismo común de activación de TKs en neoplasias hematológicas es la fusión de un receptor o un no receptor de TK con una proteína *partner*, usualmente como consecuencia de una translocación cromosómica balanceada. Una característica de esta proteína *partner* es un dominio que causa oligomerización constitutiva de la TK en ausencia de unión del ligando o señales fisiológicas activadoras, promoviendo de esta manera, la autofosforilación y activación. Un ejemplo de este mecanismo es representado por *BCR-ABL1* (TK no receptora), donde un dominio de dimerización en BCR supera la autoinhibición de la actividad catalítica de ABL1 por oligomerización y autofosforilación (Smith *et al*, 2003).

Las TKs pueden ser inhibidas farmacológicamente por múltiples mecanismos (figura 6). El objetivo del descubrimiento de drogas anti-TKs es encontrar una molécula pequeña que inhiba directamente la actividad catalítica de la quinasa interfiriendo con la unión del ATP. Otras drogas anti TKs podrían inhibir la activación de la TK por bloqueo de su dimerización. La estabilidad de algunas TKs está regulada por su unión a proteínas del *shock* térmico (como

HSP90) por lo tanto los inhibidores de HSP90 pueden interrumpir su unión determinando degradación de BCR-ABL1.

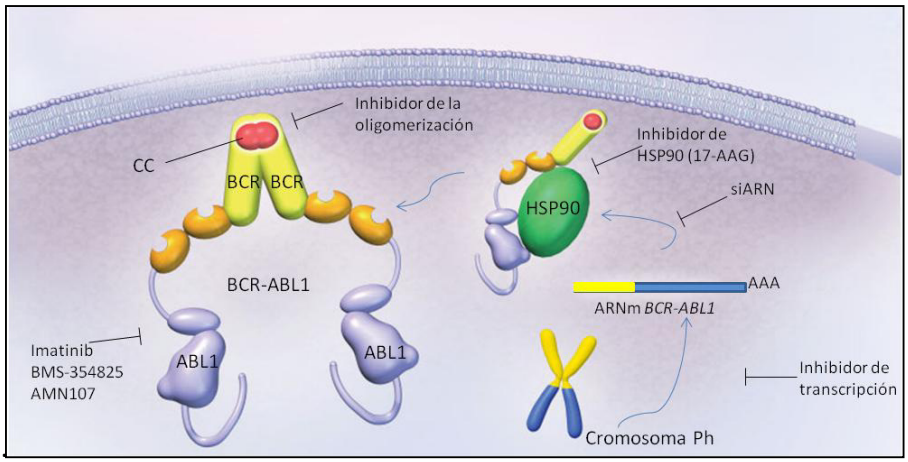


Figura 6. Fusión de TKs no receptoras ejemplificado por BCR-ABL1. Una característica común de las proteínas *partner* es un dominio que media la oligomerización como el dominio *coiled-coil* de BCR (CC). En la figura se mencionan ejemplos de blancos terapéuticos. Los inhibidores de TK usualmente bloquean la unión del ATP o del sustrato al dominio catalítico de la TK. BCR-ABL1 podría además, ser inhibido por compuestos tales como 17-AAG, que interfiere con la unión de chaperonas moleculares como HSP90. Otra estrategia es la utilización de compuestos que bloqueen la oligomerización, por *small interfering RNA* (siRNA) que inducen degradación del ARNm de *BCR-ABL1*; o por inhibidores de la transcripción de *BCR-ABL1*. (Krause et al, 2005).
17-AAG: 17-allylaminogeldanamicyna

1.1.8. Tratamiento convencional de la LMC

Los objetivos actuales del tratamiento en LMC son mantener la remisión y prevenir la progresión de la enfermedad a fase acelerada (FAc) o crisis blástica (CB) con mínima toxicidad relacionada con la terapia.

1.1.8.1. Terapias pre-imatinib

El primer tratamiento efectivo para la LMC fue la solución de Fowler (siglo XIX) que contenía arsénico como componente activo. Con el advenimiento de la radioterapia, la radiación esplénica se hizo popular entre 1920-1930, tratamiento que aliviaba la sintomatología pero no prolongaba la sobrevida.

El primer compuesto sintético con actividad en LMC fue el busulfán, un agente alquilante con gran eficacia para controlar el recuento de glóbulos blancos (RGB) durante períodos prolongados. Sin embargo, los pacientes progresaban a fases avanzadas con una supervivencia media de 45 meses.

Otro compuesto empleado fue la hidroxiurea, que provee un control a corto tiempo del RGB y del tamaño del bazo. Los pacientes progresaban a FAc y CB con una supervivencia media de 58 meses.

Si bien estos tratamientos lograban remisiones hematológicas en el 40%-50% de los casos, desde el punto de vista citogenético la mayoría de los pacientes no eliminaban las células Ph' positivas de la medula ósea y la progresión leucémica era inevitable (Kantarjian *et al*, 1993).

La primera droga que fue capaz de incrementar el período de tiempo durante el cual el paciente podía permanecer en fase crónica fue el interferón-α (INFα). El INFα es un estimulante del sistema inmune que activa las células T. Esto produce una respuesta hematológica completa (RHC) en el 40% a 80% de los pacientes y una respuesta citogenética completa (RCC) en el 10% a 15% de los pacientes. Esta respuesta se traduce en una supervivencia media de más de 89 meses. Como el INFα es un inmunoestimulante no específico, produce síntomas gripales, excesiva fatiga y en algunos pacientes, depresión. Un incremento moderado en la eficacia fue observado al combinar INFα con bajas dosis de citarabina, sin embargo, el curso de la enfermedad no fue diferente del observado en el tratamiento con INFα solo.

1.1.8.2. Trasplante de médula ósea

El trasplante alogénico de médula ósea (TAMO) es un tratamiento potencialmente curativo para la LMC. La elegibilidad del paciente para el procedimiento se basa en la identificación de un donante adecuado, edad del paciente y duración de la enfermedad. El paciente debe ser menor de 60 años. Como la edad media al diagnóstico es de 53 años, muchos pacientes no cumplen con este requisito para que el TAMO sea una opción de tratamiento viable al momento del debut de la enfermedad. Si el trasplante se realiza utilizando un hermano compatible, las chances de supervivencia libre de enfermedad a largo plazo son de 50% a 75% (Clift *et al*, 1994). Si el dador no está relacionado, las chances de supervivencia libre de enfermedad son de 40% a 50%, con un incremento en el riesgo de mortalidad temprana y reacción injerto contra huésped (GVHD) (Kernan *et al*, 1993).

1.1.8.3. Terapias con inhibidores de tirosina quinasa

A partir de la década de 1980, los científicos de Ciba Geigy (ahora Novartis) iniciaron proyectos con el objetivo de identificar compuestos con actividad inhibidora contra proteínas quinasas.

Uno de los proyectos se centraba en la inhibición de la proteína quinasa C, que en ese momento se creía que era crítica para la patogénesis de diversos tumores malignos. Este proyecto condujo a la identificación de un derivado de la 2-fenilaminopirimidina. Este compuesto tenía actividad inhibitoria débil y baja especificidad, inhibiendo tirosinas, serinas y treoninas quinasas con la misma potencia, pero sirvió como punto de partida para la síntesis de otros compuestos relacionados. Sustituciones específicas redujeron la actividad contra serinas/treoninas quinasas, incrementando la actividad contra tirosinas quinasas y mejoraron la actividad intracelular y solubilidad en agua. El resultado final fue un compuesto inicialmente llamado CGP57148, luego STI571, y finalmente mesilato de imatinib (Glivec®, Gleevec ^{TM}).

Mecanismo de acción: En general, los receptores de tirosina quinasa presentan una estructura bilobulada muy conservada. Estos lóbulos están conectados a través de una cadena peptídica única denominada *hinge* o *linker* que actúa como una bisagra permitiendo la rotación de los lóbulos durante la unión del ATP y/o sustratos. En la interfase entre los dos lóbulos, hay una serie de residuos altamente conservados que forman el sitio de unión del ATP (*P-loop*) y el sitio catalítico (*c-loop*).

El estado activo e inactivo de las quinasas depende de la posición del *loop* de activación (*A-loop*). En las quinasas activas, el *A-loop* está en una conformación abierta porque se aleja del centro catalítico. Los tres residuos N-terminales del *A-loop* (aminoácidos 381-383) contienen un motivo DFG (acido aspártico-fenilalanina-glicina) estrictamente conservados, los cuales son cruciales para la actividad catalítica. El ácido aspártico 381 se une a Mg^{+2} y coordina los grupos fosfatos provenientes del ATP. La porción C-terminal del *A-loop* sirve de plataforma para la unión de los sustratos.

La conformación activa del *A-loop* está muy conservada entre las quinasas, pero las conformaciones inactivas (cerradas) difieren entre sí. Estas distintas conformaciones inactivas son las responsables de la selectividad y especificidad del mesilato de imatinib. El cambio conformacional crítico entre la quinasa activa o inactiva, involucra una rotación de 180º del residuo ASP381 del motivo DFG. Esta conformación constituye la forma inactiva que presenta

elevada afinidad por el imatinib. Contrariamente en la conformación activa el residuo ASP381, se ubica dentro del canal de entrada del imatinib, obstaculizando su unión (Figura 7).

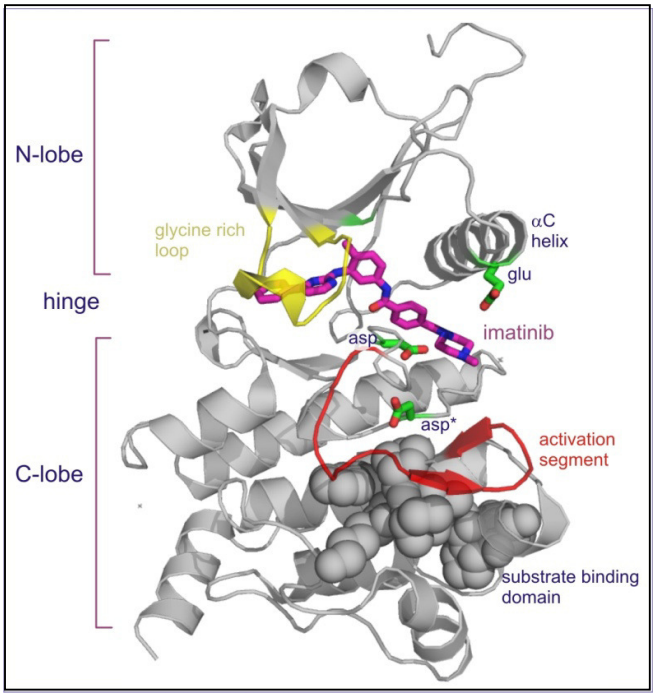


Figura 7. Estructura cuaternaria de la tirosina quinasa P210 $^{BCR-ABL1}$ en su conformación inactiva unida a imatinib. Motivo DFG del *loop* de activación: D381 (Aspártico), F382 (Fenilalanina), G383 (glicina).

El mesilato de imatinib, es un inhibidor específico de varias TKs, principalmente ABL1, ARG, c-KIT, y PDGFR, e induce remisión hematológica y citogenética en la mayoría de los pacientes con LMC en fase crónica, pero es mucho menos efectivo en fase acelerada y blástica. El mesilato de imatinib, se une a BCR-ABL1 y bloquea su función. BCR-ABL1 fosforila otras proteínas, activándolas. Estas proteínas, a su vez activan otras proteínas, creando una cascada de activación que resulta en un crecimiento descontrolado. Para activar estas proteínas *downstream*, BCR-ABL1 requiere ATP, el cual dona grupos fosfato. El ATP tiene un sitio de unión especial en BCR-ABL1 cercano al lugar de unión de proteínas sustrato (Figura 8A) (Goldman *et al*, 2001). Si el sitio de unión del ATP está ocupado por el inhibidor, no se produce la fosforilación y BCR-ABL1 ya no puede activar proteínas de señalización *downstream* que promueven la división celular (Figura 8B). La progresión de la enfermedad es controlada mediante el bloqueo del sitio de unión al ATP.

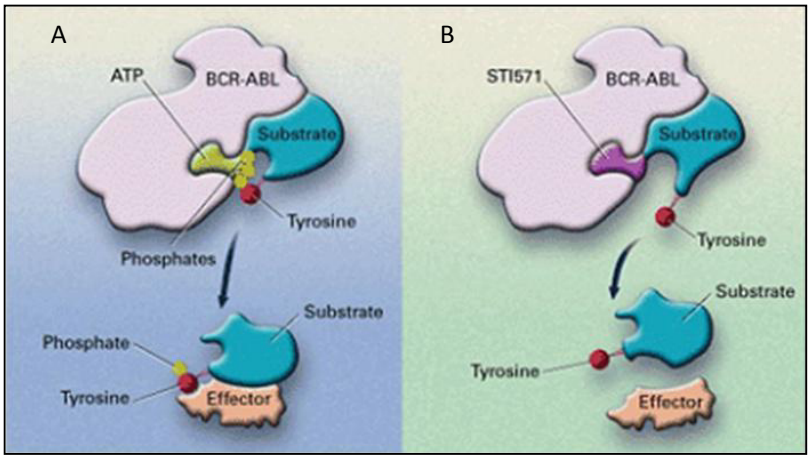


Figura 8. Modelo del mecanismo de interacción de imatinib con la proteína oncogénica BCR-ABL1. ATP: adenosina tri-fosfato; STI571: imatinib. (a) Panel izquierdo: el ATP se une a BCR-ABL1 resultando en la fosforilación de una tirosina en el sustrato. Luego, el sustrato es capaz de interactuar con proteínas efectoras. (b) Panel derecho: EL imatinib se une a BCR-ABL1. La tirosina no es fosforilada y el sustrato no puede interactuar con proteínas efectoras (Goldman *et al*, 2001).

1.1.9. Predictores de respuesta a Imatinib en pacientes con LMC *de-novo*

1.1.9.1. Scores pronósticos Sokal y Hasford

A pesar que las características moleculares en los pacientes con LMC son similares, la enfermedad es heterogénea. En 1987, Sokal y colaboradores fueron capaces de clasificar los pacientes con LMC tratados con busulfán, en tres grupos pronósticos empleando criterios definidos al diagnóstico (edad, grado de trombocitosis, tamaño del bazo y porcentaje de blastos en sangre periférica), y en 1998 Hasford y colaboradores llevaron a cabo un ensayo similar (incorporando porcentaje de eosinófilos y basófilos en sangre periférica) con pacientes tratados preferentemente con INF-α.

1.1.9.2. Deleciones del 9q+

La translocación recíproca t(9;22) da origen también a un gen quimérico de tipo *ABL1-BCR* en el cromosoma 9 derivado, der(9) (Melo *et al,* 1996). Cabe destacar, que aunque es posible detectar ARNm *ABL1-BCR* en un 60% de los casos de LMC, no se ha demostrado ninguna proteína ABL1-BCR viable, por lo que se desconoce el papel de estos transcriptos en la patogénesis de la enfermedad. En cambio, se ha demostrado el significado pronóstico desfavorable que conlleva la existencia de deleciones submicroscópicas sobre el der (9), presentes en un 10%-20% de los pacientes al diagnóstico de la LMC (Sinclair *et al*, 2000). Estas

deleciones parecen producirse de forma simultánea con la formación del cromosoma Ph', afectando a secuencias adyacentes al punto de ruptura en el der (9). Pueden ser extensas, dando lugar a pérdidas de hasta 5,5 megabases (Mb) y 17 Mb en el cromosoma 9 y en el segmento translocado del cromosoma 22 respectivamente. Si bien se ha postulado que la consecuencia biológica de las deleciones en el cromosoma 9q sería la pérdida de uno o más genes supresores de tumor, se desconoce todavía cuál de los aproximadamente 300 genes potencialmente implicados conferiría el pronóstico desfavorable asociado a esta alteración citogenética.

1.1.9.3. Perfiles de expresión génica

El potencial para identificar vías de señalización y genes desregulados, en células primarias de pacientes con LMC ha estimulado a varios grupos de investigación a realizar estudios de *microarrays* empleando células de sangre periférica o médula ósea. Hay expectativas de que estos estudios podrían aportar un perfil específico para cada paciente, predictivo de respuesta y toxicidad, permitiendo realizar un estudio terapéutico personalizado.

1.1.9.4. Sensibilidad intrínseca de los inhibidores de TK

La sensibilidad intrínseca de las células de LMC al imatinib se define como la concentración de imatinib necesaria para reducir al 50%, *in vitro*, la actividad quinasa de BCR-ABL1 ($IC50^{imatinib}$) o también puede estimarse evaluando la reducción de la viabilidad celular en un 50%. Existe una variabilidad significativa en los valores de IC50 en células mononucleares tomadas de pacientes con LMC antes de comenzar la terapia. La variabilidad en la sensibilidad al imatinib es relevante biológicamente porque pacientes con alta sensibilidad intrínseca (*low* IC50) tienen superior respuesta molecular (White *et al*, 2005). Parece que las diferencias en los valores de $IC50^{imatinib}$ son principalmente debidas a diferencias en la eficiencia de internalización y retención del imatinib. Mayores concentraciones de imatinib son necesarias en pacientes con alta IC50 (White *et al*, 2006). La captación de imatinib por las células depende de una bomba activa de influjo mediada principalmente por OCT-1 (Thomas *et al*, 2004).

1.1.10. Indicadores de respuesta tempranos

1.1.10.1. Respuesta hematológica

El logro de respuesta hematológica completa (RHC) es un pre-requisito para alcanzar la respuesta citogenética, solo unos pocos pacientes bajo tratamiento con imatinib fallan en alcanzarla. La falla en alcanzar la RHC luego de 3 meses es generalmente considerada como falta de respuesta al imatinib, indicando la necesidad de una terapia de segunda generación.

1.1.10.2. Respuesta citogenética

Tradicionalmente, la respuesta al tratamiento ha sido evaluada realizando un estudio citogenético, evaluando el porcentaje de metafases Ph' positivas en 20 células analizadas. Una respuesta citogenética parcial (RCP) representa hasta un 35% de metafases Ph' positivas y una respuesta citogenética completa (RCC) implica ausencia de células Ph´ (0%). Las respuestas citogenéticas mayores (RCM) incluyen RCC y RCP (Tabla 2). Solo el estudio citogenético puede identificar el surgimiento de anormalidades cromosómicas adicionales. La aparición de alteraciones cromosómicas secundarias en el clon Ph´ positvo es indicativo de progresión de enfermedad, las mas frecuentes son: duplicación del cromosoma Ph´, +8, i(17q) (Johannsson *et al*, 2002). También se ha reportado en un 5% de los pacientes que alcanzan la RCC bajo terapia con imatinib, la presencia de trisomía 8 y -7/del (7q) asociado a un crecimiento de tipo mielodisplásico (Baccarani *et al*, 2006).

Fluorescence in situ hybridization (FISH) en células en interfase es una metodología ventajosa ya que se pueden evaluar mayor cantidad de células, permite el uso de sangre periférica (Lesser *et al*, 2002), (Schoch *et al*, 2002) y permite obtener información de preparados citogenéticos de MO con bajo índice mitótico. Esta metodología es muy útil cuando se busca una alteración citogenética específica, Ph´ variantes, amplificación BCR-ABL1 o aberraciones submicroscópicas.

1.1.10.3. Respuesta molecular

La cantidad de transcripto *BCR-ABL1* en sangre periférica, medida como relación *BCR-ABL1* respecto a un gen control, proporciona una cuantificación relativa de los transcriptos patológicos. El nivel de *BCR-ABL1* es un buen indicador de la carga celular leucémica. El monitoreo molecular de los transcriptos *BCR-ABL1* se realiza una vez que se alcanza la respuesta citogenética completa y durante intervalos de 3 a 4 meses para monitorear la

respuesta molecular alcanzada. La interrupción temporal del imatinib, está asociada con un aumento en el nivel de los transcriptos *BCR-ABL1* (Michor *et al*, 2005). Los pacientes que desarrollan mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* casi siempre tienen un aumento significativo en el nivel de *BCR-ABL1* consistente con la proliferación de las células leucémicas resistentes (Branford *et al,* 2004). El nivel de *BCR-ABL1* es además un buen predictor de sobrevida libre de progresión (Hughes *et al*, 2003).

1.1.10.4. Estandarización internacional del monitoreo molecular

Un consenso internacional realizado en octubre de 2005, en Bethesda (Hughes *et al*, 2006) propuso la utilización de una escala internacional que podría ser aplicada en centros individuales. Estuvieron de acuerdo en que la escala internacional debería estar relacionada a la respuesta molecular mayor (RMM), la cual corresponde a un valor de 0,1%. El procedimiento para convertir los valores a escala internacional involucra (1) evaluar estándares de referencia para establecer un factor de conversión específico de cada laboratorio, (2) multiplicar los valores de *BCR-ABL1* por el factor de conversión para expresar los resultados en escala internacional. Recientemente se ha ampliado el concepto de respuesta molecular completa, definiendo reducciones de más de 4 logaritmos (Tabla 3).

Tabla 2. Definiciones de Respuesta al tratamiento.

Respuesta Hematológica	**Respuesta Citogenética**	**Respuesta Molecular *(%*BCR-ABL1**
Completa (RHC): Plaquetas <450x 10^9/L; RGB: <10 x 10^9/L; sin granulocitos inmaduros; < 5% de basófilos; bazo no palpable.	RCC: Ph+ 0% RCP: Ph+ 1%-35% RCMe: Ph+36%-65% RCMin: Ph+ 66%-95%	Completa (RMC): <0,01%, o no detectable. Mayor (RMM): 0,01%-0,1% Menor (RMMe) 0,1%-1% Mínim (RMMi) 1%-10% Nula (RMN): >10%

*Cuantificación mediante PCR en tiempo real de *BCR-ABL1* relativizado a un gen control, de acuerdo a la escala internacional. RCC: respuesta citogenética completa, RCP: respuesta citogenética parcial, RCMe: respuesta citogenética menor, RCMIN: respuesta citogenética mínima.

Tabla 3. Criterios de Respuesta Molecular

% BCR-ABL1/ABL1	Reducción log	Resp. Molecular	Copiar gen ABL1*
< 0,001% o indetectable	≥ 5,0 log	RM 5.0	> 100.000
< 0,0032% o indetectable	≥ 4,5 log	RM 4.5	>32.000
< 0,01% o indetectable	≥ 4,0 log	RM 4.0	>10.000
0,01% - 0,1%	≥ 3,0 log	RMMayor	
0,1% - 1%	≥ 2,0 log	RMMenor	
1% - 10%	≥ 1,0 log	RMMínima	
>10%	< 1,0 log	RMNula	

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

1.1.11. Falla terapéutica y respuesta subóptima

El objetivo del tratamiento es lograr la RHC, RCM y la RMM, idealmente a los 3, 6 y 18 meses respectivamente. La falta de respuesta en los tiempos establecidos permite definir los conceptos de fallo y respuesta subóptima (Baccarani et al 2006, 2009). En este contexto, fallo significa que la continuidad del tratamiento, a la dosis administrada no es apropiada para el paciente, el cual podría beneficiarse con otros tratamientos o aumento de dosis de ITK. La respuesta subóptima significa que el paciente podría todavía tener un beneficio si continúa con el tratamiento, lo cual implica un monitoreo más cuidadoso.

1.1.12. Resistencia al tratamiento con Imatinib

La resistencia primaria se define como la falta de respuesta a pesar del correcto tratamiento con imatinib. Se considera resistencia hematológica primaria si un paciente no alcanza ninguna respuesta hematológica luego de tres meses de tratamiento o falta de una respuesta hematológica completa luego de seis meses de tratamiento. La resistencia citogenética primaria se define como la falla en alcanzar alguna respuesta luego de seis meses de tratamiento o falta de una respuesta citogenética completa luego de 12 meses de tratamiento. La resistencia secundaria o adquirida se refiere a la pérdida de la remisión hematológica o citogenética ya lograda. La resistencia molecular o respuesta molecular subóptima puede ser

definida como la falla para alcanzar una respuesta molecular mayor (RMM) luego de 18 meses de tratamiento o pérdida de la respuesta molecular mayor alcanzada. La respuesta molecular se evalúa midiendo la cantidad absoluta de transcriptos *BCR-ABL1* mediante qPCR respecto de un gen control, el más utilizado es el *ABL1*.

1.1.13. Mecanismos de resistencia a imatinib dependientes de *BCR-ABL1*

1.1.13.1. Mutaciones en el dominio quinasa de *BCR-ABL1*

En los últimos tiempos han sido descriptas más de 80 mutaciones diferentes que confieren resistencia a imatinib. Las mutaciones en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1* pueden identificarse en un 40%-90% de los casos con LMC resistente al tratamiento con imatinib (Gorre *et al*, 2001), (Branford *et al,* 2002). Las mutaciones conducen a cambios estructurales en la proteína $P210^{BCR-ABL1}$ de manera que el imatinib ya no es capaz de desplazar al ATP, preservando así la actividad quinasa.

Las mutaciones de resistencia a imatinib pueden dividirse en tres grupos:

-Mutaciones en el *A-loop* tales como: L248V, G250E, Y253H, E255K/V.

-Mutaciones en posiciones de contacto con imatinib, tales como F311V, T315I, F317L. Esta clase de mutaciones afecta aminoácidos que están involucrados directamente en la unión de la droga, por lo tanto llevan a una fuerte resistencia (Gorre *et al*, 2001), (Von Bubnoff *et al*, 2002).

-Mutaciones que desestabilizan la conformación inactiva de *BCR-ABL1* (necesario para una correcta unión del imatinib). Estas pueden incluir cambios localizados en posiciones dentro del *loop* de activación, tales como H396 y M388, o mutaciones en la posición de contacto –SH2 como M351. Esta segunda clase de mutaciones, probablemente desplaza el equilibrio hacia la conformación activa impidiendo la acción del imatinib, dado que éste solo se une a la conformación inactiva de la quinasa (Schindler T et al, 2000), (Shah *et al*, 2002), (von Bubnoff *et al*, 2002). Mutaciones que estabilizan la conformación inactiva de P210, llevan solo a una resistencia moderada (Sah et al, 2002), (Von Bubnoff *et al*, 2002), (Young *et al*, 2006). Por lo tanto, el tipo de mutación puede definir el manejo terapéutico. El aumento de la dosis puede ser suficiente para bloquear mutantes resistentes. Sin embargo en el caso de mutaciones que confieren una fuerte resistencia, aumentando la dosis no se alcanzan las concentraciones

plasmáticas necesarias para bloquear eficientemente BCR-ABL1 mutado**. La tabla 4** y la figura 9, muestran el grado de resistencia a imatinib para las mutaciones más frecuentes.

Tabla 4. Valores de IC^{50} para bosutinib, imatinib, nilotinib y dasatinib de 18 mutaciones diferentes del dominio quinasa del *BCR-ABL1.* Ensayos realizados en células, Ba/F3, transfectadas con las diferentes mutaciones respecto del WT.

		IC50 aumentado (WT=1)			
		Bosutinib	**Imatinib**	**Dasatinib**	**Nilotinib**
	Parental	38,3	10,8	>50	38,4
	WT	1	1	1	1
P-*loop*	**L248V**	2,9	3,54	5,11	2,8
	G250E	4,3	6,86	4,45	4,56
	Q252H	0,81	1,39	3,05	2,64
	Y253F	0,96	3,58	1,58	3,23
	E255K	9,47	6,02	5,61	6,69
	E255V	5,53	16,99	3,44	10,3
C-Helix	**D276G**	0,6	2,18	1,44	2
	E276F	0,95	3,55	1,64	2,05
ATP-*binding*	**V299L**	26,1	1,54	8,65	1,34
	T315I	45,4	17,5	75,03	39,41
	F317L	2,4	2,6	4,46	2,22
SH2-*contact*	**M351T**	0,7	1,76	0,88	0,44
Región de unión a sustrato	**F359V**	0,93	2,86	1,49	5,16
A-*loop*	**L348M**	0,47	1,28	2,21	2,33
	H396P	0,43	2,43	1,07	2,41
	H396R	0,81	3,91	1,63	3,1
	G398R	1,16	0,35	0,69	0,49
Lóbulo C-terminal	**F486S**	2,31	8,1	3,04	1,85

Sensibilidad	≤ 2
Moderadamente resistente	2,01-4
Resistente	4,01-10
Fuertemente resistente	>10

IC^{50}: concentración relativa que inhibe el 50%; WT: *wild type*; P-*loop*: *Phosphate* binding *loop*; ATP: *adenosine triphosphate*; SH2: *SRC homology 2*; A-*loop*: *loop* de activación (*Redaelli et al, 2008)*.

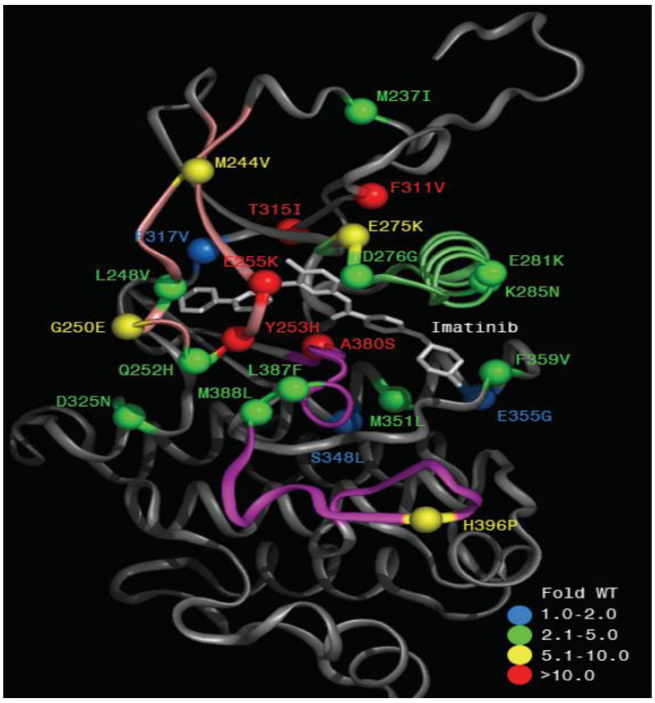


Figura 9. Localización de las mutaciones de resistencia a imatinib en el dominio quinasa del gen *ABL1*. Se observa P-*loop* en rosa, C-helix en verde, A-*loop* en fucsia en una conformación cerrada (inactiva). Los colores de las esferas representan el grado de resistencia celular a imatinib expresado como aumento en el IC^{50} respecto de su contraparte *BCR-ABL1 wild type* en células Ba/F3 (von Bubnoff *et al*, 2005).

1.1.13.2. Amplificación génica de *BCR-ABL1* y sobreexpresión de proteína

La amplificación de *BCR-ABL1* y la sobreexpresión de la proteína como posibles causas de resistencia a imatinib, son eventos identificados tanto en cultivos in vitro (le Coutre *et al*, 2000), (Mahon *et al*, 2000), (Weisberg *et al*, 2000) como en muestras de pacientes con LMC (Hochhaus *et al*, 2003).

La amplificación génica implica múltiples copias del reordenamiento BCR/ABL1, lo cual lleva a un desplazamiento de la relación inhibidor/target, por lo tanto la cantidad de inhibidor disponible dentro de la célula no es suficiente para bloquear todas las moléculas. La sobreexpresión de *BCR-ABL1* permite que el clon leucémico sobreviva, aún en presencia de imatinib.

1.1.14. Mecanismos de resistencia independientes de *BCR-ABL1*

1.1.14.1. Transportadores de drogas

Alteraciones en el transporte del imatinib a las células *target* puede resultar en una concentración sub-optima de la droga y dar lugar a resistencia al tratamiento. La concentración intracelular de imatinib está determinada por bombas activas de importación y exportación y por su unión a proteínas plasmáticas. Está demostrado que el imatinib se une a proteínas como la glicoproteína α-1 ácida (α-1 GP) (Capdeville *et al*, 2002). El incremento en el nivel de esta proteína podría reducir la concentración plasmática del imatinib libre que está disponible para la inhibición de *BCR-ABL1.* La correlación entre la carga tumoral y el estadio de la enfermedad en los pacientes con LMC (le Coutre *et al*, 2002), permitió determinar que un nivel elevado de esta proteína antes de la terapia, conduce a una respuesta más lenta a imatinib (le Coutre *et al*, 2002) Sin embargo, el nivel de α-1 GP no altera la eficacia del fármaco *in vitro* (Jorgensen *et al*, 2002). Por lo tanto, no está claro si las proteínas plasmáticas contribuyen o no a la resistencia a imatinib.

La respuesta a imatinib podría ser distinta entre pacientes como resultado de las diferencias intrínsecas en el modo en que las *stem cells* leucémicas incorporan la droga. El imatinib es sustrato de un transportador de membrana asociado a resistencia, MDR-1 y por lo tanto, puede ser activamente expulsado de la célula (Fromm *et al*, 2004), (Sparreboom *et al*, 2003). Mahon y colaboradores (2000) observaron que existe sobreexpresión de *MDR-1* en líneas celulares resistentes a imatinib, y que la inhibición de MDR-1 revierte parcialmente la resistencia. El aumento en la expresión de *MDR-1* fue observado además, en células progenitoras de pacientes con LMC en crisis blástica mieloide respecto de controles sanos (Lange *et al*, 2003). Recientemente, fue identificado otro transportador (*human organic cation transporter-1;* hOCT-1), el cual podría estar involucrado en el transporte activo del imatinib hacia dentro de la célula (Thomas *et al*, 2004). La internalización variable del imatinib es un factor clave para determinar respuesta y está apoyado por un estudio que evaluó el valor del nivel de expresión de *OCT-1* en células con LMC. Este estudio encontró que pacientes con elevada expresión de *OCT-1* era más probable que alcanzaran buena respuesta citogenética (Crossman *et al*, 2005).

En general, los mecanismos de transporte de drogas son de importancia potencial para la supervivencia de las células leucémicas en presencia de imatinib. Sin embargo, la evidencia clínica de que los mecanismos fármaco-cinéticos desempeñan un papel importante en la

resistencia a imatinib todavía no son concluyentes, dado que ningún mecanismo crítico ha sido identificado.

1.1.14.2. Evolución citogenética

En un pequeño subgrupo de pacientes resistentes a imatinib, se puede demostrar que la droga todavía bloquea efectivamente la actividad de BCR-ABL1 quinasa, sin embargo no se logra una buena respuesta. Esto indica que la leucemia se ha independizado, al menos parcialmente, de BCR-ABL1 como resultado de acontecimientos genéticos secundarios. La evolución citogenética clonal está frecuentemente asociada con la resistencia a imatinib (Marktel *et al,* 2003), (Mitelman *et al*, 1993) demostrando ser un factor de mal pronóstico independiente de BCR-ABL1 (Cortes *et al*, 2003).

Dos anomalías citogenéticas frecuentes son el isocromosoma 17q, que lleva a la inactivación de p53 (Fioretos T et al, *1999*), y la trisomía 8, que resulta en la amplificación y sobreexpresión del oncogén MYC (Jennings *et al,* 1998). Ambos eventos contribuyen a la progresión de la enfermedad y la resistencia a imatinib (Jennings *et al*, 1998), (Virtaneva *et al*, 2001), (Wendel *et al*, 2006).

El hallazgo de la sobreexpresión de la quinasa LYN en pacientes resistentes a imatinib, sugiere que la activación de la familia de SRC quinasas contribuye a la resistencia a imatinib por un mecanismo independiente de *BCR-ABL1*, (Donato *et al*, 2003).

1.1.15. Inhibidores alternativos de *BCR-ABL1*

En los últimos años, se han desarrollado compuestos que inhiben BCR-ABL1 más potentemente que el imatinib, y presentan actividad contra la mayoría de las mutaciones de resistencia a imatinib. El uso de estos nuevos agentes como AMN107 (nilotinib) o BMS-354825 (dasatinib) genera una respuesta superior a largo plazo en pacientes con LMC en fase crónica temprana (Kantarjian *et al*, 2010), (Saglio *et al*, 2010).

Los inhibidores utilizadas en LMC y LLA Ph' positiva pueden dividirse en varias categorías:

-Compuestos similares al imatinib que se unen a BCR-ABL1 en su conformación inactiva pero con mayor potencia. Entre ellos se encuentra nilotinib (AMN107), el cual no inhibe SRC quinasas. El nilotinib es de 10-30 veces más potente que el imatinib, con mayor afinidad y selectividad para bloquear las quinasas relacionadas a ABL1. Este inhibidor tiene actividad

contra la mayoría de las mutaciones de resistencia a imatinib, excepto la mutación T315I (Kantarjian *et al*, 2006), (Mestan *et al*, 2004), (Weisberg *et al*, 2005).

-Compuestos que se unen a ambas conformaciones (activa e inactiva) del BCR-ABL1. El dasatinib, 100 – 300 veces mas potente que el imatinib, constituye un ejemplo de esta clase de inhibidor, (Tokarski *et al,* 2006), (Shah *et al*, 2004). Se comporta como un potente inhibidor de BCR-ABL1, c-KIT, EPHA2, PDGFR-β y quinasas de la familia SRC. Estas últimas, juegan un rol crítico en la leucemogénesis y persistencia del fenotipo maligno. El dasatinib inhibe la mayoría de las formas de BCR-ABL1 resistentes a imatinib, excepto la T315I (Talpaz *et al*, 2006). El dasatinib y el nilotinib fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de adultos en cualquiera de las fases de la LMC con resistencia o intolerancia a otros inhibidores y recientemente como tratamiento de primera línea. En este grupo, además del dasatinib (BMS-354825, SprycelTM), se encuentran el bosutinib (SKI-606) (Kimura *et al*, 2005) y el INNO-406 (Adrian *et al*, 2006). El bosutinib, es un inhibidor de las quinasas de la familia SRC y ABL1 (Boschelli *et al*, 2005). Estudios *in vitro* en la línea K562 e *in vivo* en modelos animales confirmaron un fuerte potencial antiproliferativo (similar al del dasatinib) (Golas *et al*, 2003), es efectivo en células con mutaciones puntuales excepto para la T315I.

-Compuestos que no actúan como competidores del sitio de unión al ATP, pero sí como inhibidores alostéricos. Un ejemplo es ON012380, este compuesto podría tener actividad contra todas las mutaciones de resistencia a imatinib incluyendo la T315I, y actualmente se encuentra en desarrollo preclínico.

-Agentes que presentan actividad contra la mutación T315I. Un amplio *screening* identificó el inhibidor de aurora quinasas (VX-680), que inhibe la mutación de BCR-ABL1 T315I (O´Hare *et al*, 2004). Recientemente se ha desarrollado el ponatinib (AP24534) el cual ha mostrado en protocolos randomizados eficacia contra la mutación T315I (Cortes et al, 2011).

1.1.16. Expansión desregulada del clon maligno en LMC

La mayoría de las vías de señalización activadas por *BCR-ABL1* trasmiten señales a la maquinaria transcripcional de la célula transformada, alterando la expresión de numerosos genes.

Los mecanismos básicos atribuidos a las células *BCR-ABL1* positivas en LMC, son proliferación y supervivencia celular incrementada, aumento de resistencia a la apoptosis (Cambier *et al*, 1998), (Cortes *et al*, 1996), y alteración de sus propiedades de adhesión (Zhao *et al*, 1997).

Muerte celular disminuida. El mantenimiento de un número constante de células depende no solo de la velocidad de producción celular sino también de la velocidad de muerte celular programada (apoptosis). Cuando una célula se encuentra en condiciones no fisiológicas, muere como resultado de necrosis. La muerte celular es además un proceso importante en la mayoría de los organismos multicelulares para evitar la acumulación de un tipo celular dado, para mantener la homeostasis, y para eliminar células que han sido sujetas a agentes mutagénicos. La expansión del tumor está directamente relacionada con el desequilibrio entre la proliferación y la muerte celular (Bresciani *et al*, 1974). Los defectos en la maquinaria apoptótica pueden contribuir al fenotipo maligno de la célula leucémica. La apoptosis es un proceso fisiológico en el cual diferentes estímulos activan un programa genético para llevar a cabo una serie específica de eventos y cambios morfológicos y estructurales que resultan en la muerte de la célula (Hockenbery *et al*, 1995). En cuanto a la regulación de este mecanismo existen genes que suprimen la apoptosis *(BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1*) y otros que la activan (*BAX, BAD, BAK, BCL-XS*). Patrones aberrantes de expresión de estas proteínas en las células leucémicas pueden resultar en un crecimiento desregulado y persistencia de las células tumorales debido a la inhibición de la apoptosis. Además, células derivadas de LMC expresando P210 mostraron resistencia a la muerte celular debido a la sobreexpresión del gen antiapoptótico *BCL-XL* en lugar de *BCL-2* (Benito *et al*, 1996), (Amarante-Mendez *et al*, 1998). El gen *BCL*-X (posee dos variantes XL y XS) se localiza en el cromosoma 20q11.21 y codifica una proteína ubicada en el exterior de la membrana mitocondrial que regula la apertura del canal de membrana mitocondrial. Este canal regula el potencial de membrana y por lo tanto, controla la producción de especies reactivas del oxígeno y liberación del citocromo c por la mitocondria, siendo estos dos eventos, inductores de la apoptosis celular. Han sido descriptas dos variantes de *splicing* que codifican isoformas distintas. La isoforma más larga actúa como inhibidor de la apoptosis (BCL-XL) y la más corta actúa como activador (BCL-XS).

La contribución real de *BCL-XL* para la transformación en la LMC es todavía poco clara. En una célula tumoral la expresión aumentada del gen antiapoptótico *BCL-2*, o su homologo *BCL-XL* lleva a la célula a disminuir su susceptibilidad a la apoptosis.

Por otro lado los miembros de la familia BAX, son inductores de apoptosis. El gen BAX se localiza en el cromosoma 19q13.3-q13.4 y codifica una proteína que forma hetodímeros con BCL-2 o BCL-XL, y funciona como activador de la apoptosis celular. BAX incrementa la apertura

del canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje, que lleva a la liberación del citocromo c. La expresión de este gen está regulada por P53.

La relación de expresión de miembros anti- y pro-apoptóticos de la familia *BCL-2* podrían determinar el potencial apoptótico de una célula neoplásica. El crecimiento desregulado de las células neoplásicas a menudo es atribuible a aberraciones genéticas en genes que controlan la proliferación y diferenciación, pero la sobreexpresión de genes que suprimen la muerte celular puede llevar también a un incremento en el número de células sin alterar la velocidad de proliferación celular. La LMC es un ejemplo de tal desorden mielo-acumulativo, se caracteriza por un aumento excesivo de células relativamente maduras en la médula ósea y sangre periférica. Los progenitores mieloides presentan índices mitóticos normales, respuesta normal a factor estimulante de colonias y no proliferan más rápido que sus contrapartes normales (Strife and Clarkson, 1988). El transcripto quimérico *BCR-ABL1* confiere a la célula oncogénica la capacidad de suprimir la apoptosis activando genes involucrados en señales de sobreviva. El gen *BCR-ABL1* podría ser un regulador negativo de la apoptosis, induciendo la expresión del *BCL-XL* por activación del *STAT5* (*signal transducer activator of transcription).* El estudio del perfil de expresión de genes involucrados en el proceso apoptótico es de interés para el entendimiento de la patogénesis de la enfermedad. La cuantificación de genes expresados diferencialmente, *BAX* y *BCL-XL* y su relación (*BAX/BCL-XL*) podría ser útil para caracterizar las diferentes etapas de la enfermedad y la progresión de la patología hacia una etapa más avanzada.

Incremento de la proliferación celular. El gen *KI67* se localiza en el cromosoma 10q26.2 y codifica una proteína nuclear asociada a la proliferación celular. Este proceso biológico es controlado por mecanismos coordinados. El avance en el entendimiento de los mecanismos implicados en la regulación del ciclo celular ha crecido en los últimos años proporcionando conocimiento sobre su modulación. En el año 1983, se desarrolló el anticuerpo KI67 que reacciona selectivamente con núcleos de células proliferantes en todos los tejidos humanos estudiados (Gerdes *et al*, 1983). Mediante análisis detallado del ciclo celular se reveló que el antígeno KI67 (proteína nuclear de 359 KDa) se expresaba en todas las partes activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) y estaba ausente en células en reposo (G0) (Gerdes *et al*, 1984), indicando su utilidad como marcador de células en proliferación.

KI67 es una proteína comúnmente empleada para detectar y cuantificar células en división. La tasa de expresión del gen *KI67* refleja la tasa de proliferación celular, y actualmente esta proteína es ampliamente utilizada como marcador diagnóstico en varios tipos de tumores (Hou *et al*, 2011). En consecuencia, en histopatología el empleo de este anticuerpo es muy importante para determinar la fracción proliferante (Gerdes *et al*, 1990), de neoplasias humanas y posee valor pronóstico (Locker *et al*, 1992), dado que, cuanto mayor es el número de células positivas, más agresivo es el tumor.

El gen *CAMKII* se localiza en el cromosoma 10q22 y su producto es una de las cuatro subunidades de una enzima que pertenece a la familia de proteínas serina/treonina quinasa y a la subfamilia de proteínas quinasas dependientes de Ca(2+)/calmodulina. En mamíferos, esta enzima está compuesta por cuatro cadenas diferentes, alpha, beta, gamma, delta. El producto del gen estudiado en este trabajo es la cadena gamma.

La proteína CAMKIIγ activada (autofosforilada) tiene un rol importante en la regulación de la proliferación de las células mieloides. En estudios de investigación previos, se observó un aumento de la proteína *CAMKIIγ* autofosforilada en líneas celulares mieloides leucémicas (Jutong Si *et al*, 2008). En diferentes modelos celulares el tratamiento *in vitro* con imatinib desencadena diferenciación terminal y arresto de crecimiento, y pérdida de la capacidad proliferativa de las células leucémicas, acompañada por una marcada reducción en la activación de CAMKIIγ. Esta reducción de CAMKIIγ activada contribuye directamente a la pérdida de la capacidad proliferativa de las células leucémicas. CAMKIIγ regula directa o indirectamente múltiples caminos de señalización implicados en la proliferación de las células tumorales, incluyendo MAPK, JK/STAT y GSK3β/β-catenina.

Supervivencia Celular

HSP90. Las células oncogénicas se encuentran generalmente dentro de condiciones de *stress* y responden a este estado incrementando la síntesis de un número de chaperonas moleculares (también conocidas como proteínas del shock térmico, HSPs). Estas proteínas asisten el correcto plegamiento proteico (*folding*) y previenen la agregación de proteínas *misfolded* o *unfolded*. Existe una chaperona en particular, HSP90, de particular importancia para la supervivencia de las células neoplásicas. El gen *HSP90* (notación génica HSP90AA1) se localiza en el cromosoma 14q32.33, y codifica una proteína constitutivamente expresada con un

aumento de dos a diez veces en células tumorales respecto de sus contrapartes normales, sugiriendo su importancia en el desarrollo tumoral.

HSP90 existe como múltiples isoformas que incluyen HSP90α y HSP90β en el citoplasma y GRP94 y TRAP1 localizadas en el retículo endoplásmico y la mitocondria respectivamente (Sreedhar *et al*, 2004). La estructura de HSP90 consiste de tres regiones esenciales: un dominio NH2-terminal (24-28kDa), una región media (38-44 kDa) y un dominio COOH-terminal (11-15 kDa). La función principal de estos dominios son unión a ATP, unión a proteínas blanco y dimerización, respectivamente (Prodromou *et al*, 2003). HSP90 funciona como parte de un complejo multi-chaperonas, que involucran su asociación con varias co-chaperonas accesorias y proteínas *target*. En su estado unido a ATP, HSP90 adopta una conformación cerrada y se convierte en un complejo maduro que es esencial para que lleve a cabo su función de estabilización y plegado de proteínas blanco.

Existen varias razones por las cuales HSP90 debe ser considerada un importante *target* molecular relevante en cáncer. HSP90 es clave para la estabilidad y función de varias proteínas de importancia para la célula neoplásica, entre ellas podemos citar a BCR-ABL1, ERB-B2, EGFR, AKT, MET, VEGFR, FLT3, telomerasa, etc. Estas proteínas influencian en los rasgos distintivos de las células tumorales, tales como independencia de factores de crecimiento, resistencia a señales anti-crecimiento, potencial replicativo ilimitado, invasión tisular y metástasis, resistencia a la apoptosis, y angiogénesis sostenida (Powers *et al*, 2006).

La selectividad terapéutica de inhibidores de HSP90, podría explicarse por los siguientes motivos. Primero, las células neoplásicas necesitan de onco-proteínas que manejen el proceso maligno, por lo tanto, la falta de éstas afecta a las células tumorales en mayor medida que a las células normales. En segundo lugar, las onco-proteínas son a menudo expresadas como formas mutadas (por ejemplo: EGFR), y tienen mayor requerimiento de HSP90 para su estabilidad y función respecto de su contraparte salvaje. En tercer lugar, las células oncogénicas están expuestas a acidosis intra-tumoral, hipoxia, y falta de nutrientes, creando un ambiente de *stress* celular que requiere de la maquinaria de chaperonas en mayor grado respecto de las células normales.

Inhibidores de HSP90. La geldanamicina (GA) inhibe específicamente HSP90 por unión competitiva al dominio de unión a ATP en la región NH2-terminal (Grenert *et al*, 1997). El bloqueo de la función de HSP90 por GA o por su análogo menos tóxico, 17-allylaminogeldanamicyna (17-AAG), en células leucémicas que expresan *BCR-ABL1* induce

degradación de la proteína BCR-ABL1 y suprime la proliferación celular (Blagosklonny *et al*, 2001), (Nimmanapalli *et al*, 2001).

Hsp70. El gen *HSP70* (notación génica HSPA4) se localiza en el cromosoma 5q31.1 y codifica una chaperona molecular dependiente de ATP (Wickner *et al*, 1999). La expresión de *BCR-ABL1* en células leucémicas está asociada con una incrementada expresión de *HSP70* (Nimmanapalli *et al*, 2002). Esta chaperona interactúa con polipéptidos no-nativos, recientemente sintetizados, ayudando a su plegamiento en proteína nativa, promueve la formación de complejos multiproteicos, y asiste en el transporte de proteínas a través de la membrana celular (Hartl *et al*, 2002). Mediante su unión a regiones hidrofóbicas expuestas a la superficie, esta chaperona previene la agregación de proteínas en inclusiones insolubles no funcionales. Las proteínas *misfolded*, proteínas anormales debido a mutaciones o errores en la transcripción o traducción, son rescatadas por chaperonas dependientes de ATP o degradadas por proteasas dependientes de ATP o sufren agregación. HSP70 es inducida por *stress* celular debido a proteínas *misfolded* y desnaturalizadas. Gracias a la unión e hidrólisis del ATP, HSP70 se une y libera pequeñas regiones hidrofóbicas de proteínas *misfolded*, permitiendo así que proteínas dañadas adopten su estado nativo. En células normales, la expresión de *HSP70* es baja e inducible por *stress* (Volloch *et al*, 1999). HSP70 juega un rol activo en la transformación oncogénica. La sobreexpresión de HSP70 inhibe la apoptosis (Creagh *et al*, 2000). Varios trabajos han documentado que HSP70 inhibe el programa mitocondrial de la apoptosis por bloqueo de la activación de las caspasas tres y nueve (Gabai *et al*, 2002). Además HSP70 puede inhibir el camino apoptótico independiente de caspasas, directamente interactuando con el factor inductor de apoptosis (AIF), evitando de este modo, el importe nuclear y fragmentación del ADN por AIF (*apoptosis inductor factor*). Guo *et al* (2005), observaron que HSP70 es sobreexpresada en células leucémicas *BCR-ABL1* positivas y que esta chaperona juega un rol mecanístico en mediar el efecto antiapoptótico de *BCR-ABL1*. HSP70 contribuye a la resistencia a la apoptosis debido a agentes antileucémicos. Hsp70 se une a BAX e inhibe sus cambios conformacionales y localización en la membrana mitocondrial impidiendo la iniciación de la vía apoptótica mitocondrial. Además, HSP70 aumenta el nivel y actividad de STAT5 que inducen BCL-XL y Pim-2, aumentando la resistencia a la apoptosis ejecutada a nivel de la mitocondria (Figura 10).

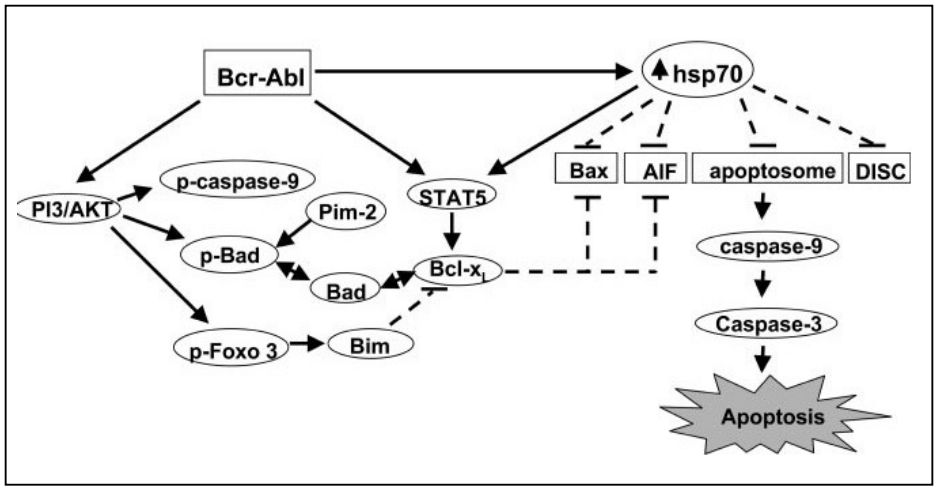


Figura 10. Consecuencia molecular de la sobreexpresión de AKT, STAT5 y HSP70 mediada por BCR-ABL1. La expresión de *BCR-ABL1* resulta en una actividad de AKT incrementada (potente mediador de señales antiapoptóticas). AKT fosforila e inactiva BAD, Caspasa-9 y un factor de transcripción Foxo3. Las células leucémicas que expresan *BCR-ABL1* también muestran un aumento en la actividad de STAT5, que resulta en un incremento en la expresión de *BCL-XL* confiriendo resistencia a la apoptosis. Se observa además, un incremento en la actividad de HSP70, que estimula STAT5, además de interferir con la señalización apoptótica en múltiples niveles. (Guo *et al*, 2005).

1.2. Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1 (-)*]

Las NMPs *BCR-ABL1 (-)* incluyen enfermedades hematopoyéticas clonales que se originan a partir de una célula madre anormal de la médula ósea. Están caracterizadas por una médula ósea hipercelular con aumento de las células maduras de una o más líneas. La hematopoyesis generalmente es efectiva y por lo tanto da lugar a un aumento en el número de elementos correspondientes en la sangre periférica. En algunos casos puede ocurrir evolución a fibrosis y fallo de la médula ósea o transformación a una fase blástica. Tradicionalmente dentro del grupo de las NMPs *BCR-ABL1*- clásicas se incluye a la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis idiopática (MP).

La causa genética vinculada a estas patologías se conoció a partir del 2005, cuando varios grupos de investigación independientes demostraron que la mayoría de los casos con PV, TE y MP adquirían una mutación puntual en el gen *JAK2 (V617F)* que codifica para una tirosina quinasa citoplasmática. Este hallazgo ha significado un importante avance en la compresión de la etiopatogenia así como en la identificación de nuevas dianas moleculares de significación diagnóstica y terapéutica.

La policitemia vera (PV) fue descripta por Louis Vaquez (1892) en un paciente con marcada eritrocitosis y hepatomegalia como resultado de una sobreproducción hematopoyética. Posteriormente, Osler (1903) observó casos con eritrocitosis y esplenomegalia y Gustav Hueck (1879) describió la mielofibrosis primaria (MP) tras notar la presencia de fibrosis medular y hematopoyesis extramedular en un grupo de pacientes. La trombocitemia esencial (TE) fue la última en ser descripta, cuando en 1934 Emil Epstein y Alfred Goedel reconocieron que pacientes con trombocitosis sin marcada eritrocitosis constituían un síndrome con características clínicas diferentes.

Aunque han sido reconocidas como entidades distintas, William Dameshek, fue el primero en reconocer que estas entidades deberían ser clasificadas como un grupo de “desordenes mieloproliferativos” fenotípicamente relacionados (Dameshek *et al,* 1951). Aunque la eritrositosis es característica de la PV, muchos pacientes desarrollan “pan-citosis” con proliferación de los linajes eritroide, megacariocítico y granulocítico. Además observó que pacientes con PV a menudo desarrollaban fibrosis medular, cambios leuco-eritroblásticos en sangre periférica y esplenomegalia consistente con progresión a mielofibrosis terminal.

Las anormalidades citogenéticas ocurren solo en un 10 a 15% de los pacientes con NMP *BCR-ABL1 (-)*, siendo las más comunes la deleción en el cromosoma 20q (Bench *et al*, 2000), (Westwood *et al*, 2000), trisomía 8 y 9 (Bench *et al*, 2005).

1.2.1. Policitemia Vera (PV)

La PV es una neoplasia que involucra excesiva eritropoyesis, granulopoiesis y megacariopoiesis (pan-mielosis). Se caracteriza por un aumento sostenido y persistente del nivel de eritrocitos (hemoglobina, hematocrito y masa eritrocitaria) y volumen sanguíneo. Su incidencia varía entre 0,5-1,9 casos cada 100.000 habitantes/año siendo la edad promedio 60 años.

Comienza con eritrocitemia, siendo los recuentos de glóbulos blancos, plaquetas y tamaño del bazo normales (estadío 1). Continúa con trombocitemia, fibrosis medular temprana, leucocitosis y esplenomegalia (estadío 2). En un tercio de los casos la mielofibrosis y esplenomegalia es progresiva (estadio tres). La siguiente etapa suele denominarse fase gastada (estadío cuatro), y puede durar varios años. En esta etapa, el bazo es grande y firme, el hígado esta aumentado y es frecuente la trombocitemia y leucocitosis. La última etapa (estadío cinco) se caracteriza por mielofibrosis, aumento de eritroblastos en sangre periférica y esplenomegalia. La identificación de la mutación *JAK2 V617F*, histopatología de médula ósea y alteraciones hematológicas permiten realizar el diagnóstico y detectar estadíos tempranos de PV diferenciándola de otras neoplasias mieloproliferativas.

Más del 50% de los casos con PV, pueden desarrollar complicaciones trombohemorrágicas, las cuales se controlan con tratamiento adecuado. En el 20% de los casos, la enfermedad puede avanzar a mielofibrosis post-PV y en un 5%-15% de los pacientes, la enfermedad puede evolucionar a Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

1.2.2. Trombocitemia Esencial (TE)

La trombocitemia (TE) es probablemente la neoplasia mieloproliferativa más común con una incidencia de 1-2,5 casos cada 100.000 habitantes/año. La TE es un trastorno mieloproliferativo crónico clonal, que compromete en forma primaria la línea de megacariocitos de MO, caracterizada por una persistente trombocitosis (mayor a 450.000/µl) e hiperplasia megacariocítica, en ausencia de eritrocitosis o leucoeritroblastosis. La mayoría de los casos se

diagnostican entre los 50 a 60 años de edad, sin predilección por sexo, con un segundo pico de incidencia a los 30 años con predominio en las mujeres 2:1 y es poco frecuente en niños.

Tiene un curso clínico relativamente benigno, con una mayor frecuencia de complicaciones trombóticas, siendo las arteriales más frecuentes que las trombosis venosas. También se observan trastornos hemorrágicas y un aumento del riesgo de transformación a una neoplasia hematológica más severa como la mielofibrosis-post TE en 4-8% a 10 años, y mucho menos frecuente es la transformación a LMA.

El 50-60 % de los pacientes con TE presentan la mutación *JAK2*^{V617F}, y entre 1-4 % son portadores de mutaciones en el gen receptor de la trombopoyetina (gen MPL).

Los pacientes portadores de *JAK2* ^{V617F} tienen características que se asemejan a la PV: mayor nivel de Hb, mayor recuento leucocitario, menor recuento plaquetario, mayor progenie eritroide y mieloide en MO, mayor frecuencia de trombosis venosa, niveles más bajos de ferritina y EPO.

1.2.3. Mielofibrosis Primaria

La mielofibrosis primaria (MP) es una enfermedad clonal de la célula madre progenitora hematopoyética caracterizada por fibrosis progresiva de la médula ósea (MO) y el desarrollo de hematopoyesis extramedular (HEM).

Clásicamente evoluciona en etapas iniciando con una fase proliferativa llegando al cuadro característico de anemia progresiva con hematíes en lágrima o dacriocitos, elementos inmaduros mieloides y eritroides (leucoeritroblastosis) en sangre periférica (SP), esplenomegalia, fatiga, dolor óseo, sudoración nocturna y pérdida de peso, con una reducida calidad de vida y una sobrevida acortada, algunos sufren transformación leucémica.

El proceso mieloproliferativo se caracteriza por ineficaz eritropoyesis, hiperplasia de megacariocitos e incremento de granulocitos inmaduros, además esta patología es acompañada de fibrosis medular y hematopoyesis extramedular. La mielofibrosis es un proceso reactivo inducido por fibroblastos como consecuencia de la liberación de citoquinas a partir de granulocitos y megacariocitos. Los cambios en el microambiente medular incluyen: aumento del número de células estromales y nivel de proteínas de la matriz extracelular y aumento de la angiogénesis.

Esta neoplasia tiene una incidencia de 0,5-1,5 casos cada 100.000 habitantes/año. Al diagnóstico la mayoría de los pacientes presentan síntomas clínicos, un 60% desarrolla anemia, un 24% agrandamiento del bazo, y el 16% restante presenta sangrado anormal.

Según lo propuesto por la OMS (2008), para el diagnóstico de MP se deben cumplir los siguientes tres criterios mayores:

-Biopsia de médula ósea caracterizada por prominente proliferación megacariocítica asociada a anormalidades morfológicas, proliferación granulocítica, hipercelularidad medular y disminución de los precursores eritroides.

-Ausencia de criterios de la WHO para PV, LMC, SMD u otros desórdenes mieloides

-Presencia de clonalidad (mutación $JAK2^{V617F}$ u otra mutación), descartando fibrosis de médula ósea atribuida a procesos no clonales.

Para reforzar la exactitud diagnóstica, se requiere la presencia de al menos dos de los siguientes criterios menores: leucoeritroblastosis, aumento del nivel de LDH, anemia o esplenomegalia palpable.

De las NMPs *BCR-ABL1 (-),* la MP es la de peor pronóstico, con una expectativa de vida estimada entre 5-7 años, que excede los 10 años en pacientes jóvenes con factores pronósticos favorables. Las principales causas de muerte son infección, eventos trombo-hemorrágicos, fallo cardíaco y transformación leucémica. Actualmente el tratamiento de la MP es paliativo y la única cura es el trasplante alogénico de médula ósea.

1.2.4. Genética de las NMPs *BCR-ABL1 (-)*

Diferentes grupos de investigación (Kralovicks *et al*, 2005), (Baxter *et al*, 2005), (James et al, 2005), (Levine *et al*, 2005), (Zhao *et al*, 2005) identificaron una única mutación puntual, adquirida y recurrente en el exón 14 del dominio pseudoquinasa del gen JAK2 (V617F). Como resultado, la proteína mutante queda fuera de control fisiológico y permanece constitutivamente fosforilada y activa distintas vías de señalización como JAK/STAT, MAPK, PI3K/AKT en ausencia de unión al ligando.

La mutación en el gen *JAK2* consiste en una sustitución de guanina a timidina (G>T) que resulta en un cambio aminoacídico de valina a fenilalanina en el codón 617 del *JAK2*. La mutación no está presente en la línea germinal, indicando que $JAK2^{V617F}$ es una mutación adquirida, como un alelo de enfermedad somática, en el compartimiento hematopoyético.

La familia de tirosinas quinasas no receptoras Janus incluye JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Cada una de las quinasas JAK tiene siete dominios de homología (Figura 12). El dominio JH1, en el extremo carboxi-terminal, contiene el dominio catalítico, mientras que el dominio JH7 en el extremo amino-terminal, es esencial para la asociación con receptores de citoquinas (Chen *et al*, 1997). La valina 617 se encuentra en el dominio JH2, o dominio pseudoquinasa, el cual carece de actividad catalítica. Basados en la observación de que deleciones del dominio JH2 lleva a un incremento de la actividad quinasa de JAK2 (Saharinen *et al*, 2002), es posible sugerir que el dominio JH2 regula negativamente la actividad quinasa de JH1.

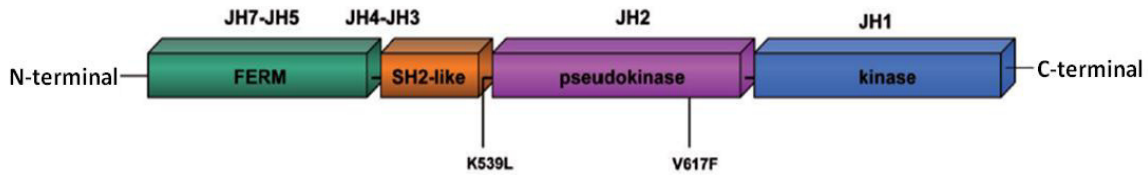


Figura 12. Estructura del gen *JAK2*. El gen *JAK2* contiene varios dominios de homología (JH): JH1, dominio quinasa; JH2, dominio pseudoquinasa y los dominios JH3-JH4 y JH5-JH7. El dominio pseudoquinasa juega un rol importante en la activación dependiente de citoquinas del dominio quinasa, y está implicado en la inhibición de la actividad basal del dominio JH1. La mutación V617F previene la inhibición de JH1 por JH2. Mutaciones en el *linker* entre el dominio –SH2 y el dominio pseudoquinasa (exón 12), también llevan a la activación de J*AK2*. La mutación V617F es detectada en un 98% de pacientes con PV y aproximadamente en el 50% de pacientes con TE y MF mientras que mutaciones del exón 12 son detectadas en el 2% de pacientes con PV que no presentan J*AK2*^{V617F}.

Después de la adquisición de la mutación J*AK2*^{V617F} puede ocurrir un fenómeno denominado pérdida de heterocigosidad (LOH), como resultado de recombinación mitótica entre cromátidas homólogas en 9p o debido a deleciones de la porción telomérica del cromosoma 9p (Figura 13). En el caso de una deleción, se espera encontrar solo una copia de ADN de la región delecionada, mientras que en el caso de la recombinación mitótica se esperaría encontrar dos copias idénticas. Estos eventos llevan a la homocigocidad de la mutación, introduciéndose el concepto de carga alélica (CAL), la cual se evalúa realizando la relación porcentual entre la cantidad de ADN de *JAK2* mutado respecto del total de ADN de *JAK2*, según la siguiente fórmula: CAL= [*JAK2*^{V617F}/*JAK2*^{V617}+*JAK2*^{WT}] x 100. Cuando este cálculo arroja valores superiores a 50% se infiere presencia de homocigocidad de la mutación. Los casos con mayores porcentajes de carga alélica se asocian con enfermedad de larga evolución, gran esplenomegalia, tratamiento citoreductivo, mayor probabilidad de complicaciones tales como

trombosis y mielofibrosis. (Passamonti *et al*, 2009), (Vannucchi *et al*, 2007), (Carobbio *et al*, 2009) y riesgo de transformación a leucemia mieloide aguda (Barosi *et al*, 2007), (Tefferi *et al*, 2008). El fenómeno de homocigocidad de la mutación se ha observado en un 30% de pacientes con PV y MF comparado con 5% en TE (Chen, *et al* 2006), (Vannucchi *et al*, 2008).

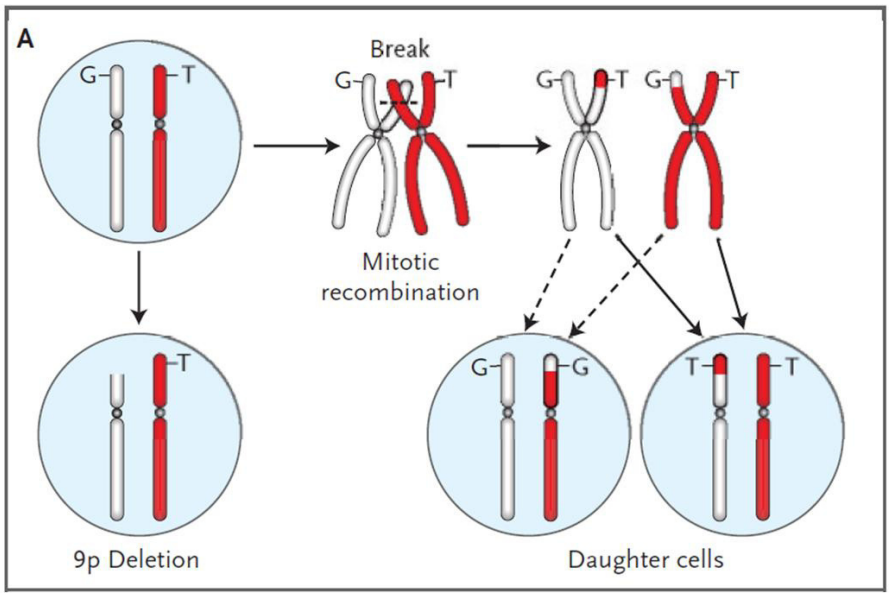


Figura 13. Mecanismo de 9pLOH. En blanco se visualiza el cromosoma 9 con la secuencia *JAK2 wild type* (G), en rojo puede observarse el cromosoma 9 con la transversión G-T. Los círculos simbolizan el núcleo de la célula. La deleción de la región telomérica del cromosoma 9p *wild type* como un posible mecanismo para 9pLOH, se representa a la izquierda. Alternativamente, la recombinación mitótica podría también resultar en 9pLOH, y se representa a la derecha. En este caso se observa la progenie celular resultante luego de la recombinación mitótica de la región cromosómica 9p (Kralovics *et al*, 2005).

1.2.5. Otras mutaciones en NMPs *BCR-ABL1 (-)*

Aunque la mayoría de los pacientes con PV y un grupo de pacientes con ET y MP son portadores de la mutación V617F en el gen *JAK2,* existe otro grupo de pacientes que no manifiestan esta mutación. Las características de laboratorio y parámetros clínicos de los dos grupos son muy semejantes, por lo tanto se hipotetiza que existen otras mutaciones somáticas en pacientes *JAK2*^{V617F} (-) que activan la vía de señalización *JAK2* de una manera análoga a la activación constitutiva por la presencia de *JAK2*^{V617F}.

Scott y colaboradores realizaron una búsqueda de genes candidatos para activar la vía de señalización *JAK2* en una pequeña proporción de pacientes con PV *JAK2*^{V617F} (-). El análisis de

secuencia de todos los exones de *JAK2* permitió identificar la presencia de mutaciones somáticas en el exón 12 del gen *JAK2*. Se han reportado al menos 8 mutaciones diferentes en el exón 12 del gen *JAK2*, incluyendo mutaciones *missense*, deleciones e inserciones que involucran los residuos 538 a 541 (Pietra *et al*, 2008). Como ocurre en presencia de la mutación V617F del exón 14 de *JAK2*, las mutaciones del exón 12 confieren a la célula hematopoyética crecimiento independiente de citoquinas y activa vías de transducción de señales incluyendo STAT5, AKT y MAPK. Las mutaciones del exón 12 han sido identificadas en pacientes con eritrocitosis, sin trombocitosis o leucocitosis asociada. Esto tiene importantes implicancias clínicas y biológicas, ya que estas mutaciones pueden ser específicas de pacientes con eritrocitosis idiopática (Percy *et al*, 2007), en oposición con la expansión pan-mieloide observada en la PV clásica. Estos datos sugieren que diferentes mutaciones que activan *JAK2* están asociadas con diferentes fenotipos clínicos.

Una mutación puntual en la posición 515 del gen *MPL* (W515L) ha sido identificada en un 5% a 10% de los pacientes con TE o MP *JAK2*^{V617F} (-) (Pardanani *et al*, 2006), (Pikman *et al*, 2006). Esta mutación sustituye leucina o lisina por triptófano. Aunque estudios *in vitro* demostraron que la mutación *MPL*^{W515L} activa constitutivamente *JAK2* y vías de señalización subsiguientes, su expresión resulta en un fenotipo caracterizado por marcada trombocitosis y mielofibrosis. En MP, la presencia de la mutación *MPL*^{W515L} está asociada con anemia y con un incremento en el requerimiento de transfusiones (Guglielmelli *et al*, 2007), consistente con la reducida eritropoyesis comparado con MP *JAK2*^{V617F}. Estos datos sugieren que los progenitores *MPL*^{W515L} positivos, tienen inclinación hacia el linaje megacariocítico y que existen diferencias en la señalización entre *JAK2*^{V617F} y *MPL* ^{W515L} que influyen en el fenotipo clínico.

1.2.6. Biología de las NMPs *BCR-ABL1 (-)*

El gen *JAK2* es crucial para las vías que involucran al receptor de eritropoyetina (EPOR) (Witthuhn *et a*l, 1993) y trombopoyetina (*MLP* o TPOR) (Tortolani *et al*, 1995), (Drachman *et al*, 1999), también participa en la señalización mediada por el receptor del factor estimulante de colonias granulocíticos (G-CSFR) (Shimoda *et al*, 1997), (Touw *et al*, 2007) y la señalización por IL3/IL5, citoquinas de la familia de factores estimulantes de colonias de macrófagos y granulocitos. Dado que las NMPs *BCR-ABL1 (-)* afectan principalmente los linajes, eritroide,

megacariocítico y granulocítico, el complejo entre *JAK2*^{V617F} y EPOR, TPOR y G-CSFR, podría explicar la hipersensibilidad e independencia de citoquinas observada en estas patologías.

El EPOR funciona como dímero en la superficie celular y luego de la unión de citoquinas sufre un cambio conformacional que desencadena la activación de *JAK2* (Constantinescu *et al*, 2001). En presencia de *JAK2*^{V617F}, ocurre señalización independiente de EPOR, que lleva a la activación de STAT5. (Lu *et al*, 2005).

La vía que involucra el EPOR, funciona activando principalmente JAK2-STAT5 y PI3K/AKT (figura 14). El receptor EPOR es un activador débil de MAPK y de STAT3 (Kirito *et al*, 2002), ya que no contiene un sitio consenso para la unión de STAT3, mientras que varios residuos tirosina fosforilados (Y348, Y401, Y429 e Y431) pueden unirse a STAT5 y son requeridos para su activación máxima (Gobert *et al*, 1996). Una consecuencia de la activación de STAT5 es la inducción de la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-XL (Socolovsky *et al*, 1999) la cual se expresa constitutivamente en progenitores eritroides en PV (Silva *et al*, 1998).

Por otra parte, TPOR activa JAK2, STAT5, PI3K/AKT (Miyakawa *et al*, 2001), pero en contraste con EPOR, es un fuerte activador de SHC, MAPK y STAT3 (figura 14 b), (Drachman *et al*, 1995), (Filippi *et al*, 2002). La primera consecuencia de la expresión de la mutación JAK2 ^{V617F} es promover la formación de plaquetas (Tiedt *et al*, 2008)

A bajo nivel de expresión, JAK2 ^{V617F} podría solo activar STAT3, lo cual sería suficiente para la formación de plaquetas. A mayor nivel de expresión, el acoplamiento de ambos TPOR y EPOR, llevaría a la activación de STAT5, y favorecería el programa eritroide. No está claro si el fenotipo policitémico es exclusivamente el resultado de la activación de EPOR o si la activación patológica de TPOR podría también contribuir a este fenotipo. Es interesante destacar que la sobreexpresión de TPOR en ciertos modelos animales lleva a una expansión del compartimiento eritroide (Cocault *et al*, 1996).

La mutación *JAK2*^{V617F} podría afectar la vía de señalización que involucra G-CSFR con menor eficiencia que las vías dependientes de EPOR y TPOR. Quizás sea esta la razón por la cual el linaje granulocítico esté afectado en menor medida en NMPs *BCR-ABL1 (-),* cuando se compara con los linajes eritroide y megacariocítico.

La activación del complejo G-CSFR y JAK2^{V617F} puede llevar a aumentado número de granulocitos, activación constitutiva de granulocitos además de interacción con plaquetas, lo cual podría contribuir a complicaciones trombóticas. No está claro si la leucocitosis que se observa en ciertos pacientes con NMPs y que parece estar asociado con ciertas complicaciones

o evolución a leucemia, (Gangat *et al*, 2007), podría ser debido a la activación patológica de G-CSFR por *JAK2*^{V617F}. Los granulocitos de pacientes con NMPs *BCR-ABL1 (-*) presentan expresión de genes alterada por causa de la expresión de *JAK2* ^{V617F}.

El receptor de G-CSF activa las vías STAT3 y MAPK, además de JAK2-STAT5 y PI3K/AKT. En este caso, existe un balance muy delicado entre la activación de STAT3, requerido para la diferenciación y la inducción de un cese del crecimiento celular (necesario para la diferenciación), y STAT5, el cual promueve la proliferación (Gangat *et al*, 2007). La unión de SOCS3 a través de su dominio SH2 a un residuo tirosina fosforilado en el extremo citosólico del receptor específicamente *downregula* la vía de señalización STAT5. La deleción de la región citosólica, la cual contiene el sitio de unión para SOCS3, lleva a una relación STAT5/STA3 aumentada, y esto se asocia con evolución a leucemia mieloide aguda en pacientes con neutropenia congénita severa.

La activación de G-CSFR podría tener un efecto sinérgico con otros mecanismos y promover la movilización de *stem cells* CD34+ y progenitores de la médula ósea a la periferia.

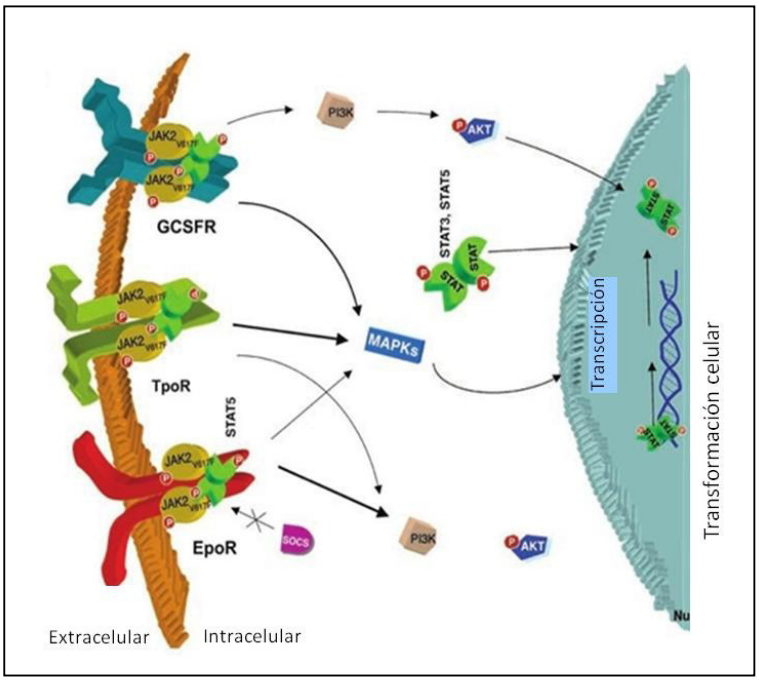


Figura 14. Modelo de señalización constitutiva de las vías que involucran los receptores de eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) y factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSFR). Es de esperar que EPOR y TPOR se unan a JAK2^{V617F}, mientras que G-CSFR lo hace solo a altos niveles de JAK2^{V617F}, por ejemplo en presencia de homocigosis de la mutación. La fosforilación constitutiva de JAK2^{V617F} lleva a la activación de las vías STATs, MAP quinasa, PI-3-quinasa (PI3K) y Akt. Las proteínas SOCS se espera que actúen sobre complejos EPOR-JAK2^{V617F} llevando a una *down*- modulación de la actividad de JAK2. El complejo EPOR-JAK2^{V617F} parece escapar de la actividad de SOCS3 (Kota *et al*, 2008).

1.2.7. Nuevas terapias en MNPs *BCR-ABL1* (-)

Dado que la mutación V617F es mucho más prevalente que las alteraciones citogenéticas, el análisis de esta mutación es actualmente el *gold standard* para demostrar clonalidad y es uno de los principales criterios de diagnóstico, lo cual abre una nueva era en el entendimiento de la patogénesis y tratamiento de estas patologías. Teniendo en cuenta la activación no regulada del *JAK2* como un potencial mecanismo causal de las NMPs *BCR-ABL1* (-) se comenzaron a desarrollar inhibidores de *JAK2*, los cuales han demostrado ser efectivos en estudios preclínicos llevados a cabo en modelos de neoplasias mieloproliferativas (Quintas-Cardama *et al*, 2010). Estos nuevos fármacos reducen selectivamente la fosforilación de la vía JAK-STAT, la proliferación celular y sobrevida de células activadas por *JAK2* tanto *in vitro* (líneas celulares *JAK2+)* como *in vivo* (modelo murino *JAK2+)* (Hitoshi *et al*, 2010). La mayoría de los inhibidores se están evaluando en pacientes con MP de alto riesgo. Durante la fase I y II todos estos inhibidores demostraron principalmente disminución del tamaño del bazo y otros síntomas (probablemente debido a la disminución de los altos niveles de citoquinas circulantes) (Verstovsek *et al*, 2007). Recientemente se han publicado los resultados de fase I/II del potente inhibidor de *JAK1* y *JAK2* denominado ruxolitinib (Verstovsek *et al*, 2009), donde se demuestra un marcado y durable beneficio clínico con rápida y continuada reducción de la esplenomegalia y disminución de los síntomas constitucionales (fiebre, cansancio, pérdida de peso, sudoración nocturna, prurito, normalización del número de plaquetas y glóbulos blancos), independientemente de la presencia o ausencia de la mutación. También se ha observado una significativa reducción de los niveles de citoquinas inflamatorias tales como IL-1, TNF-α e IL-6 así como del factor de crecimiento de endotelio vascular(VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), lo cual ofrece una explicación biológica para la respuesta al tratamiento independiente de la mutación.

Los estudios de fase III para evaluar la eficacia y seguridad de ruxolitinib condujeron a dos estudios randomizados realizados en pacientes con mielofibrosis en estadio intermedio 2 o alto riesgo: - ensayo doble ciego contra placebo denominado COMFORT-I *(Controlled Myelofibrosis Study with Oral JAK Inhibitor Treatment I),* (Verstovsek , 2012) y un ensayo comparando ruxolitinib con el mejor tratamiento disponible (COMFORT-II), (Harrison, 2012). Ambos estudios han demostrado significativos beneficios clínicos, a pesar de algunos efectos adversos, tales

como anemia y trombocitopenia que pudieron ser controlados variando las dosis administradas.

Aún no es claro de qué manera una misma alteración molecular se asocia a distintos fenotipos, postulándose la existencia de otras alteraciones genéticas o moleculares adquiridas que se suman a la mutación del *JAK2*, tales como diferencias en la carga alélica de la mutación y factores genéticos constitutivos de cada individuo, los cuales pueden modificar el fenotipo. Hay evidencias indirectas que el fenotipo clínico y algunas características biológicas son dependientes de los niveles del alelo mutado respecto del total de *JAK2.*

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la determinación de la carga alélica y expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} junto al nivel de citoquinas proinflamatorias constituyen un tema en plena investigación, por sus probables implicancias clínicas y respuesta al tratamiento.

2. Objetivos

Capítulo I: Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos (LMC)

A fin de poder establecer las causas de la resistencia a los inhibidores de tirosina quinasa se han comenzado a realizar numerosos estudios de perfiles de expresión génica tratando de determinar el o los genes responsables de este fenómeno. En este contexto, los objetivos específicos del capítulo I son los siguientes:

-Determinar el perfil de expresión de los genes: CaMKIIγ*, KI-67, HSP70* y *HSP90, BAX y BCL-XL* involucrados en procesos de proliferación, supervivencia y apoptosis regulados por la oncoproteína $P210^{BCR-ABL1}$ en las diferentes fases de la LMC (diagnostico, remisión, recaída en presencia de mutaciones, recaída en ausencia de mutaciones y progresión), a fin de definir su participación en los mecanismos de resistencia y progresión tumoral.

-Estudiar la presencia de las mutaciones G250, E255K, T315I, M351T que confieren resistencia a los ITKs, utilizando un abordaje de mayor sensibilidad (ASO-PCR) que el método de referencia (secuenciación directa). Para ello, se diseñaron construcciones de ADN conteniendo las mutaciones mencionadas.

Capítulo II: Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1* (-)]: Desarrollo de un nuevo abordaje de cuantificación de la mutación *JAK2*^{V617F}

A fin de estudiar la mutación V617F del gen *JAK2* característica de las NMPs *BCR-ABL1 (-)*, los objetivos del capítulo II son los siguientes:

-Diseñar y validar una estrategia mediante la utilización de constructos de ADN de referencia 1:1 alelo salvaje: alelo mutado que permitan cuantificar la carga alélica del $JAK2^{V617F}$ con la finalidad de estimar el estado de homocigocidad (>50%) o heterocigocidad (<50%) del clon mutado y su asociación con el fenotipo de la enfermedad.

-Estudiar la expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} en pacientes con NMPs *BCR-ABL1 (-)* mediante la utilización de constructos de de ADN complementario de referencia 1:1 alelo salvaje: alelo mutado, a fin de cuantificar el nivel de transcripción del alelo mutado.

-Correlacionar los valores de carga alélica y nivel de expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} en las NMPs *BCR-ABL1 (-)* con el propósito de estudiar el comportamiento de estas mediciones en las diferentes entidades (PV, TE, MP); evaluar mecanismos de sobreexpresión de la mutación y su asociación con parámetros clínicos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Población estudiada

3.1.1. Pacientes y controles

En el primer capítulo se evaluaron 101 pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en diferentes etapas de la enfermedad; 15 pacientes se encontraban al diagnóstico (Dx) sin tratamiento previo y 86 bajo tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (ITK). En este último grupo, 30 estaban en remisión (casos en fase crónica (FC) con respuesta hematológica y citogenética completa), 26 con resistencia adquirida (casos en FC que luego de una respuesta inicial al tratamiento habían perdido la respuesta hematológica y/o citogenética) y 30 en progresión a etapas más avanzadas de la enfermedad: fase acelerada (FAc) y crisis blástica (CB). Simultáneamente, se estudiaron 20 individuos sanos que constituyen la población control. En la Tabla 5 se muestran las principales características de los pacientes estudiados.

En el segundo capítulo se estudiaron 20 pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas *BCR-ABL* negativas [NMP *BCR-ABL* (-)], 6 con policitemia vera (PV), 5 con trombocitemia esencial (TE) y 9 con mielofribosis primaria (MP) (tabla 6). Como población control fueron evaluados 20 individuos sanos. En todos los casos fue obtenido un consentimiento informado y el trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina de Bs. As (CEIANM).

Tabla 5. Características de pacientes con LMC.

Varones/Mujeres	54/47
Edad (mediana, años)	49
Rango de edad (años)	23-77
Al diagnóstico [1]	15
En Fase Crónica (Remisión Hematológica y Citogenética)[2]	30
En Fase Crónica (Resistentes)[2]	26
Fases Avanzadas (FA, CB)[2]	30

[1] Previo al tratamiento. [2] Tratados con ITKs.

Tabla 6. Características de pacientes con *NMPs BCR-ABL1 (-).*

	PV (n= 6)	TE (n= 5)	MP (n=9)
Varones/Mujeres	3/3	2/3	3/6
Edad (mediana, años)	64	58	55
Rango de edad (años)	42-90	50-90	50-68
Características al diagnóstico:			
Hematocrito (%)	57,2 ± 2,3	42,2 ± 2,3	33 ± 0,9
WBC ($x10^9$/L)	11,5 ± 2	8,9 ± 1,2	10,5 ± 2
Neutrófilos (%)	65,8 ±6,2	59 ± 5	62,3 ± 7,2
Plaquetas ($x10^9$/L)	354,2 ±73,9	2943 ± 2100	234,1± 50,4
Esplenomegalia	1/6	0/5	4/9
Pacientes con tratamiento citoreductivo	4/6	3/5	3/9

3.1.2. Línea K562

La línea K562 (ATCC catálogo No. CCL-243) es una línea celular derivada de una efusión pleural de un paciente con LMC en crisis blástica (Lozzio *et al*, 1975). Esta fue la primera línea celular establecida con el cromosoma filadelfia (Ph') persistente a lo largo de sucesivos pasajes *in vitro*. A nivel molecular, estas células expresan el rearreglo *BCR-ABL1* de tipo b3-a2. En todos los casos las células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de Glutamina (100 mM, Invitrogen) y 1% de penicilina-estreptomicina (100 mM, Invitrogen) a 37°C en atmósfera con 5% de CO_2.

3.2. Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* positivas (LMC)

3.2.1. Tratamientos *in vitro*

Se emplearon los siguientes inhibidores de tirosina quinasa (ITKs), Imatinib (IMA), Dasatinib (DAS) y Nilotinib (NIL), además de un inhibidor de la síntesis proteica, Homaharringtonina

(HHT). Las soluciones *stock* de los ITKs (100 mM) y de HHT (1 µg/ml) fueron reconstituidas en agua estéril y almacenadas a 4ºC. Las células de la línea K562 fueron centrifugadas a 1000 g, resuspendidas en medio fresco a una concentración final de 500.000 células/ml y preincubadas 24 horas a 37ºC para alcanzar crecimiento exponencial. Luego las células fueron transferidas a placas de 4ml y tratadas *in vitro* con ITKs; Imatinib (1 µM, 5 µM y 10 µM); dasatinib (1 µM, 5 µM y 10 µM), Nilotinib (1 µM, 5 µM y 10 µM) y homoharringtonina (10 µg/ml, 50 µg/ml y 100 µg/ml). Las células tratadas fueron incubadas durante 48 horas, al cabo de lo cual se analizó la apoptosis, la viabilidad celular y se realizó la extracción de ARN total para los análisis de expresión génica.

3.2.2. Técnicas utilizadas

3.2.2.1. Lisis Celular

Las muestras de sangre periférica (SP) de pacientes y controles anticoaguladas con EDTA al 5%, se sometieron al protocolo de lisis de glóbulos rojos con buffer de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3 0,01 M) y cloruro de amonio (NH_4Cl 0,144 M) en agua deionizada; la lisis fue realizada durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego las muestras fueron centrifugadas a 3.000 g durante 10 minutos. Cada muestra fue lavada de dos a tres veces con el mismo buffer hasta obtener un *pellet* de glóbulos blancos limpio.

3.2.2.2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de leucocitos totales de SP empleando el método de fenol/cloroformo. Se hicieron tres extracciones consecutivas, la primera en un volumen de fenol (saturado en Tris/HCl 0,1 mM pH: 8), la segunda con un volumen de fenol saturado/un volumen de IAC (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 v/v saturado en agua) (1:1) y una última extracción con un volumen de IAC. En todos los casos, la fase acuosa superior fue recuperada luego de centrifugar 5 minutos a 12.000 g. El ADN de alto peso molecular se precipitó con 0,1 volúmenes de NaCl 3 M y 1,5 volúmenes de alcohol etílico absoluto. El ADN se recuperó con un capilar de vidrio sellado en sus extremos, se lavó con alcohol etílico 70%, y resuspendió en agua bidestilada estéril. Finalmente, se estimó la concentración de ADN

genómico obtenido por espectrofotometría de luz ultravioleta (UV). La pureza de los ácidos nucleicos relativa a proteínas se estimó a través de la relación DO_{260}/DO_{280} (la pureza es óptima cuando la relación es igual o mayor a 1,8). La cuantificación del ADN obtenido se realizó sabiendo que: 1 unidad DO_{260} equivale a 50 µg ADN/ml. La calidad del ADN fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio 0,25 µg/ml.

3.2.2.3. Extracción de ARN total

La extracción de ARN se realizó a partir de leucocitos totales de SP utilizando el método del *trizol* (Invitrogen *Life Technology*). Aproximadamente 1 x 10^6 células se resuspendieron en 1 ml de *trizol* durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó enérgicamente y se dejó reposar por 2-3 minutos seguido de una primera centrifugación a 12.000 g por 15 minutos a 4ºC. Se recuperó el sobrenadante, se agregaron 500 µl de isopropanol y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12.000 g por 10 minutos a 4ºC. Se descartó el sobrenadante y el pellet de ARN obtenido se lavó con 1 ml de alcohol etílico al 75% y se centrifugó a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se dejó secar a 65ºC durante 5 minutos y fue resuspendido en 30-50 µl de agua bidestilada estéril pre-tratada con DEPC al 0,1%. La concentración de ARN se estimó por espectofotometría a 260 nm, y la pureza se determinó a través de las absorbancias a las longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm (las relaciones $DO_{260}/DO_{230}<1$ son indicativas de contaminación con solventes orgánicos (fenol); relaciones $DO_{260}/DO_{280}<1,9$ son indicativas de contaminación con proteínas); una relación $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,9$ indica que la muestra está pura y se calcula la concentración del ARN sabiendo que una unidad DO_{260} equivale a 40 µg ARN/ml.

3.2.2.4. Reacción de retrotranscripción (RT-PCR)

La síntesis de ADNc se realizó mediante RT-PCR en un volumen final de 20 µl empleando 2 µg de ARN total. El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 95ºC durante 10 minutos, la retrotranscripción a 37ºC por 60 minutos y finalmente la inactivación de la enzima transcriptasa reversa a 95ºC durante 15 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando los siguientes reactivos: 5X *Reaction buffer* (50mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$ y 10mM DTT), 10 mM de cada dNTPs (desoxiribonucleótido trifosfato, dATP, dTTP, dGTP,

dCTP), *random primers* 250 ng/ul, Rnase-out (40 U/µl) y 10 U de M-MLV Transcriptasa Reversa (Promega, Madison, WI, USA).

3.2.2.5. PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR)

La expresión de los genes vinculados con la proliferación celular (*CAMKIIγ, KI-67*), apoptosis (*BAX*, *BCL-XL*), supervivencia celular (*HSP70, HSP90*) y respuesta al tratamiento con ITKs (*BCR-ABL1*) se evaluó mediante QPCR a partir de ADNc obtenido de ARN total extraído de muestras de SP. Como control endógeno de expresión constitutiva o expresión de referencia fueron utilizados los genes *β-2-microglobulina* (*β2M*) y *ABL1*.

El equipo termociclador utilizado en todos los casos fue el LightCycler® 2.0 (*Roche Diagnostics*). Este sistema utiliza capilares de vidrio (hasta un máximo de 32 capilares) ubicados en un rotor o *carrusel* que durante la medición de la fluorescencia gira y posiciona el capilar en el punto focal de máxima intensidad con respecto a la óptica del fluorímetro. Para la cuantificación se utilizó una metodología basada en el colorante SYBR-Green, que libera fluorescencia (a la longitud de onda de 530 nm) cuando se intercala en un segmento de ADN de doble hebra. Los productos de amplificación QPCR obtenidos son analizados utilizando un programa de análisis de la Temperatura de *melting* provisto por el equipo que permite estimar la especificidad de la reacción, control necesario para garantizar la validez de los resultados obtenidos por el método de QPCR con intercalantes como el SYBR-Green.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de mezcla de reacción de 20 µl conteniendo 5 µl de ADNc, 1X PCR Mix (LC FastStar DNA Master SYBR Green I, Roche Diagnostics), 3,5 mM $MgCl_2$ y 0,25 µM de cada *primer*.

La cuantificación relativa de *BCR-ABL1*, se realizó utilizando el método Taqman, empleando el kit Molecular MD que utiliza el gen *ABL1* como control de referencia, teniendo en cuenta el consenso Internacional alcanzado en 2005 para realizar esta medición. Para la cuantificación de los genes *CAMKIIγ,* KI-*67, BAX, BCL-XL, HSP70, HSP90 y β2M* se emplearon *primers* diseñados utilizando el programa PrimerSelect (DNA Star Lasergene versión 7.1.0) (tabla 6). Las condiciones de QPCR para cada gen (lográndose un único ciclado para todos ellos) se detallan a continuación: 95°C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 4 segmentos de PCR (95ºC 5 seg., 62ºC 3 seg., 72ºC 16 seg., 79ºC 1 seg.).Como control negativo de contaminación se utilizó agua bidestilada.

3.2.2.6. Curvas estándar de calibración de los *primers*

El abordaje de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) incluye en su desarrollo la utilización de curvas estándar con concentraciones decrecientes conocidas del número de copias de los genes a medir. La curva estándar cumple diferentes funciones muy importantes para una correcta interpretación del resultado final:

-permite estimar el valor absoluto (cuantificación absoluta) del número de copias de un determinado transcripto.

-permite calcular la eficiencia de la amplificación que resulta específica del par de *primers* y de las condiciones utilizadas, dato muy importante en la cuantificación relativa (intra-experimento).

-permite calcular la variabilidad y normalizar los datos de diferentes experimentos (inter-experimento).

-permite determinar el rango dinámico de la reacción QPCR o el rango de concentraciones donde la medición es sensible y específica.

Para la construcción de las curvas, se empleó el ADNc de la línea K562 ya que no disponíamos de estándares comerciales específicos para los productos génicos en estudio. Se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000) y se amplificó cada punto de la curva por triplicado. La relación entre cada gen de interés y el control endógeno o referencia (*β2M*) se calculó utilizando el *software* provisto por el equipo LightCycler.

Tabla 7. Secuencias de los *primers* empleados.

Genes (Notación génica)	Genes (Notación legada)	Secuencia *primers* (5'->3')	Tamaño (pb)	Referencia
CAMK2G	*CAMKIIγ*	Fw 5´GCAGCAGGCTTGGTTTGGTTTTG 3´ Rv 5´ GTGATGCGCTTTGCTGGGTTTATG-3´	285	Presente trabajo
MKI67	*KI-67*	Fw 5´ GGCAAGAGGCAAATCATCCGAACC 3´ Rv 5' CCTCCGCTCTCCTCTGCCACCTTA 3´	417	Presente trabajo
BAX	*BAX*	Fw 5′ GGGACGAACTGGACAGTAACA 3´ Rv 5´ CCGCCACAAAGATGGTCAC 3′	336	Presente trabajo
BCL2L1	*BCL-XL*	Fw 5′ACTGTGCGTGGAAAGCGTAG 3′ Rv 5′GGTTCTCCTGGTGGCAATG 3′	344	Presente trabajo
HSPA41	*HSP70*	Fw 5´ GCTGATCGGCCGCAAGTTCG 3' Rv 5´ TGCCCCCGCCCAGGTCAAAGAT 3´	395	Presente trabajo
HSP90AA1	*HSP90*	Fw 5' TTATGAAACTGCGCTCCTGTCTT 3´ Rv 5' AGTGCACGTTACCCCAATCTGT 3´	448	Presente trabajo
β2Microglobulina (β2M)	*β2M*	Fw 5´ AAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGA 3' Rv 5´ ACCTCTAAGTTGCCAGCCCTCCTA 3'	319	Presente trabajo

Fw: *Foward*, Rv: *Reverse*.

3.2.3. Efecto citotóxico de ITKs sobre la línea K562 mediante el ensayo MTT

El ensayo MTT es una prueba de viabilidad basada en la reducción metabólica del agente indicador, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas con ITK. Éste es un método de elección para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la intensidad del colorante azul formazán generada por la enzima mitocondrial. El porcentaje de viabilidad se obtiene por:

% Viabilidad = $DO_{540\ nm}$ células tratadas/células control x 100%

Cada ensayo se realizó por triplicado, con controles negativos (medio de cultivo RPMI1640) y células no tratadas con lecturas de DO mayores o iguales a la unidad.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos a los cuales se les transfirió 90 µl de suspensión celular en crecimiento exponencial, y se les agregó 10 µl por pocillo de la dilución de droga ITK correspondiente. La placa se incubó durante 48 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO_2. Pasadas las 48 horas se agregó 5 mg/ml de MTT a cada pocillo, se incubó durante 4 horas en las mismas condiciones y se realizó la lectura en lector de Elisa a 540 nm.

3.2.4. Detección de apoptosis mediante tinción con Anexina V

Durante el proceso apoptótico se producen cambios en la superficie celular que implican pérdida de la asimetría molecular de la membrana plasmática. En células no apoptóticas, la fosfatidilserina (PS) se localiza en la superficie citoplasmática de la membrana celular. Tras la inducción de apoptosis, en la mayoría de los tipos celulares ocurren alteraciones en la organización de los fosfolípidos que llevan a la exposición de la PS sobre la superficie celular. La PS externalizada puede ser detectada i*n vitro* por anexina V, una proteína de unión a fosofolípidos dependiente de calcio.

En este trabajo se utilizó el kit de detección de apoptosis (Calbiochen, Cat. No. PF02) donde la Anexina V está conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y permite su detección por emisión de fluorescencia mediante citometría de flujo. Las células necróticas también se unen a Anexina V-FITC, ya que en la necrosis se observa permeabilización de la membrana celular. Debido a ésto, el kit emplea ioduro de propidio que permite distinguir entre células viables, apoptosis temprana y necrosis o apoptosis tardía. Las células necróticas se unen a AnexinaV-FITC y se tiñen con ioduro de propidio mientras que este colorante es excluido de las células viables (FITC negativas) y células en apoptosis temprana (FITC positivas). En ausencia de fagocitosis celular, el estadio final de la apoptosis involucra desintegración total de las células como ocurre en el proceso necrótico, por lo tanto, las células en apoptosis tardía deberían marcarse tanto con FITC como con ioduro de propidio.

La suspensión celular de aproximadamente $1x10^6$ células/ml; se transfirió (0,5 ml) a un tubo de microcentrífuga. Se agregó 10 µl de *Media Binding Reagent* y 1,25 µl de Anexina-FITC. Luego de incubar la suspensión (protegida de la luz) 15 minutos a temperatura ambiente, las células se centrifugaron a 1000g durante 5 minutos. El *pellet* se resuspendió en 0,5 ml de *Binding Buffer*

1X. Se agregó 10 µl de ioduro de propidio y las muestras se dejaron en hielo protegidas de la luz para ser analizadas inmediatamente por citrometría de flujo.

3.2.5. Construcción de los plásmidos correspondientes al gen *ABL1* en su versión mutada (MT) y no mutada o *wildtype* (WT)

El constructo Exón6 MT-Exón3-Exón4 MT consiste en un fragmento de ADN formado por la fusión de tres exones del gen *ABL1* y donde el exón 6 contiene las mutaciones T315I y M351T (conocidas en la literatura por conferir resistencia al tratamiento con imatinib); el exón 3 no contiene mutaciones y es usado como control interno de carga de ADN, y el exón 4 contiene a las mutaciones G250E y E255K (también asociadas a resistencia al imatinib) (figura 15). El constructo Exón6 WT-Exón3-Exón4 WT presenta la misma estructura de fusión de exones del *ABL1* que el constructo MT correspondiente pero en su versión no mutada o WT.

3.2.5.1. Constructo de referencia *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT

Mutagénesis sitio dirigida

En una primera serie de PCRs, a partir de ADN genómico proveniente de un dador sano se amplificaron cuatro fragmentos independientes, utilizando *primers* específicos que incorporaron la mutación deseada en el producto amplificado: (i) un fragmento de 146 pb utilizando los *primers* Fw: E_6-315-Mut-F y Rv: 351-Mut-R, que generaron un producto de PCR conteniendo la mutación T315I; (ii) un fragmento de 151 pb empleando Fw: 351-Mut-F, Rv: E_6-Ext-R para dar un producto de PCR conteniendo la mutación M351T; (iii) un fragmento de 232 pb con los *primers* Fw: E_4-250-255-F, Rv: E_4-Ext-R que generaron un producto conteniendo dos mutaciones (G250E, E255K); (iv) un fragmento de 405 pb utilizando los *primers* Fw: E_4-Fus-F y Rv: E_4-250-255-R para dar un producto conteniendo las mutaciones G250E y E255K y (v) un espaciador de ADN correspondiente al exón 3 del ABL1 (361pb), empleando *primers* Fw: E_3-Fus-F, Rv: E_3-Fus-R cada uno diseñado con una cola en su extremo 5´ de ADN de 15 nucleótidos aproximadamente para permitir la fusión con los brazos izquierdo y derecho del constructo correspondientes al exón 4 y 6, respectivamente. Todos los *primers* utilizados para generar ambos constructos se listan en la tabla 8.

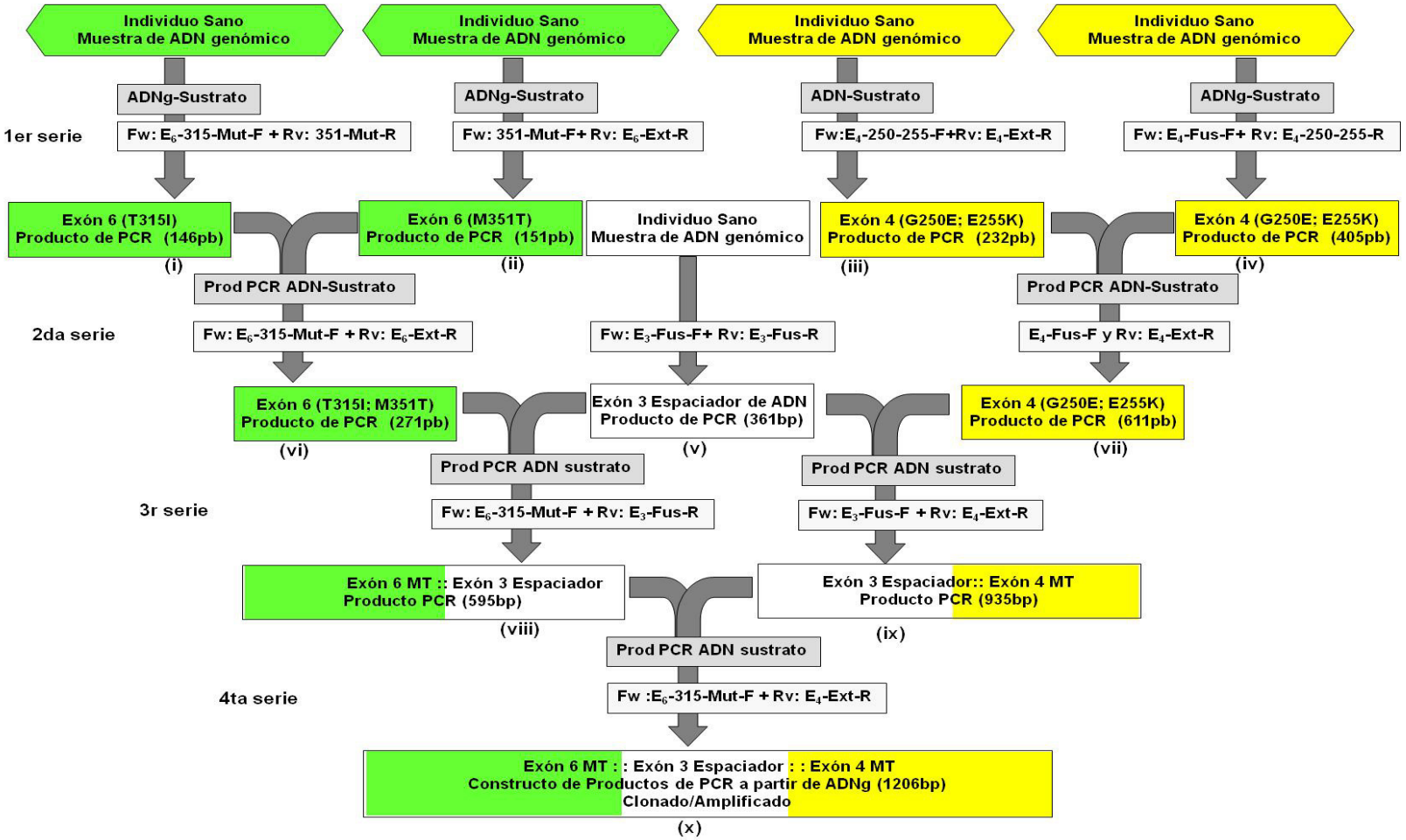


Figura 15. Abordaje empleado para la formación del constructo de referencia *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4 MT. En una primera serie de amplificaciones por PCR se obtuvieron los productos (i), (ii), (iii), (iv) y (v) a partir de ADN genómico. En la segunda serie de PCR se formaron los productos (vi) y (vii) utilizando como sustratos (i), (ii); y (iii), (iv) respectivamente. En la tercera ronda se obtuvieron (viii) y (ix) a partir de la fusión de (vi) con (v) y de (v) con (vii) respectivamente. Finalmente se realizó un cuarto paso para obtener el producto final (x) que corresponde al constructo de referencia *ABL1* Exón 6 MT: Exón 3 Espaciador: Exón 4 MT. En el esquema se indican los *primers* y sustratos utilizados para las amplificaciones.

El programa básico de amplificación varió solo en cuanto a la temperatura de *annealing* siendo las condiciones de ciclado las siguientes: 94ºC 2 min seguido por 25 ciclos de 94ºC 45 seg, temperatura de *annealing* específica 50-58ºC 1 min; 72ºC 1 min 30 seg y una extensión final de 72ºC por 5 min, siendo las temperaturas de *annealing* las que se detallan a continuación: 58ºC para (i), (ii) y (iii); 50ºC para (iv) y 56ºC para amplificar (v).

Una segunda serie de PCRs se diseñó para realizar dos fusiones: el producto de PCR obtenido en (i) fue fusionado con (ii) para obtener un fragmento (vi) de 271 pb que corresponde a todo el exón 6 conteniendo las dos mutaciones generadas (T315I y M351T), utilizando los *primers* Fw: E_6-315-Mut-F y Rv: E_6-Ext-R. El fragmento amplificado en (iii) fue ligado a (iv) para generar un producto de 611 pb (vii) que corresponde al exón 4 completo conteniendo las mutaciones G250E y E255K empleando los *primers* Fw: E_4-Fus-F y Rv: E_4-Ext-R.

La tercera serie de PCRs consiste en la fusión de los productos obtenidos en (vi) con (v) para dar un producto de 595 pb (viii) con *primers* Fw: E_6-315-Mut-F y Rv: E_3-Fus-R, que corresponde a la ligación del Exón 6 con el Exón 3 y la fusión de los productos (vii) con (v) para dar un producto de 935 pb (ix) empleando *primers* Fw: E_3-Fus-F y Rv: E_4-Ext-R que consiste en la fusión del Exón 3 con el Exón 4. La condiciones de ciclado para las amplificaciones por PCR de fusión (iv), (vii), (viii) y (ix) se basaron en estrategias del tipo *Touch up* (donde la aplicación de condiciones de *annealing* más permisivas en los primeros ciclos de amplificación asegura la formación de algunas moléculas que luego servirán de sustrato para una segunda fase de ciclos con condiciones mas restrictivas que aseguren la obtención específica del producto diseñado) : 94ºC 2 min, seguido de 4 ciclos de 94ºC 45 seg, 50ºC 1 min, 72ºC 2 min, seguido de 24 ciclos de 94ºC, 45 seg, 55ºC 1 min, 72ºC 2 min, finalizando el programa con una extensión final de 72ºC 5 min. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: 0.4 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs (Invitrogen, Argentina), 1 Unidad de GoTaq DNA Polimerasa y buffer 5X Go Taq (Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 50 mM, BSA, seroalbúmina bobina, 0,1 mg/ml).

Las colas de ADN de los *primers* necesarias para la fusión (E3-Fus-F y E_3-Fus-R) se diseñaron para hibridar secuencias con una T (timidina) en su extremo 5´, vecinal al extremo del producto de PCR, y permitir, de esta manera, el adecuado *annealing* de las cadenas de los productos de PCR que llevan una A (adenina) adicional agregada con eficiencia variable por la Taq-polimerasa en los extremos 3´.

Una cuarta ronda de PCRs se realizó utilizando como sustratos los productos obtenidos en (viii) y (ix) para obtener la versión final (x) del constructo *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4MT (1206 pb).

(Figura 15). Estos dos productos se superponen 361 pb (incluyendo las colas) en los extremos 3´ de cadenas complementarias para permitir la fusión. Para construir el producto final se emplearon 3 Unidades de GoTaq DNA Polimerasa y las siguientes condiciones de ciclado: 95ºC 3 min, seguido por una primera extensión de 10 ciclos de 95ºC 1 min y 3 min a 72ºC , en este momento se agregan los *primers (*E_6-315-Mut-F y Rv: E_4-Ext-R*)* y se continúa con 20 ciclos de 94ºC por 45 seg, 55ºC por 1 min, 72ºC por 7 min, terminando con una extensión final de 72ºC 5 min.

Todos los productos de amplificación obtenidos fueron analizados y su identidad de tamaño resuelta en electroforesis en gel de agarosa (1.5-2%), teñidos con bromuro de etidio, escindidos del gel cuidadosamente con una pipeta *pasteur (pluck-out)*. El producto final fue purificado usando cromatografía en minicolumnas GFX™ *Spin columns*, (Amersham, Argentina).

3.2.5.2 Constructo de referencia *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT

El constructo Exón6WT-Exón3-Exón4WT también consiste en una estructura combinada de tres exones: Exón6, Exón 3 y Exón 4 y fue diseñado mediante las mismas estrategias de PCRs de fusión pero en la versión no mutada (WT). (Figura 16).

A partir de ADN proveniente de un dador sano se obtuvieron tres productos de amplificación en una primera serie de PCR: (i´) un brazo izquierdo correspondiente al exón 6 (271 pb) empleando *primers*: Fw: E_6-315-WT-F, Rv: E_6-Ext-R; (ii´) un brazo derecho correspondiente al exón 4 (615 pb) utilizando *primers* Fw: E_4-Fus-F, Rv: E_4-Ext-R e (iii´) un ADN espaciador correspondiente al exón 3 (361 pb) empleando los *primers* Fw: E_3-Fus-F, Rv: E_3-Fus-R. Los reactivos, concentración de *primers* y condiciones de ciclado empleados para generar (i´), (ii´) y (iii´) son las mismas que aquellas utilizadas para generar los amplicones en su contraparte mutada.

La segunda serie de PCRs consistió en la fusión de (i´) y (iii´) para generar un fragmento de 595 pb (iv´) empleando *primers* Fw: E_6-315-WT-F, Rv: E_3-Fus-R y la fusión de (ii´) y (iii´) para dar un producto de 935 pb (v´) utilizando los *primers* Fw: E_3-Fus-F, Rv: E_4-Ext-R. Estas dos reacciones se realizaron utilizando 2 µl de cada producto de PCR purificado por columna con condiciones de reactivo similares y la misma estrategia de PCR del tipo *touch up* que fuera empleada para realizar las fusiones del constructo *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4MT.

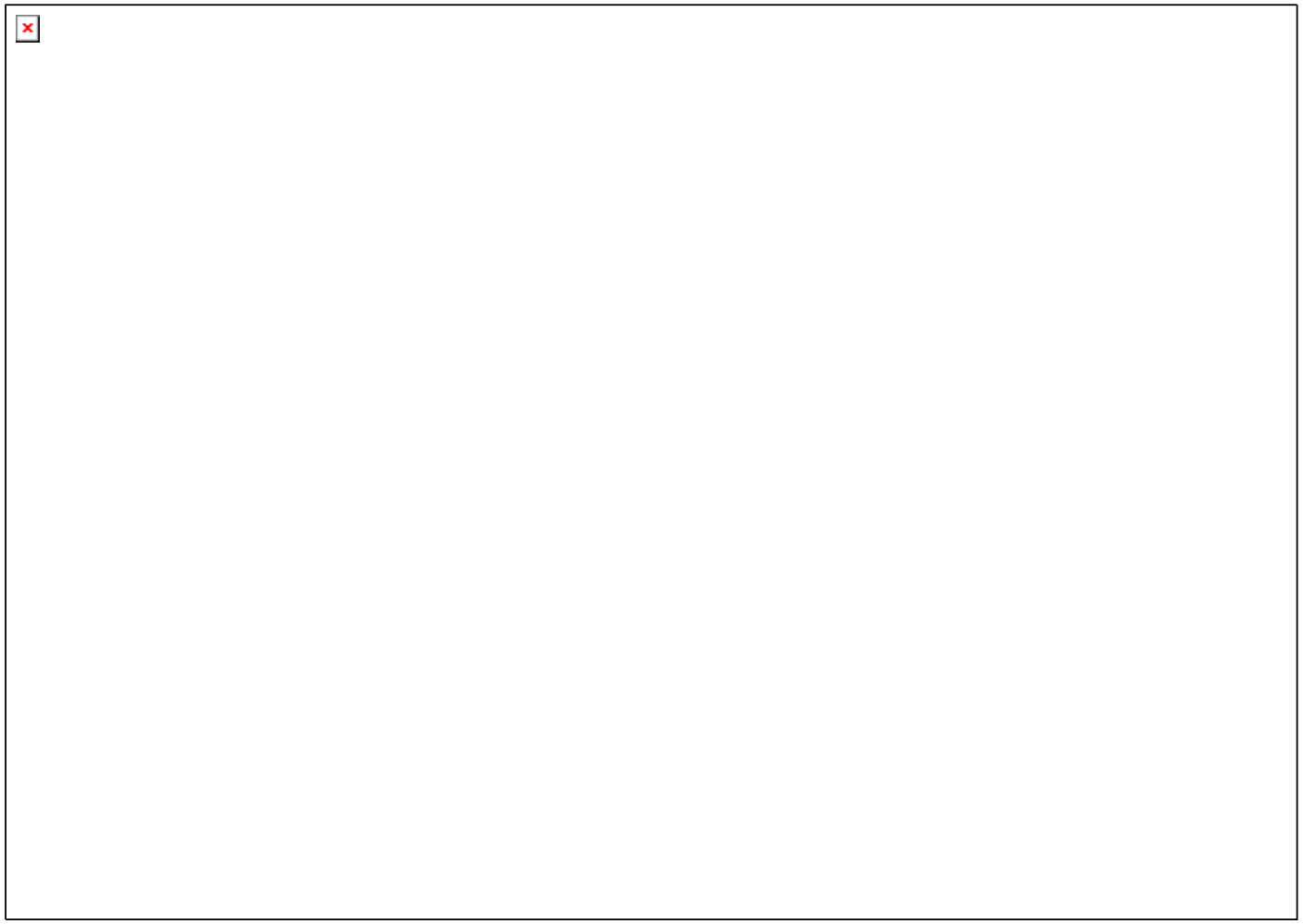


Figura 16. Abordaje empleado para la formación del constructo de referencia *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT. En una primera serie de amplificaciones por PCR se obtuvieron los productos (i´), (ii´) y (iii´) partir de ADN genómico. En la segunda serie de PCR se formaron los productos (iv´) y (v´) utilizando como sustratos (i´), (iii´) y (iii´), (ii´) respectivamente. En la tercera ronda se fusionaron (iv´) y (v´) para obtener el producto final (vi´) que corresponde al constructo de referencia *ABL1* Exón 6 WT: Exón 3 Espaciador: Exón 4 WT. En el esquema se indican los *primers* y sustratos utilizados para las amplificaciones.

Tabla 8. Secuencias de los *primers* empleados para generar los constructos *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT y *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT.

Primers	**Secuencia (5'->3')**	**Tamaño (pb)**	**Referencia**
Fw: E_6-315-Mut-F	Fw 5´AGCCCCCGTTCTATATCATCATTGAGTTC 3´	146	Presente trabajo
Rv: 351-Mut-R	Rv 5´CTTCTCCAGGTACTCCgTGGCTGACG 3´		
Fw: 351-Mut-F	Fw 5´CGTCAGCCACGGAGTACCTGGAGAAG 3´	151	Presente trabajo
Rv: E6-Ext-R	Rv 5´GGTTAGAAGCTGCGCCCTGAGA 3´		
Fw: E_4-250-255-F	Fw 5´GGGCGaGGGCCAGTACGGGaAGGTGTACGAG 3´	232	Presente trabajo
Rv: E4-Ext-R	Rv 5´AGGAATGATATAAGACGGAAAAGT 3´		
Fw: E_4-Fus-F	Fw 5´AGGGGAGTAACTTAGAGCAC 3´	405	Presente trabajo
Rv:E4-250-255-R	Rv 5´ACACCTtCCCGTACTGGCCCtCGCCCAGCTTG 3´		
Fw: E_3-Fus-F	Fw5´CAGGGCGCAGCTTCTAACCATTTGGTTCCTTTCTTCTC3´	361	Presente trabajo
Rv: E3-Fus-R	Rv 5´GTGCTCTAAGTTACTCCCCTACCTTGCCATCA 3´		
Fw: E_6-315-WT-F	Fw 5´AGCCCCCGTTCTATATCATCAtTGAGTTC 3´	271	Presente trabajo
Rv: E6-Ext-R	Rv 5´GGTTAGAAGCTGCGCCCTGAGA 3´		

*Las letras en minúscula corresponden a las bases que generan los cambios en la secuencia *target* produciendo las mutaciones específicas.

El producto final *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT (vi´) de 1206 pb se obtuvo por la fusión de (iv´) y (v´) utilizando los *primers* E_6-315-WT-F y Rv: E_4-Ext-R (Tabla 8). Las condiciones de ciclado son las mismas que las empleadas para generar el constructo de referencia con las mutaciones del *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4 MT.

Todos los productos de PCR intermediarios fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, extraídos del gel por el método de *pluck-out* explicado arriba. El producto final fue purificado usando cromatografía en minicolumnas GFX™ *Spin columns*, (Amersham, Argentina).

3.2.6. Confirmación de la presencia del inserto *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT y *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT mediante análisis de restricción

Para confirmar la correcta inserción de los constructos en cada plásmido (cada uno conteniendo una de las dos construcciones generadas), se incubó con la enzima de restricción *Eco* RI. Esta enzima posee un único sitio de corte en el *polilinker* del plásmido de manera que libera el inserto clonado respetando las identidades de tamaño. Un µg de plásmido fue digerido con 5 Unidades de enzima *Eco* RI en un volumen total de 20 µl conteniendo: B*uffer* H 10X (900 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl y 100 mM $MgCl_2$) y 10µg/µl de BSA (Promega). Los productos de restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio.

3.2.7. Confirmación de la presencia de mutaciones en el constructo *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4 MT y su contraparte *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT mediante secuenciación de ADN directa

Las secuencias de ADN de construcciones *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4MT y *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT, fueron caracterizadas para comprobar la presencia de las mutaciones generadas. Se realizó una reamplificación de cada constructo de 1206 pb empleando las siguientes condiciones de termo-ciclado: 94ºC 2 min seguido de 25 ciclos de 94ºC 45 seg, 55ºC 1 min, 72ºC 6 min seguido de una extensión final de 72ºC 5 min. Los productos amplificados fueron secuenciados por el método de secuenciación automática con marcación fluorescente, empleando el equipo ABI 3130 XL (Genetic Analizer of Applied Biosystems), (BigDye ABI, Argentina) y los *primers* E_4-Ext-R y E_6-Ext-R.

3.2.8. Detección de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1*

Las muestras de ADN empleadas para realizar los gradientes de temperatura de *annealing* (específica para cada ASO-PCR) se amplificarón por PCR para obtener la secuencia correspondiente al exón 4 y al exón 6 del gen *ABL1* empleando los *primers* Ex4 *ABL1* Fw; Ex4 *ABL1* Rv y Ex6 *ABL1* Fw ; Ex 6 *ABL1* Rv respectivamente (tabla 9).

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 94ºC 5 min seguido de 30 ciclos de 94ºC 30 seg, 64ºC 1 min, 72ºC 1 min seguido de una extensión final de 72ºC 5 min. Los productos obtenidos se secuenciaron por el método automático con marcación fluorescente, empleando el equipo ABI 3130 XL (Genetic Analizer og Applied Biosystems), (BigDye ABI, Argentina).

3.2.9. Determinación de la temperatura de annealing mediante PCR en gradiente

Para determinar las condiciones óptimas de la ASO-PCR se amplificaron específicamente las mutaciones en estudio (G250E, E255K, T315I y M351T) empleando 400 ng de ADN genómico proveniente de un paciente portador de cada mutación y de un dador sano según el caso y *primers* alelo específicos para la secuencia mutada o la secuencia *wildtype* (tabla 9). La ASO-PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 0,6 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs (Invitrogen, Argentina), 1 Unidad de GoTaq DNA Polimerasa y buffer 5X Go Taq (Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 50 mM, BSA, seroalbúmina bobina, 0,1 mg/ml). Las condiciones de termo-ciclado empleadas fueron las siguientes: 94ºC 5 min seguido de 30 ciclos de 94ºC 30 seg, gradiente de temperatura 1 min, 72ºC 1 min seguido de una extensión final de 72ºC 5 min.

Para determinar la temperatura de *annealing* óptima para cada reacción fue realizado un gradiente incrementando la temperatura de *annealing* desde 50ºC hasta 70ºC con el fin de seleccionar la condición que amplifique el alelo mutado solo en un paciente portador de la mutación y no en un dador sano.

Tabla 9. Secuencias de *primers* empleados como control y *primers* alelo específicos.

Genes	Secuencia (5'->3')	Tamaño (pb)	Referencia
Ex4 ABL1	Fw 5' TGAGCGAGTAACTTAGAGCACACG3' Rv 5' TCGGACAGCAGGCAGGAGGTAG3´	567	Presente trabajo
Ex6 ABL1	Fw 5'GGAGCGGAGCCACGTGTTGAAGT 3´ Rv 5' GTTAGAAGCTGCGCCCTGAGACCT 3'	328	Presente trabajo
CT Ex3	Fw 5´CTACTACACGCCAGTCAACAGTCT3´ Rv 5´ACACCCTCCCTTCGTATCTCAGC3´	173	Presente trabajo
G250E	Fw 5´GAAGCACAAGCTGGGCGA3´	206	Kang et al, 2006
G250 WT	Fw 5´GAAGCACAAGCTGGGCGG3´	206	Kang et al, 2006
E255K	Fw 5´GCGGGGGCCAGTACGGGA3´	193	Kang et al, 2006
E255 WT	Fw 5´GCGGGGGCCAGTACGGGG3	193	Kang et al, 2006
244r[A]	Rv 5´GCCAATGAAGCCCTCGGAC3´		Kang et al, 2006
T315I	Fw 5´GCCCCCGTTCTATATCATCAT3´	158	Kang et al, 2006
T315 WT	Fw 5´GCCCCCGTTCTATATCATCAC3´	158	Kang et al, 2006
315r[B]	Rv 5´GGATGAAGTTTTTCTTCTCCAG3´		Kang et al, 2006
M351T	Fw 5´CCACTCAGATCTCGTCAGCCAC3´	150	Kang et al, 2006
M351 WT	Fw 5´CCACTCAGATCTCGTTCAGCCAT3´	150	Kang et al, 2006
351r1[C]	Rv 5´GCCCTGAGACCTCCTAGGCT3´		Kang et al, 2006

[A], Para amplificar las mutaciones G250E, E255K y sus contrapartes WT, G250 y E255 se emplearon los *primers* Reverse 244r.[B], para amplificar la mutación T315I y su versión no mutada, T315, fue usado el *primer* reverse 315r. [C], para obtener la secuencia de la mutación M351T y su versión salvaje M351 fue empleado el *primer* 351r1.

3.2.10. Determinación de la sensibilidad de la ASO-PCR

Se realizó una amplificación por PCR a partir de diluciones seriadas de cada constructo de referencia *ABL1* (10^{-1},10^{-2}, 10^{-3}… 10^{-12}) empleando *primers* CT Ex3 Fw y CT Ex3 Rv que generan un producto de 173 pb correspondiente al exón 3 con el propósito de igualar en número de copias las preparaciones de cada plásmido (i.e., *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4 MT y *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT). Para realizar estos experimentos, se calculó el número de copias de cada plásmido a partir del cociente entre la densidad óptica medida y el peso en gramos por copia calculado según la fórmula [n° de pb del (plásmido + inserto) x 660 Da / pb]/ n° de Avogadro (copias/mol) = g/ copia de ADN). Para afinar la estimación relativa del número de copias de cada plásmido se realizaron otra vez amplificaciones PCR comparativas (*primers* CT Ex3 Fw y CT Ex3 Rv) sobre diluciones al medio (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) a partir de la primer dilución donde se observa una clara disminución en la intensidad de señal (indicación de no saturación e ingreso en rangos de concentración estimables). Finalmente para los experimentos de evaluación de la sensibilidad de cada reacción PCR alelo-específica, se realizaron las mezclas de los constructos *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT y *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4 MT (50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 10:90; 5:95; 2,5:97,5; 1,25:98,75; 0,625:99,375). Teniendo en cuenta que cada célula tiene 2 copias de *ABL1* que corresponden a 6,6 pg de ADN, se estimó el número de copias totales del gen *ABL1* (involucrado o no en el rearreglo *BCR-ABL1*) en una muestra de aprox. 400 ng ADN genómico (sustrato típico de una reacción PCR de 25 µl) y se realizaron las mezclas de plásmido con referencia a ese total (ADN sustrato de la reacción PCR: 1.2 x 10^5 copias).

3.2.11. Análisis de mutaciones mediante PCR alelo específica (ASO-PCR)

A partir de 400 ng de ADNg proveniente de 43 pacientes con LMC se amplificaron mediante PCR alelo específica (ASO-PCR) 4 mutaciones descriptas que confieren resistencia al tratamiento con ITKs (G250E, E255K, T315I y M35T). La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 0.6 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs (Invitrogen, Argentina), 1 Unidad de GoTaq DNA Polimerasa y buffer 5X Go Taq (Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 50 mM, BSA, seroalbúmina bobina, 0,1 mg/ml). Las condiciones de termo-ciclado empleadas fueron las siguientes: 94ºC 5 min seguido de 30 ciclos de 94ºC 30 seg, temperatura de *annealing*

específica 1 min (61 ºC para la mutación G250E; 67ºC para E255K; 61ºC para amplificar la mutación T315I y 69ºC para amplificar M351T), 72ºC 1 min seguido de una extensión final de 72ºC 5 min.

Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados y su identidad de tamaño resuelta en electroforesis en gel de agarosa (1.5-2%) y teñidos con bromuro de etidio.

3.3. Neoplasmas Mieloproliferativos *BCR-ABL1* negativos [NMPs *BCR-ABL1* (-)]

3.3.1. Construcción de plásmidos de referencia JAK2^{V617F}-JAK2$^{Wild\ Type}$ (JAK2MT-JAK2WT)

3.3.1.1. Constructo de referencia JAK2 ADNg 1:1 MT:WT

El constructo de referencia *JAK2* ADNg-MT: WT consiste en una estructura tripartita (un brazo izquierdo mutado, MT-left-arm, un espaciador de ADN y un brazo derecho *wildtype*, WT-right-arm) (Figura 17) y se construyó utilizando estrategias de PCRs de fusión.

En una primera serie de PCRs se obtuvieron 3 productos: (i) un MT-left-arm (453 bp) usando los *primers* FOin y ROin (Tabla 10) sobre el ADN genómico (ADNg) de un paciente homocigota para la mutación V617F; (ii) un espaciador de ADN (473 pb) correspondiente a una región del intrón 22 del gen del factor 8 de coagulación (F8) empleando los *primers* Up-Sp-gDNA y Lo-Sp-gDNA, cada uno diseñado con una cola de 15 nucleótidos de longitud en su extremo 5´ para permitir la fusión de los brazos (Tabla 10), y (iii) WT-right-arm (453 bp) utilizando los *primers* FOin y ROin sobre el ADNg de un individuo sano.

En una segunda serie de amplificaciones se realizaron dos fusiones: (iv) el MT-left-arm obtenido en (i) se fusionó con el espaciador de ADN (ii) para obtener un fragmento de 775 pb empleando los *primers* FOin y Lo-Sp-gDNA, y (v) el WT-right-arm obtenido en (iii) se fusionó con el espaciador de ADN (ii) para obtener un producto de 781 pb utilizando los *primers* Up-Sp-gDNA y ROin.

Todas las colas de ADN necesarias para la fusión (Up-Sp-gDNA, Lo-Sp-gDNA, además de los *primers* empleados para fusionar en la próxima sección, Up-Sp-cDNA, Lo-Sp-cDNA) se diseñaron para hibridar secuencias con una T (timidina) en su extremo 5´, vecinal al extremo del producto de PCR, y permitir, de esta manera, el adecuado *annealing* de las cadenas de los productos de PCR que llevan una A (adenina) adicional agregada con eficiencia variable por la Taq-polimerasa en los extremos 3´.

La tercera ronda de amplificaciones por PCR consiste en la fusión de los productos obtenidos en (iv) y (v) con *primers* FOin y ROin para obtener la versión final del constructo de referencia *JAK2* ADNg-MT: WT (1083 bp) (figura 17). Los productos (iv) y (v) se superponen en 473 nucleótidos (incluyendo las colas) en los extremos 3´ permitiendo la fusión.

Para construir el *JAK2* ADNg-MT: WT, las condiciones de ciclado y reactivos de las tres reacciones en la primera serie de PCRs son similares (e.i., (i) MT-left-arm, (ii) Spacer y (iii) WT-right-arm) y todas utilizan ADNg como sustrato. La reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 µl con 150 ng de ADN, 0,4 µM de cada *primer,* 200 µM de dNTPs (Invitrogen, Argentina), 1 Unidad de GoTaq DNA Polimerasa (Promega, Argentina) y buffer 5X Go Taq (Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 50 mM, BSA, seroalbúmina bobina, 0,1 mg/ml). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94° C por 2 min., seguido por 4 ciclos de 94°C 45 seg, 60°C 1 min y 72°C 90 seg; 24 ciclos de 94°C 45 seg, 55°C 1 min y 72°C 90 seg, y un paso de extensión final de a 72°C por 5 min.

Para lograr las fusiones que resultaron en (iv) MT-left-arm con Spacer-DNA y (v) Spacer-DNA con WT-right-arm, se emplearon similares condiciones de reactivos y 2 µl de cada producto de PCR. Las condiciones de ciclado para las amplificaciones por PCR de fusión se basaron en estrategias del tipo *Touch up* debido a la reducida homología entre los productos: un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 2 min, seguido por 4 ciclos de 94°C por 45 seg, 50°C 1 min y 72°C por 2 min; 24 ciclos adicionales de 94°C 45 seg, 55°C 1 min y 72°C por 2 min, y un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

La amplificación de los productos de PCR obtenidos en i, ii, iii, iv y v, se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5-2%), teñidos con bromuro de etidio, y los productos se escindieron del gel cuidadosamente con una pipeta *pasteur (pluck-out).*

La amplificación del producto final de 1083 pb de longitud ADNg MT::WT fue obtenida gracias a la fusión de 2 µl de los productos (iv) y (v) empleando los *primers* FOin y ROin (Tabla 10) y condiciones de reactivos similares a las mencionadas anteriormente pero utilizando 3 Unidades of GoTaq DNA Polymerasa. Fue usado un protocolo de PCR modificado del tipo *touch-down*: un paso inicial de 95°C por 3 min, 10 ciclos of 95°C por 1 min, 72°C por 3 min, 10 ciclos of 94°C por 45 seg, 60°C 1 min y 72°C por 5 min, 10 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C 1 min, y 72°C por 7 min, seguido por un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

El producto de PCR correspondiente al constructo final, fue purificado usando cromatografía en minicolumnas GFX^{TM} *Spin columns*, (Amersham, Argentina) para luego ser clonado y secuenciado.

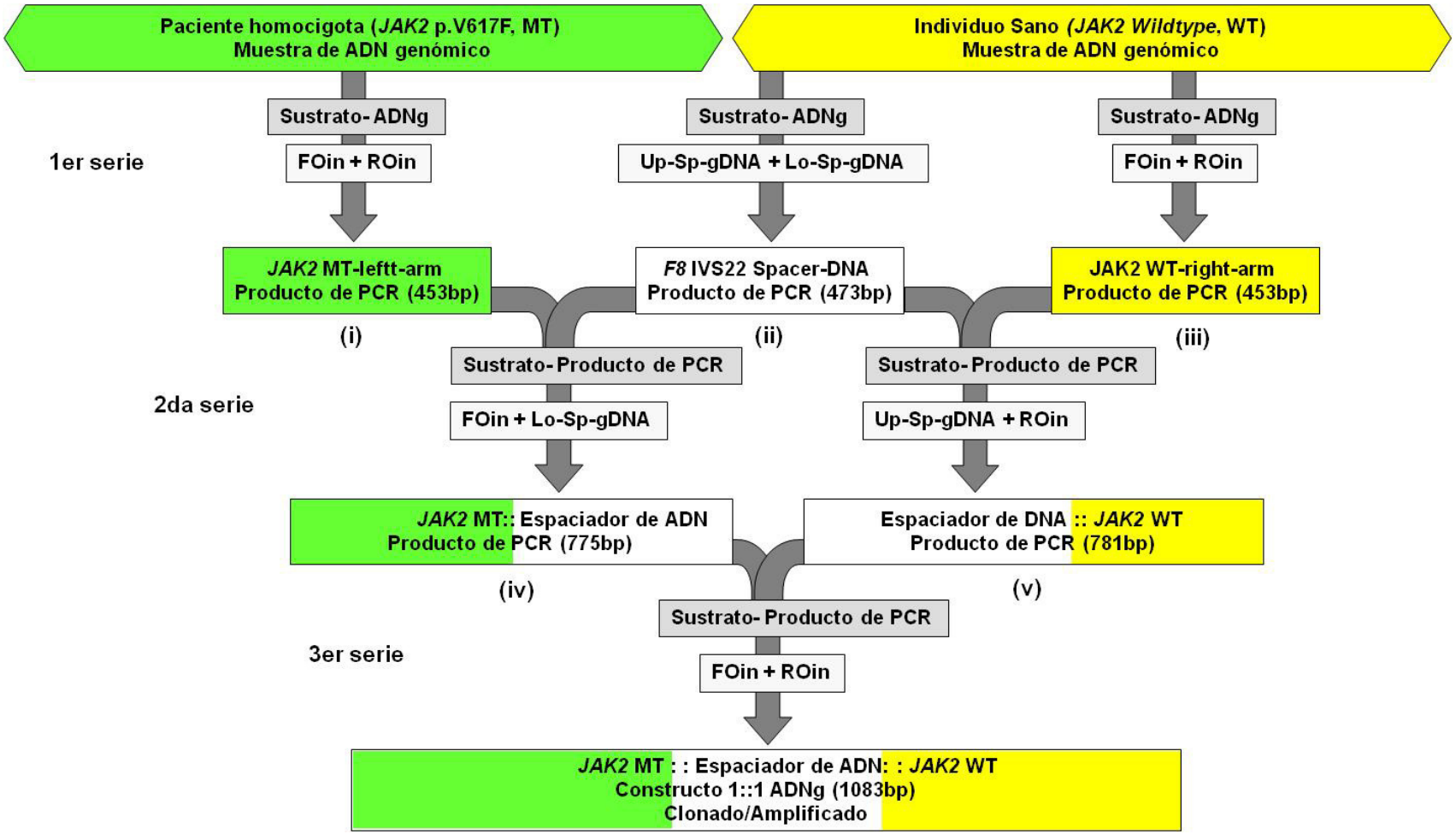


Figura 17. Construcción del plásmido de referencia ADNg *JAK2* ^{V617F} MT: WT 1:1. La primera serie de PCR fue llevada a cabo para obtener los productos (i), (ii) e (iii) a partir de ADN genómico como sustrato. En la segunda serie se obtuvo (iv) a partir de (i) más (ii) y (v) a partir de (ii) más (iii). La producción del constructo final, ADNg *JAK2* ^{V617F} MT: WT 1:1, se llevó a cabo en una tercera ronda de amplificaciones por PCR empleando los productos (iv) y (v). En el esquema se indican los *primers* y sustratos empleados en cada amplificación.

3.3.1.2. Constructo de referencia JAK2 ADNc 1:1 MT:WT

De la misma manera como fue descripto para el constructo de referencia a partir de ADNg, el *JAK2* ADNc-MT: WT consiste en una estructura tripartita con un brazo izquierdo (*MT-left-arm*), un espaciador de ADN (*Spacer*) y un brazo derecho (*WT-right-arm)* y fue construido por el uso de las mismas estrategias de PCR de fusión (Figura 18). Para construir el ADNc MT::WT fueron obtenidos tres productos a partir de una primera serie de amplificaciones por PCR: (i´) un *MT-left-arm* (371 bp) empleando los *primers* FO-1 y RO-1 (Tabla 10) y 3 µl del ADNc (ADN copia) de un paciente homocigota para la mutación JAK2 V617F; (ii´) un espaciador de ADN (473 pb) que corresponde a una región del intrón 22 del gen del factor 8 de coagulación (F8) con *primers* Up-Sp-cDNA y Lo-Sp-cDNA, cada uno diseñado con una cola de 15 nucleótidos de longitud en los extremos 5´para permitir la fusión con los brazos *MT-left-arm* y *WT-rigt-arm*, respectivamente (Tabla 10), y (iii') *WT-right-arm* (371 bp) utilizando los primers FO-1 y RO-1 y 3 µl de ADNc de un individuo con JAK2 salvaje (WT).

Excepto por el uso de ADNc como sustrato en lugar de ADNg, todos los reactivos, concentraciones de *primers* y condiciones de termo-ciclado empleados para amplificar (i'), (ii') e (iii') son las mismas que aquellas utilizadas para amplificar el constructo a partir de ADNg (es decir, (i), (ii) e (iii)).

Una segunda ronda de amplificaciones por PCR fue realizada para fusionar (i´*) MT-left-arm* con el espaciador de ADN (ii') para formar un producto de 752 pb, y el espaciador (ii') con (iii') *WT-right-arm* para formar un producto (v') de743 pb. Ambas fusiones fueron realizadas utilizando 2 µl de cada producto de PCR purificado con similares condiciones de reactivos y condiciones de termo-ciclado del tipo *touch-up* como fue descripto anteriormente.

Todos los productos intermediarios que dieron lugar al constructo de referencia a partir de ADNc, (i'), (ii'), (iii') e (iv') fueron resueltos en electroforesis en gel de agarosa y escindidas las bandas del tamaño correspondiente utilizando una pipeta pasteur (*pluck-out*).

Para la amplificación del constructo final de 1023 pb de longitud, ADNc MT:WT, se emplearon 2 µl de los productos purificados obtenidos en la segunda serie de PCR, (iv´) y (v´), usando *primers* FO-1 y RO-1 (Tabla 10), e iguales condiciones de reactivos y ciclado que las utilizadas para el constructo de referencia a partir de ADN genómico.

El producto de PCR correspondiente al constructo final ADNc MT::WT fue purificado mediante cromatografía en minicolumnas GFX^{TM} *Spin columns*, (Amersham, Argentina) para luego ser clonado y secuenciado.

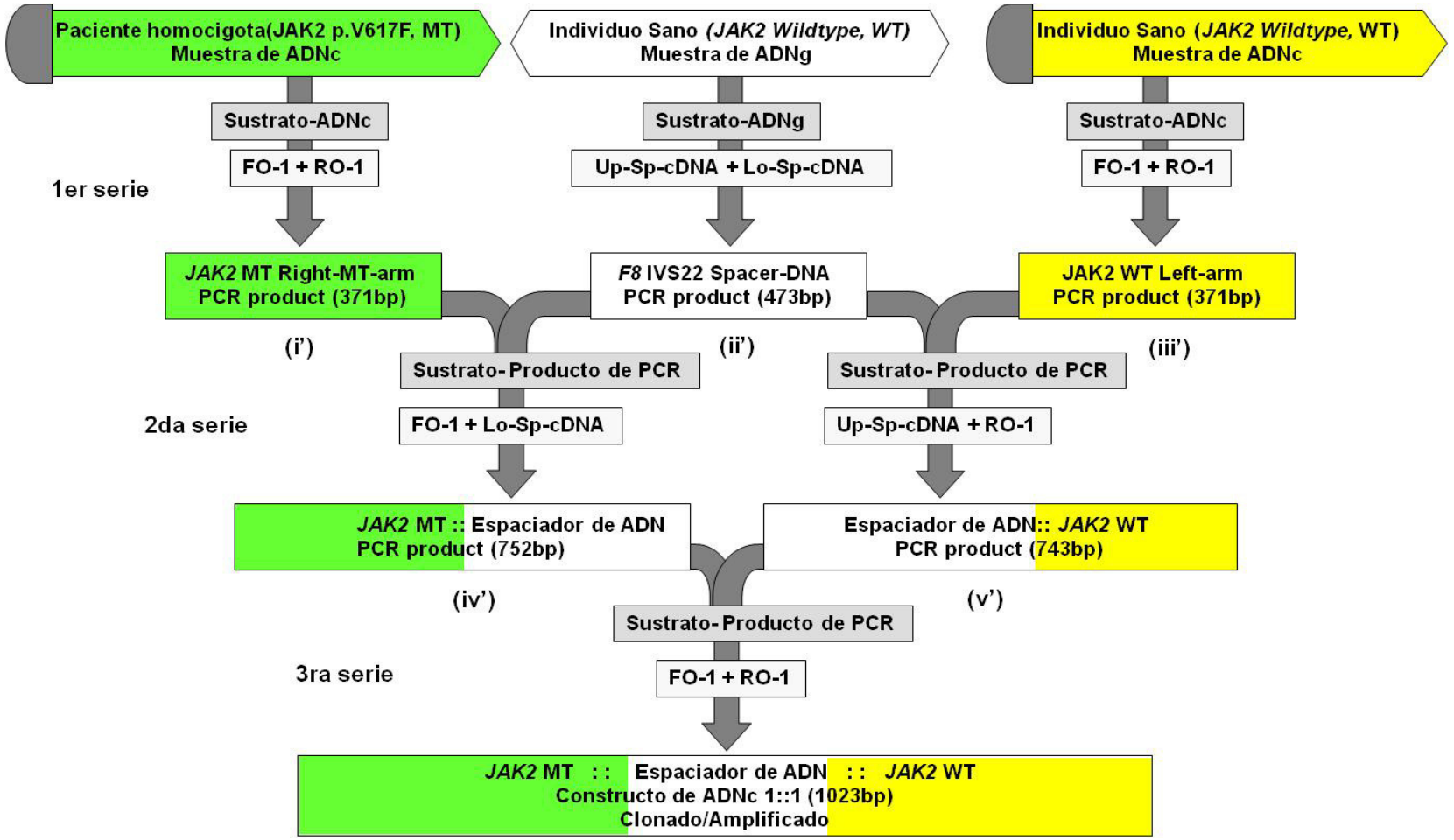


Figura 18. Construcción del plásmido de referencia ADNc *JAK2* ^{V617F} MT: WT 1:1. En la primera serie de PCR fueron obtenidos los productos (i´), (ii´) e (iii´) empleando ADN complementario (ADNc) como sustrato. En la segunda serie se obtuvo (iv´) a partir de (i´) más (ii´) y (v´) a partir de (ii´) más (iii´). La producción del constructo final, ADNc *JAK2* ^{V617F} MT: WT 1:1, se llevó a cabo en una tercera ronda de amplificaciones por PCR fusionando los productos (iv´) y (v´). En el esquema se indican los *primers* y sustratos empleados en cada amplificación.

Tabla 10. Secuencias de *primers* para la construcción de los plásmidos de MT : WT 1:1 ADNg y ADNc MT:WT 1:1.

Nombre	Secuencia (5'->3')	Referencia
Construcción del plásmido de referencia ADNc MT:WT 1:1		
FO-1	ATTTTTAAAGGCGTACGAAGAGAAGTAG	Vannucchi et al, 2006.
RO-1	ATAAGCAGAATATTTTTGGCACATACAT	Vannucchi et al, 2006.
Up-Sp-Cdna	GAAGTTGCTAAACAGaagaaaccccaggaaacaga	Presente trabajo.
Lo-Sp-cDNA	CTGAATAGTTTCTGTctcagcccctaagtcgtatc	Presente trabajo.
Construcción del plásmido de referencia ADNg MT:WT 1:1		
FOnew	CATATAAAGGGACCAAAGCACA	Presente trabajo
FOin	TCCTCAGAACGTTGATGGCAG	Jones et al, 2005.
ROin	ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGAT	Jones et al, 2005.
Up-Sp-gDNA	CAGAGCATCTGTTTTaagaaaccccaggaaacaga	Presente trabajo.
Lo-Sp-gDNA	GACTGTTGTCCATAActcagcccctaagtcgtatc	Presente trabajo.
Primers alelo específicos para ADNc		
RI-1	ACCAGAATATTCTCGTCTCCACAaAA	Vannucchi et al, 2006.
FI-1	GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG	Vannucchi et al, 2006.
Primers alelo específicos para ADNg		
Rmt	GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAaAA	Jones et al, 2005.
Fwt	GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG	Jones et al, 2005.
RMTnew	TTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA	Presente trabajo.

3.3.2. Clonado de los constructos correspondientes a los genes *ABL1* y *JAK2*

Dos µl de cada constructo (*ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT y *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT) fueron ligados directamente en el plásmido pCR2.1 TOPO a temperatura ambiente durante cinco minutos.

Para mejorar la eficiencia de transformación y el número de copias del plásmido cosechado, 2,5 µl de la mezcla de reacción TOPO se añadió a las bacterias a transformar, *DH5αTM-T1*, células competentes de *E. coli* (Invitrogen, Argentina).

Para las reacciones de transformación, las células *E. coli* competentes se incubaron en hielo durante 30 minutos y se sometieron a shock térmico durante 30 segundos a 42°C para generar poros temporarios en la membrana plasmática. Los tubos se enfriaron rápidamente y se agregó 250 µl de medio SOC (2% tripsina, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM de glucosa), luego se agitó horizontalmente a 250 rpm a 37°C durante 1 hora. Veinte µl de células transformadas fueron cultivadas durante toda la noche a 37°C en placas selectivas con 100 mg/ml del antibiótico ampicilina; 40 µl del compuesto orgánico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido, comúnmente conocido como X-Gal. Al utilizar el sustrato cromogénico X-Gal, las colonias con el inserto (colonias blancas) puede ser distinguidas de aquellas sin inserto (colonias azules). Las placas con colonias fueron almacenadas a 4°C. Diez colonias blancas fueron incubadas en 2 ml de medio LB con 50 mg/ml de ampicilina a 37°C durante toda la noche, luego se centrifugaron, y el *pellet* bacteriano fue resuspendido en solución de lisis alcalina (300 µl de Solución A: 25mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa; 300 µl de Solución B: 0,2 M NaOH, 0,1% SDS y 300 µl de Solución C: 3M AcNa pH 5) para liberar preferentemente ADN plásmídico en lugar de ADN cromosómico. Después de centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se precipitó con 0,63 µl de isopropanol frío durante 15 minutos a -20°C. Pasado el tiempo de incubación cada muestra se centrifugó a 15000 g durante 15 minutos y el *pellet* obtenido fue lavado dos veces con 70% de etanol y resuspendido en 50 µl de agua. Las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su uso posterior.

El número de copias del plásmido se calculó por la fórmula, [(pb plásmido+ pb inserto) x 330Da (1 pb) x 2 cadenas]/ $6{,}022 \times 10^{23}$= g/moléculas. Entonces el número de copias de cada plásmido por µl se calculó determinado su absorbancia por espectrofotometría de luz ultravioleta (UV) a 260 nm (g/µl) y dividiendo ese valor por aquél obtenido en la fórmula mencionada anteriormente.

3.3.3. Confirmación de la presencia de la mutación JAK2^{V617F} en ambos constructos de referencia, ADNg y ADNc mediante análisis de restricción y secuenciación directa

La mutación *JAK2* en la posición V617F (c.1849G>T), introduce un sitio único de restricción para la enzima Bsa XI en ambos constructos de referencia (ADNg y ADNc). Por lo tanto, fue utilizada la enzima de restricción Bsa XI para investigar la presencia de una única copia de JAK2 mutado en cada constructo.

Tres µl de una dilución 10^{-3} del plásmido de referencia ADNg y 3 µl de una dilución 10^{-7} del plásmido de referencia ADNc fueron digeridos con 20 Unidades de enzima Bsa XI en un volumen total de 20 µl conteniendo: 1X NEB*uffer4* (20 mM Tris-acetato (pH 7.9), 50 mM acetato de potasio NaCl, 10 mM acetato de magnesio, 1 mM DTT) y 10µg/µl de BSA (New England Biolabs, USA). Los productos de restricción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio.

Por otra parte, los constructos JAK2 ADNg y ADNc MT: WT 1:1, fueron secuenciados bidireccionalmente (con los *primers* FOin y ROin para el constructo ADNg y con los *primers* FO-1 y RO-1 para el constructo ADNc) por el método de secuenciación automática con marcación fluorescente, empleando el equipo ABI 3130 XL (Genetic Analizer og Applied Biosystems), (BigDye ABI, Argentina).

3.3.4. Especificidad de los plásmidos de referencia JAK2 ADNg- y ADNc-MT: WT 1:1

La especificidad de los *primers* empleados para generar los constructos ADNg y ADNc fue confirmada utilizando diferentes combinatorias de *primers* cuyas secuencias se listan en la tabla 9. El protocolo óptimo de termo-ciclado incluye: un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, 25 ciclos de 94°C 30 seg, 58/60°C 45 seg, y 72°C por 1 min, seguido por un paso de extensión final a 72°C por 5 min.

3.3.5. PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) se realizó empleando el LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), basado en la metodología del sistema SYBR-Green. Todas las mediciones se realizaron en un volumen total de 20 µl de mezcla de reacción conteniendo: 5 µl de

ADNc o 20 ng de ADN, 1X PCR Mix (LC FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Diagnostics, Argentina), 3,5 mM $MgCl_2$ y 0,5 µM de cada *primer.*

Las condiciones de reacción óptimas para la amplificación de JAK2 ^{V617F} y WT, empleando ADN como sustrato fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min seguido por 45 ciclos de un segmento que contiene 4 pasos de PCR (95°C por 5 seg, 62°C por 6 seg, 72°C por 12 seg).

Las condiciones empleadas para la amplificación de JAK2 V617F y WT utilizando ADNc como sustrato se detallan a continuación: un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min seguido por 50 ciclos de un segmento que contiene 4 pasos de PCR (95°C por 5 seg, 58°C por 3 seg, 72°C por 20 seg y 75°C 1 seg). Los *primers* alelo específicos empleados en este estudio para la cuantificación relativa de *JAK2* V617F y *JAK2* WT a partir de muestras de ADNc o ADNg son los publicados por Vannucchi et al (2006) y diseñados en este trabajo, respectivamente (Tabla 10).

Las curvas de calibración necesarias para la cuantificación fueron realizadas a partir de diluciones seriadas de los plásmidos de referencia ADNg o ADNc JAK2V617F:JAK2WT 1:1 con el fin de estimar las eficiencias de amplificación y cuantificar la carga alélica y nivel de transcritos JAK2^{V617F} y JAK2WT dentro del rango dinámico.

3.3.6. Estrategia de cuantificación, formulas y estimación de error

La carga alélica (CAL) fue calculada empleando la formula MT / (MT+WT), donde MT representa la cantidad de alelo mutado (c.1849G>T) y WT, el alelo salvaje (*wildtype*), ambos en unidades relacionadas a las diluciones del constructo de referencia MT:WT 1:1, usadas para elaborar las curvas de calibración. El error de las determinaciones de MT y WT, fue estimado por el uso de una regresión lineal entre el promedio y el desvío estándar (DS) de cada dilución por triplicado: 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} y 10^{-8}. El error primario o teórico de la carga alélica (ΔCAL) fue estimado por propagación de los errores individuales de los triplicados de cada medición de MT y WT en el punto de interpolación en la curva de calibración mediante el método de Gauss de derivadas parciales: $\Delta CAL^2 = | \delta CAL / \delta MT |^2 \Delta MT^2 + | \delta CAL / \delta WT |^2 \Delta WT^2$ que resulta en $\Delta CAL_{(MT;\ \Delta MT;\ WT;\ \Delta WT)} = [(WT * \Delta MT)^2 + (MT * \Delta WT)^2]^{½} / (MT + WT)^2$. La estimación experimental del error de CAL que resulta más representativa de la dispersión de datos obtenidos en las muestras de DNA genómico fue calculada a partir de múltiples réplicas de mediciones de pacientes con diferentes niveles de CAL.

3.3.7. Determinación de la mutación V617F mediante ARMS-PCR (*Amplification Refractory Mutation System)*

El ADN fue extraído a partir de leucocitos totales de SP de 23 pacientes con diagnostico de NMPs *BCR-ABL1*- por el método de fenol:cloroformo. Se empleó un abordaje del tipo ARMS-PCR basado en una estrategia que utiliza cuatro *primers* para llevar a cabo la amplificación, dos *primers* para amplificar específicamente el alelo normal (Fwt/ROin) y el mutado (FOin/Rmt) y un control positivo (FOin/ROin) en una misma reacción (Jones, 2005) (Tabla 10). Los *primers* presentan *mismatches* para maximizar la discriminación entre los dos alelos. La PCR fue realizada empleando una temperatura de *annealing* de 60^{o}C, 25 ng de ADN genómico y reactivos y condiciones de amplificación estándar. Los productos fueron resueltos en geles de agarosa 3% y visualizado mediante tinción con bromuro de etidio.

3.3.8. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente empleando el *test t de Student* (para variables cuantitativas) y *Fisher exacto* (para variables categóricas). Los puntos de corte en la expresión de genes agrupados en un *Score* de mutabilidad se seleccionaron de acuerdo al test *Receiver Operating Characteristic* (ROC), el cual ayuda a determinar un valor umbral que permite discriminar con buena sensibilidad y especificidad una población de muestras considerada normal para la variable en estudio respecto de una anormal. Para todos los test, se consideró un $p<0,05$ como estadísticamente significativo.

4. Capítulo I: Resultados

Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos (LMC)

El Capítulo I presenta la evaluación de la expresión diferencial de genes involucrados en procesos de señalización activados por la oncoproteína P210 $^{BCR\text{-}ABL1}$. Entre ellos se estudia la expresión de genes vinculados al proceso apoptótico (*BAX* y *BCL-XL)*, genes ligados a proliferación celular (*CAMKIIγ* y *Ki-67*), supervivencia celular (*Hsp70* y *Hsp90*) y respuesta al tratamiento con ITKs (*BCR-ABL1*) y su correlación con las diferentes etapas de la LMC (diagnóstico, remisión, recaída y progresión a fases más avanzadas).
Asimismo, se estudió la presencia de mutaciones puntuales en el dominio quinasa del gen quimérico *BCR-ABL1* que condicionan la falta de respuesta al tratamiento con ITKs.

4.1. Optimización de los parámetros de la PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR)

Para determinar los niveles de expresión de los transcriptos de interés es necesaria una optimización previa de las condiciones de la PCR, que incluye el diseño de *primers* específicos para cada uno de los genes, optimización de las concentraciones de estos *primers* y de $MgCL_2$ y el ajuste de las condiciones de termo-ciclado. Estos ajustes son cruciales para encontrar un protocolo de amplificación apropiado que permita llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica con una alta eficiencia, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad.

4.2. Eficiencia de la amplificación QPCR

La clave de la técnica de PCR es la amplificación exponencial de un segmento de ADN definido, por secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (*primers*) que se hibridan de forma específica con cada hebra del ADN. La amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos que comprenden cambios de temperatura para favorecer la desnaturalización del ADN molde, la hibridación de *primers* con el templado y la síntesis de ADN complementario por la enzima DNA polimerasa. Cuando la estrategia de PCR es utilizada con fines cuantitativos basada en la medición del producto obtenido en tiempo real (ciclo por ciclo), es necesario optimizar la eficiencia de amplificación de cada par de *primers* con el propósito de depurar el resultado final de cualquier artefacto experimental. La eficiencia de una reacción de PCR se define como el porcentaje de conversión de ADN molde a producto por ciclo. El máximo valor de eficiencia es

2, donde todas las moléculas de ADN existentes son duplicadas en el ciclo subsiguiente, y el mínimo valor es 1, que representa nula amplificación. Para una exacta cuantificación es necesario que las eficiencias de los estándares y las muestras sean similares (por encima del 90%) pues pequeñas variaciones en la eficiencia de amplificación generan grandes errores en la estimación de la concentración. Entre otros factores, la eficiencia de la amplificación PCR depende de la calidad de los *primers* (especificidad única, contenido CG promedio, presencia de estructuras secundarias o dímeros), de las condiciones de amplificación (termociclado, concentración de: enzima, muestra sustrato, nucleótidos y $MgCL_2$), y de la pureza de la muestra. Para medir el nivel de expresión de genes (*CAMKIIγ, KI67*, *BAX*, *BCLXL*, *HSP70 y HSP90*) la eficiencia fue determinada con el ADNc de la línea K562. Las curvas de calibración correspondientes a cada gen se realizaron por triplicado realizando una serie de diluciones 1:10 de la línea celular K562. Se graficó el *Crossing Point* (Cp) (calculado automáticamente por el *software* del equipo Light Cycler 2.0 en la fase exponencial de amplificación) *versus* el logaritmo de la concentración (dilución del ADNc). En la tabla 11 se detallan los valores de eficiencias promedio para todos los genes estudiados así como para el gen de referencia. La eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la recta resultante: Eficiencia= $10^{-1/\text{pendiente}}$.

Tabla 11. Eficiencias de amplificación obtenidas en cuatro ensayos de QPCR utilizando ADNc de la línea K562.

Transcripto	Eficiencia				Promedio
	CST1	CST2	CST3	CST4	
BAX	1,98	1,95	1,86	1,98	1,94
BCL-XL	1,85	1,8	1,81	1,82	1,82
β2M	1,9	1,9	1,85	2,03	1,92
CAMKIIγ	1,978	1,92	1,9	1,88	1,92
KI67	1,91	2	1,9	1,85	1,92
HSP70	2,04	2.1	2,05	2,1	2,07
HSP90	1,91	1,91	1,83	1,95	1,9

CST: curva estándar

4.3. Reproducibilidad de la PCR cuantitativa

La reproducibilidad es la capacidad de un ensayo para obtener iguales resultados a partir de mediciones de la misma muestra. Es un parámetro clave a tener en cuenta en la PCR cuantitativa. Todos los pasos realizados durante el análisis de PCR, desde la preparación de la muestra hasta la detección final de los productos, influyen en la reproducibilidad del ensayo incluyendo el diseño del protocolo experimental, la precisión al manipular volúmenes pequeños y la eficiencia de la PCR.

El coeficiente de variación (CV) de los *Cp* se utiliza habitualmente como un indicador de la reproducibilidad. La variabilidad intra-ensayo se determinó a partir de los *Cp* obtenidos por triplicado de una dilución central del rango dinámico de la curva para cada gen. La variabilidad inter-ensayo se calculó evaluando el promedio de los CV obtenidos para las cuatro curvas (Tabla 12).

Tabla 12. Determinación de la reproducibilidad intra- e inter-ensayo de la QPCR.

Gen	Reproducibilidad intra-ensayo (CV)	Reproducibilidad inter-ensayo (CV)
BAX	0,26%	0,30%
BCL-XL	0,43%	0,60%
β2M	0,22%	0,55%
CAMKIIγ	0,16%	0,26%
KI67	0,70%	0,37%
HSP70	0,59%	0,60%
HSP90	0,60%	0,55%

CV: coeficiente de variación (desvío estándar/promedio). Los valores de CV se expresan como porcentajes.

4.4. Sensibilidad límite y especificidad de la QPCR

Para determinar la sensibilidad límite o límite de detección, (mínima cantidad de ADNc detectable), se realizó una curva de calibración para cada gen a partir de diluciones seriadas (1:10) de la línea celular K562 que expresa los genes en estudio (Figura 19).

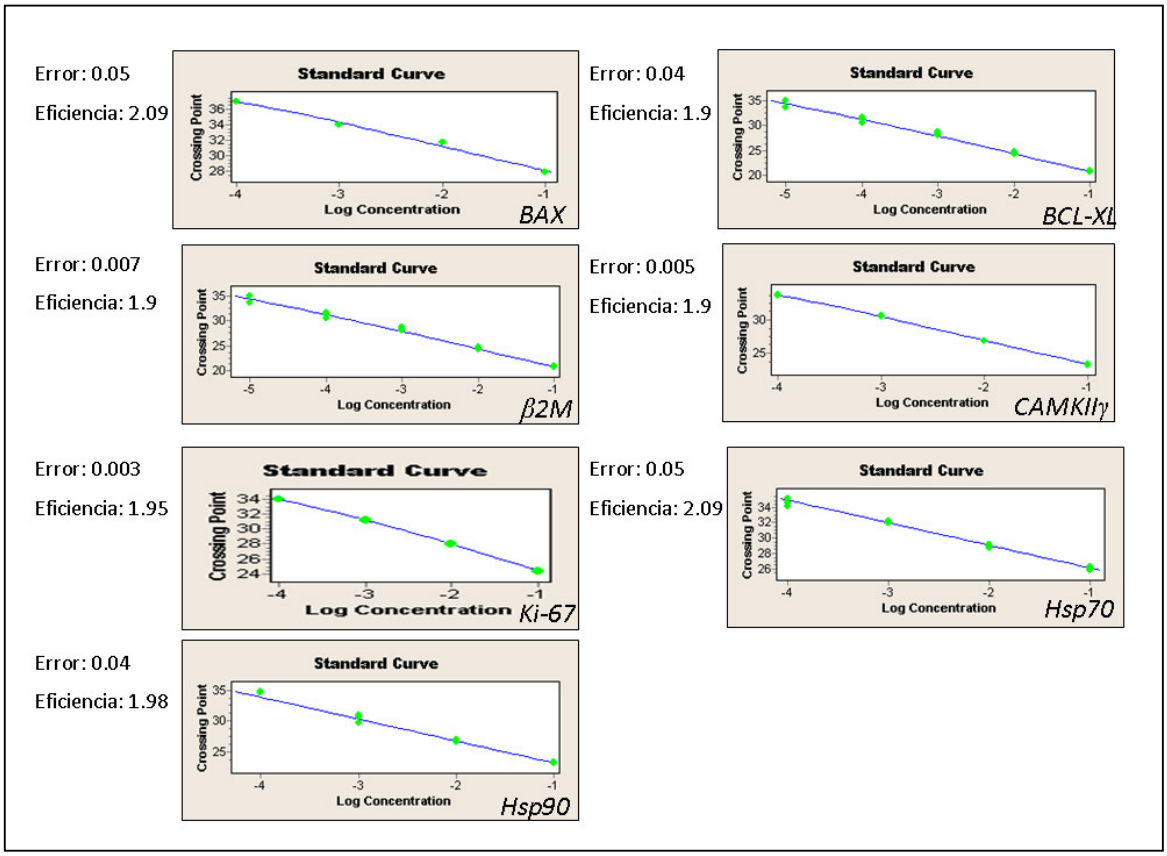


Figura 19. Curva de calibración obtenida mediante el logaritmo de la concentración (dilución ADNc de K562) respecto a su *Cp*. Se indica para cada gen la eficiencia y el error entre triplicados.

Para determinar la especificidad de este método hay que tener en cuenta que el colorante, SYBR Green I, se intercala cuantitativamente en cualquier especie de ADN doble cadena. Por lo tanto detecta el producto PCR específico y también eventualmente los productos inespecíficos y los dímeros de *primers*. Por lo tanto, es necesario comprobar que el producto amplificado que prevalezca sea el producto PCR específico. A tal efecto, fueron analizadas cualitativamente las curvas de desnaturalización de los productos en cada caso (*Melting curve*). Este método consiste en medir la fluorescencia emitida por el SYBR Green I (intercalado en ADN doble

cadena) en todo el rango de temperaturas, desde un punto por encima de la desnaturalización hasta un mínimo debajo de la temperatura de hibridación de los *primers*. Los valores de fluorescencia son convertidos en curvas de desnaturalización, mediante la representación de la derivada negativa de la fluorescencia *versus* la temperatura (-dF/dT *vs* T). Las curvas de desnaturalización son características de cada producto PCR específico dependiendo de su longitud, su secuencia de bases y su contenido de GC. En cada caso la obtención de un único pico en la curva de *melting* garantiza la especificidad de la amplificación (Figura 20).

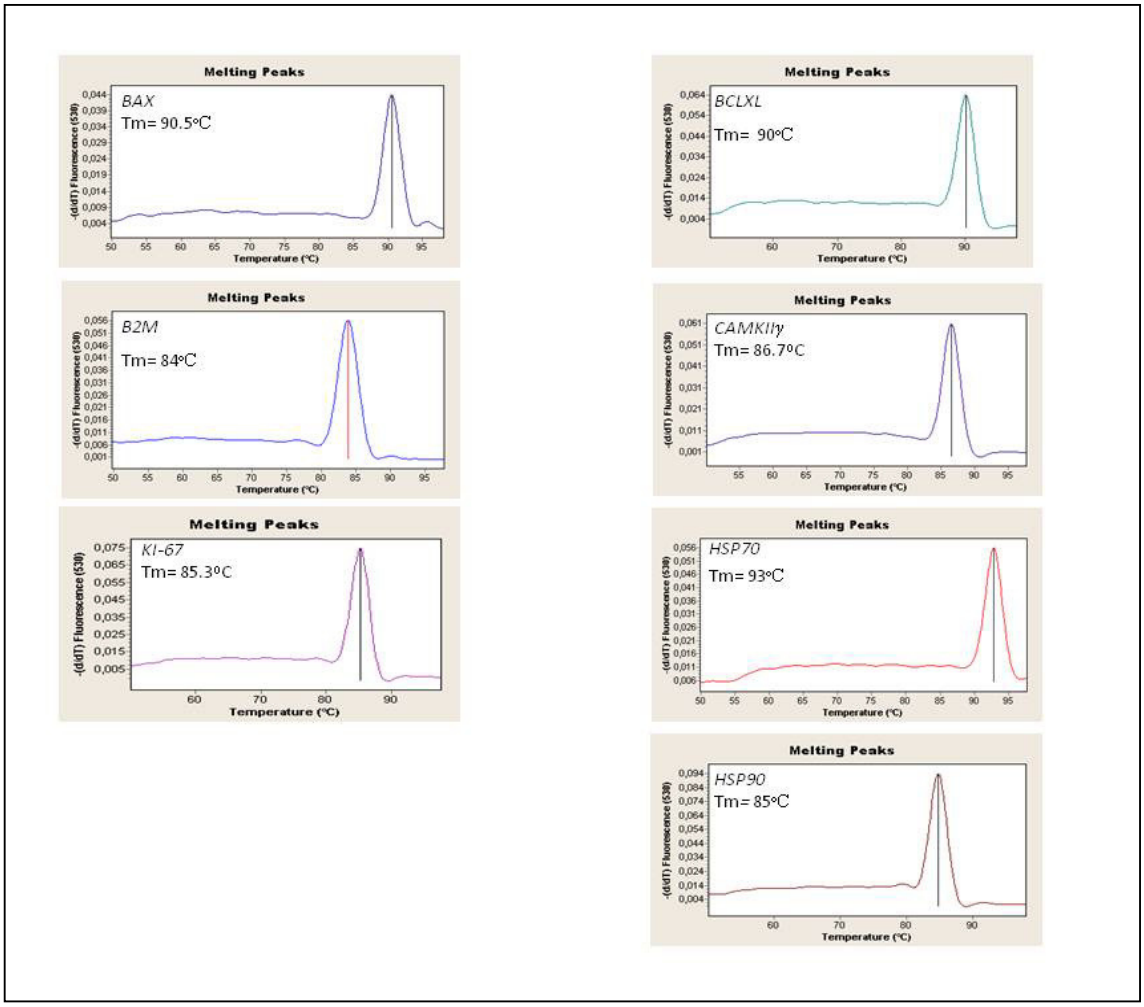


Figura 20. Gráfico de la derivada de la fluorescencia *vs* la temperatura de cada uno de los genes en estudio. Se identifica la Tm como un pico único bien definido característico de cada producto amplificado (línea vertical).

Asimismo, los productos obtenidos por QPCR cuantitativa fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, constatando la amplificación de un único producto específico del tamaño esperado para cada gen (figura 21).

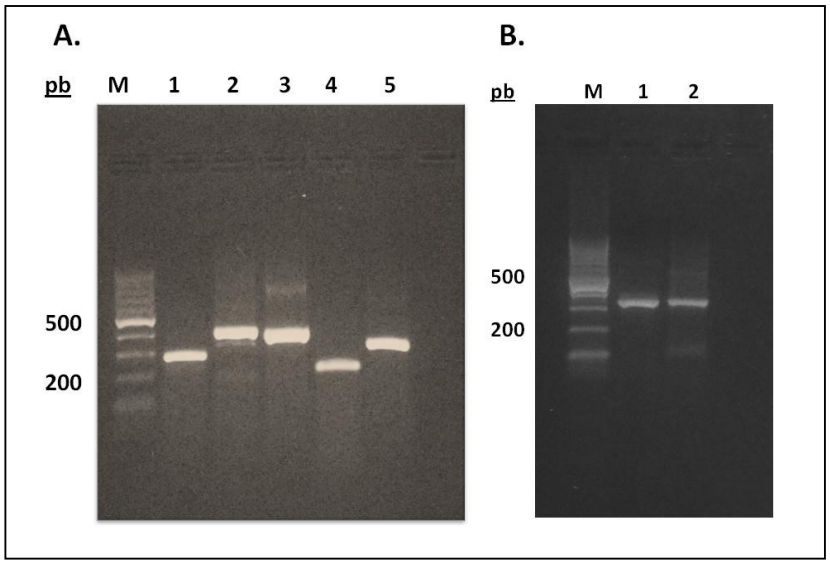


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa (1,5% p/v) de los productos de amplificación QPCR de los transcriptos correspondientes a los genes estudiados. (A). 1*: β2M,* 2: *HSP90,* 3: *KI67,* 4*: CAMKIIγ* y 5*: HSP70.* (B). 1: *BAX*, 2: *BCLXL*. M: marcador de peso molecular, escalera de 100 pares de bases (pb).

4.5. Estudios *in vivo*

4.5.1. Detección de mutaciones en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1*

Se analizaron un total de 56 muestras de pacientes con:

-Respuesta sub-óptima (definida como fallo en lograr una respuesta citogenética mayor (RCMa) a los 6 meses ó una respuesta citogenética completa (RCC) a los 12 meses de tratamiento (Baccarani *et al*, 2006). Estos pacientes, denominados refractarios o con resistencia primaria al tratamiento tienen un mayor riesgo de progresión de enfermedad (Sorel *et al*, 2004; Guilhot *et al,* 2004).

-Resistencia adquirida (pacientes que responden eficientemente al tratamiento con imatinib, pero luego de un tiempo variable pierden la respuesta citogenética y/o hematológica lograda).

La secuenciación del dominio quinasa del gen *BCR-ABL1* de las 56 muestras incluídas en este trabajo permitió identificar presencia de mutaciones en 31 casos, mientras que los 25 restantes no evidenciaron mutaciones, teniendo en cuenta la sensibilidad del método (20%).

Nueve pacientes presentaron mutaciones en el sitio de fosforilación (*P-loop*): incluyendo la mutación L248V (1 caso), G250E (2 casos), Y253H (1 casos) y E255K/V (5 casos).

Tres pacientes presentaron mutaciones ubicadas en el *C-Hélix loop*: E279K (1caso), V289F (1 caso) y L298V (1 caso).

Ocho pacientes presentaron mutaciones en el sitio de unión al ATP (*ATP-binding*): T315I (5 casos), F317L (2 casos) y L324M (1 casos).

Diez pacientes presentaron mutaciones en el dominio catalítico (*C-loop*): L348M (2 casos), M351I (3 casos), E355G (1 caso), N358S (1 caso) y F359V/I/C (3 casos).

Un paciente presentó una mutación en el *A-loop*: L387M.

La figura 22 muestra la localización de cada una de las mutaciones encontradas.

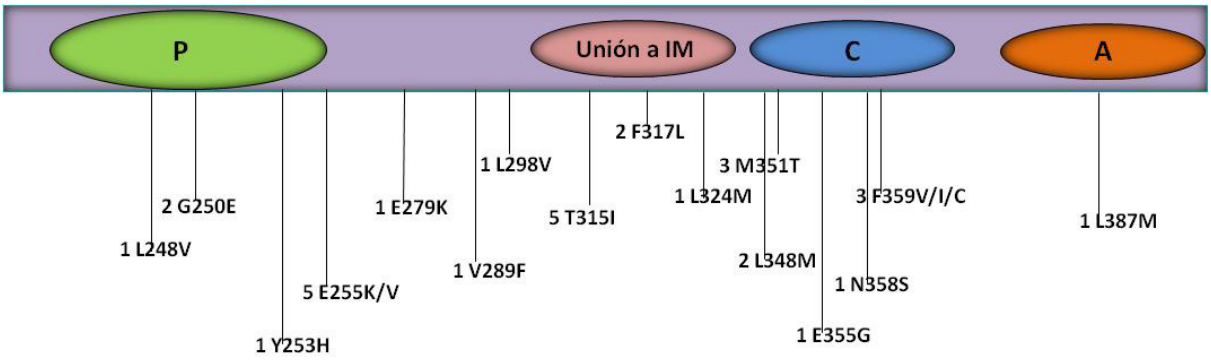


Figura 22. Representación esquemática de las mutaciones del dominio quinasa del gen *BCR-ABL1*. En el esquema se visualizan las mutaciones encontradas en este estudio.

4.5.2. Expresión diferencial de genes involucrados en procesos de señalización activados por P210$^{BCR-ABL1}$

La expresión diferencial de los genes estudiados (*BAX, BCL-XL, CAMKIIγ, KI67*, *HSP70, HSP90* y *BCR-ABL1*), fue estimada a partir de muestras de leucocitos de sangre periférica de 101 pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad: Debut, Fase Crónica en Remisión (FC Rem), Fase Crónica No Respondedora (FC No Resp) y Fase Avanzada (FA) y en 20 individuos sanos.

4.5.2.1. Expresión de *BCR-ABL1/ABL1* en la respuesta al tratamiento con ITKs

La respuesta molecular fue evaluada mediante cuantificación relativa de transcriptos *BCR-ABL1/ABL1*, figura 23.

Los pacientes al Debut, en FC No Resp y en FA presentaron un porcentaje mayor de *BCR-ABL1/ABL1* (promedio ± error-estándar) (185,4 ± 30,56), (37,28 ± 10,87) y (36,00 ± 6,976) respectivamente, respecto del grupo en FC Rem (0,2328 ± 0,1283), ($p<0.0001$).

Los datos muestran que el nivel de *BCR-ABL1* disminuye entre 2 y 3 log cuando los pacientes alcanzan la remisión completa indicando que la determinación de la expresión relativa *BCR-ABL1*/*ABL*1 es un excelente monitor de respuesta al tratamiento.

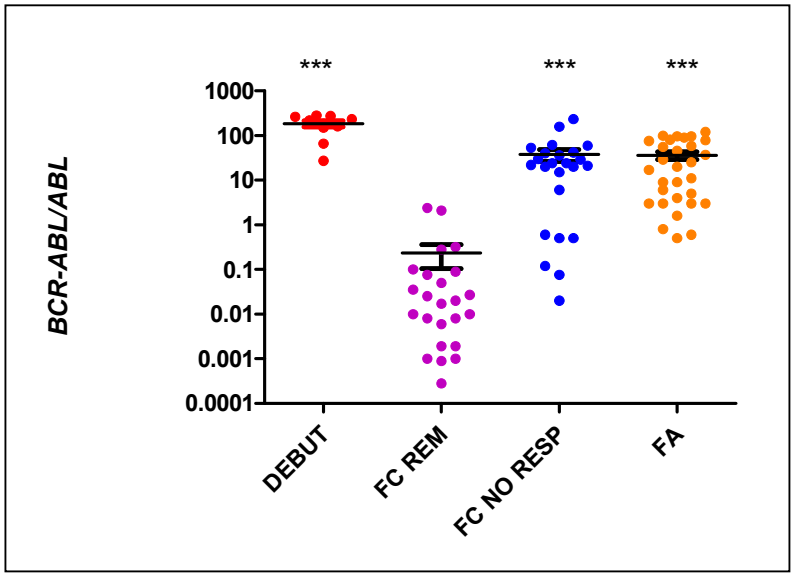


Figura 23. Perfil de expresión de *BCR-ABL1.* Diferencias significativas en pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad, Debut (al diagnóstico), FC No Resp (Fase Crónica sin respuesta al tratamiento) y FA (Fase Avanzada incluye fase acelerada y crisis blástica) respecto al grupo FC Remisión (Fase Crónica en Remisión). *** $p<0,0001$.

4.5.2.2. Expresión de genes involucrados en la vía mitocondrial del programa apoptótico (*BAX y BCL-XL*)

Con el objetivo de estudiar la biología y encontrar eventuales marcadores de las distintas fases de la LMC, se determinaron los niveles de expresión de los genes *BAX* y *BCL-XL* implicados en la vía mitocondrial del programa apoptótico y la relación entre ellos *BAX/BCL-XL* en pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad, y en controles (dadores normales).

Se observó que pacientes al Debut, en FC No Resp y en FA presentaron relaciones *BAX/BCL-XL* significativamente menores (Debut: 1,288 ± 0,16; FC No resp: 3,866 ± 1,3 y FA: 3,12 ± 0,6) respecto a la relación de los pacientes en FC Rem (FC Rem: 14,2± 2,2) ($p<0.0001$; $p<0,009$ y $p<0,0001$, respectivamente). El grupo control no presentó diferencias significativas respecto del grupo FC Rem. Los datos se grafican en la figura 24.

La evidencia de una disminución significativa en la relación *BAX/BCL*-XL al debut de la enfermedad y a medida que la patología progresa hacia un estado más agresivo, indica su potencialidad como factor pronóstico en LMC.

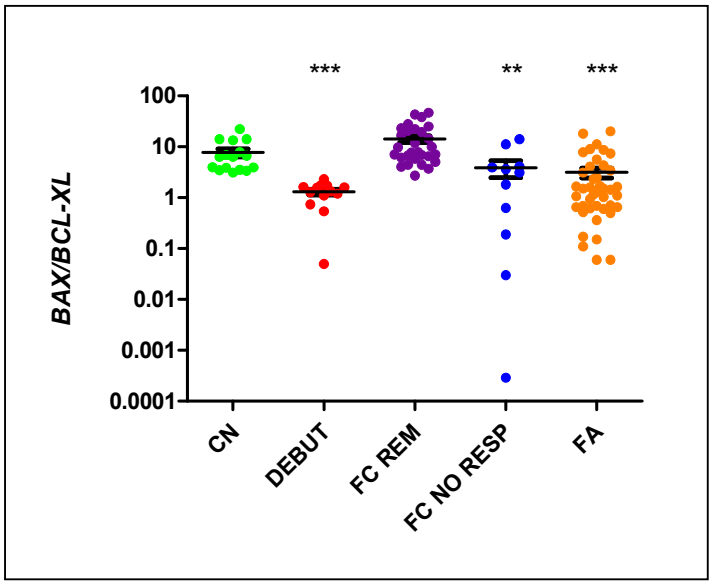


Figura 24. Expresión relativa de *BAX/BCL-XL* en pacientes con LMC y controles normales. Se muestran los grupos de pacientes clasificados según el estadio de la enfermedad al momento de la toma de la muestra: Debut (al diagnóstico), FC Rem (Fase Crónica en Remisión), FC No Resp (Fase Crónica sin respuesta al tratamiento), FA (Fase Avanzada, incluye fase acelerada y crisis blástica), CN (controles normales). Las diferencias estadísticas entre cada uno de los tres grupos (i.e., Debut, FC No resp y FA) y el grupo en FC Rem resultaron altamente significativas. *** $p<0,0001$, ** $p<0,009$.

4.5.2.3. Expresión de genes vinculados a proliferación celular (*CAMKIIγ, Ki-67)*

CAMKIIγ es un gen involucrado en múltiples caminos de señalización que regulan la proliferación celular cuya activación (autofosforilación) es desregulada por el oncogén *BCR-ABL1*. En células mieloides, *CAMKIIγ* fosforila *STAT3* y estimula su actividad oncogénica.

KI67 es un antígeno nuclear asociado a proliferación y usado frecuentemente como parámetro específico para medir la fracción de células que se encuentran en etapa de crecimiento, debido

a que se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero no en Go. En consecuencia, la proteína KI67 es considerada como un importante marcador de proliferación de células neoplásicas.

Los pacientes al Debut, en FC No Resp y en FA presentaron valores de expresión de *CAMKIIγ* más altos (128,7 ± 69,20), (24,75 ± 7,219) y (20,67 ± 7,862) respectivamente que en el grupo en FC Rem (0,9952 ± 0,5083) ($p<0.0001$). Los resultados se muestran en la figura 25A.

Respecto a la expresión *KI67* se observó un comportamiento similar, los pacientes al Debut, en FC No Resp y en FA presentaron una expresión respectivamente más alta (0,2331 ± 0,1), (0,01776 ± 0,01) y (0,03852 ± 0,02348) que la del grupo de pacientes en FC Rem (0,0006382 ± 0,0001) ($p<0.01$). Los resultados se muestran en la figura 25 B.

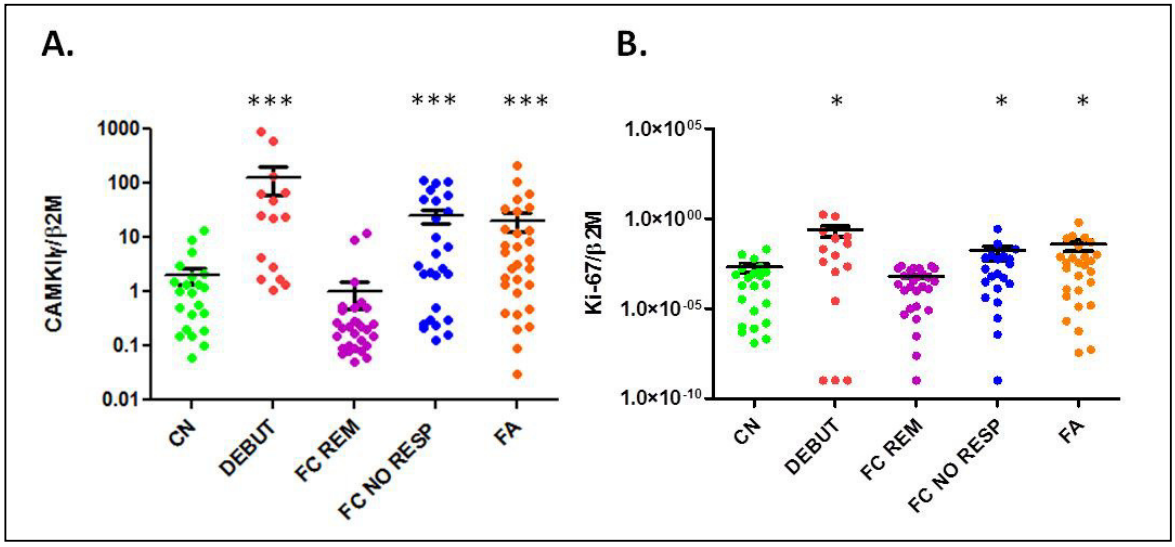


Figura 25. Expresión de *CAMKIIγ* y *KI67*. (A). Expresión de *CaMKIIγ* en pacientes en diferentes etapas de la LMC (Debut, FC Rem, FC No Resp y FA), mostrando diferencias significativas respecto al grupo FC Rem, *** $p<0,0001$. (B). Expresión de *KI67* en pacientes en diferentes etapas de la LMC (Debut, FC Rem, FC No Resp y FA) mostrando diferencias significativas respecto al grupo FC Rem, * $p<0,01$. También se muestra un grupo de controles normales (CN).

4.5.2.4. Expresión de genes vinculados a la supervivencia celular (*HSP70, HSP90)*

HSP70 es una proteína de la familia de las chaperonas. Estudios de otros grupos de investigación demostraron que esta proteína está sobreexpresada en la línea celular HL60 (con expresión ectópica de *BCR-ABL1)*, resistente al tratamiento con imatinib, por lo que se postula

que HSP70 podría tener un rol importante en la resistencia al tratamiento con ITK en pacientes con LMC (Pocaly *et al*, 2008).

HSP90 es una chaperona que evita la agregación y facilita el plegamiento molecular (*folding*) de la proteína quimérica BCR-ABL1 afectando su estabilidad. Estudios *in vitro* demostraron que el producto BCR-ABL1 mutado incrementa su dependencia por *HSP90* para alcanzar su estabilidad.

La expresión de *HSP70* en el grupo de pacientes al Debut, en FC No Resp y en FA (38,52 ± 24,2), (1,827 ± 0,53) y (5,665 ± 2,9), respectivamente, resultó significativamente mayor al grupo de pacientes en FC Rem (0,3352 ± 0,09) ($p<0,0001$; $p<0,03$ y $p<0,001$, respectivamente) (Figura 26 A).

Respecto de los niveles de expresión de *HSP90, s*e observó que había un incremento en el grupo de pacientes en FC No Resp (63,0 ± 40,0) y en FA (107,1 ± 50,0) respecto de aquellos en FC Rem (1,5 ± 0,4) ($p<0,02$) y ($p<0.01$), respectivamente, indicando que la medición de los niveles de expresión de RNA de las chaperonas HSP70 y *HSP90* podría constituir un posible marcador de resistencia al tratamiento con ITK (Figura 26 B).

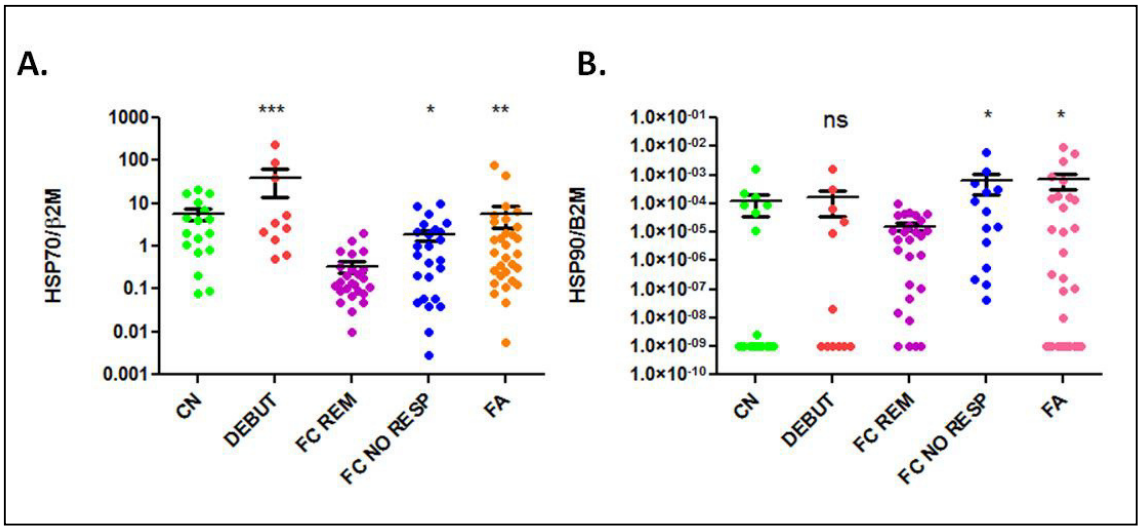


Figura 26. Expresión diferencial de chaperonas moleculares. (A) Expresión de *HSP70* en pacientes en diferentes etapas de la LMC (Debut, FC No Resp y en FA, respecto del grupo en FC Rem). (B). Expresión de *HSP90* en pacientes en diferentes etapas de la LMC (Debut FC Rem, FC No Resp y FA).CN: controles normales; ns: no significativo; *** $p<0,0001$; ** $p<0,001$; * $p<0,05$.

4.5.3. Perfiles de expresión génica en pacientes con LMC resistentes al tratamiento con ITKs

Los pacientes en FC No Resp y en FA fueron agrupados en función de la presencia o ausencia de mutaciones en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1*. El estudio del perfil de expresión de los genes *CaMKIIγ , KI67, HSP70, HSP90, BAX* y *BCLXL, BCR-ABL1,* involucrados en los procesos de proliferación, supervivencia, apoptosis y respuesta molecular al tratamiento, permitió definir su comportamiento con la presencia (MT) o ausencia (WT) de mutaciones. Se calculó el logaritmo decimal de los valores de expresión para fines gráficos (log (expresión) ± error estándar), debido a la dispersión de los datos. La expresión de *CAMKIIγ,* y *HSP70* resultó significativamente mayor en el grupo de pacientes con mutaciones (MT): 0,8312±0,1555 y 0,01286±0,1618 respectivamente, respecto de aquellos sin mutaciones (WT): 0,2739±0,2 y -0,5757±0,1 con $p<0,03$ y $p<0,04$, respectivamente (figura 27A y 27B). El nivel de expresión de *HSP90* fue significativamente menor para el grupo MT (-7,064±0,4247) respecto del grupo WT (-5,522±0,5) con $p<0,03$ (figura 27 C), mientras que *BCR-ABL1*, *KI67* y la relación *BAX/BCL-XL* no presentaron diferencias entre los grupos mutados y no mutados (figura 28A, 28B y 28C).

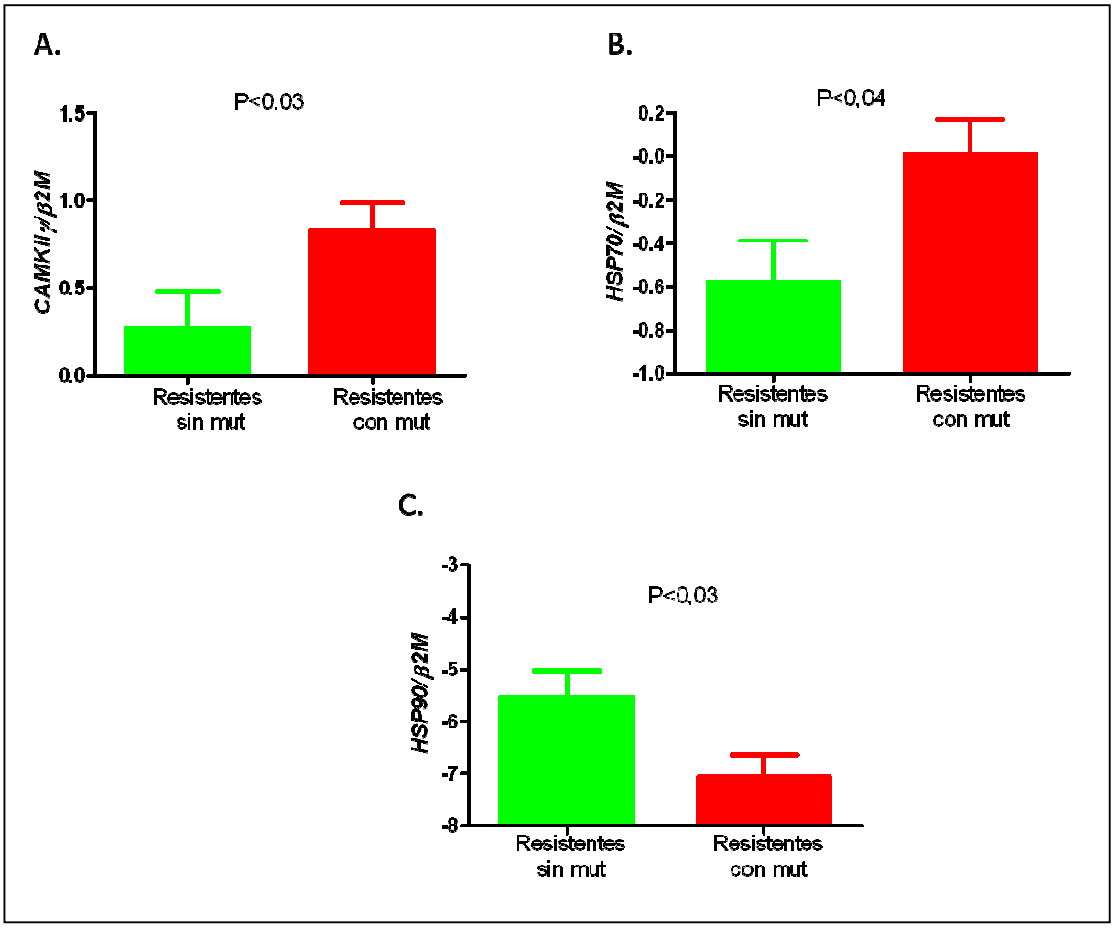


Figura 27. Comparación en los niveles de expresión relativa de los genes estudiados entre los grupos resistentes con mutaciones (MT) y resistentes sin mutaciones (WT). *(A) CAMKIIγ, (B) HSP70* y (C) *HSP90*, respectivamente.

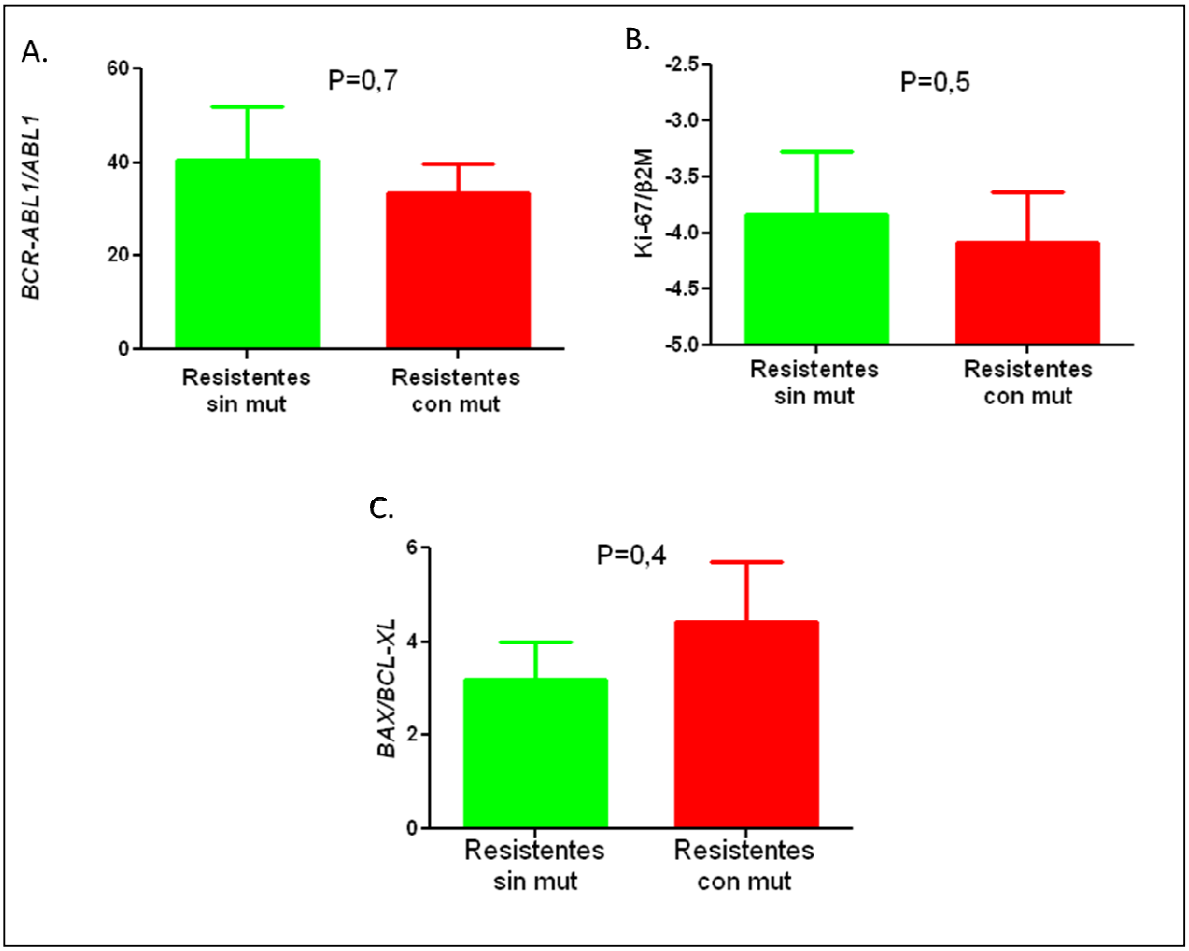


Figura 28. Comparación en los niveles de expresión relativa de los genes estudiados entre los grupos con (MT) y sin mutaciones (WT) en pacientes sin respuesta al tratamiento con ITKs. *(A) BCR-ABL1/ABL1, (B) KI67/B2M y (C) BAX/BCL-XL,* respectivamente.

Teniendo en cuenta solamente los genes *CAMKIIγ, HSP70 y HSP90,* los cuales presentaron un nivel de expresión diferencial entre mutados y no mutados, se diseñó un *score* de base logarítmica decimal (Log_{10}) con las expresiones génicas según la siguiente fórmula: [*CAMKIIγ+HSP70-HSP90*].

Se observaron diferencias significativas para el valor del *score* entre los grupos MT (0,97 ± 0,5) y WT (-1,42 ± 0,6) ($p<0.01$) (figura 29).

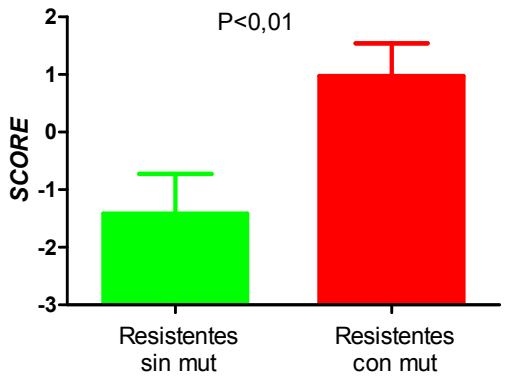


Figura 29. *Score* de la expresión de los genes *CAMKIIγ*, *HSP70* y *HSP90* según [*CAMKIIγ+HSP70-HSP90*]. El análisis estadístico entre los grupos de pacientes resistentes con mutaciones (MT) y sin mutaciones (WT) resultó significativo con p<0,01.

Para el aprovechamiento óptimo de la potencialidad del *score* [*CAMKIIγ+HSP70-HSP90*] se investigó la detección de un valor crítico que permitiera discriminar en forma sensible y específica dentro del grupo de pacientes resistentes a ITKs aquellos que podrían tener mutaciones respecto de los que no tendrían mutaciones (WT) (pacientes que habrían desarrollado otros mecanismos de resistencia). El análisis con curvas ROC (*receiver operating characteristic*), permitió maximizar la diferenciación entre las poblaciones MT y WT, y establecer un punto óptimo de corte (*cut-off)* sobre un *score* límite de 1,1. Valores de *score* mayores a 1,1 tienen 6 veces más probabilidades (OR (IC95%)) (1,8-20,4) de presentar mutaciones que valores menores (p<0.002) (figura 30). Este valor de *score* límite de 1,1 estima el estado mutacional de cada paciente con un 60% de sensibilidad y 80% de especificidad.

Datos analizados	Resistentes con mutación	Resistentes sin mutación	Total
Mayor a 1,1	18	5	23
Menor a 1,1	12	21	33
Total	30	26	56

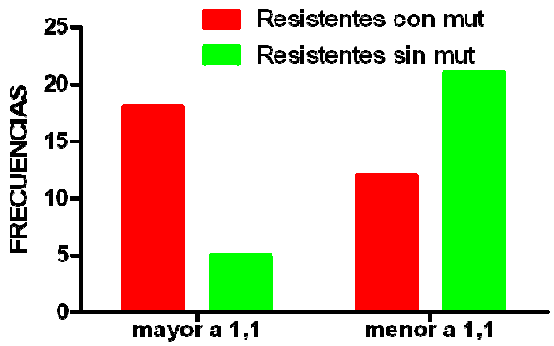


Figura 30. Frecuencias de mutaciones en pacientes No Respondedores. El valor límite del *score* (c*ut off: 1,1*) obtenido a partir de las curvas ROC permite diferenciar dos grupos de pacientes. Las frecuencias figuran en la tabla de contingencia. Prueba exacta de Fisher, p<0,002. ODDS RATIO: 6 (OR (IC95%) (1,86-21,3).

4.6. Estudios *in vitro*

4.6.1. Citotoxicidad inducida por ITKs sobre células leucémicas Ph' positivas

Las células de la línea celular K562 fueron tratadas durante 48 horas con ITKs y se evaluó la viabilidad celular mediante el método MTT basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Como control negativo fueron empleadas células de la línea celular K562 con medio de cultivo sin tratamiento, normalizando el 100% de viabilidad. Se ensayaron concentraciones crecientes de ITKs, y se determinó el porcentajes de viabilidad en cada caso (% ± ES), Para Imatinib: 1 µM, 2 µM, 5 µM y 10µM, se obtuvieron los siguientes resultados: 40,5 ± 10,5; 35,5 ± 12,5; 28,5 ± 4,5 y 25,5 ± 0,5, respectivamente. Para Dasatinib: 1µM, 2 µM, 5 µM y 10 µM se obtuvo 52,0 ± 8,0; 54,5 ± 4,0; 50,0 ± 3,0 y 50,0 ± 3,0), respectivamente. Para Nilotinib: 1µM, 2 µM, 5 µM y 10µM los datos fueron: 39,0 ± 19,0; 39,0 ± 16,0; 36,5 ± 15,5 y 32,0 ± 12,0, respectivamente. y para Homoharringtonina: 10 µg/ml y 50µg/ml la viabilidad celular fue de27,0 ± 10,0 y 21,0 ± 8,0, respectivamente (figura 31).

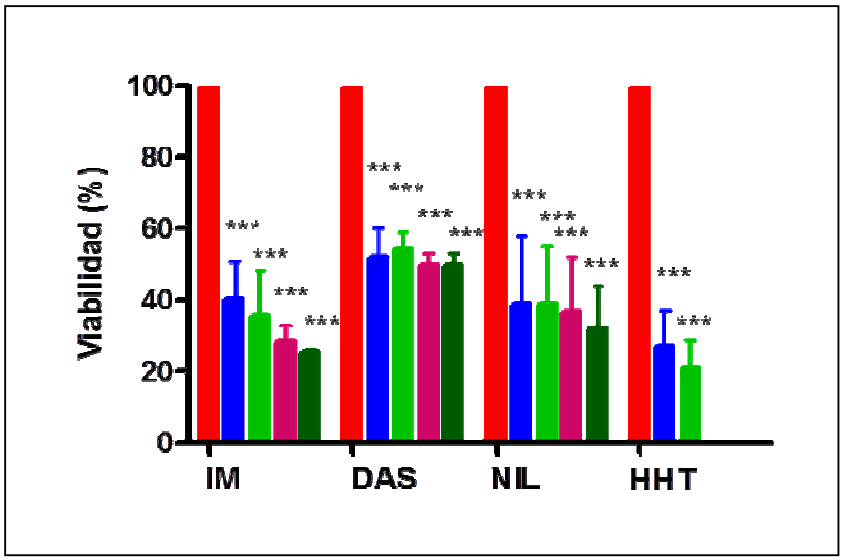


Figura 31. Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Columna roja: control sin droga; columna azul: 1 µM de IM, DAS, NIL o 10 µg/ml de HHT; columna verde: 2 µM de IM, DAS, NIL o 50 µg/ml de HHT**;** columna fucsia: 5 µM de IM, DAS o NIL; columna verde oscuro: 10 µM de IM, DAS o NIL. Análisis estadístico Two-way ANOVA, Bonferroni Post test, **p<0,001.

4.6.2. Apoptosis inducida por ITKs sobre células leucémicas Ph' positivas

Las células de la línea K562 fueron tratadas durante 48 horas con concentraciones seleccionadas de ITKs: imatinib (1 µM, 10 µM); dasatinib (1 µM, 10 µM); nilotinib (1 µM, 10 µM) y homoharringtonina (10 µg/ml, 100 µg/ml) y se evalúo la apoptosis mediante anexina V/FITC (Figura 18). Los niveles de apoptosis (% ± ES) inducidos durante el tratamiento de la línea K562 fueron los siguientes: 1 µM imatinib, (46,1 ± 11,1), 10 µM imatinib, (66,7 ± 3,2), 1 µM dasatinib, (51,2 ± 0,2), 10 µM dasatinib, (59,5 ± 5,5), 1 µM nilotinib, (70,7 ± 8,5) y para 10 µM nilotinib, (72,5 ± 0,5). La homoharringtonina generó con 10 µg/ml (47,6 ± 2,1), y con 100 µg/ml (73,2 ± 13) La apoptosis basal (línea K562 sin tratamiento) es de (15,4 ± 3,6) (figura 32).

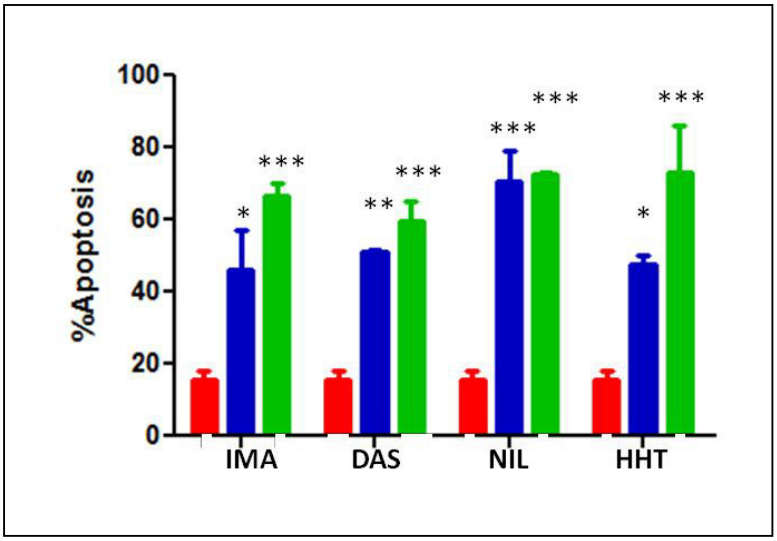


Figura 32. Evaluación de apoptosis de las células neoplásicas (K562) tratadas con ITKs mediante el ensayo de anexina-V. Columna roja: control sin droga; columna azul: 1 µM de IM, DAS, NIL o 10 µg/ml de HHT; columna verde: 10 µM de IM, DAS, NIL o 100 µg/ml de HHT. Análisis estadístico Two-way ANOVA, Bonferroni Post test, *P<0, 05, **P<0,001.

4.8. Diseño y armado de constructos de referencia correspondientes al gen *ABL1*

Con el propósito de evaluar la presencia o ausencia de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* en pacientes con LMC con falta o pérdida de respuesta a ITKs fue desarrollada una herramienta de control y referencia para evaluar la especificidad y sensibilidad de la detección de cuatro de las mutaciones más frecuentes encontradas en pacientes con LMC resistentes al tratamiento con ITKs mediante la estrategia de PCR alelo específica. Para ello, fueron diseñados dos constructos de referencia correspondientes al gen *ABL1*, uno de ellos conteniendo el exón

4 con las mutaciones G250E y E255K y el exón 6 con las mutaciones T315I y M351T separados por el exón 3 (ADN espaciador empleado como control de carga). El otro constructo está formado por los mismos fragmentos de ADN pero en su versión no mutada (WT, *wild type*) (figura 33). El ensamblado molecular de los segmentos componentes de cada uno de estos constructos fue realizado por el uso combinado de la estrategia de PCR de fusión múltiple diseñada especialmente para cada caso específico. El uso de estas construcciones permitió determinar la sensibilidad de los ensayos de PCR alelo específicos para cada una de las cuatro mutaciones analizadas.

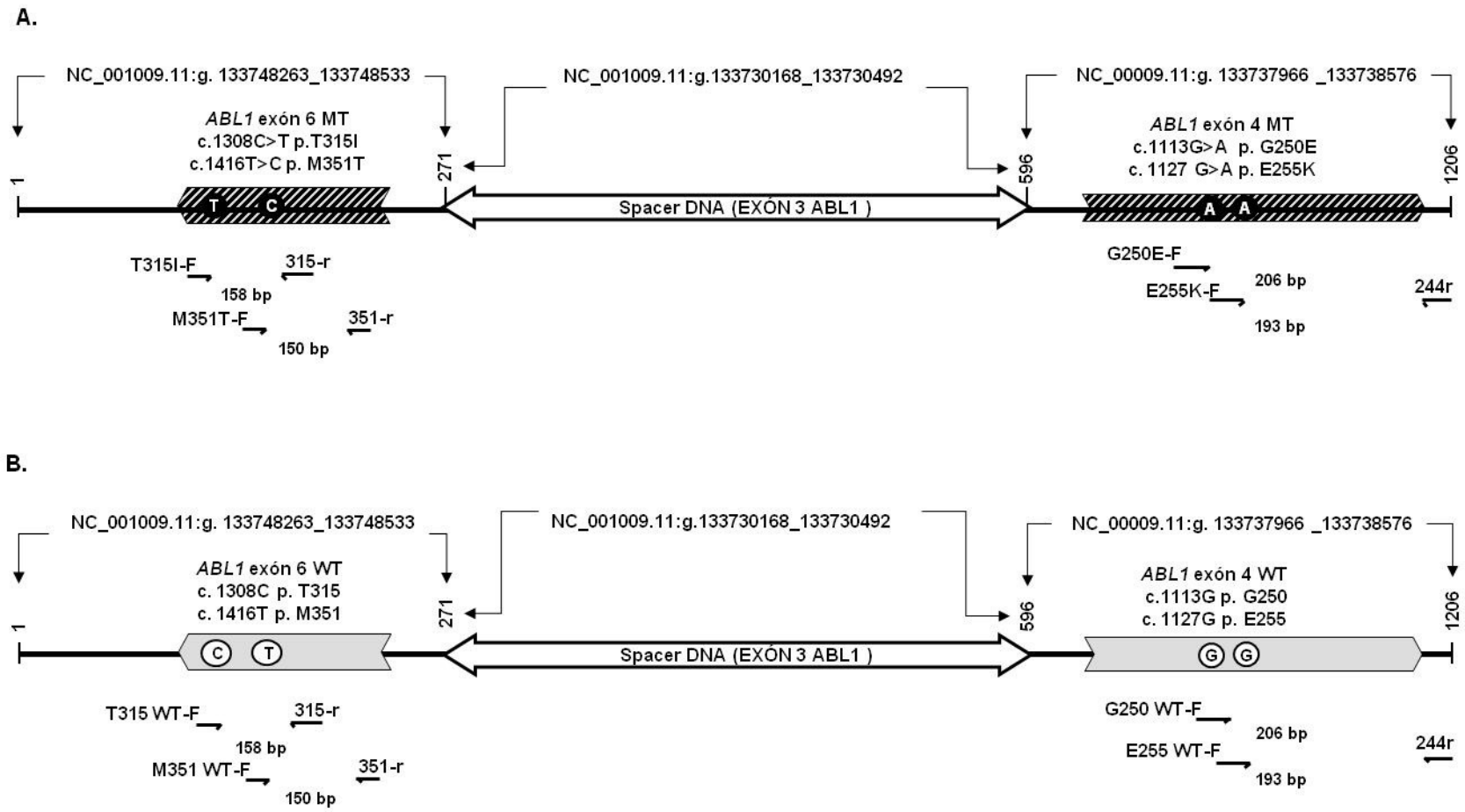


Figura 33. Constructo de referencia *ABL1.* (A) Exón6MT-Exón3-Exón4MT. (B) Exón6WT-Exón3-Exón4WT. En el esquema se indican los *primers* alelo específicos empleados para amplificar el alelo mutado y el alelo salvaje. Se indican además, los tamaños de cada producto.

En la figura 34 se muestran los productos intermediarios que permitieron la obtención final del constructo de referencia *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT, y en la figura 35 se muestran los intermediarios correspondientes al constructo de referencia control no mutado *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT. Las mutaciones puntuales fueron generadas mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (*primers*) modificados y amplificación PCR.

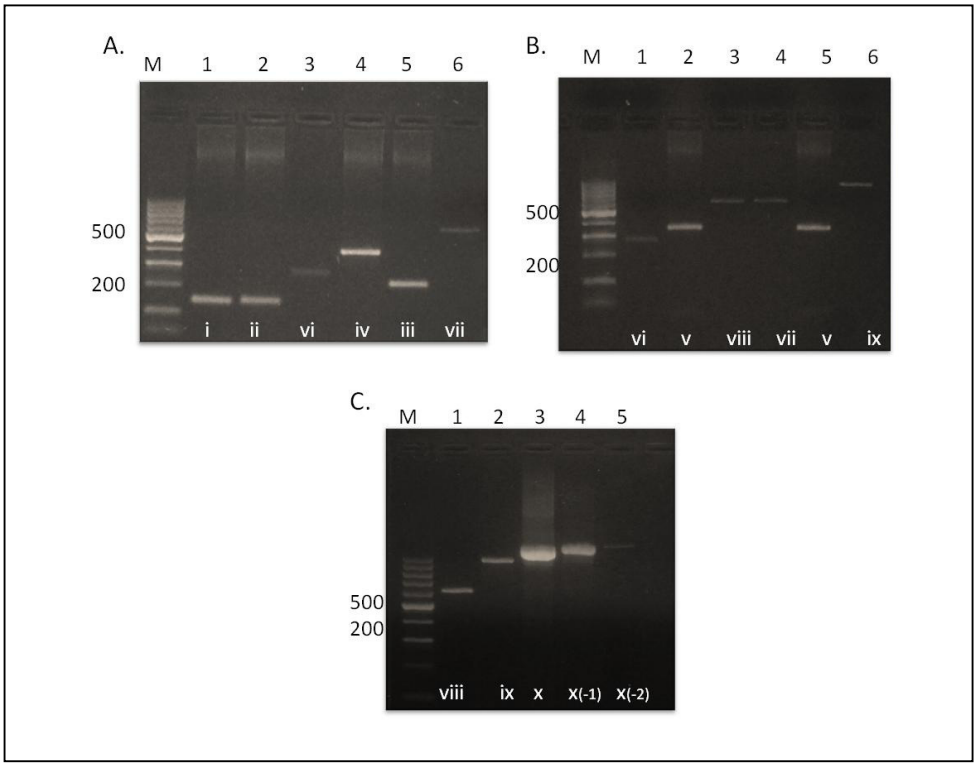


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los intermediarios de ensamblado del constructo de referencia *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT. (A). Mediante mutagénesis sitio dirigida se obtuvieron los productos de amplificación (i) e (ii) conteniendo los cambios T315I y M351T respectivamente; y los productos (iii) y (iv) ambos conteniendo las mutaciones G250E y E255K. La fusión de (i) e (ii) dio lugar al producto (vi); la fusión de (iii) y (iv) generó el producto (vii). (B). El producto de PCR (v) corresponde al exón 3 del *ABL1* que será utilizado como espaciador de ADN. El producto de PCR (viii) fue generado por la fusión de (vi) y (v). El producto de PCR (ix) fue generado por la fusión de (v) y (vii). (C) El producto final (x) de 1206 pb fue generado por la fusión de (viii) y (ix). (x^{-1}) dilución 1/10 de (x); (x^{-2}) dilución 1/100 de (x).

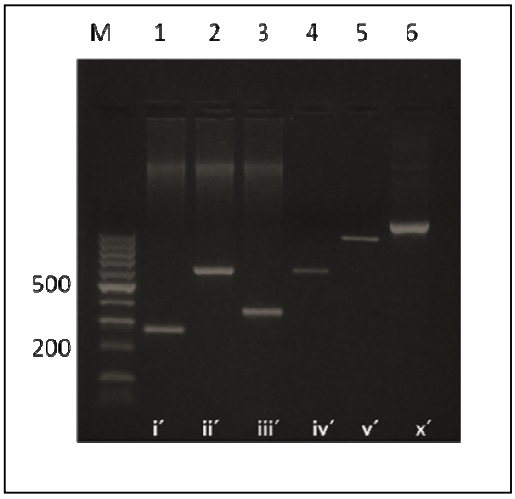


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los intermediarios de ensamblado del constructo de referencia control no mutado *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT. El producto de PCR (i´) corresponde al exón 6 conteniendo los sitios T315 y M351 en su versión *wild type*. El producto de amplificación (ii´) corresponde al exón 4 conteniendo los sitios G250 y E255 en su versión *wild type*. El fragmento (iii´) corresponde al exón 3 que será utilizado como espaciador de ADN. El producto (iv´) fue generado por la fusión de (i´) y (iii´). El producto de fusión (v´) fue generado por la fusión de (ii´) y (iii´). El producto final de 1206 (x´) pb fue generado por la fusión de (iv´) y (v´).

Para su almacenamiento, eventual amplificación y oferta como herramienta de análisis a otros grupos de investigación, los constructos generados (hasta aquí productos PCR) fueron clonados en el sistema del plásmido pCR2.1 TOPO y las células bacterianas DH5αTM-T1. Se seleccionaron 10 colonias que habían incorporado el plásmido recombinante (colonias blancas) y se realizó la purificación del ADN plasmídico correspondiente. La presencia del inserto en cada plásmido fue confirmada mediante análisis de restricción empleando la enzima *Eco* RI (figura 36). Esta enzima presenta un sitio de restricción en el plásmido dentro del sitio de ligado múltiple o *polilinker* de manera que libera el inserto clonado respetando las identidades de tamaño.

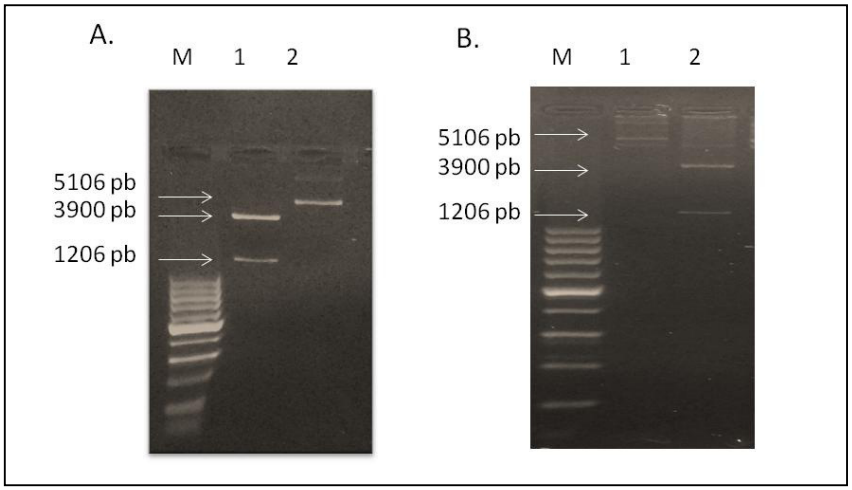


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los fragmentos de restricción generados por la enzima *Eco* RI en los plásmidos de referencia. (A). Calle 1: pCR2.1 TOPO conteniendo el fragmento correspondiente al constructo *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT digerido con la enzima de restricción *Eco* RI. Calle 2: pCR2.1 TOPO sin digerir. (B). calle 1: pCR2.1 TOPO sin digerir. Calle 2: pCR2.1 TOPO conteniendo el fragmento correspondiente al constructo *ABL1* Exón6 MT-Exón3-Exón4 MT digerido con la enzima de restricción *Eco* RI. M: marcador de peso molecular.

Para obtener los fragmentos de 1206 pb (tamaño completo de cada constructo), a partir de los plásmidos purificados se reamplificaron por PCR los fragmentos clonados que corresponden a cada constructo y la identidad de secuencia de estos productos fue caracterizada mediante secuenciación de ADN directa. Este análisis permitió confirmar la presencia de las mutaciones puntuales específicas presentes en el constructo versión mutado, *ABL1* Exón6 (T315I y M351T) - Exón3-Exón4 (G250E y E255K) y la ausencia de éstas mutaciones en su contraparte no mutada, *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT (figura 37 A y B).

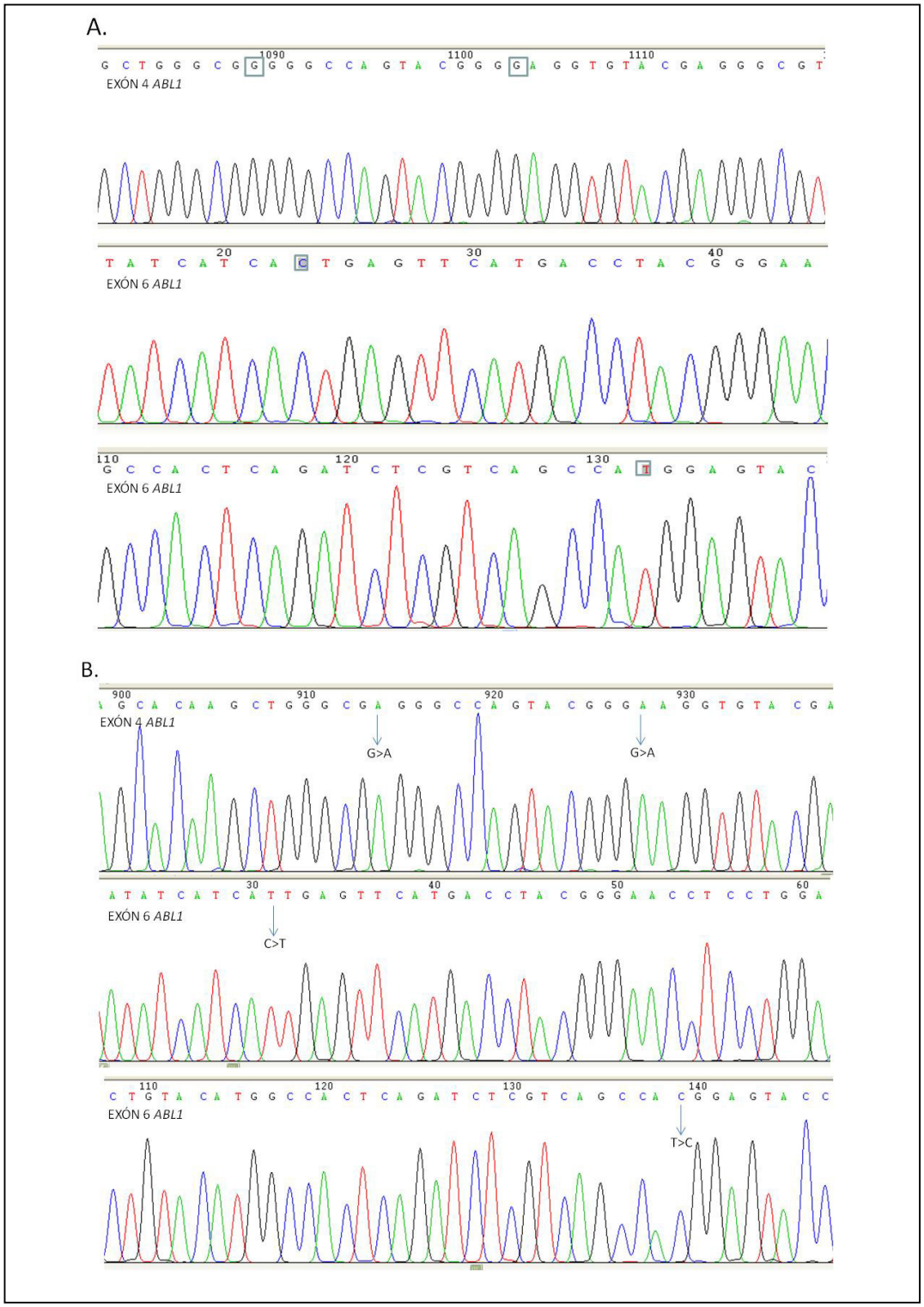


Figura 37. Caracterización de la secuencia de ADN de los constructos *ABL1* clonados versión no mutada y mutada. (A). Secuencia correspondiente al constructo *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT. Los recuadros señalan los sitios susceptibles a mutaciones. (B). secuencia correspondiente al constructo *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4MT. Las flechas indican los cambios de base correspondientes a las mutaciones generadas: G250E; E255K; T315I y M351T.

4.9. Detección de mutaciones en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1*

Para determinar la temperatura de *annealing* óptima para cada reacción de amplificación ASO-PCR se realizaron PCRs en gradiente incrementando la temperatura de a*nnealing* desde 50ºC hasta 70ºC. Estas amplificaciones se llevaron a cabo a partir de muestras de ADN de pacientes portadores de las mutaciones G250E; E255K; T315I y M351T empleando *primers* alelo específico (tabla 5, materiales y métodos). La presencia de estas mutaciones en los ADN empleados como sustrato fue confirmada mediante secuenciación de ADN directa (figura 38). La condición que amplificó solo una secuencia específica mutada, pero no su contraparte normal fue empleada para el ensayo de ASO-PCR, figura 39. La tabla 13 presenta las temperaturas de *annealing* seleccionadas para cada reacción alelo específica.

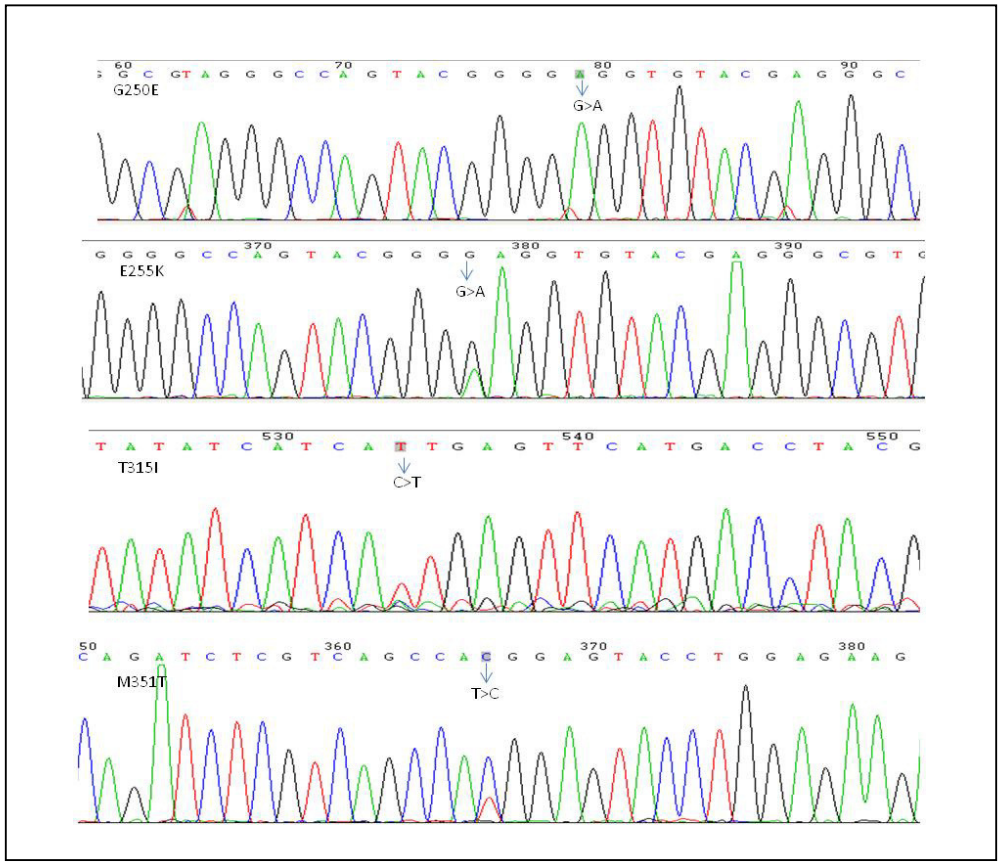


Figura 38. Caracterización de la secuencia de ADN correspondiente al dominio quinasa del gen *BCR-ABL1* de pacientes. Muestras de ADN empleadas para realizar los gradientes. Las flechas indican los cambios correspondientes a cada mutación. G250E: G>A; E255K: G>A; T315I: C>T y M351T: T>C.

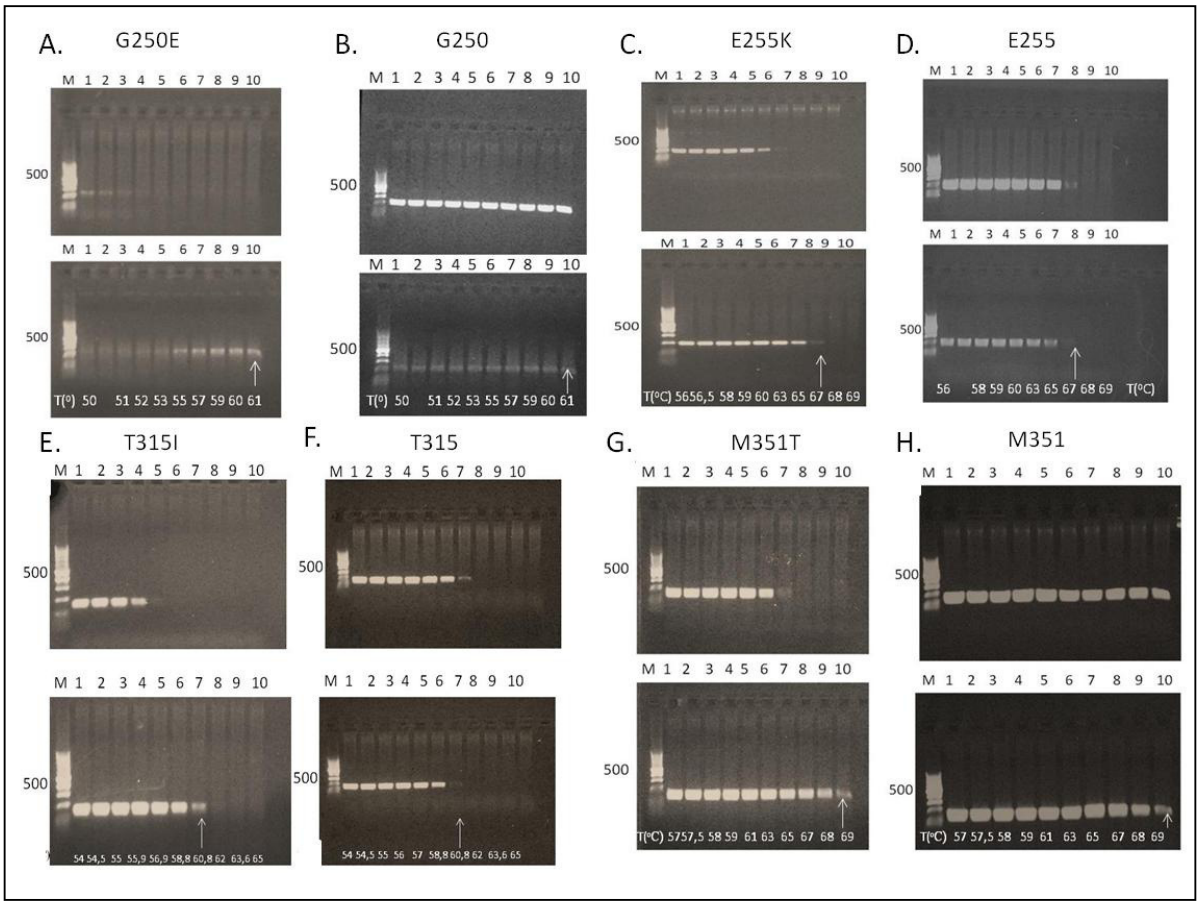


Figura 39. PCRs para definir la temperatura de *annealing* para cada reacción de PCR alelo específica. Reacción ASO-PCR para amplificar el alelo mutado correspondiente a: (A) G250E; (C) E255K; (E) T315I; (G) M351T. Reacción ASO-PCR para amplificar el alelo salvaje correspondiente a: (B) G250; (D) E255; (F) T315; (H) M351. El panel superior de cada figura muestra reacciones PCR que emplean ADN WT como sustrato. El panel inferior emplea ADN MT como sustrato. Las flechas indican la condición con una temperatura de *annealing* específica seleccionada para cada reacción ASO-PCR. Los gradientes fueron realizados en un rango de temperaturas de *annealing* desde 50ºC hasta 70ºC.

Tabla 13. Temperaturas de *annealing* para cada reacción ASO-PCR

ASO-PCR	Temperatura de *annealing* (ºC)
G250E	61
E255K	67
T315I	61
M351T	69

4.10. Determinación de la sensibilidad de la ASO-PCR

A partir de la densidad óptica medida y teniendo en cuenta el tamaño del plásmido más el inserto clonado fue posible calcular el número de copias obtenido en cada caso: plásmido *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4 MT: $3{,}3.10^{11}$ copias/µl y plásmido *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT: $5{,}33.10^{11}$ copias/µl.

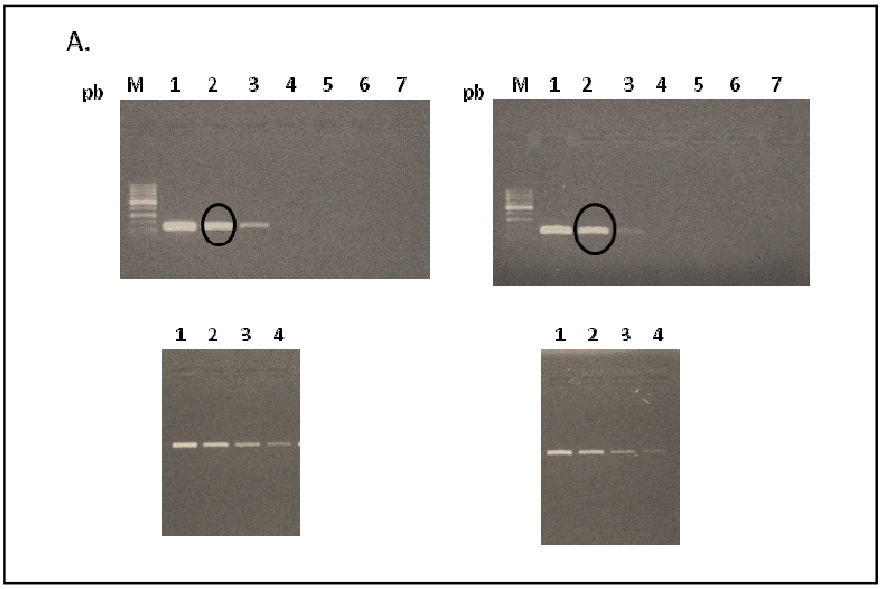
La sensibilidad de la reacción ASO-PCR fue estimada para cada una de las cuatro mutaciones empleando mezclas del plásmido *ABL1* mutado (Exón6MT-Exón3-Exón4 MT) en dilución seriada en el plásmido *ABL1* no-mutado (Exón6WT-Exón3-Exón4 WT).

La figura 40 A muestra las amplificaciones PCR control del *ABL1* exón 3 necesarias para estimar e igualar el número de copias de cada una de las preparaciones de plásmido (i.e., MT y WT).

La tabla 14 y figura 40 B muestran que el límite de detección fue ligeramente variable para cada mutación. El ensayo ASO-PCR para detectar la mutación G250E y M351T permitió reconocer una señal específica positiva cuando el porcentaje del alelo mutante fue mayor al 1,25%, mientras que la mutación E255K y T315I fueron detectadas cuando el porcentaje del alelo mutante fue mayor al 2,5% y 5%, respectivamente. Estos porcentajes corresponden a fracciones del total de $1{,}2.10^5$ copias de gen ABL1 presentes en 400 ng de ADN genómico (sustrato de un ensayo PCR estándar).

Tabla 14. Sensibilidad obtenida para las 4 mutaciones testeadas.

Mutaciones testeadas	Sensibilidad (%)
G250E	1,25
E255K	2,5
T315I	5
M351T	1,25



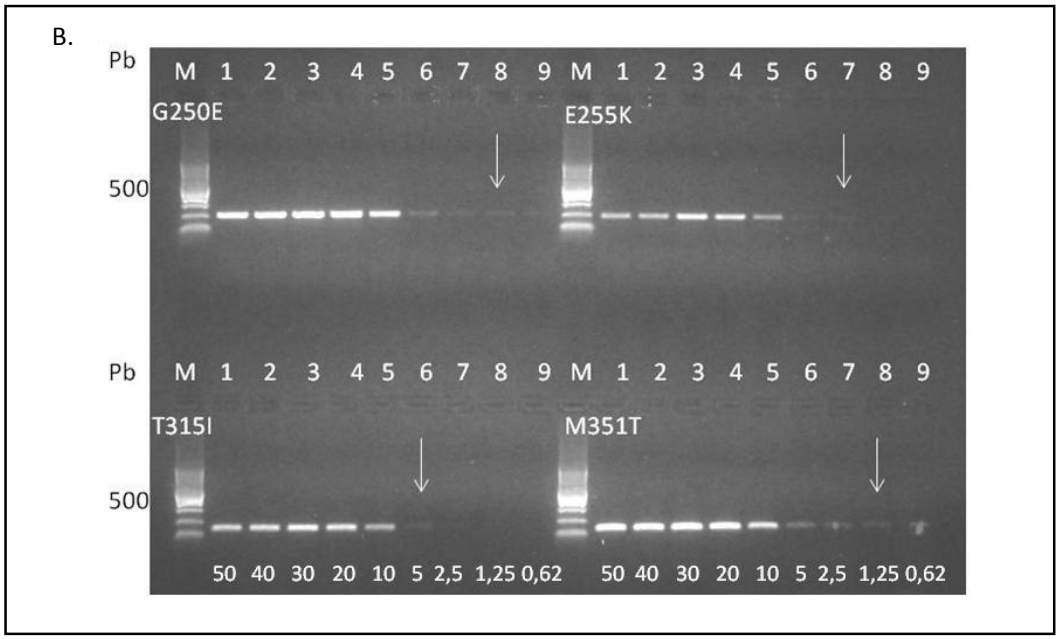


Figura 40. Amplificaciones PCR para determinar el límite de detección de la reacción ASO-PCR. (A). Amplificaciones PCR con *primers* del Exón3. Panel superior izquierdo: diluciones 10^{-6}-10^{-12} del plásmido *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT. Panel superior derecho: diluciones 10^{-6}-10^{-12} del plásmido *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4 MT. Panel inferior izquierdo y derecho: amplificaciones PCR comparativas sobre diluciones al medio (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) a partir de la primera la dilución donde se observa una clara disminución en la intensidad de señal (10^{-7}).
(B). Límite de detección estimado para los ensayos de PCR alelo específica. Las flechas indican la mínima cantidad de alelo mutado reconocido como señal positiva. Para estos experimentos de evaluación de la sensibilidad de cada reacción PCR alelo-específica, se realizaron las mezclas de los constructos *ABL1* Exón6MT-Exón3-Exón4 MT en *ABL1* Exón6WT-Exón3-Exón4WT (50%; 40%; 30% 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%).

4.11. Análisis de pacientes mediantes ASO-PCR

Se analizaron 41 pacientes con LMC con falla o pérdida de respuesta al tratamiento con ITKs para determinar la presencia de mutaciones en el domino quinasa del gen *BCR-ABL1,* tabla 15. Se estudiaron 4 mutaciones (G250E, E255K, T315I y M351T) que confieren a la célula un fenotipo resistente al tratamiento con imatinib empleando *primers* alelo específicos (tabla 8, materiales y métodos). Mediante secuenciación directa, fueron reveladas estas mutaciones en 8 pacientes, mientras que por ASO-PCR se detectaron 17 mutaciones (3 pacientes presentaron la mutación G250E; 5 pacientes la E255K; 6 pacientes la mutación T315I y 3 la M351T). El paciente número 5, presentó mediante secuenciación directa sólo la mutación L248V (no evaluada por ASO-PCR). Este paciente, había sido analizado por secuenciación en dos oportunidades anteriores presentando la mutación G250E y T315I. Al analizar la muestra por ASO-PCR, fueron detectadas nuevamente las dos mutaciones, G250E y T315I las cuales no fueron reveladas por secuenciación confirmando la mayor sensibilidad del método. La detección temprana de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* se está evaluando en la práctica clínica ya que podría tener implicancia en la elección del tratamiento.

Tabla 15. Resultados obtenidos mediante ASO-PCR para las mutaciones testeadas (G250E, E255K, T315I, M351T).

Paciente Nº	G250E	E255K	T315I	M351T
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17……..41				
Total	3/41	5/41	6/41	3/41

(+) Para la mutación indicada. (-) Para la mutación indicada.

5. Capítulo I: Discusión

Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos (LMC)

Los estudios que conforman el presente capítulo han permitido investigar dos aspectos importantes a tener en cuenta en la fármaco-resistencia de las células *BCR-ABL1* positivas al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (ITKs). En primer lugar, se realizó un análisis de expresión génica asociada a la inducción de los caminos de señalización desencadenados por *BCR-ABL1*.

En una segunda parte del capítulo, se desarrolló un abordaje, PCR alelo específica, que permite determinar la presencia de cuatro mutaciones que confieren resistencia al tratamiento con ITKs, con alta especificidad y sensibilidad. Para la evaluación de este abordaje se diseñaron dos constructos: uno portador de las mutaciones (MT) y otro en configuración *Wild Type* (WT) o no mutado.

5.1 Análisis de expresión génica en Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

La leucemia mieloide crónica es un desorden mieloproliferativo que afecta células madres (*stem cells*) hematopoyéticas pluripotentes, lo cual explica que se encuentren involucrados la mayoría de los linajes hematopoyéticos: serie granulocítica, eritrocítica, megacariocítica, precursores B tempranos y células T inmaduras. La LMC se caracteriza por la presencia de un cromosoma marcador denominado cromosoma Philadelphia, Ph´, t(9;22) (q34;q11), el cual origina un gen de fusión *BCR-ABL1* (Faderl *et al*, 1999) que codifica la oncoproteína quimérica P210 con actividad de tirosina quinasa. La activación constitutiva de esta onco-proteína induce varios caminos de transducción de señales que estimulan la proliferación celular, inestabilidad genómica, anormalidades del citoesqueleto y disminución de la apoptosis.

La LMC es una patología trifásica, comienza con una fase crónica (FC) de duración variable (dependiendo de la respuesta al tratamiento), continúa con una fase acelerada (FAc) y termina en una crisis blástica (CB). Esta última se caracteriza por un incremento en el número de células inmaduras en la médula ósea y sangre periférica, con anemia y trombocitopenia progresiva. Los blastos leucémicos pueden presentar características de mieloblastos, en la mayoría de los casos (indistinguibles de una LMA) o de células linfoides inmaduras que expresan inmunofenotipo de linfoblastos (Jamieson *et al*, 2004).

El tratamiento de elección en la LMC son los ITKs que compiten con el ATP inhibiendo la función de la oncoproteína $P210^{BCR\text{-}ABL1}$. El descubrimiento del mesilato de imatinib como un inhibidor específico de la actividad quinasa, mediante diseño racional y su utilización terapéutica en primera línea revolucionó el tratamiento de la LMC. La mayoría de las células leucémicas sufren apoptosis cuando la actividad tirosina quinasa es suprimida por los ITKs. Las células que sobreviven al tratamiento son *stem cells* quiescentes o células que han adquirido resistencia a la droga. La falta de respuesta al tratamiento puede originarse por diversos mecanismos, que pueden definirse como dependientes o independientes de *BCR-ABL1* (Salomoni *et al*, 2009), (Quintas-Cardama *et al*, 2007) (Deininger *et al*, 2005), (Gargallo *et al*, 2003).

El ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) proporciona un estrategia de monitoreo apropiada para pacientes con LMC que expresan *BCR-ABL1* (Branford *et al*, 1999; Kantarjian *et al*, 2003; Kaeda *et al*, 2006).

La aplicación de QPCR provee una precisa estimación de la masa total de células leucémicas y del grado de transcriptos *BCR-ABL1,* permitiendo el monitoreo de la reducción inducida por la terapia, parámetro que correlaciona directamente con la supervivencia libre de progresión.

Un nivel creciente de *BCR-ABL1* es un indicador temprano de pérdida de respuesta e implica la consecuente reevaluación de la estrategia terapéutica. Por lo tanto, el monitoreo de *BCR-ABL1* es esencial para evaluar el nivel de respuesta al tratamiento y la eventual progresión de la enfermedad. En el año 2005, se elaboraron una serie de recomendaciones por consenso internacional en el *National Institute of Health* (NIH), donde se propusieron las siguientes sugerencias: (1) armonizar las metodologías para la cuantificación de *BCR-ABL1* en pacientes con LMC empleando un factor de conversión mediante el cual laboratorios individuales pueden expresar el nivel de transcriptos *BCR-ABL1* de acuerdo a una escala internacional unificada; (2) emplear los resultados de QPCR en lugar de los obtenidos por citogenética de médula ósea o FISH para el monitoreo individual de pacientes y (3) detectar y reportar subpoblaciones Ph' positivas con mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* (Hughes *et al*, 2006).

La metodología vigente en nuestro laboratorio para la cuantificación de transcriptos *BCR-ABL1*, ha sido validada en el año 2011 mediante el envío de 60 muestras (en dos etapas) al laboratorio de Referencia *Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaida, Australia* que determinó un factor de conversión de 0,45%, lo cual permite convertir nuestros datos a la escala internacional. Las recomendaciones para la determinación de *BCR-ABL1* se basaron en el *International Randomized Interferon versus STI571* (*IRIS*), (Hughes *et al*, 2003) donde se definió

que el valor basal de *BCR-ABL1* al debut de la enfermedad es del 100% en escala internacional y que la respuesta molecular mayor (RMMa) corresponde a una reducción de tres log respecto del valor basal, es decir 0,1%. A pesar que los estándares originales utilizados en el ensayo IRIS no están disponibles, la trazabilidad de la escala internacional es provista por controles de calidad generados en el laboratorio de Referencia mencionado (Branford *et al,* 2006; Brandford *et al*, 2008).

En el presente estudio se han evaluado los niveles de transcriptos de diferentes genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR), en pacientes con LMC en diferentes estadios de la enfermedad: Debut, FC Rem, FC No Resp y FA.

Luego de haber optimizado el método de cuantificación, se analizó la expresión de genes vinculados a diferentes caminos de señalización: *BAX y BCL-XL* involucrados en el programa apoptótico; *KI-67* y *CAMKII*γ relacionados con proliferación; *HSP70* y *HSP90* con supervivencia celular y *BCR-ABL1* con respuesta molecular al tratamiento.

Los pacientes evaluados al Debut, FC No Resp y aquéllos en FA presentaron un porcentaje significativamente mayor de transcriptos *BCR-ABL1* respecto del grupo FC Rem. El nivel de los transcriptos *BCR-ABL1* disminuye entre dos y tres log cuando los pacientes responden al tratamiento y logran remisión de la enfermedad, indicando que esta determinación es un excelente monitor de respuesta al tratamiento y evaluación de enfermedad mínima residual. Actualmente este estudio es considerado el más adecuado para realizar el seguimiento de la enfermedad, pues define si la respuesta a la terapia es óptima, sub-óptima o nula. Estos resultados permiten clasificar a los pacientes en buenos o malos respondedores, y determinar si es conveniente o no, modificar el tratamiento.

A nivel celular, la incapacidad para sufrir apoptosis, es un mecanismo importante de resistencia a drogas y evolución neoplásica en LMC. La presencia del rearreglo *BCR-ABL1* ha sido vinculado a la regulación negativa (*down regulation*) de la expresión de genes pro-apoptóticos (*BAX*) y a la regulación positiva o estimulación (*up regulation*) de genes anti-apoptóticos (*BCL-XL*) (Brumatti *et al*, 2003; Ravandi *et al*, 2001).

En leucemia mieloide aguda (LMA), se sabe que la apoptosis juega un papel importante en la respuesta a la quimioterapia, sugiriendo una asociación entre la apoptosis inducida por la terapia y la eficacia terapéutica. En consecuencia, el análisis de proteínas apoptóticas y su relación puede representar una herramienta útil con valor pronóstico. En LMA, niveles de expresión *BAX/BCL2* incrementados (indicando mayor expresión de BAX o menor de BCL2)

correlacionan con una mayor supervivencia global, y supervivencia libre de eventos (Del Poeta *et al*, 2003).

Células derivadas de pacientes con LMC, con $P210^{BCR-ABL1}$ como proteína oncogénica, presentan expresión del gen antiapoptótico *BCL-XL* en lugar de *BCL2* (Benito *et al*, 1996). En LMC, la expresión de *BCL-XL* es inducida por la proteína quinasa *BCR-ABL1* través de la activación del transductor y activador de transcripción (*STAT5*). La velocidad de proliferación se ha relacionado con estadios clínicos de leucemia terminal, crisis blástica y altos niveles de actividad de *STAT5*.

En este trabajo se determinó una importante variación de la relación *BAX/BCL-XL* entre los pacientes en diferentes estadios de la LMC. Se observó una disminución significativa en la relación *de BAX/BCL-XL* en los pacientes con LMC al Debut, en FC No Resp y en FA respecto a un grupo de individuos sanos y de pacientes en FC Rem. En la mayoría de los casos en remisión, el valor de la relación *BAX/BCL-XL* se incrementó significativamente, indicando la activación del programa apoptótico. Estos datos son coincidentes con los reportados por otros autores (Gutierrez-Castellanos *et al*, 2004; Horita *et al,* 2000), quienes detectaron un aumento en *BCL-XL* durante la evolución de la enfermedad. Nuestros hallazgos de expresión génica en pacientes con LMC fueron corroborados por citometría de flujo con experimentos *in vitro* mediante el tratamiento de la línea K562 con inhibidores de tirosina quinasa y evaluación posterior de la apoptosis mediante el sistema de anexina V/FITC. En estos experimentos *in vitro*, se observó un aumento significativo de la apoptosis celular luego del tratamiento de la línea celular con ITKs (IMA, DAS, NIL) y homoharringtonina respecto del control sin tratamiento.

Nuestros resultados muestran que la relación de la expresión relativa *BAX/BCL-XL* en pacientes con LMC se modifica significativamente en los diferentes grupos de riesgo, lo cual indica que este ensayo podría ser utilizado durante el monitoreo y seguimiento de la enfermedad como un factor pronóstico (Gonzalez *et al*, 2010).

Asimismo, se estudiaron los niveles de expresión de genes vinculados a proliferación celular tales como *KI-67* y *CAMKIIγ* en pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad. La proliferación celular es un proceso biológico controlado por mecanismos coordinados. El avance en el entendimiento de mecanismos y regulación del ciclo celular ha crecido en los últimos años proporcionando conocimiento sobre numerosos moduladores del ciclo celular. En el año 1983, fue descripto un anticuerpo denominado KI67 que reacciona selectivamente con núcleos de células proliferantes en todos los tejidos humanos estudiados (Gerdes *et al*, 1983).

Mediante análisis detallado del ciclo celular se reveló que el antígeno KI67 (proteína nuclear de 359 KDa) se expresa en todas las etapas activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) pero está ausente en células en reposo (G0) (Gerdes *et al*, 1984; Darzynkiewicz *et al*, 1992), indicando su utilidad como marcador de células en proliferación.

KI67 es una proteína comúnmente empleada para detectar y cuantificar células proliferantes, por lo tanto esta proteína es ampliamente utilizada como marcador pronóstico en varios tipos de tumores (Hou *et al*, 2011). En consecuencia, la determinación de la fracción en crecimiento con el anticuerpo Ki-67 actualmente es muy utilizado en histopatología (Gerdes *et al*, 1990), (Fontana *et al*, 1992; Locker *et al*, 1992).

Dado que el antígeno *KI-67* identifica células proliferantes en un tumor determinado, cuanto mayor es el número de células positivas, más agresivo es el tumor. En este trabajo, se observó que la expresión *KI67* fue significativamente más alta en los pacientes al Debut, en FC No Resp y en FA respecto del grupo en FC Rem. Esta evidencia permitió correlacionar la expresión del antígeno *KI67* con la evolución clínica de la LMC. Asimismo, se observó que el nivel de expresión de *KI67* aumenta significativamente acorde la progresión a etapas más avanzadas en pacientes con LMC.

La proteína CAMKIIγ activada (autofosforilada) tiene un rol importante en la regulación de la proliferación de las células mieloides. En estudios de investigación previos, se observó un aumento de la proteína CAMKIIγ autofosforilada en líneas celulares mieloides (K562), (Jutong *et al*, 2008). En diferentes modelos celulares el tratamiento *in vitro* con imatinib desencadena diferenciación terminal y arresto de crecimiento. Esta pérdida de la capacidad proliferativa de las células leucémicas está acompañada por una marcada disminución en la activación de CAMKIIγ. La reducción de CAMKIIγ activada contribuye directamente a la pérdida de la capacidad proliferativa de las células leucémicas. CAMKIIγ regula directa o indirectamente múltiples caminos de señalización implicados en la proliferación de las células tumorales, incluyendo MAPK, JK/STAT y GSK3β/β-catenina.

En este trabajo se observó que los pacientes al Debut, en FC No Resp y en FA, presentaron un aumento de la expresión de C*AMKIIγ* respecto del grupo en FC Rem. Teniendo en cuenta que *CAMKIIγ* es un importante regulador de múltiples fosfoproteínas en la proliferación mieloide, experimentos dirigidos a su silenciamiento específico podrían ser útiles para modular o regular la dinámica de la progresión de la enfermedad.

En general, las proteínas involucradas en el *shock* térmico son chaperonas moleculares de estructura muy conservada, que se expresan constitutivamente, y que facilitan el correcto plegamiento (*folding*) proteico. Las chaperonas moleculares tienen varias funciones, tales como proteger a las proteínas de su agregación, asistir el *folding* de proteínas nacientes y el *refolding* de proteínas dañadas.

Guo *et al,* (2005) intentaron determinar, en células leucémicas, el rol de la proteína *HSP70* en la vía anti-apoptótica mediada por *BCR-ABL1*. La expresión de *BCR-ABL1*, en células leucémicas resulta en una sobreexpresión de *HSP70* que lleva a la inducción y activación del factor de transcripción *STAT5* e interfiere con caminos de señalización involucrados en la inhibición del proceso apoptótico. Las células leucémicas expresando *BCR-ABL1* presentan altos niveles de p-HSF-1, principal factor del *shock* térmico responsable de la inducción de *HSP70* en células humanas (Creagh *et al*, 2000). En presencia de *stress* fisiológico, incluyendo el *stress* por calor, la serina monomérica y fosforilada HSF-1 es translocada al núcleo (Zou *et al*, 1998; Morimoto *et al*, 1998). Allí, HSF-1, forma trímeros, se hiperfosforila, se une a elementos del *shock* térmico, y transactiva a *HSP70* (Cotto *et al*, 1996). La expresión de *BCR-ABL1* induce el aumento del nivel de ARNm y el nivel proteico de HSP70, lo cual contribuye significativamente a la resistencia a la apoptosis observada en LMC (Creagh *et al*, 2000). Consistente con esto, la inhibición de la actividad tirosina quinasa de BCR-ABL1 por imatinib resulta en una atenuación del nivel de p-HSF y HSP70.

HSP70 está involucrado en el programa extrínseco iniciado por APO-2L/TRAIL y el programa mitocondrial intrínseco desencadenado por agentes antileucémicos, por lo tanto, esta chaperona se presenta como un interesante blanco terapéutico potencial para células leucémicas que expresan *BCR-ABL1*.

Existen evidencias de sobre-expresión *de HSP70* en células primarias derivadas de pacientes en crisis blástica (Nimmanapalli *et al*, 2003). Por lo tanto, es de interés determinar si la sobreexpresión de *HSP70* está restringida a FA de la enfermedad. En este trabajo, se observó un aumento significativo en la expresión de *HSP70* en el grupo de pacientes al Debut, FC No Resp y en FA respecto del grupo en FC Rem. Estos resultados sugieren que la expresión de *BCR-ABL1* lleva a un incremento en la expresión de *HSP70*, que contribuye a la resistencia a la apoptosis. La inhibición de la oncoproteína BCR-ABL1 por el tratamiento con imatinib, resulta en una atenuación de *HSP70*. En consecuencia, esta proteína podría ser un blanco potencial para la terapia en células leucémicas que expresan *BCR-ABL1*.

Por su parte, HSP90 es una de las proteínas más abundantes en eucariotas, representando a más del 1% de todas las proteínas solubles. HSP90 juega un rol importante en el *refolding* de proteínas celulares dañadas, y por lo tanto, en la protección de las células del estrés ambiental, y resulta necesaria para la maduración conformacional de varias clases de proteínas involucradas en vías de transducción o que median señales de crecimiento en células normales (Jakob *et al*, 1994). La secuencia de aminoácidos de HSP90 está conservada entre especies, sugiriendo que esta chaperona juega un rol fundamental en la fisiología celular.

Además se ha sugerido que una posible función de HSP90 podría ser permitir el plegado de proteínas con mutaciones genéticas que juegan un rol importante en el proceso evolutivo (Queitseh *et al*, 2002). Esto podría explicar cómo en células tumorales genéticamente inestables, HSP90 podría ser un factor crítico para la supervivencia celular en presencia de una alta tasa de mutabilidad. HSP90 es una proteína que funciona por un mecanismo que involucra cambios conformacionales cíclicos del dímero HSP90. La proteína dimérica actúa como un *clamp* formando un complejo en colaboración con otras proteínas accesorias llamadas co-chaperonas tales como HSP70, HSP40, HOP, AHA1 y p23 (Pearl *et al*, 2008). Algunas de estas chaperonas como HSP70 han sido estudiadas como posibles blancos moleculares con potencialidad terapéutica. El conocimiento creciente de la estructura de HSP90 y su interacción con las co-chaperonas es fundamental para el desarrollo de moléculas inhibidoras de HSP90.

Existen varias razones por las cuales HSP90 debe ser considerada como un importante blanco molecular en cáncer. Esta chaperona es clave para la estabilidad y funcionalidad de una serie de proteínas que cumplen roles substanciales en las células neoplásicas, tales como BCR-ABL1, ERB-B2, EGFR, CRAF, AKT, MET, VEGFR, FLT3, telomerasa, etc. Estas proteínas influyen en los rasgos distintivos de las células oncogénicas, tales como la independencia de factores de crecimiento, la resistencia a señales anti-proliferativas, el potencial replicativo ilimitado, la invasión tisular, la falta de apoptosis y la angiogenesis sostenida (Powers *et al*, 2006). En suma, para mantener la potencialidad de las células neoplásicas, éstas requieren una mayor actividad de chaperonas como HSP90 que las células normales.

El exitoso tratamiento de la LMC con el inhibidor de tirosina quinasa imatinib, lleva a una respuesta citogenética completa en un gran porcentaje de pacientes, aunque en algunos casos puede desarrollarse una resistencia primaria o secundaria. La recaída de los pacientes está asociada a la pérdida de la inhibición por imatinib, debido a amplificación *BCR-ABL1* o a la presencia de ciertas mutaciones puntuales específicas en el dominio quinasa del *BCR-ABL1*.

Gorre *et al* (2002) demostraron que cuando *BCR-ABL1* se encuentra mutado, aumenta su dependencia por HSP90 para su estabilidad. Estudios *in vivo* empleando un modelo animal, demostraron que la inhibición de HSP90 atenúa significativamente la resistencia inducida por presencia de mutaciones en el dominio quinasa de *BCR-ABL1* respecto de los casos resistentes sin mutaciones (*wild type*) (Peng *et al*, 2007). El inhibidor de HSP90, Geldanamicina (GA) y su análogo 17-allylamino-17-desmethoxygeldanamycin (17-AAG), se unen fuertemente a HSP90 y bloquean específicamente su actividad como chaperona, induciendo la degradación de ambos *BCR-ABL1* mutado y no mutado. Basado en esta evidencia podría resultar interesante estudiar la combinación del imatinib con GA y con 17-AAG en pacientes con LMC en fases avanzadas y en aquellos en fase crónica que han fallado en alcanzar la respuesta citogenética con imatinib como monoterapia.

HSP90 participa en al menos dos complejos que luego se asocian con sus proteínas blanco. Uno de estos complejos comprende HSP90, P23 y P50 y el otro consiste en HSP90, HSP70 y $P60^{HOP}$. Mientras la asociación de las proteínas blanco con el complejo HSP90::P23::P50 se vincula con la función de chaperona, la asociación con el complejo conteniendo HSP90, HSP70 y $P60^{HOP}$ se asocia con la degradación por el proteasoma (Won *et al*, 2000). El inhibidor GA desarma el complejo formado con HSP90::P23::P50 pero estabiliza aquel formado por HSP90::HSP70::$P60^{HOP}$. Won *et al* (2000) demostraron que $P210^{BCR-ABL1}$ se asocia con HSP90::P23::P50 en células de la línea K562 y que el tratamiento con GA causa desestabilización de la quinasa P210. Luego de la disrupción del complejo, HSP90 se asocia entonces con HSP70 y $P60^{HOP}$. Tras el tratamiento con GA, el cambio en la composición del complejo de chaperonas moleculares-quinasa es seguido por una disminución en los niveles de $P210^{BCR-ABL1}$ que es mediada por el proteasoma (Radujkovic *et al*, 2005).

Los inhibidores de *BCR-ABL1* sólo inhiben transitoriamente su actividad quinasa sin causar una reducción cuantitativa de BCR-ABL1 a nivel proteico, por lo que una estrategia de tratamiento alternativa sería causar la degradación de la proteína aberrante BCR-ABL1 antes que confiar en que la inhibición de la actividad quinasa de BCR-ABL1 sea suficiente para inducir apoptosis de la célula neoplásica (Blagosklonny *et al*, 2002). En ratones, la inhibición directa de HSP90 representa una estrategia alternativa y efectiva que atenúa la leucemia inducida por BCR-ABL1 causando degradación de la proteína P210 sin importar su estado mutacional de resistencia a la terapia con ITKs.

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de los niveles de expresión de *HSP90,* caracterizados por un aumento significativo en el grupo de pacientes en FC No Resp y FA respecto de aquellos en FC Rem, indican la potencialidad de la medición de la expresión de estas chaperonas como marcadores de resistencia al tratamiento con ITK en pacientes con LMC.

Por lo tanto, es importante la búsqueda de otras drogas con capacidad para obstruir efectivamente los caminos de transducción de señales involucrados en la patogénesis de la LMC. En este escenario, la inhibición de no solo el *BCR-ABL1* sino también de otras proteínas también involucradas podría ayudar a superar la resistencia primaria y secundaria al tratamiento convencional con ITK. En este sentido, actualmente están siendo estudiadas varias moléculas *in vitro* e *in vivo*. Nuestros datos indican que Hsp70 y Hsp90 podrían ser proteínas blanco para la depleción de los clones neoplásicos *BCR-ABL1* (+) en LMC. Asimismo, el uso simultáneo de ITKs e inhibidores de Hsp90 y Hsp70 en pacientes en fase crónica podría prevenir el desarrollo de clones resistentes.

Las mayores diferencias en cuanto a la expresión de los genes *CAMKIIγ, HSP70, HSP90, BCR-ABL1, KI-67* y *BAX/BCLXL* fueron observadas en pacientes resistentes (con o sin mutaciones en el dominio quinasa) en FC No Resp y en FA. Con el objetivo de determinar si el perfil de expresión génica permitía distinguir el grupo de pacientes portadores de mutaciones, los casos fueron agrupados en función de la presencia o ausencia de cambios nucleotídos en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1*. Se observó que la expresión de *CAMKIIγ,* y *HSP70* resultó significativamente mayor en el grupo de pacientes con mutaciones (MT) respecto de aquellos sin mutaciones (WT). También resultó interesante que el nivel de expresión de *HSP90* fue significativamente menor en el grupo MT respecto del grupo WT; mientras que *BCR-ABL1, KI-67* y *BAX/BCL-XL* no presentaron diferencias. Con esta evidencia acerca de las diferencias entre los dos grupos de pacientes resistentes (MT y WT), se diseño un *score* aplicando la siguiente formula: Log10 [*CAMKIIγ* + *HSP70* - *HSP90*] que permitió discriminar ambos grupos. Analizado los valores del *Score* mediante curvas ROC se pudo maximizar la diferenciación entre las poblaciones MT y WT, y establecer un punto de corte (*cut off: 1,1*) que permite estimar el estado mutacional de cada paciente con un 60% de sensibilidad y 80% de especificidad. En resumen el estudio de los niveles de expresión de los genes *CAMKIIγ*, *HSP70* y *HSP90* y la elaboración del *Score* sirve para estimar la presencia de mutaciones en pacientes con LMC resistentes al tratamiento con ITKs en forma rápida, específica y costo-efectiva. De todos

modos, este abordaje no reemplaza al estudio de mutaciones en el dominio quinasa del gen *ABL1* para determinar la identidad de la mutación y así estimar sobre base racional el redireccionamiento del tratamiento.

5.2 Búsqueda específica de mutaciones en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1*

El tratamiento de la LMC se ha modificado radicalmente por el descubrimiento del mesilato de imatinib, un inhibidor selectivo de la proteína quimérica BCR-ABL1 causante de la enfermedad (Kantarjian *et al*, 2002), (Druker *et al*, 2006), (Hochhaus *et al*, 2008). El imatinib es capaz de unirse a la conformación inactiva de BCR-ABL1 previniendo la entrada del ATP a su sitio de unión. A pesar del enorme éxito terapéutico alcanzado por esta estrategia, un porcentaje de pacientes experimentan resistencia a la terapia con imatinib, dependiendo de la fase y tipo de enfermedad. La resistencia puede deberse a diferentes mecanismos tales como amplificación génica de *BCR-ABL1*, sobreexpresión del transcripto (Bianchini *et al*, 2009), evolución cariotípica, o por la presencia de mutaciones en el dominio TK del *BCR-ABL1* (Hochhaus *et al*, 2002).

Se ha formulado la hipótesis que el fenómeno de resistencia se pone en evidencia por la presión de selección ejercida por el propio tratamiento, seleccionando aquellas células neoplásicas que resisten a la acción del fármaco. La mayoría de las mutaciones reportadas en el *BCR-ABL1* están agrupadas en el dominio quinasa del segmento *ABL1* del *BCR-ABL1* preferentemente en el sitio de fosforilación (P-*loop*), o en el sitio de unión a la droga (Imatinib-*binding site*), más raramente en el sitio catalítico o en el sitio de activación (Hochhaus *et al*, 2003). El efecto de estas mutaciones puede a veces, contrarrestarse aumentando la dosis terapéutica, mientras que en otros casos se tornan totalmente insensibles al tratamiento.

Entre las metodologías que han sido empleadas para detectar mutaciones en el dominio quinasa del *BCR-ABL1,* la secuenciación directa del ADN es el método de referencia tomado por consenso, a pesar de su limitada sensibilidad (aproximadamente 20%), (Shah *et al,* 2002), (Branford *et al*, 2003).

En este trabajo desarrollamos un ensayo de PCR alelo específico para detectar las mutaciones más importantes en el dominio quinasa del gen *BCR-ABL1* que confieren resistencia a los ITKs. Nuestro objetivo fue desarrollar un ensayo con habilidad para detectar células mutadas alcanzando mejores niveles de sensibilidad pero manteniendo los niveles de especificidad

respecto a la secuenciación de ADN. Para poder estimar estos parámetros desarrollamos una herramienta que permitió estimar sin sesgos la sensibilidad de detección de cuatro de las mutaciones más frecuentes. Con este propósito, fueron diseñadas dos constructos de referencia correspondientes al gen *ABL1*, uno de ellos conteniendo el exón 4 con las mutaciones G250E y E255K y el exón 6 con las mutaciones T315I y M351T separados por el exón 3 (ADN espaciador como secuencia control). La otra construcción incluye la misma estructura exónica a la descripta pero en su versión no mutada (*wild type)*. Estas herramientas permitieron determinar el límite de detección de la reacción ASO-PCR (PCR alelo-específica) para cada una de las mutaciones analizadas. Mediante este ensayo se detectaron las mutaciones G250E y E255K cuando el porcentaje del alelo mutante fue mayor a 1,25% y 2,5%, respectivamente; mientras que las mutaciones T315I y M351T fueron detectadas cuando el porcentaje del alelo mutante fue mayor al 5% y 1,25%, respectivamente. Si bien nuestros resultados no llegan a las sensibilidades (1:100) reportadas por Kang *et al* (2006) nuestro abordaje incorpora un método de medición de sensibilidad por dilución célula mutada a célula no-mutada, mientras que otras metodologías sólo estiman el límite de detección mediante meras diluciones en agua del alelo mutado sin la intervención del alelo no-mutado como competidor, lo que sobreestima el poder de detección de la técnica. El empleo de dos plásmidos (mutado y salvaje) preparados a partir de la igualación del número de copias permitió realizar mezclas para obtener una estimación no sesgada del límite de detección de cada mutación.

Por otra parte, Willis *et al* (2005) llegaron a la conclusión que la detección de mutaciones con técnicas de muy alta sensibilidad no sería recomendable ya que podría detectar clones residuales que luego fallen en expandirse, o no tengan impacto clínico. Actualmente, se discute el nivel del clon mutado o umbral a partir del cual una carga de mutación tendría importancia en la expansión clonal efectiva y finalmente en la evolución clínica desfavorable por resistencia al tratamiento. A partir de esta observación, se han planteado nuevos estudios de seguimiento que permitan esclarecer el verdadero valor de la detección temprana de cada una de las diferentes mutaciones y su asociación con mecanismos adicionales que colaboran con la adquisición del fenotipo resistente.

6. Capítulo II: Resultados

Neoplasias Mieloproliferativas *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1 (-)]:* Desarrollo de un nuevo abordaje de cuantificación de la mutación *JAK2*^{V617F}

Este capítulo presenta el diseño, desarrollo y validación de un nuevo abordaje para la evaluación cuantitativa de la carga alélica y expresión de la mutación JAK2^{V617F} en muestras de pacientes con neoplasias mieloproliferativas crónicas [NMPs *BCR-ABL1 (-*)] Esta metodología emplea constructos de referencia con relación 1:1 en número de copias del alelo normal (WT) y mutado (MT), permitiendo realizar determinaciones más exactas (virtualmente no sesgadas) y específicas de la mutación V617F. Los constructos de referencia 1:1 WT: MT a nivel genómico (ADNg) y transcripcional (ADNc) permiten analizar la homo o heterocigocidad, así como el nivel de expresión de la mutación.

6.1. Diseño, ensamblado y amplificación de constructos de referencia *JAK2* 1:1 MT: WT para ADNg y ADNc

Con la finalidad de reducir al máximo posibles sesgos en la determinación de la carga alélica y nivel de expresión de la mutación V617F en pacientes con [NMPs *BCR-ABL1 (-)]* fue desarrollada una herramienta que permite realizar estas estimaciones con mayor especificidad y sensibilidad. Para ello, fueron diseñados dos constructos de referencia, empleando ADNg y ADNc como sustrato para amplificación PCR alelo-específica. Estas construcciones contienen un fragmento de ADN correspondiente al alelo mutado y otro correspondiente al alelo salvaje separados por un espaciador de ADN (figura 41). Estos constructos permitieron realizar las curvas de calibración necesarias para la cuantificación mediante PCR en tiempo real (QPCR).

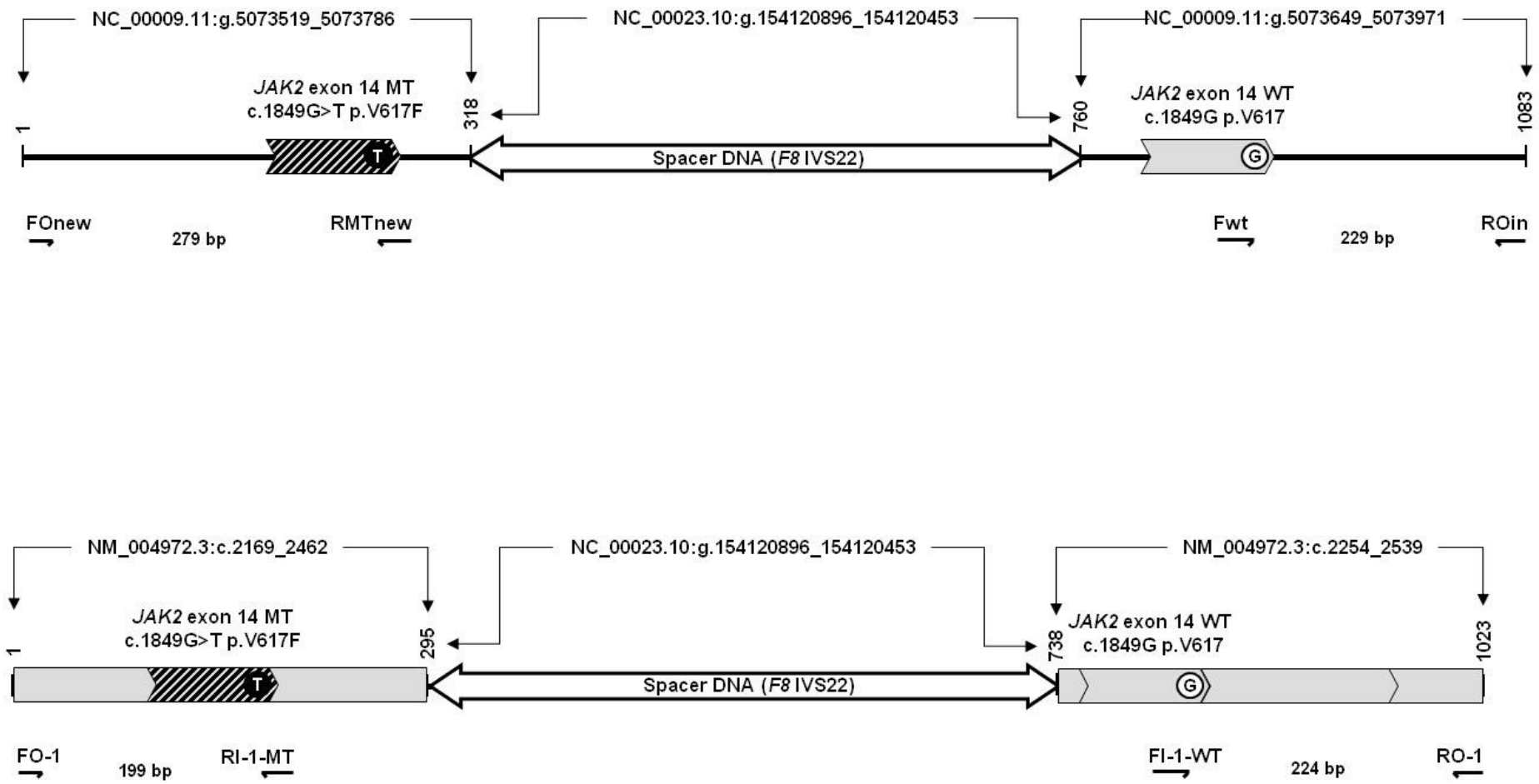


Figura 41. Constructos de referencia *JAK2* 1:1 MT: WT. Diagrama superior: Constructo de referencia a partir de ADN genómico. Diagrama inferior: Constructo de referencia a partir de ADN copia. En los esquemas se muestran los *primers* alelo específicos empleados para amplificar el alelo mutado (MT) y el alelo salvaje (WT). Se indican los archivos del *GenBank,* los tamaños moleculares de cada segmento y de cada producto de amplificación.

Los productos PCR que han sido construidos como intermediarios para la obtención final del constructo de referencia *JAK2* 1:1 MT: WT de ADNg y ADNc se muestran en las figuras 42 y 43, respectivamente. Los detalles de la estrategia de construcción se encuentran en Materiales y Métodos.

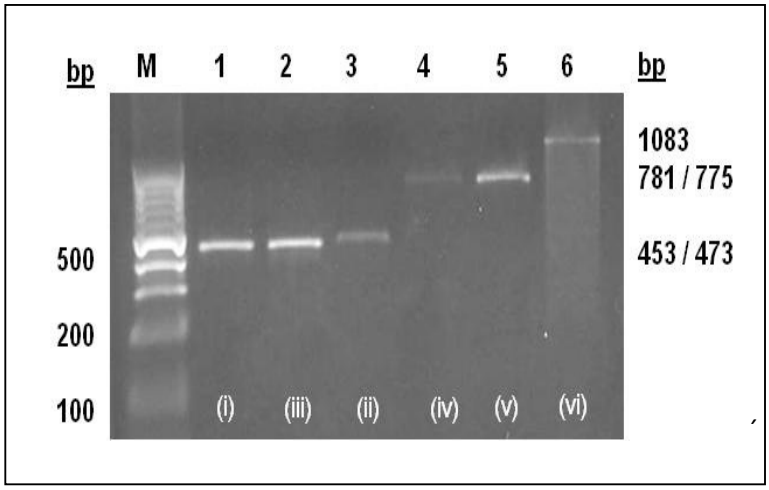


Figura 42. Productos intermediarios del constructo de referencia ADNg *JAK2* MT:WT 1:1. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Calle 1: producto PCR de 453 pb utilizando los *primers* FOin y ROin sobre ADNg de un paciente homocigota para la mutación V617F (i). Calle 2: producto de PCR de 453 bp con *primers* FOin y ROin sobre el ADNg de un individuo no mutado (iii). Calle 3: ADN espaciador de 473 pb (ii). Calle 4: producto de fusión de (i) e (ii) originando un fragmento de PCR de 775 pb (iv). Calle 5: producto de fusión de (ii) e (iii) generando un fragmento de 781pb (v). Calle 6: Producto de fusión de (iv) y (v) dando lugar al constructo final de 1083, pb ADNg-MT: WT 1:1 (vi). Ver detalles en Materiales y Métodos.

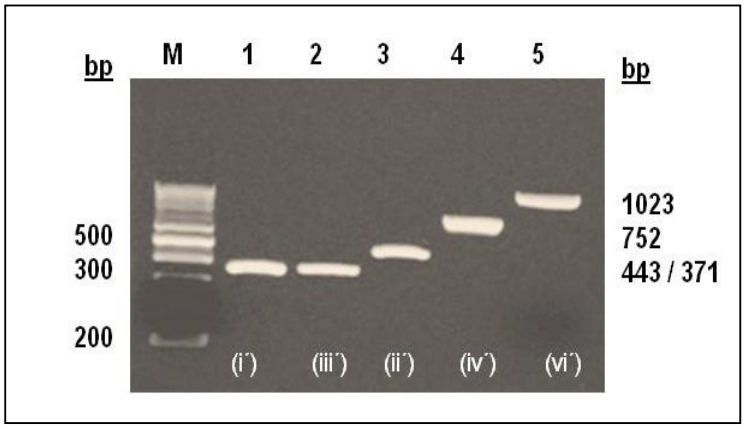


Figura 43. Productos intermediarios del constructo de referencia ADNc *JAK2* MT:WT 1:1. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Calle 1: producto PCR de 371 pb utilizando los *primers* FO-1 y RO-1 sobre ADNc de un paciente homocigota para la mutación V617F (i´). Calle 2: Producto de PCR de 371 bp con *primers* FO-1 y RO-1 sobre ADNc de un individuo no mutado (iii´). Calle 3: ADN espaciador de 473pb (ii´). Calle 4: producto PCR de 752 pb (iv´) generado por fusión de (i´) e (ii´). Calle 5: Producto final ADNc-MT:WT 1:1 de 1023pb (vi´) Ver detalles en Materiales y Métodos.

Los constructos generados fueron clonados para su amplificación y conservación segura en el plásmido pCR2.1 TOPO y las células bacterianas *DH5αTM-T1*.

Para investigar y confirmar la presencia de una única copia de *JAK2* mutado en cada constructo, fue utilizada la enzima de restricción BsaXI, figura 44. La mutación *JAK2* en la posición V617F (c.1849G>T), introduce un sitio único de restricción para la enzima BsaXI en ambos constructos de referencia (ADNg y ADNc).

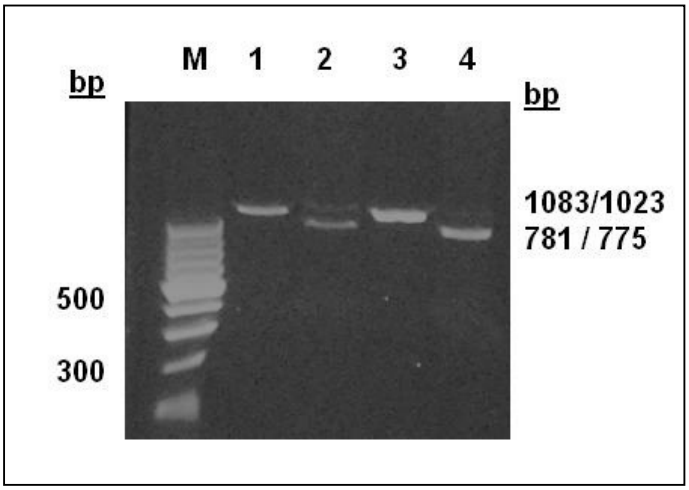


Figura 44. Análisis de restricción con la enzima BsaXI. Calle 1: ADNg 1:1 MT: WT no digerido. Calle 2: ADNg 1:1 MT: WT digerido con BsaXI. Calle 3: ADNc 1:1 MT: WT no digerido. Calle 4: ADNc 1:1 MT: WT digerido con BsaXI.

Los plásmidos recombinantes purificados fueron caracterizados mediante secuenciación directa de ADN sobre los productos de amplificación de 1083 pb y 1023 pb para confirmar la presencia de la mutación V617F en *JAK2* ADNg- MT: WT 1:1 y ADNc-MT: WT 1:1 (figura 45 A y B).

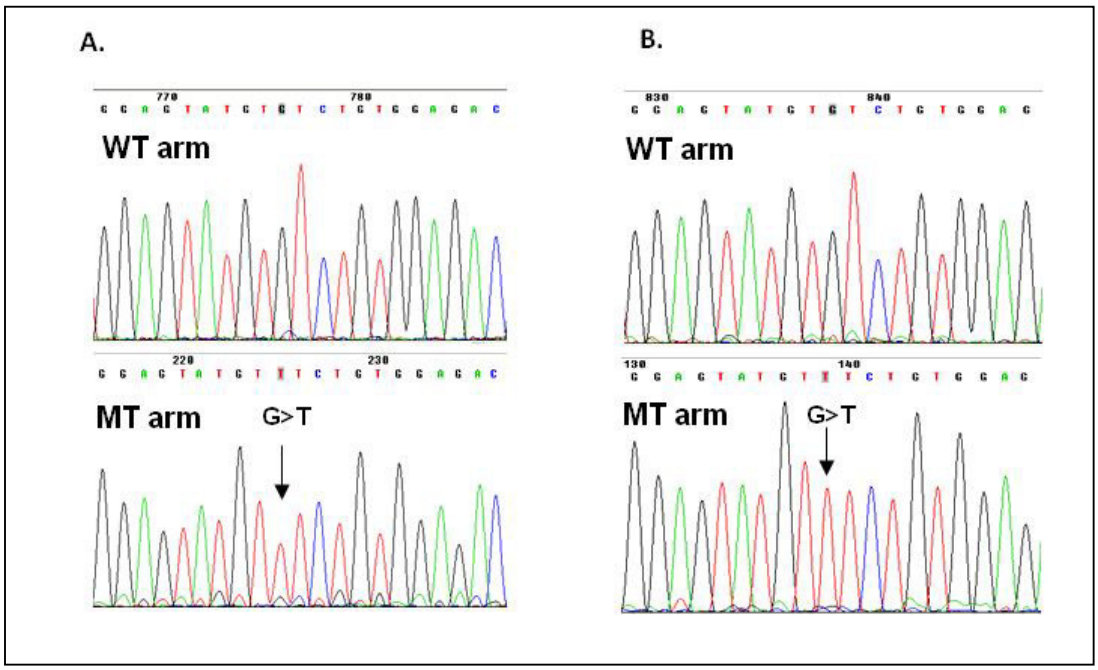


Figura 45. Caracterización de la secuencia de ADN correspondiente a los plásmidos de referencia *JAK2* MT: WT. (A). Constructo *JAK2* ADNg-MT: WT. Panel superior: secuencia correspondiente al brazo salvaje Panel inferior: secuencia correspondiente al brazo mutado. (B). Constructo *JAK2* ADNc-MT: WT. Panel superior: secuencia correspondiente al brazo salvaje. Panel inferior: secuencia del brazo mutado.

6.2. Especificidad de los plásmidos de referencia *JAK2* ADNg y ADNc MT:WT 1:1 reactividad cruzada de primers oligo-específicos

Con el propósito de confirmar la estructura molecular de los constructos a partir de ADNg y ADNc, fueron analizadas las amplificaciones PCR a partir de una variedad de combinaciones de *primers*. Sólo los productos de amplificación esperados fueron obtenidos a partir de ADNg y ADNc respectivamente. Los siguientes pares de *primers* generaron amplificaciones PCR del tamaño específico: FOin/RMTnew (279 pb), UpSp-g/LoSp-g (473 pb) y Fwt/ROin (229 pb) sobre el plásmido ADNg como sustrato, y FO-1/RI-1 (199 pb), UpSp-c/LoSp-c (473 pb) y FI-1/RO-1 (224 pb) sobre el plásmido ADNc como sustrato. En estos experimentos se utilizaron dos condiciones de temperatura de hibridación (58°C y 60°C) para explorar la especificidad estructural bajo dos condiciones de amplificación ligeramente distintas, y los resultados fueron coincidentes (figura 46).

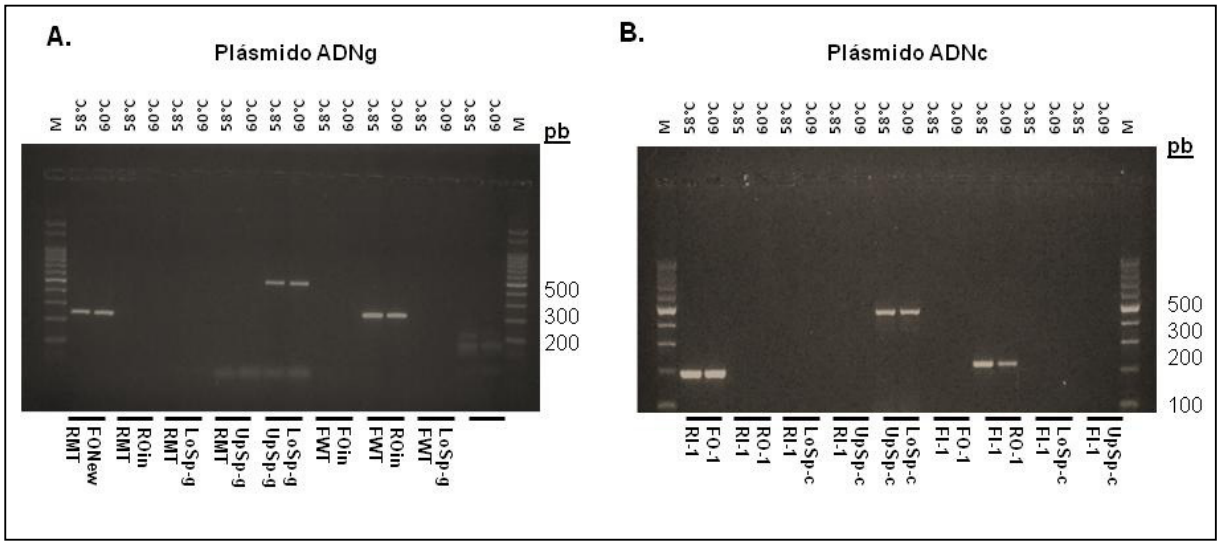


Figura 46. Reactividad cruzada de *primers*, especificidad estructural de los plásmidos de referencia ADNg y ADNc. Las temperaturas de hibridación y los pares de *primers* combinados se indican en la parte superior e inferior de la figura respectivamente. Ver Fig 17 y 18 de Material y Métodos para corroborar la especificidad de los *primers* para generar productos PCR sobre los constructos de ADNg (A) y ADNc (B).

6.3. Estrategia para determinar la carga alélica de la mutación V617F en el gen *JAK2* empleando constructos de referencia 1:1 MT: WT

Para determinar el rango dinámico (rango de medición confiable) de ADNg y ADNc que permite la cuantificación mediante PCR en tiempo real, se realizaron curvas de calibración a partir de diluciones seriadas (1:10) de los plámidos de referencia ADNg *JAK2* 1:1 MT: WT y ADNc *JAK2* 1:1 MT: WT, respectivamente. (Figura 47).

Asimismo, la especificidad de los productos obtenidos en las amplificaciones QPCR fue investigada mediante el análisis de las curvas de desnaturalización de los productos obtenidos en cada caso (*melting curves*) (figura 48).

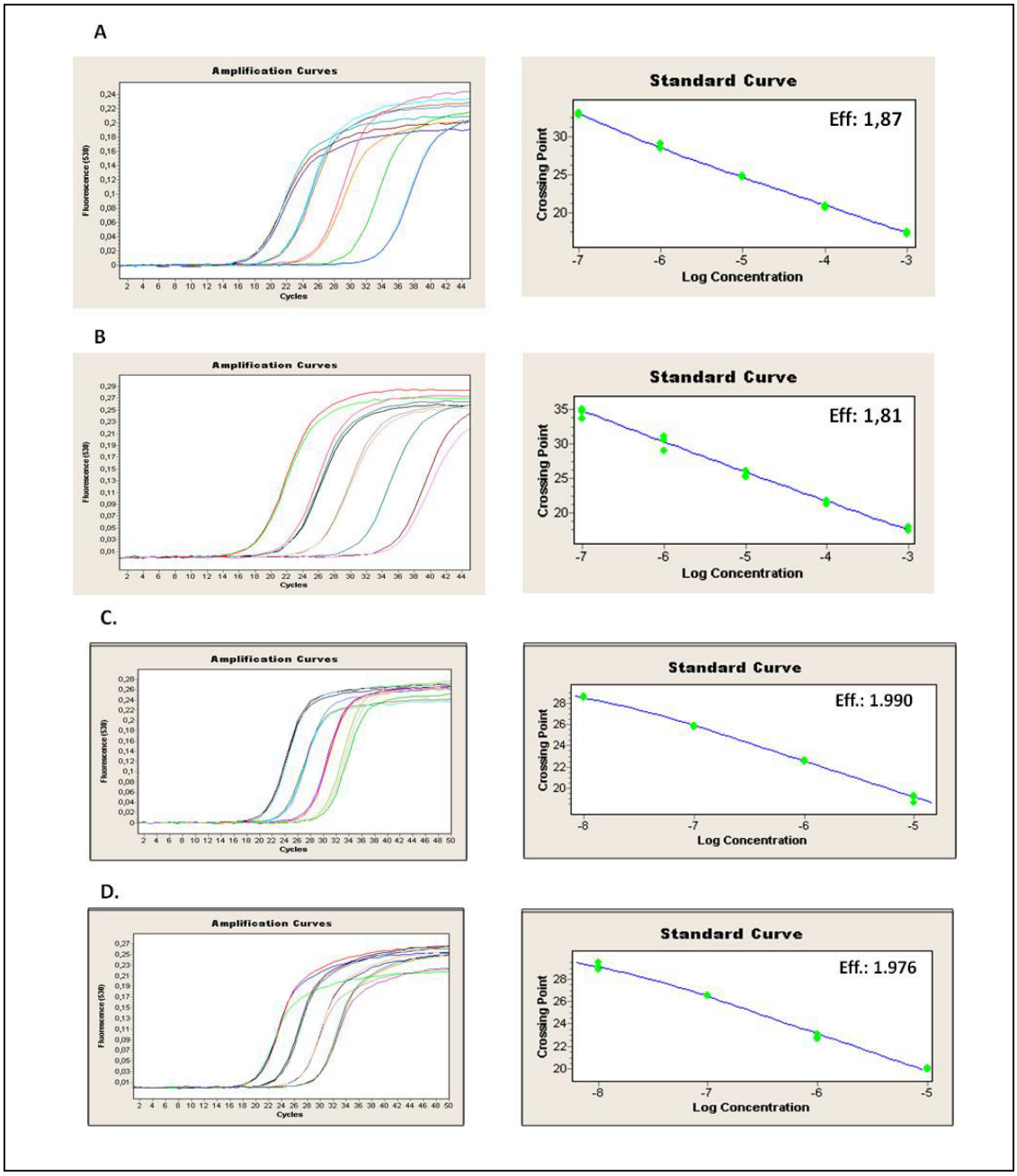


Figura 47. Curvas de calibración para el análisis de expresión de alelo mutado (MT) *JAK2*^{V617F} y del alelo salvaje (WT) *JAK2*^{V617}. En el panel izquierdo se muestran las curvas de amplificación PCR en tiempo real (intensidad de fluorescencia medida en cada ciclo) y en el panel derecho se muestran los gráficos correspondientes al Cp (*Crossing point*) *vs* el Log de la concentración del plásmido (en UA: unidades arbitrarias asociadas con una dilución específica del mismo plásmido). Las mediciones QPCR se realizan por triplicado. (A) Cuantificación del alelo mutado (MT) y (B) del alelo normal, correspondientes al constructo ADNg MT: WT 1:1. (C) cuantificación del alelo mutado (MT) y (D) del alelo normal, correspondientes al constructo ADNc MT: WT 1:1. Eff: indica la eficiencia de amplificación por PCR en tiempo real (Eff = 2, indica amplificación óptima).

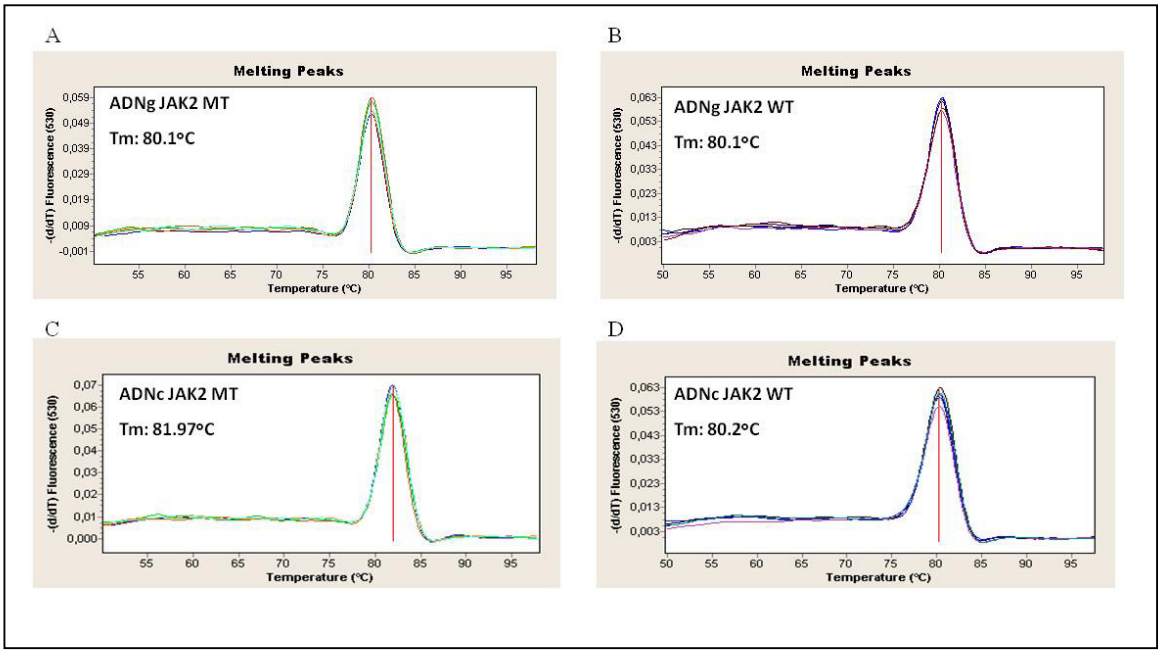


Figura 48: Temperatura de *melting* (Tm) de los productos de amplificación QPCR MT y WT para ADNg y ADNc. Se identifica la Tm como un pico único bien definido característico de cada producto amplificado (línea vertical). (A) Alelo mutado (MT) y (B) alelo salvaje (WT) obtenido a partir de ADNg. (C) Alelo MT y (D) alelo WT obtenido a partir de ADNc.

Para estudiar la capacidad de los plásmidos de referencia ADNg y ADNc para determinar con precisión la carga alélica (CALg) y nivel de expresión (CALc) de la mutación *JAK2*^{V617F} correspondiente al 50%, se definió un rango dinámico como el rango de dilución del plásmido de referencia en el cual las fluctuaciones en el 50% fueron mínimas. En el rango de diluciones de 10^{-3} a 10^{-7} para el plásmido ADNg se obtuvo un promedio de 52,53% y un desvío estándar de 4,2%; mientras que para el plásmido ADNc en el rango de diluciones de 10^{-6} a 10^{-9} se obtuvo un promedio de 51,46% y una desviación estándar de 4,21% (Figura 49).

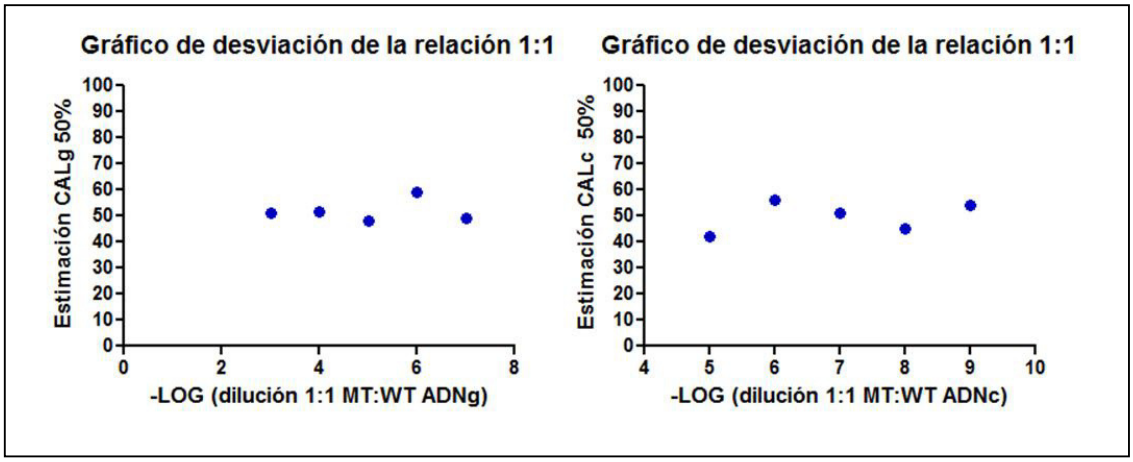


Figura 49. Gráficos de desviación de la relación 1:1 en el rango dinámico de diluciones de los plásmidos de referencia. Panel izquierdo, CALg medida para cada dilución del plásmido ADNg, y panel derecho para el plásmido ADNc.

Es importante señalar que dentro del rango dinámico, las diluciones del plásmido de referencia, ADNg *JAK2* 1:1 MT: WT, (10^{-3}-10^{-7}) corresponden aproximadamente a 1,2 x 10^{6} – 1,2 copias de *JAK2* e incluyen el número de copias de *JAK2* para un *input* de ADN de 20 ng (6 x 10^{3} copias) empleado en este sistema de QPCR. El rango dinámico de ADNc (10^{-6}-10^{-9}) corresponde a 9,65 x 10^{3} – 9,65 copias de *JAK2* en muestras de ADNc. Sin embargo, la imposibilidad de estimar el número de copias absoluto de *JAK2* en muestras de ADNc (transcripción reversa de 2 µg de ARN extraído de leucocitos de pacientes con [NMPs *BCR-ABL1 (-)]* no permite, en principio, determinar si el rango dinámico contiene el número absoluto de copias correspondientes al total de ADNc inoculado.

Cada valor individual de WT y MT está asociado con un error (ES), que es obtenido por interpolación de los valores de dilución del plásmido en regresión lineal con cada desvío estándar, en cada uno de los triplicados de cada dilución de los plásmidos de referencia (i.e., dilución de plásmido *vs* desvío estándar de triplicados).

6.4. Comparación de los resultados cuantitativos por QPCR con los resultados cualitativos por ARMS-PCR

Para poder determinar a partir de qué valor una muestra debe ser considerada positiva para la mutación $JAK2^{V617F}$ mediante QPCR se calculó un valor a partir de 20 muestras de individuos sanos de la población general negativos para la mutación $JAK2^{V617F}$. El promedio de las

relaciones $JAK2^{V617F}$ x100/$JAK2^{V617F}$ + $JAK2^{WT}$ de las 20 muestras controles fue 1,04% y el desvío estándar 1,3% por lo tanto se fijó un *cut off* de 3,65 % (calculado como la media más dos veces el desvío estandar: 1,04 %+2x1,3 %).

Con el propósito de comparar y validar el método basado en QPCR usando los plásmidos de referencia 1:1 WT: MT con el método cualitativo usado en la práctica clínica, ARMS-PCR (Jones et al, 2005), se analizaron en paralelo en experimentos a ciegas un grupo de pacientes con diagnóstico de [NMPs *BCR/ABL1* (-)]. De las 20 muestras analizadas, 10 fueron positivas para la mutación V617F y 10 negativas por la metodología ARMS-PCR. Los resultados obtenidos por QPCR mostraron concordancia en casi todos los casos analizados (Figura 50), excepto en dos muestras negativas por ARMS-PCR y positivas por QPCR mostrando cargas alélicas de 5,1% y 6,7 %, valores que estarían ligeramente por debajo del nivel de detección estimado para el método cualitativo de ARMS-PCR, explicando así la discordancia observada

Las muestras negativas por ARMS presentaron un valor de carga alélica promedio estimado por QPCR (media ± ES) (1,9% ± 0,6%); y las muestras positivas por ARMS arrojaron un valor de carga alélica promedio (55% ± 9%).

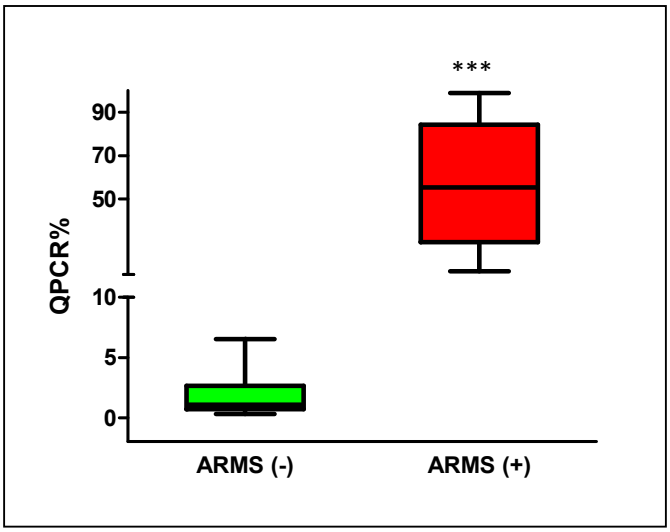


Figura 50. Validación de los ensayos de QPCR empleando la metodología ARMS. Los resultados obtenidos por QPCR mostraron concordancia en casi todos los casos analizados, excepto en dos muestras negativas por ARMS-PCR y positivas por QPCR. (*** P<0.0001).

6.5. Aplicación de la estrategia desarrollada para la cuantificación de la carga alélica y expresión de *JAK2*^{V617F} a partir de muestras de pacientes con NMPs *BCR-ABL1* (-)

Los resultados de carga alélica a nivel genómico (ADN) y transcripcional (ARN) obtenidos mediante QPCR en 19 pacientes con NMPs *BCR-ABL1 (-)* (6 PV, 5 TE y 8 MP) positivos para la mutación JAK2V617F se detallan en la figura 51 A y B. El estudio de este grupo de pacientes es para demostrar la aplicación y *performance* de la estrategia desarrollada en casos clínicos reales. El número de pacientes no es suficiente para presentar conclusiones estadísticas, aunque sí es posible observar una tendencia similar a la reportada en la literatura respecto a los valores de carga alélica del clon mutado en cada una de estas entidades. En este escenario, nuestros datos perfilan un incremento en la carga alélica y expresión del alelo mutado *JAK2*^{V617F} en pacientes con MP (media ± ES) (80,3% $\pm$ 5,2%), (97$\pm$ 1,2%), respectivamente, respecto de pacientes con TE (53% $\pm$ 9%), (53,6 % $\pm$ 9,5 %), y PV (56% $\pm$ 17%), (71% $\pm$ 13%), (Tabla 15, Figura 51).

Tabla 15. Valores de carga alélica a nivel genómico y expresión de la mutación *JAK2*$^{V617F.}$

Paciente (N°)	MNPs	*JAK2*^{V617F} CAL g (%) *	*JAK2*^{V617F} CALc (%)*
1	PV	34.8	99.9
2	PV	92.6	83.4
3	PV	53.08	57.3
4	PV	19.3	12.8
5	PV	97.27	97.3
6	PV	80.3	78.6
7	TE	39.5	45.7
8	TE	67.7	45.7
9	TE	45.1	53.3
10	TE	31.5	35.02
11	TE	81.1	89.9
12	MF	86.2	99.8
13	MF	93.05	90.1
14	MF	62.3	94.1
15	MF	60.1	99.9
16	MF	98.6	99.8
17	MF	67.18	99.3
18**	MF	0.54	5.21E-04
19	MF	83.4	99.9
20	MF	91.2	95.4

* El error propagado (SD) de la carga alelica (CAL) de cada valor individual de MT y WT es despreciable por lo que no fue considerado. (Rango: $6{,}37x10^{-8}$-$1{,}5310^{-5}$). **El caso Nº18 es negativo para la mutación *JAK2*^{V617F}.

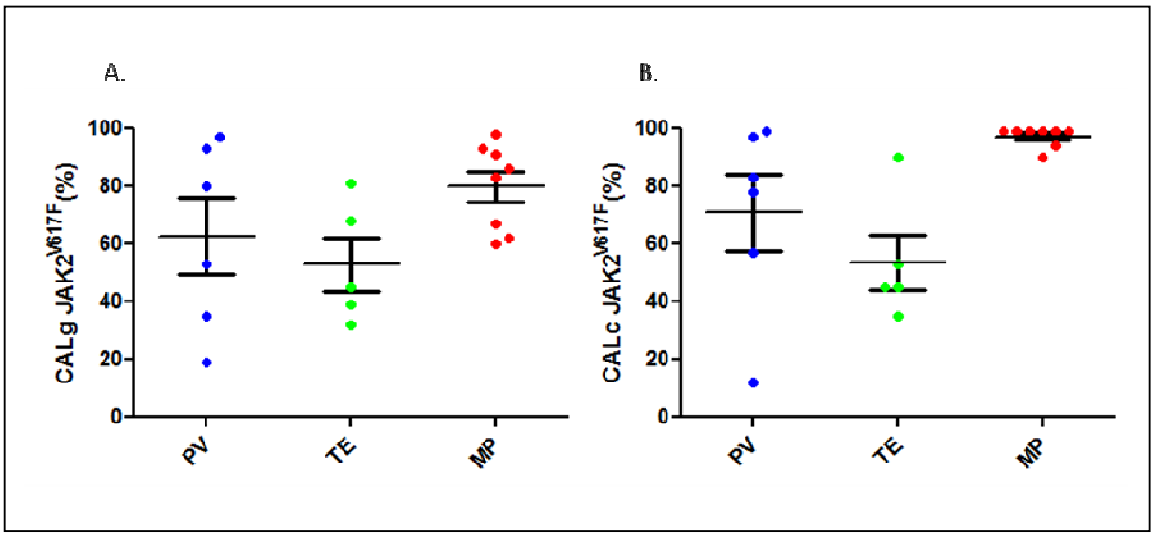


Figura 51. **Carga alélica y nivel de expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} en NMPs *BCR-ABL1 (-).*** (A) Determinación de la carga alélica (CALg) de la mutación *JAK2*^{V617F} mediante QPCR. (B) Determinación del nivel de expresión (CALc) de la mutación *JAK2*^{V617F} mediante QPCR. La población estudiada presenta un número acotado de casos que no permiten realizar un análisis estadístico, por lo tanto, estos gráficos fueron realizados con propósito ilustrativo.

Los experimentos de comparación de niveles de *JAK2*^{V617F} en muestras pareadas de ADN y ARN de los 20 pacientes indicaron una correlación estadísticamente significativa sólo con nivel marginal (Spearman r=0,53, p=0,02), debido a la presencia de 4 casos (20%) que se alejan de la tendencia central (*outliers*) (Figura 52). Cuando el análisis fue circunscripto al 80% correspondiente a esta tendencia (N=16) se observó una excelente correlación entre el nivel de expresión de la mutación y el valor de carga alélica (Spearman r=0,83, P<0,0002). El grupo de *outliers* presentó niveles muy incrementados de transcriptos *JAK2*^{V617F} lo cual podría asociarse a una expresión aumentada o sobreexpresión de la mutación. Es interesante observar que estos cuatro pacientes discordantes en los valores de CALg y CALc (un paciente con PV y tres pacientes con MP) presentaron todos ellos un perfil clínico definido por esplenomegalia asociada a un alto recuento de glóbulos blancos, y todos estos pacientes se encontraban bajo tratamiento con hidroxiurea.

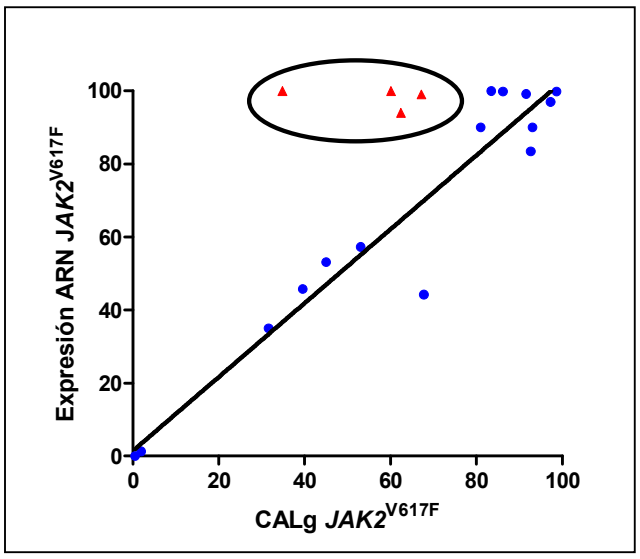


Figura 52. Análisis de correlación entre los resultados de QPCR empleando ADNg y ADNc como sustrato. Se observa una correlación significativa entre la carga alélica y los niveles de expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} (Spearman P<0,0002).

La carga de la mutación *JAK2*^{V617F} determinada por la proporción entre el alelo mutado respecto al total (*JAK2* MT + WT) tiene importancia en el tiempo de evolución y progresión de la enfermedad. Existen evidencias que niveles más elevados de carga alélica en PV y TE se asocian a mayor frecuencia de trombosis y a una mayor probabilidad de evolución a mielofibrosis post-policitemia vera (MP post-PV) o post trombocitemia esencial (MP post-TE). Hasta el presente, la importancia de la cuantificación de la carga alélica en el manejo clínico de los pacientes con NMPs *BCR-ABL1 (-)* no está definida pues son escasos los estudios orientados a determinarla directamente. Actualmente, los estudios clínicos prospectivos en curso definirán la importancia de la cuantificación de la carga alélica en el manejo clínico de los pacientes y en el monitoreo de la respuesta molecular durante el tratamiento con inhibidores de *JAK2*.

7. Capítulo II: Discusión

Neoplasias Mieloproliferativos *BCR-ABL1* negativas [NMPs *BCR-ABL1 (-)]*

Las NMPs *BCR-ABL1 (-*) son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales derivadas de una stem cell común y caracterizadas por la proliferación en médula ósea de uno o más de los linajes mieloides (eritroide, granulocitico, megacariocítico) con aumento de células maduras en sangre periférica. Las NMPs *BCR-ABL1 (-)* clásicas incluyen a la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis primaria (MP) (Tefferi *et al*, 2008). La clasificación actual, (OMS 2008), de estas patologías se basa en criterios clínicos, histológicos y moleculares.

Las NMPs *BCR-ABL1 (-)* se caracterizan por la presencia de una mutación somática adquirida en el exón 14 del gen *Janus Kinase 2* (*JAK2*), *JAK2*^{V617F}. Esta mutación identificada por varios grupos de investigación (Baxter *et al*, 2005; Levine *et al*, 2005; Kralovics *et al,* 2005; James *et al*, 2005) es detectada en casi todos los casos de PV y en aproximadamente 50-60% de los casos con TE y MF. La mutación consiste en una transversión nucleotídica G por T (c.1849G>T) que resulta en un cambio de valina por fenilalanina en la posición 617 (p.V617F). Esta mutación involucra el dominio pseudoquinasa JH2, cuya función es inhibir la actividad quinasa de *JAK2*. Como resultado, la proteína *JAK2* permanece constitutivamente fosforilada activando distintas vías de señalización como JAK/STAT, MAPK y PI-3K/Akt.

Después de la adquisición somática de la mutación *JAK2*^{V617F} puede ocurrir un fenómeno de recombinación mitótica o pérdida de heterocigosidad, LOH (*loss of heterozygosity*) que transforma al clon neoplásico en homocigota para la mutación *JAK2* por pérdida del alelo normal. En consecuencia, la carga alélica de la mutación *JAK2*^{V617F} (CALg), que consiste en la relación porcentual entre la cantidad del alelo *JAK2* mutado respecto del total de *JAK2* aumenta. Este estudio constituye un parámetro clave para estimar el grado de evolución molecular de estas neoplasias. Cuando la CALg indica valores superiores al 50% se infiere presencia de homocigocidad para la mutación *JAK2*^{V617F}. Se ha observado que mayores porcentajes de carga alélica se asocian con enfermedad de larga evolución, con gran esplenomegalia y con mayor probabilidad de complicaciones tales como trombosis, mielofibrosis (Passamonti *et al*, 2009; Vannucchi *et al*, 2007; Carobbio *et al*, 2009) y riesgo de transformación a leucemia mieloide aguda (Barosi *et al*, 2007, Tefferi *et al*, 2008). El fenómeno de homocigocidad de la mutación se ha observado en un 30% de pacientes con PV y MP comparado con sólo un 5% de los pacientes con TE (Chen *et al,* 2006; Vannucchi *et al*, 2008).

Dado que la mutación V617F es mucho más prevalente que las alteraciones citogenéticas, el análisis de esta mutación es actualmente usado como la técnica de referencia (*gold standard*) para demostrar clonalidad y es uno de los principales criterios diagnósticos.

El descubrimiento de las mutaciones en el gen *JAK2* ha permitido un enorme avance en el entendimiento de la fisiopatología de las NMPs. Esta mutación ha mejorado y simplificado el enfoque diagnóstico de estas neoplasias. Sin embargo, el mecanismo por el cual da origen a tres patologías diferentes es un fenómeno no resuelto.

Por todo lo expuesto, en la actualidad existe un interés creciente en conocer la carga del alelo *JAK2*^{V617F} y su posible influencia en el fenotipo, progresión y evolución de la enfermedad (Passaminti *et al*, 2009).

La determinación de la carga alélica del clon neoplásico es un parámetro muy importancia a tener en cuenta en estas patologías. El diseño de los constructos *JAK2*^{V617F} MT:WT 1:1 para control no sesgado de la amplificación y para un ajuste de las condiciones de ciclado y reactivos ha permitido alcanzar eficiencias cercanas al 100%. La PCR cuantitativa en tiempo real es un procedimiento eficiente de amplificación y ha sido empleado en este trabajo para la determinación de la carga alélica de la mutación *JAK2*^{V617F} y del nivel de expresión de la misma. Es muy importante utilizar estándares apropiados para realizar las curvas de calibración necesarias para llevar a cabo una determinación por QPCR, ya que la aparición de discrepancias en la carga del alelo mutado podría ser en parte dependiente de la estrategia empleada en la cuantificación.

La finalidad de la utilización de abordajes del tipo de estos constructos de referencia es el de reducir al máximo eventuales sesgos en el cálculo de la carga alélica de la mutación V617F alrededor del 50%, teniendo en cuenta la importancia de esta determinación.

Además, con el propósito de emplear nuestro abordaje como una herramienta cualitativa, se determinó un valor umbral a partir de donantes sanos, de 3,65% (media + 2xDS), que permitió la detección positiva de JAK2^{V617F} en 19 casos con NMPs, observándose un límite de detección mejorado en comparación con ARMS-PCR (≥ 6,7%).

La QPCR empleando constructos con relación MT:WT 1:1, permitió una estimación rápida y precisa de la carga alélica y de expresión de ARN de la mutación JAK2^{V617F} en 19 casos positivos con MPNs *BCR-ABL1* (-), detectando 13 casos con clones homocigotas (CALg ≥ 56,73% (media + SD)).

La carga alélica (CALg), representa un porcentaje promedio ponderado de células con ninguna,

una o dos copias de *JAK2*^{V617F} en una muestra dada de ADN genómico. Este porcentaje debería ser similar al porcentaje de ADNc (CALc) pero puede estar modificado por la expresión diferencial del ARN, ya sea afectado por una transcripción aumentada de *JAK2* MT o por una estabilidad diferencial del ARN.

Como el objetivo de este trabajo fue desarrollar un abordaje metodológico empleando constructos de referencia 1:1 MT:WT, para estudiar la mutación *JAK2*^{V617F} a nivel genómico (ADNg) y transcripcional (ADNc), el análisis de pacientes se realizó para demostrar la aplicación y *performance* de esta estrategia en casos clínicos reales. Se observó una tendencia similar a la reportada en la literatura respecto a los valores de carga alélica del clon mutado en cada una de las entidades estudiadas, siendo mayor en MF y menor TE.

Los experimentos de comparación de niveles de carga alélica y de expresión de *JAK2*^{V617F} mostraron una correlación significativa (Spearman r=0,53, p=0,02), a pesar de la presencia de 4 casos que se alejan de la tendencia central (*outliers*). El grupo de *outliers* presentó niveles muy incrementados de transcriptos *JAK2*^{V617F} lo cual podría asociarse a una expresión aumentada o sobreexpresión de la mutación.

La cuantificación de la mutación *JAK2*^{V617F} es de gran interés en la evaluación de las neoplasias mieloproliferativas. Dicha medición es importante en el seguimiento de los pacientes que han recibido un trasplante de médula ósea o tratamiento con inhibidores de *JAK2*. La respuesta a esta terapia podría ser evaluada mediante la determinación de la carga del clon mutado aunque todavía es un tema en discusión.

El desarrollo de una metodología cuantitativa para determinar la carga alélica y expresión del alelo mutado *JAK2*^{V617F} en NMPs *BCR-ABL1* (-) clásicas, permite definir el tamaño del clon neoplásico y su nivel transcripcional lo cual podría tener importantes implicancias clínicas.

8. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se enumeran las siguientes conclusiones:

Capítulo I: Sindromes Mieloproliferativos *BCR-ABL1* positivos: Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

- La relación de la expresión de los genes *BAX/BCL-XL*, implicados en la regulación de la apoptosis celular, mostró diferencias significativas en las distintas etapas de la LMC. Fue menor al diagnóstico y en progresión de enfermedad y mayor en remisión, debido a variaciones en la expresión del gen antiapoptótico BCL-XL.

- Los niveles de expresión de los genes *CAMKIIγ, KI67, HSP70 y HSP90* se incrementaron significativamente en los pacientes con LMC al diagnóstico y en progresión de enfermedad respecto de los casos en remisión, indicando que la expresión desregulada de estos genes se asocia a resistencia.

El incremento de la expresión de los genes *CAMKIIγ y HSP70* y la disminución del gen *HSP90* en pacientes resistentes con mutaciones, permitió elaborar un score [*CAMKIIγ+HSP70-HSP90]* que discrimina con un 60% de sensibilidad y 80%de especificidad la presencia de mutaciones en el dominio quinasa de *BCR-ABL1*.

La especificidad y sensibilidad de la metodología ASO-PCR para la detección de mutaciones del dominio quinasa de *BCR-ABL1* fue estimada mediante el diseño de un constructo portador de 4 de las mutaciones mas frecuentes: G250E, E255K, T315I y M351T. Esta estrategia permitió determinar el límite de detección de cada una de ellas en 1,25%, 2,5%, 5%, 1.25% respectivamente, aumentado significativamente la detección respecto de la secuenciación directa (método de referencia).

Capítulo II: Neoplasias Mieloproliferativas [NMPs *BCR-ABL1* (-)]: Desarrollo de nuevos abordajes de cuantificación de la mutación *JAK2*^{V617F}

- Se desarrolló un nuevo abordaje para evaluar la carga alélica y expresión de la mutación JAK2^{V617F} en muestras de pacientes con NMPs *BCR-ABL1 (-).* Se diseñaron constructos de referencia con relación 1:1 en número de copias del alelo normal (WT) y mutado (MT), lo que permitió analizar la homo o heterocigocidad de la mutación a nivel genómico y transcripcional con mayor precisión y sin sesgo.

- La técnica QPCR utilizando constructos de referencia MT: WT 1:1 demostró ser un método de alta sensibilidad y especificidad. Los estudios de validación comparando los resultados de QPCR con los obtenidos por ARMS-PCR sobre las mismas muestras demostraron que la estrategia QPCR presentaba una buena correlación y con potencialidad de discriminar falsos negativos.

-La evaluación de la carga alélica del clon mutado en cada una de las NMPs *BCR-ABL1 (-)* estudiadas indicó un incremento de la carga alélica en MP y PV respecto de TE, coincidente con lo reportado en la literatura.

-Los niveles de carga alélica y expresión de la mutación *JAK2*^{V617F} mostraron una correlación estadísticamente positiva en el 80% (16/20) de los casos estudiados. El 20% (4/20) restante presentó niveles muy incrementados de transcriptos *JAK2*^{V617F} indicando sobreexpresión de la mutación, lo cual se asoció con características clínicas (esplenomegalia, mayor recuento de blancos y aumento de la fibrosis).

9. *Bibliografía*

Bibliografía

-Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus- induced thymic-independent disease in mice. Cancer Res 1970; 30:2213-2222.

-Adrian FJ, Ding Q, Sim T, *et al*. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. Nat Chem Biol 2006; 2:95–102.

-Amarante-Mendes G, Kim C, Liu L, *et al*. Bcr-Abl exerts its anti-apoptotic effect against diverse stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome c and activation of caspase-3. Blood 1998; 91:1700-1705.

-Amarante-Mendez G, McGahon A, Nishioka W, *et al*. BCL-2 independent BCR-ABL mediated resistance to apoptosis protection is correlated with up regulation of BCL-XL, Oncogene 1998; (16) 1383–1390.

-Anafi M, Gazit A, Gilon C, *et al*. Selective interactions of transforming and normal abl proteins with ATP, tyrosine-copolymer substrates, and tyrphostins. J Biol Chem 1992, 267(7):4518-23.

-Baccarani M, Saglio G, Goldman J, *et al*. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood 2006, 108 (6): 1809-1818.

-Barosi G,Bergamaschi G, Marchetti M *et al*. JAK2V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. Blood 2007; 110: 4030- 6.

-Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, *et al*. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature 1983; 306: 277-280.

-Baxter E, Scott L, Campbell P, *et al*. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005; 365: 1054 – 1061.

-Bench AJ, Nacheva EP, Hood TL, *et al*. Chromosome 20 deletions in myeloid malignancies: reduction of the common deleted region, generation of a PAC/BAC contig and identification of candidates genes. Oncogene 2000; 19: 3902-13.

-Bench AJ, Pahl HL. Chromosomal abnormalities and molecular markers in myeloproliferative disorders. Semin Hematol. 2005; (4):196-205.

-Benito A, Silva M, Grillot D, *et al*. Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by Bcl-XL. Blood 1996; 87 3837–3843.

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

-Blagosklonny MV, Fojo T, Bhalla KN, *et al*. The Hsp90 inhibitor Geldanamycin selectivity sensitizes BCR-ABL-expressing leukemia cells to cytotoxic chemotherapy. Leukemia 2002; 15, 1537-1543.

-Boschelli DH, Wu B, Barrios Sosa AC, *et al*. Inhibition of Src kinase activity by 7-[(2,4-dichloro-5-methoxyphenyl)amino]-2-heteroaryl-thieno[3,2-b]pyridine-6-carbonitriles. Bioorg Med Chem Lett 2005; 15(21):4681-4.

-Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. Br J Haematol 1999; 107: 587–599.

-Branford S, Rudzki Z,Walsh S, *et al*. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. Blood 2002; 99:3472–3475.

-Branford S, Rudzki Z, Walsh S, *et al*. Detection of *BCR-ABL1* mutations in patients with CML treated with Imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with poor prognosis. Blood 2003; 102 (1): 276-83.

-Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, *et al*. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. Blood 2004; 104:2926-2932.

-Branford S, Cross N, Hochhaus A, *et al*. Rationale for the recomendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. Leukemia 2006; 20, 1925-1930.

-Branford S, Fletcher L, Cross NC, Müller MC, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. Blood 2008; 112(8):3330-8.

-Bresciani F, Paoluzi R, Benassi R, *et al*. Cell kinetics and growth of squamous cell carcinomas in man. Cancer Res 1974; 34 2405–2415.

-Brumatti G, Weinlich R, Chehab C, *et al*. Comparison of the anti-apoptotic effects of BCR-ABL, BCL2 and BCL-XL following diverse apoptogenic stimuli. FEBS Let 2003; 57-63.

-Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A. Signalling pathways: jack of all cascades. Curr Biol 1996; 6: 16-19.

-Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, *et al*. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. Nat Rev Drug Discov 2002; 1:493–502.

-Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, *et al.* JAK2V617F allele burden and trombosis: A direct comparson in essential thrombocythemia and polycythemia vera. Exp Hematol 2009; 37: 1016-1021.

-Chalandon Y, Jiang X, Christ O, *et al*. BCR-ABL-transduced human cord blood cells produce abnormal populations in immunodeficient mice.Leukemia 2005; 19:442-8.

-Chen M, Cheng A, Chen YQ, *et al*. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:6910-6915.

-Chen G, Prchal J. Polycythemia vera and its molecular basis: An update. Best Practice & Research Clinical Haematology 2006; 19: 387-397.

-Clift RA, Buckner CD, Thomas ED, *et al*. Marrow transplantation for patients in accelerated phase of chronic myeloid leukemia. Blood 1994; 84(12):4368-73.

-Cocault L, Bouscary D, Le Bousse Kerdiles C, *et al*. Ectopic expression of murine TPO receptor (c-mpl) in mice is pathogenic and induces erythroblastic proliferation. Blood 1996, 88: 1656-1665.

-Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, *et al.* Ligand-independient oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. Proc Natl Acad USA 2001; 98: 4379-4384.

Cortes J, Kantarjian H, O'Brien S, *et al.* Result of interferon-alpha therapy in patients with chronic myelogenous leukemia 60 years of age and older. Am J Med 1996; 100(4):452-5.

-Cortes JE, Talpaz M, Giles F, *et al.* Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. Blood 2003; 101:3794–3800.

-Cotto JJ, Kline M, Morimoto RI. Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. J Biol Chem. 1996; 271:3355-3358.

-Creagh EM, Sheehan D, Cotter TG. Heat shock proteins-modulators of apoptosis in tumor cells. Leukemia 2000; 14: 1161-1173.

-Cross NC, White HE, Müller MC, *et al*. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. Leukemia 2012; Oct; 26(10): 2172-5.

-Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, *et al*. hOCT 1 and resistance to imatinib. Blood 2005; 106:1133-1134; author reply 1134.

-Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science 1990; 247:824-30.

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

-Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96:3343–3356.

- Deininger and Melo. Hematol Oncol Clin North Am 2004; 18(3):545–568.

- Deininger MW, Cortes J, Paquette R, *et al.* The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetics abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. Cancer 2005; 110: 1509-1519.

-del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, *et al.* Interleukin-3-induced phosphorylation of bad through the protein kinase akt. Science. 1998; 278:687-689.

-Del Poeta G, Venditi A, Del Principe M,*et al.* Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). Blood 2003; (101) 2115-2131.

-Diekmann D, Brill S, Garrett MD, *et al*. BCR encodes a GTPase-activating protein for p21rac. Nature 1991; 351:400-402.

-Diekmann D, Nobes CD, Burbelo PD, *et al*. Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites. EMBO J 1995; 14:5297-5305.

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

-Drachman JG, Millet KM, Kaushansky K. Throbopoietin signals transduction requires functional JAK2, not TYK2. J Biol Chem 1999; 274: 13480-13484.

-Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, *et al*. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2006; 355(23):2408-17.

-Epstein E, Goedel A. Hemorrhagic thrombocythemia with a cascular, sclerotic spleen. Virchows Arch 1934; 293:233-248.

-Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, *et al*. The biology of chronic myeloid leucemias. N. Engl J. Med 1999; 341 164-172.

-Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H. c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. EMBO J 1994; 13:2341-2351.

-Filippi MD, Porteu F, Le Pesteur F, *et al*. Requirement for mitogen-activated protein kinase activation in the response of embryonic stem cell-derived hematopoietic cells to thrombopoietin *in vitro*. Blood 2002; 99: 1174-1182.

-Fioretos T, Strombeck B, Sandberg T, *et al.* Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. Blood 1999; 94:225–232.

- Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. Trends Pharmacol Sci 2004; 25:423–429.

-Gabai VL, Sherman MY. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. J Appl Physiol. 2002; 92(4):1743-8.

-Gangat N, Strand J, Li CY, *et al*. Leucocytosis in polycythaemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. Br J Haematol 2007; 138: 354-358.

-Gargallo P, Cuello M, Negri Aranguren P, *et al*. Amplification of the BCR/ABL fusion gene clustered on a masked PH chromosome in a patient with myelocitic blast crisis of chronic myelocytic leukemia. Cancer Genetics and Cytogenetics 2003; 143 140-144.

-Gerdes, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *SEM, Cancer Biol* 1990; 1:99-206.

-Gerdes J, U. Schwab H, Lemke, *et al*. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer 1983;* 31:13-20.

-Gerdes J, Lemke H, Baisch H, *et al*. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody *Ki-67. J lmmunol 1984;* 133:1710- 1715.

-Gobert S, Chretien S, Gouilleux F, *et al*. Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation. EMBO J 1996; 15: 2434-2441.

-Golas JM, Arndt K, Etienne C, *et al.* SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. Cancer Res 2003; 63:375–381.

-Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001; 344:1084-86.

-Gonzalez MS, De Brasi CD, Bianchini M, *et al.* BAX/BCL-XL gene expression ratio inversely correlates with disease progression in chronic myeloid leukemia. Blood Cells Mol Dis. 2010; 45(3):192-6.

-Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, *et al*. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 2001; 293:876–880.

-Gorre ME, Ellwood-Yen K, Chiosis C *et al*. BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate- resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. Blood 2002; 100:3041-4.

-Goss VL, Lee KA, Moritz A, *et al*. A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. Blood 2006; 107(12):4888-97.

-Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, *et al*. The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. J Biol Chem 1997; 272(38):23843-50.

-Griffith J, Black J, Faerman C, *et al*. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. Mol Cell 2004; 13:169-78.

- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, *et al*. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell 1984; 36:93-99.

-Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, *et al*. Anaemia characterizes patients with myelofibrosis harbouring MPLW515L/K mutation. Br J Haematol 2007; 137: 244-247.

-Guilhot F. Sustained durability of responses plus high rates of cytogenetic responses result in long-term Benedit for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia (CML-CP) treated with imatinib (IM) therapy: update from the IRIS Study. Annual Meeting of the American Society of Hematology 2004; San Diego, CA.

-Guo *et al*. Is Hsp70 another target for Ph+ leukemias?. Blood 2005; 105.

-Gutierrez-Castellanos S, Cruz M, Rabelo L, *et al*. Differences in BCL-XL expression and STAT5 phosphorylation in chronic myeloid leukemia patients. Eur. J. Haematol 2004; 231-238.

-Harrison C, Vannucchi AM. Ruxolitinib: a potent and selective Janus kinase 1 and 2 inhibitor in patients with myelofibrosis. An update for clinicians. Ther Adv Hematol. 2012; 3(6):341-54.

-Harrison CN, Mesa RA, Kiladjian JJ, et al. Health-related quality of life and symptoms in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib versus best available therapy. Br J Haematol 2013; 162(2):229-39.

-Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 2002; 295(5561):1852-8.

-Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. J Natl Cancer Inst 1998, 90(11):850-8.

-Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. Nature 1985; 315(6022):758-61.

-Hitoshi Y, Lin N, Payan D, Markovtsov V. The current status and the future of JAK2 inhibitors for the treatment of myeloproliferative diseases. Int J Hematol 2010; 91:189-200.

-Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, *et al*. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia 2002; 16(11):2190-6.

-Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. SeminHematol 2003; 40:69–79.

-Hochhaus A, Druker B, Sawyers C, *et al*. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. Blood 2008; 111(3):1039-43.

-Hockenbery DM. bcl-2, a novel regulator of cell death. Bioessays 1995; 17(7):631-8.

-Horita M, Andreu EJ, Benito A, *et al*. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis ofchronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. J Exp Med 2000; 191:977-984.

-Hou Y-Y, Cao W-W, Li L, *et al*. Tang, H. MicroRNA-519d targets MKi67 and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. Cancer Lett 2011; 307: 182-190.

-Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia. Semin Hematol. 2003; 40(2 Suppl 2):62-8.

-Hughes TP, Branford S, Reynolds J, *et al.* Maintenance of imatinib dose intensity in the first six months of therapy for newly diagnosed patients with CML is predictive of molecular response, independent of the ability to increase dose at a later point. ASH Annual Meeting Abstracts 2005; 106:164a.

-Hughes TP, Deininger MW, Hochhaus A, *et al.* Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors—review and recommendations for “harmonizing” current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood, 2006; 108:28-37.

-Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. Blood 2006; 20:29.

-Jakob U, Buchner J. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. Trends Biochem Sci 1994; 19(5):205-11.

-James C, Ugo V, Le Couedic J, *et al*. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434: 1144-1148, 2005.

-Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, *et al*. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Engl J Med 2004; 351: 657-667.

-Jennings BA, Mills KI. c-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia. Leuk Res 1998; 22:899–903.

-Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic mieloide leucemia. Acta Haematol 2002; 107:76-94.

-Jorgensen HG, Elliott MA, Allan EK, *et al.* Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. Blood 2002; 99:713–715.

-Jutong Si, Steven J. Collins. Activated Ca^{2+}/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Iiγ is a critical regulator of Myeloid Leukemia cell proliferation. Cancer Res 2008; 68: (10) 3733-3742.

-Kaeda J, O'Shea D, Szydlo RM*, et al*. Serial measurement of BCR-ABL transcripts in the peripheral blood after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia: an attempt to define patients who may not require further therapy. Blood 2006; 107: 4171–4176.

-Kantarjian HM, Talpaz M. Therapy of chronic myelogenous leukemia. Stem Cells 1993; Suppl 3:8-9.

-Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, *et al*. Treatment of philadelphia chromosome-positive, accelerated-phase chronic myelogenous leukemia with imatinib mesylate. Clin Cancer Res. 2002; 8(7):2177-87.

-Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, *et al*. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCRABL during therapy with imatinib mesylate (STI571; gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. Clin Cancer Res 2003; 9: 160–166.

-Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. Blood 2004, 103(8):2873-8.

-Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, *et al.* Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. N Engl J Med 2006; 354:2542–2551.

-Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, *et al*. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. Blood 2011; 117(4):1141-5.

-Kernan NA, Bartsch G, Ash RC, *et al*. Analysis of 462 transplantations from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N Engl J Med*. 1993; 328:593-602.

-Kimura S, Naito H, Segawa H, *et al.* NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. Blood 2005; 106:3948–3954.

-Kirito K, Nakajima K, Watanabe T, *et al*. Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. Blood 2002; 99:102-110.

-Kralovics R, Passamonti F, Buser A, *et al*. A gain of function mutation of Jak2 in myeloproliferative disorders. N. Engl J Med 2005; 352: 1779 – 1790.

-Krause D S., and Richard A. Van Etten. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. N Engl J Med 2005; 353:172-87.

-Lahaye T, Riehm B, Berger U, *et al*. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up. Cancer 2005; 15; 103(8):1659-69.

-Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. Semin Immunol. 1995; 7:255-266.

-Lange T, Gunther C, Kohler T*, et al.* High levels of BAX, low levels of MRP-1, and high platelets are independent predictors of response to imatinib in myeloid blast crisis of CML. Blood 2003; 101:2152–2155.

-le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, *et al*. Induction ofresistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. Blood 2000; 95:1758–1766.

-le Coutre P, Kreuzer KA, Na IK, *et al*. Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Phþ chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571. Blood Cells Mol Dis 2002; 28:75–85.

-Lesser ML, Dewald GW, Sison CP, Silver RT. Correlation of three methods of measuring cytogenetic response in chronic myelocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 2002; 137(2):79-84.

-Levine R, Wadleigh M, Cools J, *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essencial thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofobrosis. Cancer Cell 2005; 7: 387 – 397.

-Lewis JM, Baskaran R, Taagepera S, *et al*. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93:15174-15179.

-Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. J Biol Chem. 1998; 273:14225-14230.

- Llaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. J Biol Chem. 1996; 271:31704-31710.

-Locker A, Birrell K, Bell JA, *et al*. Ki-67 immunoreactivity in breast carcinoma: relationships to prognostic variables and short term survival. *Fur. J. Surgical Oncology* 1992; 18:224-229.

-Lu X, Levine R, Tong W, *et al.* Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2 V617F- mediated transformation. Proc Natl Sci USA 2005; 102: 18962-18967.

-Ma G, Lu D, Wu Y, *et al.* BCR phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. Oncogene 1997; 14:2367-2372.

-Mahon F.-X, Belloc F, Cholet C, *et al*. Detection of resistance to STI571 in patients with BCR-ABL positive acute leukemia and chronic myeloid leukemia blast crisis (abstract). Blood 2000; 96:471a.

-Mahon FX, DeiningerMW, Schultheis B, *et al*. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. Blood 2000; 96:1070–1079.

-Marais R, Light Y, Paterson HF, *et al*. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. EMBO J. 1995; 14:3136-3145.

-Marktel S, Marin D, Foot N, *et al.* Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional cytogenetic abnormalities predicts disease progression. Haematologica 2003; 88:260–267.

-McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. EMBO J. 1993; 12:1533-1546.

-Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood 1996; 88:2375-2384.

-Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. Hematol Oncol Clin North Am. 2004; 18(3):545-68, vii-viii.

-Mestan J, Weisberg E, Cowan-Jacob SW, *et al*. AMN107: In vitro profile of a new inhibitor of the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl. Blood 2004; 104:546a.

-Michor F, Hughes TP, Iwasa Y, *et al*. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. Nature 2005; 435:1267-1270.

-Mitelman F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 11 Suppl 1993; 1:11–15.

-Moloney WC. Radiogenic leukemia revisited. Blood 1987; 70(4):905-8.

-Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev. 1998; 12:3788- 3796.

-Nimmanapalli R, O´Bryan E and Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-AAG lowers BCR-ABL levels and induces apoptosis and differentiation of BCR- ABL-positive human leukemic blasts. Cancer Res, 2001; 61, 1799-1804.

-Nimmanapalli R, Bhalla K. Novel targeted therapies for Bcr-Abl positive acute leukemias: beyond STI571. Oncogene 2002; 21(56):8584-90.

-Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132: 1497.

-O'Brien S, Giles F, Talpaz M, *et al.* Results of triple therapy with interferon-alpha, cytarabine, and homoharringtonine, and the impact of adding imatinib to the treatment sequence in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in early chronic phase. Cancer 2003; 98(5):888-93.

-O'Hare T, Pollock R, Stoffregen EP, *et al*. Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: Implications for CML. Blood 2004; 104:2532–2539.

-Osler W. Chronic cyanosis with polycythaemis and enlarged spleen: a new entity. Am J Med Sci. 1903; 126:187-192.

-Pane F, Frigeri F, Sindona M, *et al*. Neutrophilicchronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). Blood 1996; 88:2410-2414.

-Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, *et al.* MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood 2006; 108: 3472-3476.

-Passamonti F, Rumi E. Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. Haematologica 2009; 94: 7-10.

-Pearl LH, Prodromou C, Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. Biochem J 2008; 410: 439-53.

-Pelicci G, Lanfrancone L, Salcini AE, *et al*. Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. Oncogene 1995; 11:899-907.

-Peng C, Brain J, Hu Y, Goodrich A, *et al.* Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T315I- Induced leukemia and suppresses leukemic stem cells. Blood 2007.

-Percy MJ, Scott LM, Erber WN, *et al*. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erytrhocytosis patients with low serum erythropoietin levels. Haematologica 2007; 92: 1697-1614.

-Pietra D, Li S, Brisci A, *et al*. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. Blood 2008; 111: 1686-1689.

-Pikman Y, Lee BH, Mercher T, *et al*. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 2006; 3: e270.

-Pocaly M, *et al.* Proteomics 2008, 8, 2394-2406

-Powers MV, Workman P. Targenting of multiple signaling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. Endocr Relat Cancer 2006; 13 Suppl 1:S125.35.

-Prodromou C, Pearl LH. Structure and functional relationships of Hsp90. Curr Cancer Drug Targets 2003, (5):301-23.

-Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. Nature2002; 6; 417(6889) 618-24.

-Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors. Nat Rev Drug Discov 2007; 6:834-848.

-Quintas-Cardama A, Vaddi K, Liu P, *et al.* Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitors INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. Blood 2010; 115:3109-17.

-Radujkovic A, Schad M, Topaly J, *et al.* Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL. Inhibition of P-glicoprotein function by 17-AAG. Leukemia 2005; 19:1198-206.

-Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM, *et al*. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:11746-11750.

-Ravandi F, Kantarjian H, Tapaz M, *et al.* Expression of apoptosis proteins in chronic myelogenous leukemia: associations and significance. Cancer 2001; 91 1964-1972.

-Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, *et al*. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. J Clin Oncol 2009, 27(3):469-71.

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

-Saglio G, Baccarani M. First-line therapy for chronic myeloid leukemia: new horizons and an update. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2010, 10(3):169-76.

-Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of JAK2 and JAK3 tyrosine kinase and for cytokine-inducible activation of signal transduction. J Biol Chem 2002; 277:47954- 47963.

-Salgia R, Pisick E, Sattler M, *et al.* p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. J Biol Chem. 1996; 271: 25198-25203.

-Salomoni P, Calabretta B. Targeted therapies and autophagy: New insights from chronic myeloid leukemia. Autophagy 2009, (7):1050-1. Epub 2009 Oct 14.

-Sattler M, Salgia R, Okuda K, *et al*. The protooncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. Oncogene 1996; 12:839-846.

-Sattler M, Salgia R, Shrikhande G, *et al.* Differential signaling after b1 integrin ligation is mediated through binding of CRKL to p120(CBL) and p110(HEF1). J Biol Chem 1997; 272:14320-14326.

-Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, *et al*. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. Cell 1994; 77:121-131.

-Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 1999; 340(17):1330-40.

-Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, *et al*. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. Blood 2002; 99(10):3530-9.

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

-Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2000; 13:211-25.

-Schoch C, Schnittger S, Bursch S, *et al*. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. Leukemia 2002; 16:53-59.

-Schutte J, Opalka B, Becher R, *et al*. Analysis of the p53 gene in patients with isochromosome 17q and Ph1-positive or -negative myeloid leukemia. Leuk Res 1993; 17:533–539.

-Shah NP, Tran C, Lee FY, *et al*. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. Science 2004; 305:399–401.

-Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, *et al*. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell 2002; 2:117–125.

-Shah NP, Tran C, Lee FY, *et al*. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. Science 2004; 305:399–401.

-Shimoda K, Feng J, Murakami H, *et al*. JAK1 plays an essential role for receptor phosphorylation and Stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor. Blood 1997; 90:597-604.

-Silva M, Richard C, Benito A, *et al.* Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. N Engl J Med 1998; 338: 564-571.

-Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, *et al*. Large deletions at the t(9:22) breakpoint are common and may identify a poor prognosis subgroup of patients with chronic mieloide leucemia. Blood 2000; 95: 738-743.

-Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska, *et al*. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. Blood. 1995; 86:726-736.

-Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. Oncogene, 2002 Dec 9;21(56):8591-604. Review.

-Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA. Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. Mol Cell. 2003; 12(1):27-37.

-Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, *et al.* Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a -/- 5b -/- mice: a direct role for Stat5 in BCLX(L) induction. Cell 1999, 98: 181-191.

-Sokal JE. Prognosis in chronic myeloid leukaemia: biology of the disease vs. treatment. Baillieres Clin Haematol. 1987; (4):907-29.

-Sorel N, *et al*. Evidence of ABL-kinase domain mutations in highly purified primitive stem cell populations of patients with chronic myelogenous leukemia. Biochem Biophys ResCommun 2004; 22, 323(3):728-30.

-Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, *et al*. Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. Drug Resist Updat 2003; 6:71–84.

-Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P, *et al*. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. FEBS Lett. 2004, 562(1-3):11-5. Review.

-Strife A, Clarkson B. Biology of chronic myelogenous leukemia: is discordant maturation the primary defect? Semin Hematol. 1988; 25(1):1-19. Review.

-Sureda A, Carrasco M, de Miguel M, *et al.* Imatinib mesylate as treatment for blastic transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia. Haematologica 2003, (11):1213-20.

-Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, *et al*. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. Blood 2002, 99(6):1928-37.

-Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, *et al*. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med 2006; 354:2531–2541.

-Tefferi A, Vardiman J. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasma: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia 2008; 22: 14-22.

-Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. Blood 2004; 104:3739-3745.

-Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, *et al*. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild type JAK2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood 2008; 111 3931-3940.

-Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, *et al*. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinibresistant ABL mutants. Cancer Res 2006; 66:5790–5797.

-Tortolani PJ, Johnston JA, Bacon CM, *et al*. Thrombophoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of the Janus kinase, JAK2. Blood 1995; 85: 3444-3451.

-Touw IP, van de Geijn GJ. Granulocyte colony- stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front Biosci* 2007; 12: 800-815.

-Uemura N, Griffin JD. The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. J Biol Chem 1999; 274: 37525-37532.

-Urbano-Ispizua A, Cervantes F, Matutes E, *et al*. Immunophenotypic characteristics of blast crisis of chronic myeloid leukaemia: correlations with clinico-biological features and survival. Leukemia 1993; 7(9):1349-54.

-Van Etten RA. c-Abl regulation: a tail of two lipids. Curr Biol 2003; 13:R608-R610.

-Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C, et al. A quantitative assay for JAK2 (V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. Leukemia 2006; 20(6):1055-60.

-Vannucchi A, Antonioli E, Guglielmelli, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 V617F allele burden. Leukemia 2007; 21: 1952 – 1959.

-Vannucchi A, Antonioli E, Guglielmelli P, *et al.* Clinical correlates of Jak2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. Leukemia 2008; 22: 1299 – 1307.

-Vaquez H. On a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocytosis. Com Rend Soc Biol 1892; 12:384-388.

-Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, *et al*. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2009; 114(5):937-51.

-Verstovsek S, Kantarjian H, Pardanani A, *et al*. INCB018424, an oral, selective JAK2 inhibitor, shows significant clinical activity in a phase I/II study in patients with primary myelofibrosis

(PMF) and post polycythemia vera/ essential thrombocythemia myelofibrosis (post-PV/ET-MF) [abstrat]. Blood 2007; 110: 558.

-Verstovsek S. Therapeutic potential of JAK2 inhibitors. Hematology Am Soc Hematol. Educ Program 2009; 636-42.

-Verstovsek, S., Kantarjian, H., Mesa, R.A., Pardanani, A.D., Cortes-Franco, J., Thomas, D.A. et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. N Engl J Med 2010; 363: 1117-1127.

-Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, *et al.* Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:1124–1129.

-Volloch V, Rits S. A natural extracellular factor that induces Hsp72, inhibits apoptosis, and restores stress resistance in aged human cells. Exp Cell Res. 1999, 253(2):483-92.

-Von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. Lancet 2002; 359:487–491.

-Von Bubnoff N, Veach DR, Van der Kuip H, *et al*. A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor. Blood 2005; 105:1652–1659.

-Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. Blood 2000; 95:3498–3505.

-Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. Cancer Cell 2005; 7:129–141.

-Wendel HG, de Stanchina E, Cepero E, *et al.* Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:7444–7449.

-Westwood NB, Gruszka-Westwood AM, Pearson CE *et al*. The incidences of trisomy 8, trisomy 9 and D20S108 deletion in polycythaemia vera: an analysis of blood granulocytes using interphase fluorescence in situ hybridization. Br J Haematol 2000, 110:839-46.

-Wetzler M, Talpaz M, Yee G, *et al.* Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(8):3488-92.

-White D, Saunders V, Lyons AB, *et al*. In vitro sensitivity to imatinib-induced inhibition of ABL kinase activity is predictive of molecular response in patients with de novo CML. Blood 2005; 106:2520-2526.

-White DL, Saunders VA, Branford S, *et al*. The in-vivo level of imatinib induced kinase inhibition achieved in de-novo CML patients during the first 28 days of therapy is a powerful predictor of molecular Outcome. ASH Annual Meeting Abstracts. 2005; 106:436a.

-White DL, Saunders VA, Dang P, *et al.* OCT-1 mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107); reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. Blood 2006; 2005-2011- 4687.

-Wickner S, Maurizi MR. Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. -Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(15):8318-20.

-Willis SG, Lange T, Demehri S *et al*. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not reswponse to therapy. Blood 2005; 106:2128-37.

-Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, *et al.* JAK2 associates with the eritropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. Cell 1993; 74: 227-236.

-Won G, An, Theodor W. Schulte, and Leonard M. Neckers. The Heat Shock Protein 90 Antagonist Geldanamycin Alters Chaperone Association with p210bcr-abl and v-src Proteins before Their Degradation by the Proteasome. Cell Growth & Differentiation 2000; *11: 355–360.*

-Young MA, Shah NP, Chao LH, *et al*. Structure of the kinase domain of an imatinibresistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680. Cancer Res 2006; 66:1007–1014.

-Zhao RC, Tarone G, Verfaillie CM. Presence of the adhesion inhibitory b1B integrin isoform on CML but not normal progenitors is at least in part responsible for the decreased CML progenitor adhesion. Blood 1997; 90:393ª.

-Zhao R, Xing S, Li Z, *et al.* Identification of a acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. J Biol Chem 2005; 280: 22788-22792.

-Zou J, Guo Y, Guettouche T*, et al*. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitivity.