

**Detección de mutaciones en el gen quimérico  
BCR-ABL1, como causa de resistencia al  
tratamiento con Imatinib; en pacientes con  
leucemia mieloide crónica**

## Índice

|                                                                          |                               |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>1. CARTA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN</b>                           | <b>1</b>                      |
| <b>2. PORTADA</b>                                                        | <b>2</b>                      |
| <b>3. CONTRAPORTADA (reverso de la portada)</b>                          | <b>3</b>                      |
| <b>4. CONTENIDO</b>                                                      | <b>4</b>                      |
| <b>5. INDICE DE ILUSTRACIONES</b>                                        | <b>5</b>                      |
| <b>6. RESUMEN</b>                                                        | <b>9</b>                      |
| <b>7. ABSTRACT</b>                                                       | <b>10</b>                     |
| <b>8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>                                     | <b>11</b>                     |
| <b>9. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>                                | <b>13</b>                     |
| <b>10. OBJETIVOS</b>                                                     | <b>18</b>                     |
| <b>11. HIPÓTESIS (si procede)</b>                                        | <b>18</b>                     |
| <b>12. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                          | <b>19</b>                     |
| <b>13. RESULTADOS</b>                                                    | <b>21</b>                     |
| <b>13.2 Matriz de Resultados</b>                                         | <b>29</b>                     |
| <b>14. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>                                       | <b>32</b>                     |
| <b>15. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN</b>             | <b>32</b>                     |
| <b>16. CONCLUSIONES</b>                                                  | <b>35</b>                     |
| <b>17. RECOMENDACIONES</b>                                               | <b>36</b>                     |
| <b>18. BIBLIOGRAFÍA</b>                                                  | <b>36</b>                     |
| <b>19. ORDEN DE PAGO (deberá estar contenida en una sola hoja)</b>       | <b>62</b>                     |
| <b>20. NOTAS IMPORTANTES</b>                                             | <b>7675</b>                   |
| <b>i. ARTÍCULO CIENTÍFICO</b>                                            | ¡Error! Marcador no definido. |
| <b>ii. FORMA DE ENTREGA Y FECHAS DE ENTREGA</b>                          | ¡Error! Marcador no definido. |
| <b>iii. INSTRUCCIONES PARA AUTORES DE CIENCIA, TECNOLOGÍA Y SALUD</b>    | ¡Error! Marcador no definido. |
| <b>iv. INSTRUCCIONES PARA AUTORES DE CIENCIAS SOCIALES Y HUMANIDADES</b> | ¡Error! Marcador no definido. |



## 1. CARTA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN

Guatemala, 15 de diciembre del 2014

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Director General de Investigación  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Estimado M.Sc. Arroyo

Por este medio le informo sobre el proyecto de investigación, con número de partida 4.8.63.1.69 denominado “Detección de mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL1, como causa de resistencia al tratamiento con Imanitib; en pacientes con leucemia mieloide crónica” y realizado por el equipo de investigación conformado por Dra. Claudia Carranza Coordinador del proyecto, Lic. Darwin Alvarez auxiliar de investigación llevado a cabo durante los meses de febrero a noviembre del año 2014.

El presente documento fue revisado por esta autoridad en donde se determinó que cumple con los objetivos planteados en el proyecto. Así mismo con las instrucciones de elaboración del informe final y artículo científico establecidos por DIGI. Por tanto se ordena el pago correspondiente para los investigadores. Atentamente

---

Dr. Roberto Flores  
Director  
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas IIQB, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

## 2. PORTADA



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación  
Interdisciplinaria en Salud (PUIIS)

INFORME FINAL

**DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN QUIMÉRICO BCR-  
ABL1, COMO CAUSA DE RESISTENCIA AL TRATAMIENTO  
CON IMANITIB; EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE  
CRÓNICA**

### **Equipo de investigación**

Dra. Claudia Carranza Meléndez  
Lic. Darwin Alvarez

Coordinador del proyecto  
Auxiliar de Investigación II

**15 de diciembre del 2014**

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud (PUIIS)

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas IIQB, Facultad de Ciencias  
Químicas y Farmacia, USAC.  
Instituto de Investigación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas  
-INVEGEM-

### 3. CONTRAPORTADA (reverso de la portada)

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Director General de Investigación

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Valencia de Abril  
Coordinadora del PUIIS

Dr. Roberto Flores Arzú  
Director, Instituto de Investigación de Ciencias Químicas y Biológicas

Dra. Claudia Carranza Meléndez  
Coordinador del proyecto.

Lic. Darwin Alvarez  
Auxiliar de Investigación II

Partida Presupuestaria  
4.8.63.1.69  
Año de ejecución: 2014

**4. CONTENIDO****CONTENIDO**

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| CONTENIDO GENERAL                                                   | 4  |
| CONTEIDO DE TABLAS Y FIGURAS                                        | 5  |
| TÍTULO DEL PROYECTO, RESUMEN Y ABSTRAC                              | 9  |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA                                          | 10 |
| OBJETIVOS                                                           | 18 |
| HIPÓTESIS                                                           | 18 |
| 1. MARCO TEÓRICO/ESTADO DEL ARTE                                    | 13 |
| 2. METODOLOGÍA                                                      | 19 |
| i. Ubicación Geográfica                                             |    |
| ii. Descripción del método, técnicas, procedimientos e instrumentos |    |
| iii. Metodología de análisis de información                         |    |
| 3. RESULTADOS                                                       | 21 |
| 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS                                          | 32 |
| 5. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN                | 35 |
| 6. CONCLUSIONES                                                     | 36 |
| 7. RECOMENDACIONES                                                  | 36 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA                                                     | 38 |
| 9. ANEXOS                                                           | 41 |

## 5. INDICE DE ILUSTRACIONES

### INDICE DE ILUSTRACIONES

| <b>INDICE DE FIGURAS</b>                                                                                             | <b>PAG.</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| • Figura No. 1: monitoreos moleculares de bcr-abl1 .....                                                             | 23          |
| • Figura No.2: alineamiento de proteína del paciente .....<br>con mutación G250E                                     | 24          |
| • Figura No. 3: monitoreo molecular de BCR-ABL1<br>del paciente LMC-160.....                                         | 25          |
| • Figura No. 4: alineamiento de proteína de la mutación<br>T315I en paciente LMC-160.....                            | 26          |
| • Figura No. 5: monitoreos moleculares del<br>Paciente MUT- 160.....                                                 | 27          |
| • Figura No. 6: presencia de mutación E453K en el<br>Paciente MUT-49.....                                            | 28          |
| • Figura no. 7: presencia de la mutación g250e en el<br>paciente mut-49.....                                         | 28          |
| • figura no. 8: mutaciones en el dominio kinasa del gen abl ..                                                       | 32          |
| • figura no. 9: esquema de la t(9;22) y la localización<br>de los genes abl y bcr.....                               | 41          |
| • Figura No. 10: se observa la realización de la lisis de amonios                                                    | 43          |
| • Figura No. 11: en la figura se observa procedimiento<br>de Extracción de ADN de leucocitos.....                    | 44          |
| • Figura No. 12: se muestra una electroforesis en gel<br>de agarosa para visualizar la amplificación del gen BCR-ABL | 45          |
| • Figura No. 13: se muestra la purificación de productos<br>de PCR para su respectiva secuenciación.....             | 46          |
| • Figura No.14: Validación y estandarización de técnicas,<br>amplificando las tres primeras muestras.....            | 49          |
| • <i>Figura No. 15: se observa la amplificación de las<br/>muestras No. LMC-149 y LMC-130.....</i>                   | 49          |
| • Figura No. 16: se observa la amplificación de las<br>muestras No. LMC-191 y LMC-196.....                           | 50          |
| • Figura No. 17: se observa la amplificación de las<br>muestras No.LMC- 20 y LMC-70.....                             | 50          |
| • Figura No. 18: se observa la amplificación de las<br>muestras No. LMC- 20 y LMC-70.....                            | 51          |
| • Figura No. 17: se observa la amplificación de las<br>muestras No.LMC- 20 y LMC-70.....                             | 51          |
| • Figura No. 20: se observa la amplificación de las<br>muestras No. LMC-160 y LMC-215.....                           | 52          |
| • Figura No. 21: se observa la amplificación de las<br>muestras No. 128 y 159.....                                   | 52          |

|                                                                                                 | PAG. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| • Figura No. 22: se observa la amplificación de las muestras No. 113 y 173.....                 | 53   |
| • Figura No. 23: se observa la amplificación de las muestras No. 117 y 92.....                  | 53   |
| • Figura No. 24: Se observa el cromatograma de la muestra No. 81 con usencia de mutaciones..... | 54   |
| • Figura No.25: Se observa el cromatograma de la muestra No. 115.....                           | 54   |
| • Figura No. 26: Se observa el cromatograma de la muestra No. 120.....                          | 55   |
| • Figura No. 27: Se observa el cromatograma de la muestra No. 122.....                          | 55   |
| • Figura No. 28: Se observa el cromatograma de la muestra No. 122.....                          | 56   |
| • Figura No. 29: Se observa el cromatograma de la muestra No. 130.....                          | 56   |
| • Figura No. 30: Se observa el cromatograma de la muestra No. 130.....                          | 57   |
| • Figura No. 31: Se observa el cromatograma de la muestra No. 166.....                          | 57   |
| • Figura No. 32: Se observa el cromatograma de la muestra No. 191.....                          | 58   |
| • <i>Figura No. 33: Se observa el cromatograma de la muestra No. 196.....</i>                   | 58   |
| • Figura No. 34: Se observa el cromatograma de la muestra No. 215.....                          | 59   |
| • Figura No. 35: Se observa el cromatograma de la muestra No. 304.....                          | 59   |
| • Figura No. 36: Se observa el cromatograma de la muestra No. 255.....                          | 60   |
| • Figura No. 37: Se observa el cromatograma de la muestra No. 113.....                          | 60   |
| • Figura No. 38: Se observa el cromatograma de la muestra No. 20.....                           | 61   |
| • Figura No. 39: Se observa el cromatograma de la muestra No. 92.....                           | 61   |
| • Figura No. 40: Se observa el cromatograma de la muestra No. 128.....                          | 62   |
| • Figura No. 41: Se observa el cromatograma de la muestra No. 159.....                          | 62   |
| • Figura No. 42: Se observa el cromatograma de la muestra No. 173.....                          | 63   |
| • Figura No. 43: Se observa el cromatograma de la muestra No. 184.....                          | 63   |

|                                                                        | PAG. |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| • Figura No. 44: Se observa el cromatograma de la muestra No. 207..... | 64   |
| • Figura No. 45: Se observa el cromatograma de la muestra No. 20.....  | 64   |
| • Figura No. 46: Se observa el cromatograma de la muestra No. 160..... | 65   |
| • Figura No. 47: Se observa el cromatograma de la muestra No. 49.....  | 65   |
| • Figura No. 48: Se observa el cromatograma de la muestra No. 49.....  | 66   |
| • Figura No. 49: Se observa el cromatograma de la muestra No. 71.....  | 66   |
| • Figura No. 50: Se observa el cromatograma de la muestra No. 85.....  | 67   |
| • Figura No. 51: Se observa el cromatograma de la muestra No. 182..... | 67   |
| • Figura No. 52: Se observa el cromatograma de la muestra No. 117..... | 68   |
| • Figura No. 53: Se observa el cromatograma de la muestra No. 16.....  | 68   |
| • Figura No. 54: Se observa el cromatograma de la muestra No. 123..... | 69   |

| <b>INDICE DE TABLAS</b>                                                                                                                         | <b>PAG.</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Tabla no. 1: resumen de datos de los pacientes analizados .....                                                                                 | 22          |
| Tabla no. 2: valores hematológicos del paciente lmc-20.....                                                                                     | 23          |
| Tabla no. 3: valores hematológicos del paciente lmc-160.....                                                                                    | 25          |
| Tabla no. 4: valores hematológicos del paciente lmc-160.....                                                                                    | 27          |
| Tabla no. 4: mutaciones más frecuentes que causan<br>Resistencia a imatinib y otros inhibidores.....                                            | 33          |
| Tabla 5: evaluación de la respuesta al<br>Tratamiento imatinib.....                                                                             | 41          |
| Tabla no. 6: mutaciones frecuentes en bcr-abl.....                                                                                              | 42          |
| Tabla no. 7: respuesta al imatinib del total de<br>pacientes analizados .....                                                                   | 42          |
| Tabla no 8: respuesta al imatinib alcanzada durante el monitoreo<br>Molecular.....                                                              | 42          |
| Tabla 8. Cuantificación de copias de bcr-abl a 75 pacientes<br>Candidatos al estudio y selección de 30 casos<br>para estudio de mutaciones..... | 47          |

### Título completo del proyecto

**Detección de mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL1, como causa de resistencia al tratamiento con Imatinib, en pacientes con leucemia mieloide crónica.**

## 6. RESUMEN

El desarrollo de medicamentos a nivel molecular como el Imatinib marcan una nueva etapa en la era del tratamiento en cáncer. La leucemia mieloide crónica es un tipo de cáncer en la sangre, que se produce por una alteración genética única. El 90% de los pacientes tienen una alteración en el cromosoma 9 y 22, en la cual se produce una rotura en ambos, y se intercambia la información genética, esto da lugar al gen anormal llamado BCR-ABL1. Imatinib es un tratamiento específico para los pacientes que poseen el gen anormal BCR-ABL1.

Se ha reportado que la principal causa de resistencia a este medicamento es la presencia de mutaciones en el gen BCR-ABL1, en Guatemala se ha encontrado, en un estudio realizado previamente por nuestra institución que aproximadamente un 30% de pacientes no están respondiendo bien al tratamiento con Imatinib, y sin saber la causa. Con el fin de estudiar la causa de la mala respuesta, se pretendió detectar la presencia de mutaciones en el gen BCR-ABL1 en pacientes que no han alcanzado una respuesta óptima; esto sirvió como parámetro a evaluar por parte del médico para determinar el cambio a medicamentos de segunda línea como Nilotinib y Dasatinib.

Se analizaron un total de 75 pacientes, de los cuales se seleccionaron 30 pacientes que no habían alcanzado respuesta citogenética completa (arriba del 1%) como candidatos para evaluar mutaciones.

Se procedió a la extracción de sangre periférica de estos 30 pacientes, posteriormente se realizó una lisis de amonios, con el fin de obtener los leucocitos, lo cuales fueron almacenados a -20C; posteriormente se realizó extracción de ARN a partir de los leucocitos. Se amplificó el gen BCR-ABL1, se purificó y envió a secuenciar.

Del total de 30 pacientes analizados, se encontraron tres pacientes con mutaciones en el gen analizado. Y las mutaciones encontradas son G250E, E453K y la T315I.

La mutación T315I, es considerada la mutación más agresiva; ya que es resistente a todos los medicamentos disponibles en Guatemala. La mutación G250E se encuentra en el dominio P-loop, y también es considerada agresiva, aunque responde mejor al tratamiento con Dasatinib. Y por último la mutación E453K, es una mutación no agresiva, y que no produce resistencia fuerte a los medicamentos disponible. En General la frecuencia de mutaciones encontradas en el presente estudio, es bajo comparado con lo presentado en otros países, por lo que se sugiere estudiar la adherencia de los pacientes, y otros genes que causan resistencia como MDR1 y OCT1.

## 7. ABSTRACT

The arrivals of drugs at the molecular level as Imatinib mark a new stage in the era of cancer treatment. Chronic myeloid leukemia is a blood disease, which has a main molecular feature. 90% of patients have a disorder on chromosome 9 and 22, in which a failure occurs in both, and genetic information is exchanged, this results in abnormal gene called BCR-ABL1. Imatinib is a specific treatment for patients who have an abnormal gene BCR-ABL1.

It has been reported that the main cause of resistance to this drug is the presence of mutations in the BCR-ABL1 gene, Guatemala has been found in a previous study by our institution that approximately 30% of patients are not responding well to Imatinib treatment, without knowing the cause.

In order to study the cause of the poor response, is intended to detect the presence of mutations in the BCR-ABL1 gene in patients who have not achieved an optimal response; this served as a parameter to evaluate by the physician to determine the switch to second-line drugs Dasatinib and Nilotinib

A total of 75 patients were analyzed, and 30 patients who had not achieved complete cytogenetic response (above 1%) were selected as candidates to evaluate mutations.

We proceeded to the extraction of peripheral blood of these 30 patients subsequently ammonium lysis was performed in order to obtain leukocytes, which were stored at -20C; RNA extraction was then performed from white blood cells. BCR-ABL1 gene was amplified, purified and sent for sequencing

Of the total of 30 patients analyzed, three patients with mutations in the gene analyzed were found. And the mutations found are G250E, E453K and T315I.

The T315I mutation is considered the most aggressive mutation; because it is resistant to all drugs available in Guatemala. The G250E mutation is in the domain P-loop, and is also considered aggressive, though responds best to treatment with Dasatinib. And finally the E453K mutation, is a non-aggressive mutation, and does not produce strong resistance to medicines available.

The percentage of mutations is low compared with that presented in other countries, so it is suggested to study the adherence of patients, and other genes that cause resistance as MDR1 and OCT1.

## 8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 8.1 Descripción del problema

Imatinib es el primer medicamento de la era molecular, cuya diana es un gen quimérico llamado BCR-ABL1, y que se encuentra en un 90% en leucemia mieloide crónica (LMC). Un alto porcentaje de los pacientes con LMC, responden muy bien al tratamiento con Imatinib, y sin efectos secundarios severos como ocurre cuando esta enfermedad se trata solo con quimioterapia. Una respuesta óptima al tratamiento con Imatinib se define cuando el paciente alcanza una respuesta molecular mayor ( $< 0.1\%$  IS BCR-ABL1/ABL) en un período menor o igual a 18 meses. Si un paciente no logra alcanzar la respuesta molecular mayor en este período; se dice que hay un fallo de terapia; y este fallo de terapia se debe principalmente a presencia de mutaciones en el gen BCR-ABL1, que provocan una respuesta muy pobre al tratamiento con Imatinib. En Guatemala, no se han estudiado las causas de la resistencia al tratamiento con Imatinib, en los pacientes con leucemia mieloide crónica BCR-ABL1 positivo. La importancia de determinar cuáles son las mutaciones presentes en el gen quimérico, radicó en que existen tres medicamentos que son de segunda línea, y que son eficaces dependiendo de las mutaciones que presente el paciente; estos son el nilotinib, dasatinib y bosutinib. Además solo existe una mutación reportada, la T315I, que es resistente a todos los tratamientos moleculares que existen en el mercado, dejando el trasplante de médula ósea como única opción para los pacientes que tienen esta mutación.

### 8.2 Definición del problema (preguntas de investigación)

En Guatemala no se han estudiado con anterioridad las causas de la resistencia al tratamiento con Imatinib en pacientes con leucemia mieloide crónica BCR-ABL1 positivo. Y por esta razón la sugerencia de cambio a medicamentos de segunda línea, se hace sólo basado en datos clínicos, aunque la indicación sea determinar la presencia de mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL1. La detección de estas mutaciones confirmaría la resistencia al tratamiento con Imatinib, e indicarían el tratamiento a elegir, ya sea los medicamentos de segunda línea o el trasplante de médula ósea.

Con el presente proyecto se utilizaron los resultados de las mutaciones encontradas en el gen BCR-ABL1 como base para determinar resistencia al tratamiento con Imatinib, e indicar al hematólogo el cambio del tratamiento.

Además se estableció el tipo de mutaciones más frecuentes encontrados en los pacientes con LMC originarios de Guatemala.

### **8.3 Justificación (sustente con argumentos precisos y convincentes la realización de la investigación)**

El conocimiento de las mutaciones en el gen BCR-ABL1 en pacientes con leucemia mieloide crónica en la población guatemalteca, brindó información sobre las mutaciones más frecuentes que se encuentran en la población. Este dato es importante como parte de la caracterización genética de la leucemia mieloide crónica en nuestro país, ya que no se ha estudiado con anterioridad. Además será la primera vez en Guatemala, que la detección de mutaciones en un gen se utilizará como indicador del fallo a alguna terapia específica.

La aplicación práctica de este proyecto consistió en que el conocimiento de las mutaciones presentes en el gen BCR-ABL1, se utilizaron de indicación clínica para sugerir el cambio del tratamiento Imatinib a los medicamentos de segunda línea o a trasplante de médula ósea.

La estandarización de las técnicas de detección de mutaciones en este gen, brindó un aporte metodológico para el manejo de los pacientes con leucemia mieloide crónica; y esto permitió a los médicos acceder a una nueva herramienta molecular que oriente al médico sobre la decisión terapéutica a seleccionar. Esta técnica se prestara como un servicio posteriormente a todos los pacientes que se sospeche de fallo a terapia con Imatinib.

Con esta técnica, se obtuvo un nuevo conocimiento sobre qué tipo de mutaciones son las más frecuentes en la población guatemalteca y se comparó con la reportada en otros países.

## 9. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad en la que se produce un crecimiento desordenado de un clon celular, debido a una alteración en el proceso de crecimiento celular, en la diferenciación celular o en la apoptosis celular.

Es una enfermedad considerada de origen genético adquirido; esto quiere decir que su causa son las distintas alteraciones genéticas que se han desarrollado y adquirido con el transcurso del tiempo.

Las principales técnicas que actualmente se utilizan para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de las neoplasias son las técnicas citogenéticas y las moleculares.

Las técnicas de análisis citogenético permiten estudiar de manera global los 46 cromosomas, y detectar cualquier alteración presente. Las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa –PCR- y sus distintas variedades, se han desarrollado también ampliamente para el estudio de distintas neoplasias. Entre las ventajas de las técnicas moleculares sobre las citogenéticas es que poseen una mayor sensibilidad y especificidad.

En resumen para un estudio genético completo de una neoplasia hematológica se recomienda utilizar tanto las técnicas citogenéticas como las moleculares (1-8).

### NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

Las neoplasias hematológicas forman un grupo de enfermedades que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas. La leucemia constituye una colección heterogénea de neoplasias originadas en el tejido formador de sangre, que se caracteriza por la expansión clonal de células hematopoyéticas como resultado de una alteración en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular, en cualquiera de las etapas de maduración de las células sanguíneas, habitualmente acompañada de la invasión al torrente sanguíneo y producción de metástasis, con mayor o menor grado de desorganización de los tejidos invadidos (4-12).

Las leucemias se clasifican basándose en el tipo de células afectadas y en su estado de maduración. Las agudas se caracterizan por la presencia de células muy inmaduras (denominadas blastos) y por un curso rápidamente mortal. Las crónicas se caracterizan por una población expandida de células que proliferan y que conservan su capacidad para diferenciarse y madurar. Se distinguen dos variantes: linfocíticas y mielocíticas. Así pues de forma rudimentaria las leucemias se pueden clasificar en cuatro tipos: leucemia linfocítica aguda (linfoblástica) (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielocítica aguda (mieloblástica) (LMA) y leucemia mielocítica crónica (LMC) (4-12).

El diagnóstico se realiza, considerando, además de las manifestaciones clínicas, estudios de laboratorio que incluyen hemograma, frotis de sangre periférica, inmunofenotipo, biopsia y el frotis de médula ósea. En la actualidad la tinción con inmunohistoquímica de células malignas en sangre periférica, es uno de los métodos más específicos para clasificar las leucemias por lo cual se recomienda realizar este procedimiento en todo paciente con esta enfermedad, al igual que el seguimiento de un protocolo que combine la citomorfología y citoquímica con el inmunofenotipo, y siempre que sea posible acompañado por métodos citogenéticos y moleculares permitiendo con ello no solo un diagnóstico certero, sino que además proporcionar una amplia información sobre el pronóstico del paciente, así como del tratamiento a seguir (12).

### **Leucemia mieloide crónica (LMC)**

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo crónico de naturaleza clonal, con origen en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas. Representa entre el 15% y el 20% del total de leucemias y su incidencia en los países occidentales se ha estimado en 1,6 casos por cada 100.000 habitantes/año (12-18).

La LMC fue la primera enfermedad en la que se determinó una anomalía genética en el cariotipo, denominada cromosoma filadelfia, el cual se asoció en gran medida a la patogenia de dicha leucemia. El cromosoma filadelfia, es el resultado de la translocación entre los cromosomas 9 y 22, esta translocación genera la fusión de los genes *BCR-ABL1*; esta reordenación se encuentra en el 90% de los pacientes con LMC. Sin embargo a pesar de que el cromosoma filadelfia existe como única anomalía cromosómica a través de la fase crónica de la enfermedad y se mantiene también durante las fases avanzadas, entre el 50 y 80 % de los pacientes adquieren anomalías cromosómicas adicionales, desarrollando cariotipos complejos que incluyen trisomía 8, trisomía 19, isocromosoma 17 y copias adicionales distintos cromosomas (18-19).

#### **REORDENACION *BCR-ABL1***

La fusión génica *BCR-ABL1* resulta de la formación del cromosoma Filadelfia, en la que ocurre la translocación de la región q11 del cromosoma 22 (*BCR*) a la región q34 del cromosoma 9 (*ABL1*) ( Ver Anexo No.1, la Figura No.1) (19).

El gen *ABL1* localizado en el cromosoma 9q, es el homólogo humano del oncogen *v-abl* del virus de la leucemia murina y codifica para un receptor de tirosina cinasa. La proteína normal *ABL1* está involucrada en la regulación del ciclo celular, en la respuesta al estrés genotóxico y en la transmisión de información acerca del ambiente celular a través de la señalización mediada por las integrinas. Al parecer la proteína *ABL1* tiene un complejo papel como modulador celular que integra las señales del ambiente extracelular e intracelular e influye en las decisiones para mantener el ciclo celular y la apoptosis (19-22).

El gen *BCR*, se localiza en la región q34 del cromosoma 22. La proteína *BCR* está presente en varios tejidos y aunque existen datos que apoyan la hipótesis de que *BCR* participa en la transducción de señales, su verdadero papel permanece sin ser determinado (19-22).

A nivel molecular, la t(9;22) resulta en una fusión cabeza-cola de los genes *BCR* y *ABL1* cuando parte del gen *ABL1* localizado en el cromosoma 9 es transferida e insertada dentro del gen *BCR* del cromosoma 22, originando el transcrito de fusión del gen quimérico *BCR-AB1L*, mismo que codifica para una proteína que aumenta la actividad tirosina quinasa con potencial neoplásico (19-22).

### **INHIBIDORES TIROSIN KINASA**

Los inhibidores tirosin kinasa, son los primeros medicamentos de la era molecular, que fueron diseñados por computadora; y que además tienen como blanco la proteína de un gen quimérico (*BCR-ABL*). Con estos medicamentos el pronóstico de los pacientes con leucemia mieloide crónica ha aumentado considerablemente. Aunque todavía no se considera curativo, ha incrementado la expectativa de vida de estos pacientes, con pocos efectos secundarios. El primer medicamento de esta línea es el Imatinib, y ahora más recientemente el Nilotinib, Dasatinib y Bosutinib ( 23-26)

#### **IMATINIB**

Imatinib fue el primer inhibidor tirosin kinasa desarrollado para el cromosoma filadelfia en leucemia mieloide crónica. Se considera como medicamento de primera línea a elegir en pacientes *BCR-ABL* positivos. Estudios demostraron que con una dosis de Imatinib de 400 mg. un 88% de pacientes alcanzaron la respuesta hematológica completa y un 49% la respuesta citogenética completa. El nombre comercial de este medicamento es GLEEVEC (23,24).

#### **NILOTINIB**

Nilotinib es 30 veces más potente que el Imatinib, y tiene actividad ante varias mutaciones que confieren resistencia a Imatinib. Fue aprobado en el año 2007.

#### **DASATINIB**

Dasatinib es un inhibidor tirosin kinasa 325 veces más potente que el Imatinib. Dasatinib cruza la barrera hematoencefálica, a diferencia del Imatinib que no la cruza, y además se une tanto a la conformación activa como la inactiva de *BCR-ABL1*. Este medicamento fue aprobado en el año 2006 (23,24)

#### **RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IMATINIB**

En el estudio IRIS, la resistencia primaria o fallo para alcanzar la respuesta citogenética completa se observó en al menos 24% de pacientes después de 18 meses de haber iniciado el tratamiento. Después de cinco años de tratamiento, la resistencia secundaria o recaídas se observaron en un 17%.

Cuando hay un fallo a la terapia con imatinib es imperativo el cambio a terapia de segunda línea ( nilotinib, dasatinib y bosutinib)

El nivel inicial de respuesta al tratamiento con imatinib es la respuesta hematológica completa; que se define como la normalización de los conteos celulares en sangre periférica. El siguiente nivel a alcanzar es la respuesta citogenética completa (CCR). Y por último la respuesta molecular mayor (MMR) medida por PCR en Tiempo Real.

Se considera fallo del tratamiento cuando la terapia con Imatinib ya no es efectiva al paciente y por lo tanto se recomienda un cambio de tratamiento. Una respuesta sub-óptima indica que a pesar de que el paciente puede seguir obteniendo beneficios del imatinib, a largo plazo va a ser necesario un cambio de tratamiento. El Fallo de conseguir la MMR dentro de 18 meses del inicio del tratamiento o la pérdida de MMR a cualquier tiempo indica una respuesta sub-óptima (23,24)

En el estudio IRIS, el 68% de los pacientes después de un año de inicio del tratamiento con imatinib alcanzaron la CCR; y de estos se detectó MMR en 57%. También en el IRIS, ningún paciente con CCR y MMR a los 12 meses progresó a una enfermedad avanzada en 5 años (Ver Anexo No.1, Tabla No. 1) (23,24).

#### MUTACIONES EN EL GEN BCR-ABL1

Los mecanismos de resistencia al imatinib son multifactoriales; dentro de los cuales se puede mencionar un aumento en la producción de la proteína BCR-ABL1 (debido a amplificación génica y sobreexpresión) y una disminución en los niveles celulares de imatinib (25,26).

Por otro lado la resistencia secundaria, se debe principalmente a la presencia de mutaciones puntuales en BCR-ABL1, las cuales inhiben la unión del imatinib. En estudios recientes se ha determinado que la detección de mutaciones en BCR-ABL son altamente predictivas de pérdida de la respuesta citogenética completa y progresión a crisis blástica (25,26).

El análisis mutacional es recomendado en pacientes en los cuales la terapia ha fallado; siempre antes del cambio de inhibidor tirosin kinasa u otro tratamiento, y en algunos casos de respuesta subóptima (25,26).

A la fecha se han reportado más de 100 mutaciones en el gen BCR-ABL1; sin embargo en su mayoría, estas se traducen en sustituciones únicamente 15 aminoácidos (Ver Anexo No.1, tabla No. 2) (25,26).

La mutación T315I es considerada la más agresiva, ya que no existe ningún inhibidor tirosin kinasa que sea efectivo para esta mutación. En la tabla No. 2 del anexo No. 1, se muestran las principales mutaciones reportadas internacionalmente (25,26).

Las mutaciones dentro del dominio P-loop del dominio kinasa de BCR-ABL1 incluyendo la Y253F/H y la E255K/V son altamente resistentes a Imatinib. El Nilotinib exhibe actividad contra la mayoría de mutaciones que provocan resistencia a Imatinib, incluyendo la Y253F/H, E255K/V y T315I. Dasatinib también presenta actividad contra la mayoría de mutaciones que causan resistencia a Imatinib, excepto la T315I; el efecto de Dasatinib para los pacientes con mutaciones es más fuerte que el nilotinib e imatinib (25,26).

#### **SITUACION EN GUATEMALA**

Del período 2010 al 2012 se realizó el primer proyecto de investigación (FODECYT 24-2010); en el cual se monitoreo cada 3-4 meses, la cantidad de copias de BCR-ABL1 que tenían 30 pacientes con diagnóstico de leucemia

mieloide crónica. Todos los pacientes se monitorearon por un período de 18 meses. Los pacientes se clasificaron, según su respuesta al Imatinib como respuesta óptima, subóptima y fallo de terapia ( Ver Tabla No. 3 y 4, Anexo No.1). Un 39% de los pacientes analizados obtuvieron una respuesta óptima; es decir que alcanzaron una respuesta citogenética completa a los 12 meses o una respuesta molecular mayor a los 18 meses. Y luego se observa que un 25% de los pacientes incluidos en el presente estudio tuvieron una respuesta subóptima, menos de respuesta molecular mayor a los 18 meses; y por último presentaron fallo a la terapia un 36% de pacientes; los cuales no alcanzaron ni respuesta citogenética completa a los 18 meses; de estos pacientes fallecieron 3. Los pacientes con fallo a terapia y con respuesta subóptima son candidatos a análisis de mutaciones.

En Guatemala, no se han realizado estudios de mutaciones en el gen BCR-ABL1 previamente; por lo que no se conocen las mutaciones más frecuentes en el país. Y también no se utilizan para evaluar el cambio de inhibidor de tirosin kinasa.

## 10. OBJETIVOS

### General

Detectar la presencia de mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL1, como causa de resistencia al tratamiento con Imatinib en pacientes con leucemia mieloide crónica.

### Específicos

Establecer las mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL1 más frecuentes referidas por ASOPALEU y por el IGSS..

Determinar la resistencia al tratamiento con Imatinib en pacientes que presenten mutaciones en el gen BCR-ABL1.

## 11. HIPÓTESIS (si procede)

El presente proyecto de investigación carece de hipótesis, ya es un estudio de carácter descriptivo, en el que se determinará en Guatemala las mutaciones de BCR-ABL más frecuentes, y se evaluará su presencia en pacientes con fallo a terapia o respuesta subóptima al Imatinib.

## 12. MATERIALES Y MÉTODOS

- Descripción de la ubicación geográfica de la investigación: El presente proyecto de investigación se realizó en los pacientes con diagnóstico de Leucemia mieloide crónica BCR-ABL1 positivo, que pertenecen a ASOPALEU (Asociación de Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica) y el IGSS ( Instituto de Seguridad Social) en el departamento de Guatemala. No aplica a distribución geográfica.
- Período de la investigación: El período de duración de investigación fue de 11 meses, a partir de febrero del 2014.
- Descripción del método, técnicas, procedimientos e instrumentos a utilizar (Ver Anexo No. 2)

### A. TOMA DE MUESTRA

La muestra a utilizada fue sangre periférica en 3 tubos con EDTA. Antes de tomar la muestra el paciente firmó un consentimiento informado, en donde indicó claramente su aceptación a participar en el presente estudio.

### B. EXTRACCIÓN DE LEUCOCITOS

De la sangre periférica se extrajo leucocitos, utilizando la técnica de lisis de amonio. Los leucocitos se estabilizaron mediante la adición de RNAlater y fueron almacenados a -20 grados centígrados.

### C. EXTRACCIÓN DE ARN

Se procedió a extraer ARN de los leucocitos, utilizando la técnica de trizol. Y luego se cuantificó la cantidad de ARN extraído por fluorometría.

### D. RETROTRANSCRIPCIÓN

El ARN extraído se trató con una enzima transcriptasa reversa, para obtener su ADN complementario.

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA –PCR

Se realizó un PCR seminested. La secuencia de primers utilizados fueron:

First-step forward primer: 5\_ tga cca act cgt gtg tga aac tc

First-step reverse primer: 5\_ tcc act tcg tct gag ata ctg gat t

Second-step forward primer: 5\_ cgc aac aag ccc act gtc t

### F. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Una vez realizada la PCR, se procedió a purificar los productos, con el fin de eliminar exceso de primers y otros reactivos.

#### G. SECUENCIACIÓN DE ADN

Para la secuenciación de productos de PCR, se contrataron los servicios de MACROGEN USA.

#### H. ANÁLISIS DE RESULTADO

Se analizaron los resultados obtenidos, utilizando el programa sequencher, con el fin de establecer el tipo de mutación presente en cada paciente.

- Definición de las variables: tipos y formas de análisis de las variables: Porcentaje en sistema internacional de BCR-ABL1: esta es una variable cuantitativa expresada en porcentaje. Mutaciones en BCR-ABL1: esta es una variable cualitativa, que únicamente indicará la presencia de alguna mutación.
- Metodología de análisis de la información: El presente proyecto es un trabajo descriptivo, ~~por lo que no se utilizó un método estadístico para el análisis.~~ El análisis se realizó por frecuencias y porcentajes de los distintos tipos de mutaciones encontradas. Se realizó una descripción de cada caso encontrado con mutación.
- Selección de muestra: la selección de muestra fue por conveniencia.
  1. Criterios de inclusión:
    - Tener diagnóstico de leucemia mieloide crónica.
    - Estar en tratamiento con Imatinib.
    - Presentar arriba de 1% de copias de BCR-ABL, según el sistema internacional.
  2. Criterios de exclusión:
    - Tener diagnóstico de otro tipo de leucemia.
    - Tener un tratamiento distinto con Imatinib.
    - Y poseer respuesta óptima al tratamiento.

### 13.RESULTADOS

Los pacientes se han seleccionado en base a que tengan más de un 1% de copias del gen BCR-ABL1, ya que arriba de este porcentaje se establece que existe un fallo al tratamiento con imatinib. En el anexo No. 3; se muestra el porcentaje de BCR-ABL de los 75 pacientes que han sido sometidos al presente estudio, de estos se seleccionaron 30 pacientes con porcentajes elevados del gen, como candidatos a la evaluación de mutaciones; estos treinta pacientes se muestran en la tabla No. 1.

A los treinta casos de pacientes seleccionados para evaluar la presencia de mutaciones, se les realizaron los siguientes procedimientos: Extracción de Sangre periférica, Lisis de amonios, Extracción de ARN, Retrotranscripción, PCR, electroforesis y secuenciación del ADN (Ver anexo No. 2). También en el anexo No. 3 se muestran los geles de algunas muestras amplificadas por triplicado.

En el anexo No. 4, se observan los cromatogramas de todos los pacientes secuenciados en el presente estudio.

De los 30 pacientes seleccionados para en estudio de mutaciones en el gen BCR-ABL1, se encontraron tres pacientes con mutaciones en este gen, y un paciente presentó dos mutaciones; por esta razón se describen 4 mutaciones encontradas.

TABLA No. 1: Resumen de datos de los pacientes analizados

| Código Proyecto | Edad    | Escala Internacional % (Copias BCR-ABL) | Resultado MUTACIONES ABL1   | BCR- |
|-----------------|---------|-----------------------------------------|-----------------------------|------|
| LMC-16          | 46 años | 26.95                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-20          | 31 años | 68.37                                   | G250E p-loop                |      |
| LMC-49          | 64 años | BCR-ABL>ABL                             | G250E p-loop<br>E453K E453K |      |
| LMC-71          | 70 años | 0.4540                                  | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-81          | 53 años | 10.38                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-85          | 35 años | 0.5924                                  | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-92          | 22 años | 37.43                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-113         | 49 años | 21.46                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-115         | 69 años | 29.0096                                 | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-117         | 63 años | 0.104                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-120         | 52 años | 72.207                                  | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-122         | 33 años | 27.93                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-123         | 49 años | 0.009                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-124         | 26 años | 57.38                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-128         | 18 años | 76.28                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-130         | 42 años | 0.656                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-149         | 57 años | 26.46                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-159         | 30 años | BCR-ABL>ABL                             | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-160         | 34 años | 13.84                                   | T315I                       |      |
| LMC-166         | 37 años | 2.3993                                  | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-173         | 17 años | 170.30                                  | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-182         | 57 años | 0.7149                                  | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-184         | 43 años | 1.99                                    | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-191         | 64 años | 49.24                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-196         | 54 años | 23.29                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-207         | 31 años | 1.15                                    | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-215         | 22 años | 34.15                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-255         | 46 años | 37.88                                   | No presenta mutaciones      |      |
| LMC-304         | 35 años | 21.10                                   | No presenta mutaciones      |      |

A continuación se presenta un análisis de los tres casos de pacientes positivos encontrados para las mutaciones en el gen BCR-ABL1

### **CASO MUT-20**

HISTORIA:—: Paciente de sexo masculino, con 67 años de edad procedente de la ciudad de Guatemala; El paciente fue diagnosticado con leucemia mieloide crónica el 25 de abril del 2005, y hasta el año 2010 se le identificó por medio de

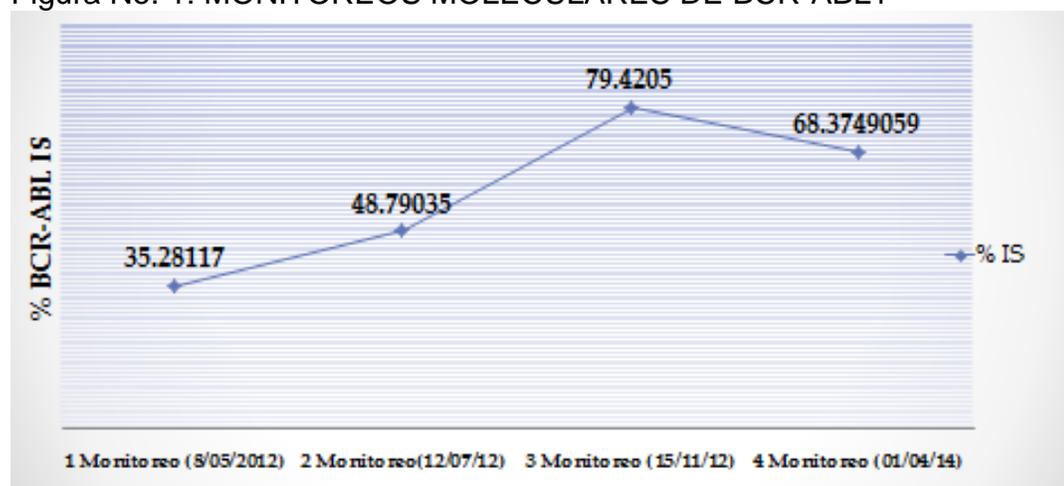
cariotipo la presencia del cromosoma philadelphia ( gen BCR-ABL). Inicio tratamiento con Imatinib 400 mg; luego por falta de respuesta al tratamiento, en el año 2012 se le subió a 600 mg. y en el año 2013 a dasatinib 100mg. Los valores de hematología se muestran en la tabla No. 2, en donde se puede observar que desde el año 2012 el paciente no tiene respuesta hematológica, siendo este otro parámetro para confirmar la resistencia al medicamento del paciente. Al paciente se le han realizado 4 monitoreos moleculares del gen BCR-ABL1, en donde todos se han encontrado arriba del 1% IS, lo que lo hace sospechoso de la presencia de mutaciones (ver figura No.1).

Al realizar el análisis de mutaciones, se encontró que este paciente es positivo para la mutación G250E; la cual se encuentra en el dominio P-loop, la cual es una mutación agresiva y resistente a Imatinib, Nilotinib y Dasatinib ( Ver figura No. 2)

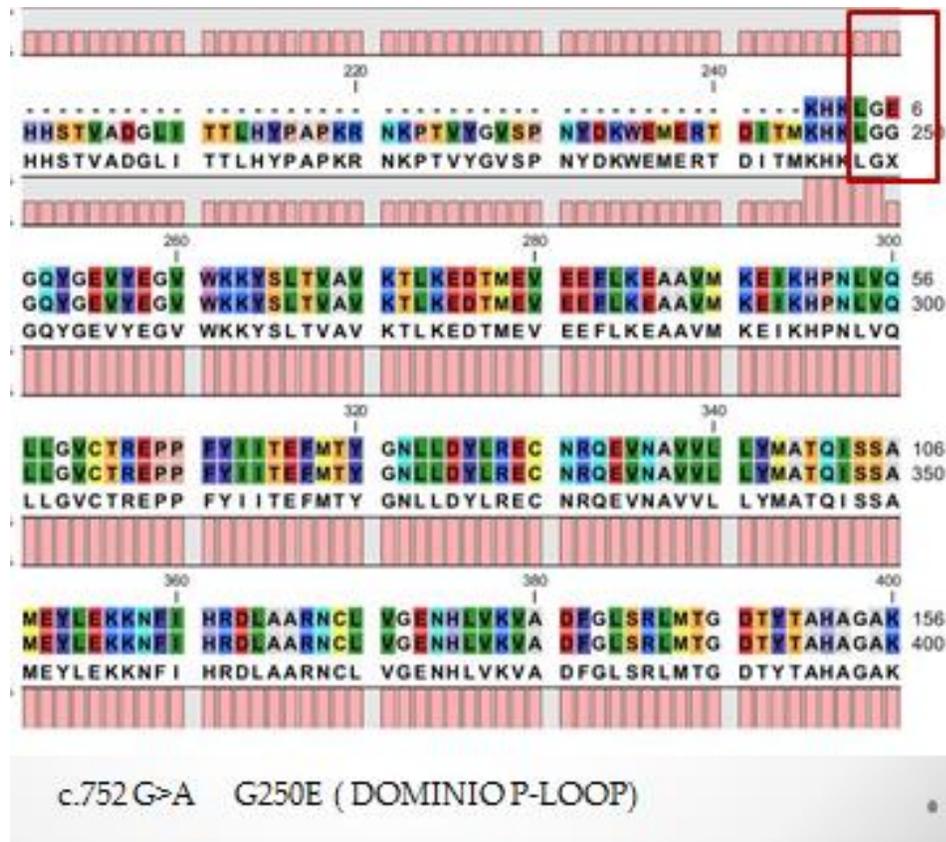
TABLA No. 2: Valores hematológicos del paciente LMC-20

|      | 1 Monitoreo (8/5/2012) | 2 Monitoreo (15/11/2012) | 3 Monitoreo (01/03/12) |
|------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| RGB  | 2800                   | 48700                    | 54000                  |
| RPLQ | 89000                  | 1,202,000                | 814000                 |
| HG   | 11.5                   | 12.9                     | 8.5                    |

Figura No. 1: MONITOREOS MOLECULARES DE BCR-ABL1



**Figura No.2: alineamiento de proteína del paciente con mutación G250E**



### CASO MUT-160

**HISTORIA DEL CASO:** paciente de sexo femenino, con 50 años de edad, procedente de Quetzaltenango El paciente, fue diagnosticado en el febrero del 2012, y en ese mismo año se le confirmó por cariotipo la presencia del cromosoma philadelphia (gen BCR-ABL1). En el año 2012, inicio tratamiento con Interferón, y a finales del mismo año fue cambiado a Imatinib; por falta de respuesta en junio del 2013, fue cambiado al tratamiento Nilotinib 400mg/día. Y actualmente se le subió la dosis de nilotinib a 600 mg/día. En la tabla No. 3, se muestran los valores de hematología presentados por el paciente, en donde se puede observar que a partir del año 2014 el paciente vuelve a perder la respuesta hematológica, ya que sus glóbulos blancos se encuentran elevados (21,320 leucocitos/ mm<sup>3</sup>). En la figura No. 3, se muestra que sus monitoreos moleculares se han mantenido superiores al 1% IS, lo que lo hace un candidato a la evaluación de mutaciones. Al realizar el análisis de mutaciones, se encontró que este paciente es positivo para la mutación T315I; la cual es considerada la mutación más agresiva que puede encontrarse, siendo

resistente a todos los medicamentos, y dejando como única opción el trasplante de médula ósea (figura No. 4)

Tabla No. 3: Valores hematológicos del paciente LMC-160

|      | MONITOREO<br>(02/06/12) | MONITOREO<br>(29/04/13) | MONITOREO<br>(8/01/2014) | 4<br>MONITOREO<br>(04/07/2014) |
|------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| RGR  | 2.54                    | 4.73                    | 4.66                     | 4.16                           |
| RGB  | 127.70                  | 8.2                     | 9.4                      | 21.32                          |
| RPLQ | 1,527                   | 491.6                   | 249.2                    | 403                            |
| Hb   | 7.9                     | 13.32                   | 13.1                     | 11.41                          |
| HCT  | 22.1                    | 39.48                   | 38.41                    | 34.05                          |

Figura No. 3: monitoreo molecular de BCR-ABL1 del paciente LMC-160

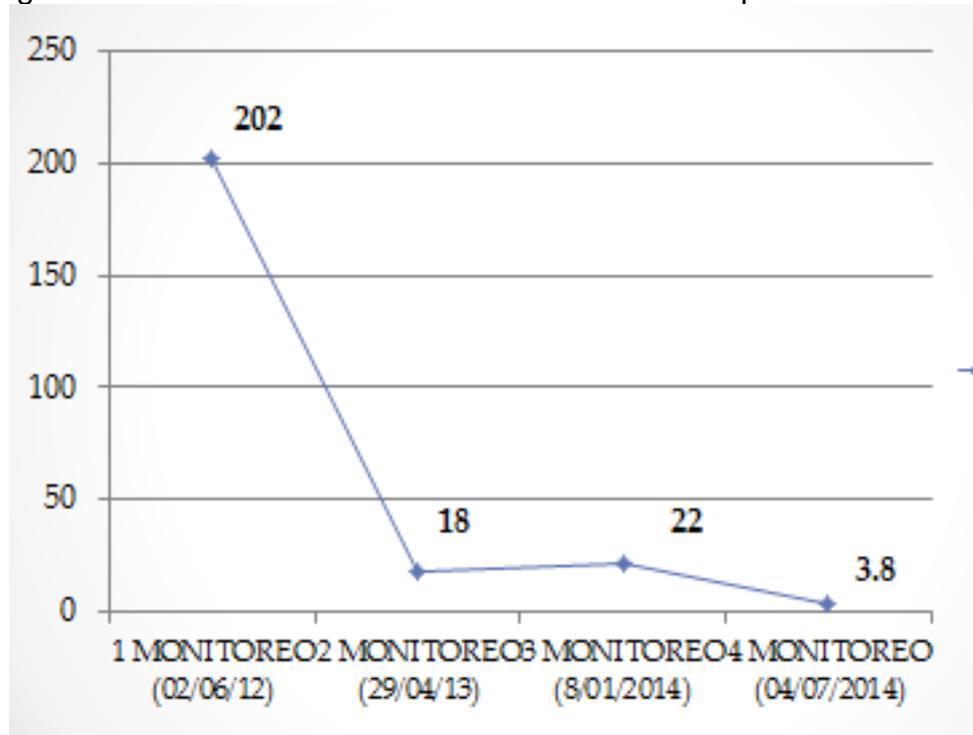
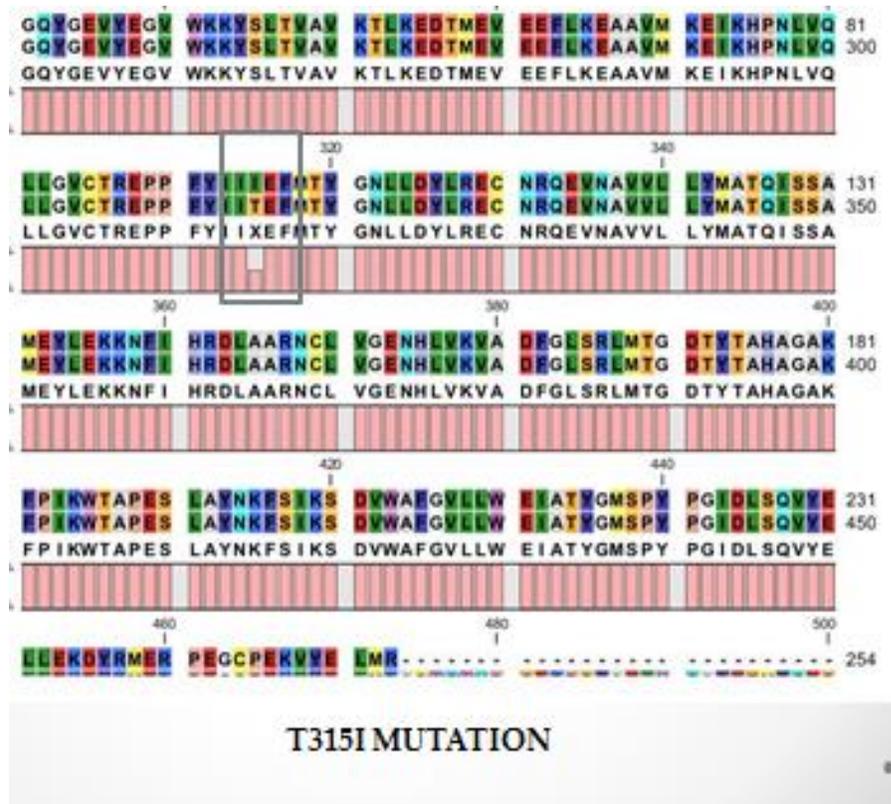


Figura No. 4: alineamiento de proteína de la mutación T315I en paciente LMC-160



### CASO MUT-49

**HISTORIA DEL CASO:** Paciente de 60 años de edad, de sexo masculino, procedente de San Marcos, ~~El paciente~~ fue diagnosticado en abril del año 2005. Se le realizó cariotipo, y se encontró un 9% de metafases positivas para la translocación t(9;22). En septiembre del año 2010 inicia tratamiento con imatinib, luego por falta de respuesta es cambiado a 800 mg de nilotinib. En la tabla No. 4 se puede observar que desde julio del año 2012, el paciente perdió la respuesta hematológica, y presentó el recuento de glóbulos blancos por arriba del rango normal. En la figura 5, se observa que el paciente ha mantenido el número de copias de BCR-ABL1 elevados, lo que demuestra que no tiene ni respuesta molecular ni citogenética. Y por último en las figuras 6 y 7 se observa las mutaciones que están presente en este paciente. El paciente fallece en el año 2014.

Tabla No. 4: Valores hematológicos del paciente LMC-160

|          | 1 Monitoreo<br>(15/07/11) | 2 Monitoreo<br>(17/11/11) | 3 Monitoreo<br>(01/03/12) | 4 Monitoreo<br>(5/7/12) | 5 Monitoreo<br>(8/11/12) | 6 Monitoreo<br>(08/01/2014) |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| RGB      | 5.6                       | 5.15                      | 8.77                      | 13.79                   | 32.16                    | 24.1                        |
| RPLQ     | 214                       | 141                       | 156                       | 172                     | 214                      | 242                         |
| % BLATOS | 1%                        |                           |                           |                         |                          |                             |
| HG       | 11.1                      | 12.3                      | 12.3                      | 10.6                    | 10.9                     | 11.3                        |

Figura No. 5: monitoreos moleculares del paciente MUT- 160

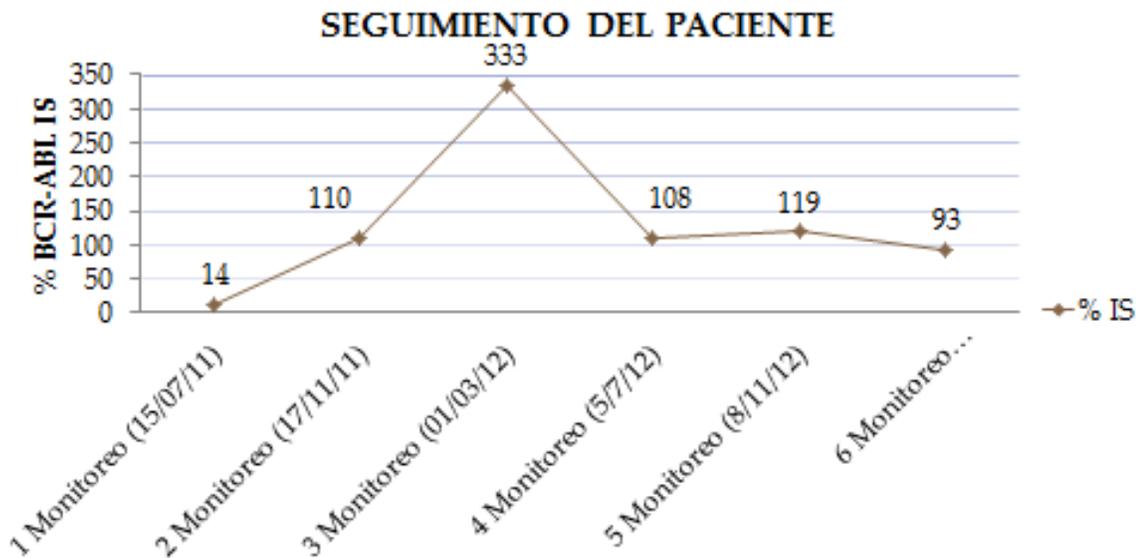


Figura No. 6: alineamiento de proteína del paciente MUT-49 con la mutación E453K

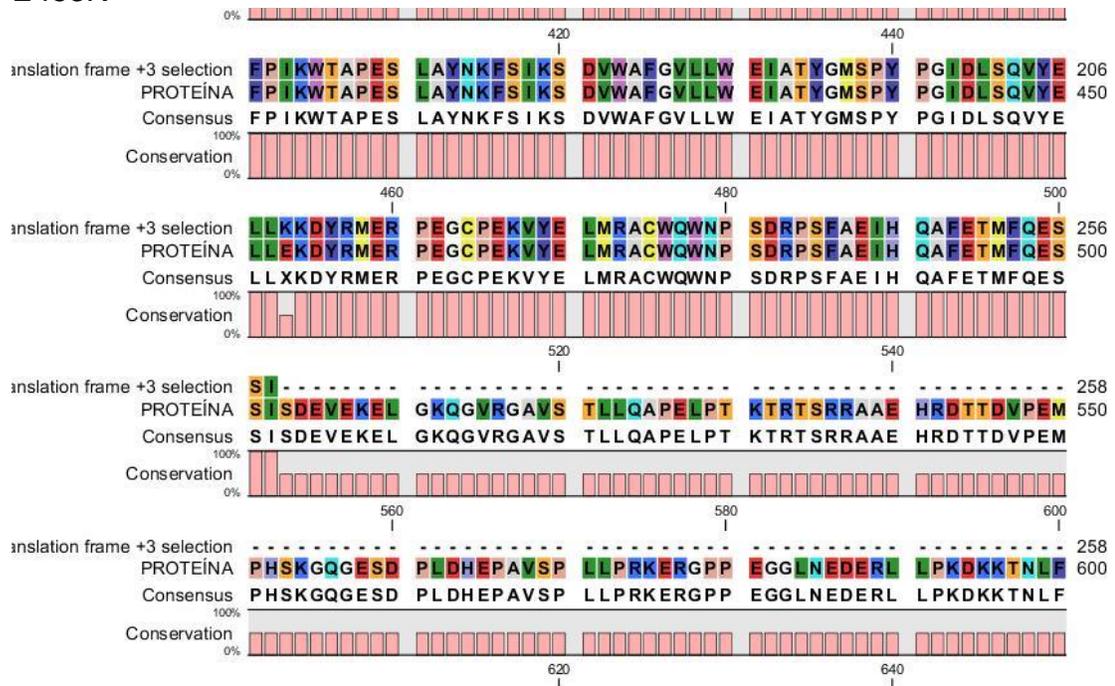
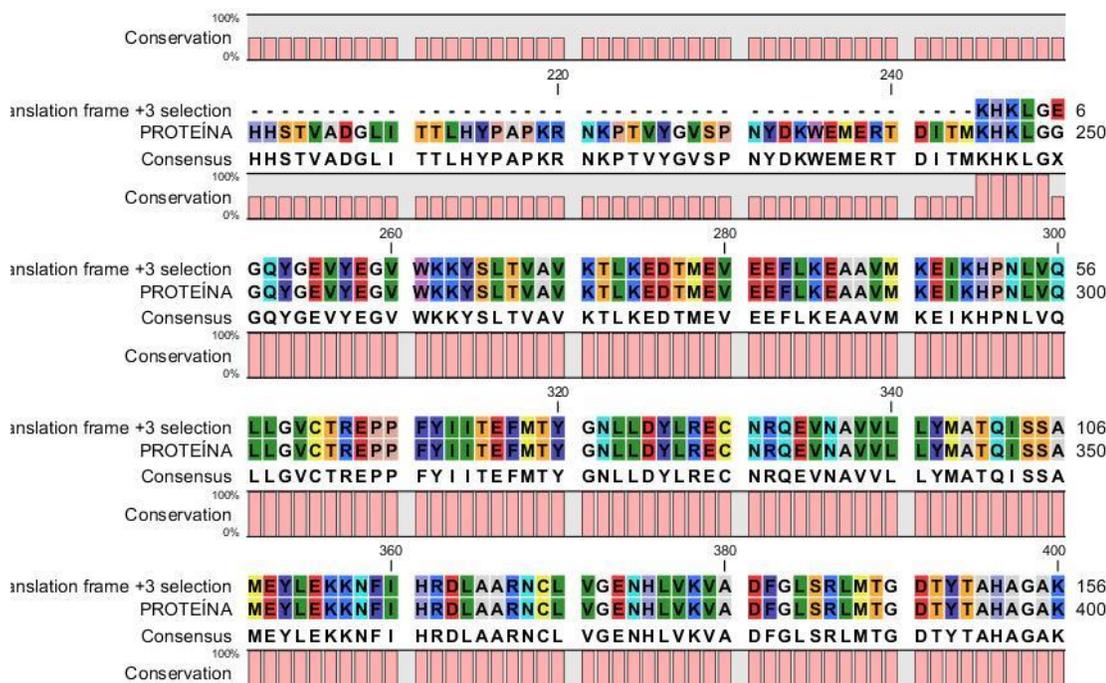


Figura No. 7: alineamiento de la proteína del paciente MUT-49 con la mutación G250E.



### 13.2 Matriz de Resultados

Esta matriz presenta los resultados esperados (resultados al inicio del proyecto) y los resultados concretos u obtenidos en la investigación, por medio de la siguiente matriz:

| Objetivo Específico 1                                                                                     | Resultados esperado                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Resultado obtenido                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Establecer las mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL1 más frecuentes en la población guatemalteca</p> | <p>- <b>ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS:</b> Las mutaciones son cambios de bases nitrogenadas que se producen en el ADN, y cuyo cambio se traduce en una enfermedad, en alguna resistencia a medicamento, o toxicidad al mismo. El gen BCR-ABL es el blanco del medicamento llamado Imatinib. Imatinib es el primer medicamento molecular diseñado por Química Computacional que posee excelentes resultados en pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica; Sin</p> | <p>Procedimientos estándar de operación de las siguientes técnicas:<br/>Lisis de amonios<br/>Extracción de ARN<br/>Retrotranscripción<br/>PCR<br/>Purificación de productos de PCR.<br/>Secuenciación del ADN<br/>Análisis de mutaciones (en la sección de análisis de indicadores verificables, se presenta un resumen de los procedimientos estándar de operación, de los procedimientos de laboratorio</p> |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>embargo un pequeño grupo de pacientes puede desarrollar mutaciones en este gen, que hacen que el paciente se vuelva resistente al Imatinib.</p> <p>Para la detección de mutaciones en el gen BCR-ABL1 se han estandarizado varias técnicas como la lisis de amonio, la extracción de ARN, retrotranscripción, reacción en cadena de la polimerasa –PCR-, electroforesis, y la purificación de productos para secuenciación; cada uno de estos procedimientos se detallan en el anexo No.2 .</p>        | <p>aquí mencionados).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|  | <p><b>- SELECCIÓN DE PACIENTES:</b><br/>Los pacientes a incluir en el presente estudio, son los que por alguna razón no están respondiendo bien al medicamento, y por lo tanto poseen altas copias del gen BCR-ABL; para seleccionarlos se utilizó como criterio que no tuvieran respuesta citogenética completa, es decir más de un 1% de copias del gen BCR-ABL sobre el gen control. Los pacientes a analizar son 75, de los cuales se seleccionaron 30 pacientes con un porcentaje mayor a un 1%.</p> | <p>Resultados de Cuantificaciones mayores a un 1% ( en la sección de análisis de indicadores verificables, se puede observar una gráfica de un paciente que posee un porcentaje mayor al 1 % y que por lo tanto es candidato para el análisis de mutaciones como posible causa de resistencia al imatinib.. Además en la sección de análisis de indicadores verificables se muestra una tabla, en donde se han analizado los porcentajes de BCR-ABL en un total de 75 pacientes con el fin de seleccionar a los candidatos.</p> |
|  | <p><b>- PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:</b> Una vez seleccionados a los pacientes con porcentaje arriba de un 1%, se procedió a leerles un consentimiento informado ( anexo No. 5), en donde se les explica el presente estudio, y</p>                                                                                                                                                                                                                                            | <p>Fotografías de geles amplificando el gen BCR-ABL. Cromatogramas de pacientes, que se muestran como resultado de la secuenciación. Total de pacientes que presentan mutaciones, y los análisis de cada caso. Deteminación de frecuencia de</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                |

|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                        | <p>donde ellos deciden voluntariamente participar. Una vez firmado el consentimiento informado, se procedió a la extracción de sangre periférica, y la realización de todos los procedimientos descritos en el apartado de estandarización de técnicas.</p> | <p>mutaciones (ver detalles en la sección de análisis de indicadores verificables). Se han secuenciado muestras de 30 pacientes candidatos al estudio, de los cuales tres pacientes han resultado positivos para las mutaciones.</p> |
| <b>Objetivo Específico 2</b>                                                                                           | <b>Resultado esperado</b>                                                                                                                                                                                                                                   | <b>Resultado obtenido</b>                                                                                                                                                                                                            |
| <p>Determinar la resistencia al tratamiento con Imatinib en pacientes que presenten mutaciones en el gen BCR-ABL1.</p> | <p><b>EVALUACIÓN DE RESULTADOS DE MUTACIONES EN BCR-ABL:</b> Identificación de pacientes con mutaciones de resistencia a los inhibidores tirosin quinasa</p>                                                                                                | <p>Análisis de 3 casos de pacientes con resistencia confirmada por secuenciación.</p>                                                                                                                                                |
|                                                                                                                        | <p><b>INFORMACIÓN Y ORIENTACIÓN A CAMBIO DE MEDICAMENTO</b> Entrega de resultados a pacientes.</p>                                                                                                                                                          | <p>Modelo de entrega de resultados.<br/>Orientación a tratamiento en los tres casos resultados positivos</p>                                                                                                                         |

## 14. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De un total de 75 pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica que se encuentran con tratamiento de Inhibidores tirosin kinasas ( Imatinib, Dasatinib o Nilotinib). Se seleccionaron 30 pacientes que poseen arriba de un 1% de porcentaje en sistema internacional de BCR-ABL1, es decir que no tienen el equivalente a respuesta citogenética completa y que por lo tanto son candidatos al estudio de mutaciones como causa de resistencia al tratamiento. Estos 30 pacientes fueron sometidos al análisis de mutaciones en el dominio kinasa ABL, por medio de reacción en cadena de la polimerasa –PCR- y secuenciación de Sanger.

Se encontraron un total de 3 pacientes positivos a alguna mutación, este número corresponde a un porcentaje de positividad de 4. Un paciente presento tanto la mutación G250E como la E453K; otro paciente la T315I y el último paciente la G250E.

Además según lo reportado en otros países la frecuencia de mutaciones (4%) de Guatemala es muy baja. Ya que en otros países se reporta hasta un 50% de mutaciones como causa de resistencia. Este aspecto debe estudiarse con mayor profundidad en futuros estudios. Una de las causas de esta baja frecuencia, podría ser que los pacientes tengan baja adherencia al tratamiento, y por lo tanto presenten porcentajes de BCR-ABL1 que corresponden a fallo de terapia; pero en realidad reflejen la falta de toma del medicamento por parte de los pacientes. Y además podría ser que las características genéticas de nuestra población; implique otros genes involucrados en la resistencia.

En el anexo No. 6, se puede observar la clasificación de las mutaciones según su respuesta a cada uno de los fármacos. Se puede ver claramente que la mutación más agresiva es la T315I; ya que es altamente resistente a los fármacos disponibles en Guatemala ( Imatinib, Nilotinib y Dasatinib). Luego la mutación G240E, que se encuentra en el dominio P-LOOP, también es considerada resistente a los tres fármacos, aunque algunos estudios indican que esos pacientes son ligeramente más sensibles a dasatinib. Y por último la mutación E453K, es una mutación poco agresiva.

El caso MUT-20, fue seleccionado por su falta de respuesta molecular, encontrándose, siempre con valores arriba del 35% en el sistema internacional. Además en las hematologías se puede ver claramente que carece también de respuesta hematológica, es decir sus recuentos de glóbulos blancos están aumentados. Este paciente presentó la mutación G250E, la cual como se mencionó anteriormente está en el dominio P-LOOP, y por lo tanto es de las más agresivas. Este paciente debería de cambiarse a terapia con Dasatinib, ya que algunos estudios han reportado que responden mejor a este tratamiento. En este caso se puede observar claramente como las características genéticas del paciente orientan a el medicamento más apropiado para cada paciente. En

la era de medicamentos con diana molecular, se apunta a una medicina personalizada.

El caso de MUT-160, está recibiendo terapia con Nilotinib, por su falta de respuesta a Imatinib. Sin embargo en resultados se puede observar que al igual que el caso anterior carece de respuesta molecular y hematológica; por lo que es un paciente candidato al estudio de mutaciones. Este paciente posee la mutación más agresiva, la T315I. Lo único que se puede realizar a este paciente es un trasplante de médula ósea.

El caso de MUT-49, es un paciente que no posee ni respuesta molecular ni hematológica; se le realizó el estudio de mutaciones y se encontraron dos mutaciones presentes, la G250E y la E453K, la primera mutación como se mencionó anteriormente es más agresiva al encontrarse en el dominio P-LOOP. Este paciente fallece aproximadamente a los 2 meses de haberse detectado la presencia de las mutaciones, y no se pudo cambiar de terapia

## 15. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN

En esta sección debe colocar las actividades realizadas durante el proceso de investigación en:

Docencia:

Los resultados parciales, se han impartido como docencia en el Curso de Especialización a nivel post-grado en Biología Molecular, que imparte INVEGEM con el aval académico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de Universidad San Carlos de Guatemala.

Divulgación

Los resultados parciales han sido presentados en una gran variedad de conferencias y congresos:

- Congreso Nacional de Hemato-oncología, realizado en agosto del 2014 en el Hotel Intercontinental; conferencia titulada “Futuro de la Biología Molecular en la hemato-oncología”.
- Semana Científica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; se presenta conferencia del presente proyecto aprobado por la DIGI.
- Congreso de Químicos farmacéuticos, realizado en septiembre del 2014, en donde se impartió la conferencia “ Farmacogenómica del cáncer”.
- Conferencia: Servicios genéticos en Guatemala, impartida en noviembre del 2014 en el Salvador.

Gestión y vinculación

Se han realizado actividades de Gestión, con los hospitales: Hospital General San Juan de Dios, Hospital Nacional Roosevelt, Instituto de Seguridad Social – IGSS- y la Unidad de Oncología Pediátrica –UNOP-; esto con el fin de divulgar el proyecto y proceder a la selección adecuada de los pacientes.

## 16. CONCLUSIONES

- La frecuencia de mutaciones en el dominio kinasa en el transcrito BCR-ABL1 en la población estudiada es de un 4%.
- Las mutaciones en el gen BCR-ABL1 encontradas fueron la G250E, T315I y la E453K, siendo las dos primeras las más agresivas.
- La frecuencia de mutaciones encontradas en la población estudiada es baja, posiblemente existan otros genes implicados en la resistencia como los son el MDR1 y el OCT1 o que exista falta de adherencia de los pacientes al tratamiento

## 17. RECOMENDACIONES

- Ampliar el tiempo del presente estudio para evaluar más pacientes candidatos a la detección de mutaciones, es decir que posean un % en escala internacional superior al 1%.
- Determinar si los pacientes que poseen altos niveles de BCR-ABL1, tienen buena adherencia al tratamiento.
- Estudiar nuevos genes implicados en la resistencia a Imatinib en la población guatemalteca.

**18. BIBLIOGRAFÍA**

1. Mejía-Aranguré J. et al. (1996). Incidence trends of acute leukemia among the children of Mexico City: 1982- 1991. Arch Med Res, 27, 223-227.
2. Campbell L. et al. (1995). Prognostic implications of karyotypes in 159 newly diagnosed adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Rev. Blood, 86,678-680.
3. Carranza C. (2007) Caracterización genética de pacientes con neoplasias mieloides y alteraciones del brazo largo del cromosoma 3. Mecanismo de sobreexpresión y análisis funcional del promotor del gen EVI1. Memoria de investigación. Suficiencia Investigadora (programa de doctorado en biología molecular y celular). Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, Centro de Investigación Médica Aplicada. –CIMA- Pamplona, España. Septiembre.
4. Marilina A. et. al. (2001). Real-time quantification of different types of bcr-abl transcript in chronic myeloid leukemia. Haematologica, 86, 252-259.
5. Lee, W. et al. (2002). Quantitative measurement of BCR-ABL transcripts using real-time polymerase chain reaction. Annals of oncology, 13, 781-788.
6. Freudhomme C. (1999). Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a real time quantitative RT-PCR assays. Leukemia. 13, 957-964.
7. Akihiro A. et al. (2008). Retention but significant reduction of BCR-ABL transcript in hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia after imatinib therapy. Int J hematol, 88, 471-475.
8. Rosas A. et. al. (2003). Análisis del tipo de transcrito BCR-ABL y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica. Gac Méd Méx, 139, 70-75.

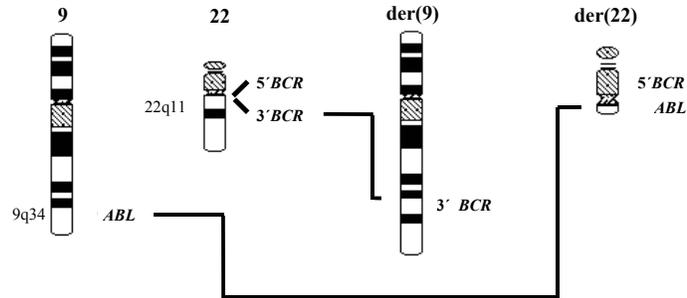
9. Ustek D. et al. (2008). Cloning of Chimerical translocations as positive control for molecular genetic diagnosis of leukemia. *Turk J Haematol*, 25, 20-23.
10. Ortiz V. et al. (2008). Frecuencia de transcritos del gen BCR/ABL en pacientes Mexicanos con Leucemia Mieloide Crónica que están en tratamiento con Glivec. Primer foro Universitario "Investigación y Desarrollo" Avances y perspectivas. Universidad Autónoma de Tamaulipas, 133-137.
11. Cross N, et al. (1993). Minimal residual disease after allogenic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse. *Br J Haematology*, 84, 67-74.
12. Whang J. et al. (1963). The Distribution of the Philadelphia Chromosome in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, 22,664-673.
13. Calasanz M. (2002). Técnicas de Diagnóstico Genético en Neoplasias Hematológicas y Tumores Sólidos. *Rev. ASOVANSA*.
14. Artigas C. (2003). Transcritos de fusión del gen BCR-ABL en pacientes con leucemia mieloide crónica. *Rev. Int. J. Morphol*, 21, 205-209.
15. Hernández P. (2001). Nueva opción terapéutica en la leucemia mieloide crónica. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 40, 205-210.
16. Lowenberg B. (2003). Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Rev. N Eng J Med*, 349, 1399-1401.
17. Lange T. (2003). Residual disease in chronic myeloid leukemia after induction of molecular remission. *Rev. N Eng J Med*, 349, 1483-1484.
18. Margolin J. et al. (2001). Acute lymphoblastic leukemia. En: Pizzo A., Poplack D., Editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 4<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 489-544.
19. Melo J. (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Rev. Blood*, 88, 2375-2384.

20. Kurzrock R, et al. (2003). Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*, 138, 819-830.
21. Goldman J, et al. (2003). Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med*, 349, 1451-1464.
22. Deininger M, et al. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Rev Blood*, 96, 3343-3356.
23. Druker B. (2003) Imatinib mesylate in the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Expert Opin. Pharmacother*, 4(6), 963-971.
24. Fullmer A, et al. (2010). Nilotinib for the treatment of Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Expert Opin. Pharmacother*, 11(18), 3065-3072.
25. Ernst T, et al. (2011). BCR-ABL mutations in Chronic Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin*, 25, 997-1008.
26. Hochhaus A, et al. (2011). Impact of BCR-ABL mutations on patients with chronic myeloid leukemia. *Cell cycle*, 10(2), 250-260.

19. ANEXOS

ANEXO No. 1

FIGURA No. 9: ESQUEMA DE LA t(9;22) Y LA LOCALIZACIÓN DE LOS GENES ABL Y BCR.



Fuente: Melo J. Rev. Blood. 1996; 88:2375-2384.)

TABLA 5: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO IMATINIB

| MESES                                            | OPTIMA       | SUBÓPTIMA                          | FALLO DE TERAPIA                |
|--------------------------------------------------|--------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 3                                                | CHR          | No CHR ( Ph>95%)                   | Menos de CHR                    |
| 6                                                | PCR (Ph<35%) | Menos de pCR ( h<35%)              | No CgR (Ph> 95%)                |
| 12                                               | CCR          | pCR ( 1% a 35%)                    | Menos de pCR (Ph>35%)           |
| 18                                               | MMR          | Menos de MMR                       | Menos de CCR, no MMR            |
| Cualquier tiempo durante duración de tratamiento | MMR estable  | Pérdida de presencia de Mutaciones | Perdida de CHR, perdida de CCR; |

CHR: respuesta hematológica completa; CCR: respuesta citogenética completa; pCR: respuesta citogenética parcial; MMR: respuesta molecular mayor.

Fuente: Bacarani M, et al. Journal of Clinical Oncology, 27:6041-6051, 2009.

**Tabla No. 6: MUTACIONES FRECUENTES EN BCR-ABL**

| MUTACIÓN | LOCALIZACIÓN           |
|----------|------------------------|
| T315I    | Región de unión al ATP |
| Y253F    | P-loop                 |
| Y253H    | P-loop                 |
| E255K    | P-loop                 |
| E255V    | P-loop                 |
| M351T    | Dominio catalítico     |
| G250E    | p-loop                 |
| F359V    | Dominio catalítico     |
| H396P    | A-loop                 |
| H396R    | A-loop                 |

Fuente:XXXXX

**TABLA No. 7 : RESPUESTA AL IMATINIB DEL TOTAL DE PACIENTES ANALIZADOS**

| RESPUESTA ÓPTIMA | RESPUESTA SUBÓPTIMA | FALLO DE TERAPIA | FALSOS POSITIVOS |
|------------------|---------------------|------------------|------------------|
| 39%              | 25%                 | 36%              | 6%               |

Fuente: FODECYT 24-2010

**TABLA No 8: RESPUESTA AL IMATINIB ALCANZADA DURANTE EL MONITOREO MOLECULAR**

| % CCgR | % MMR | %MR |
|--------|-------|-----|
| 21%    | 29%   | 14% |

Fuente FODECYT 24-2010

## ANEXO No. 2: ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS

**ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS DE LABORATORIO:** se realizó la estandarización de cada una de las técnicas de laboratorio utilizadas en el presente estudio, a continuación se presenta un resumen de los procedimientos estándar de operación estandarizados para la realización del presente proyecto de investigación.

### LISIS DE AMONIOS ( Ver figura No. 10)

#### Listado de materiales y reactivos

Jeringa de 10 mL

RNA later

Buffer de Lisis

Solución salina Isotónica

Hielera

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Guates desechables

Bata manga larga, que llegue como mínimo a la rodilla

Descartador de puntas

Bolsa roja, debidamente identificada con el símbolo de bioseguridad.

Campana de flujo laminar

Centrifugadora en frío Tubos falcon de 15 MI

#### METODOLOGÍA

La lisis de amonios se realiza con el fin de lisar todos los glóbulos rojos presentes en la sangre tomada al paciente; para realizar esto se utiliza una mezcla de buffers de amonio, y luego se realizan una serie de lavados para dejar libres los glóbulos blancos. Posteriormente los glóbulos blancos son estabilizados con RNA later y almacenados en congelación hasta su análisis.

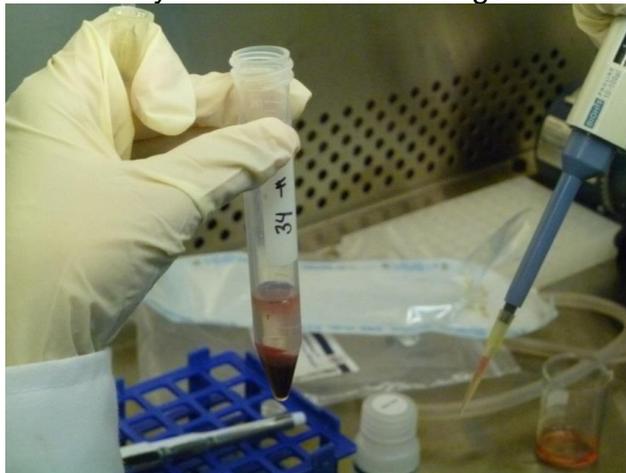


Figura No. 10: se observa la realización de la lisis de amonios

## EXTRACCIÓN DE ARN ( Ver figura No. 11)

### Listado de materiales y reactivos

RNA later

Buffer de Lisis

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Guates desechables

Bata manga larga, que llegue como mínimo a la rodilla

Descartador de puntas

Bolsa roja, debidamente identificada con el símbolo de bioseguridad.

Campana de flujo laminar

Trizol

Cloroformo

Isopropanol

Etanol

Agua

### METODOLOGÍA

La metodología estandarizada para la realización de la extracción de ARN está basada en la precipitación del ARN mediante la utilización de trizol, y solventes como isopropanol, etanol y cloroformo. El ARN precipitado se resuspende en agua grado molecular.

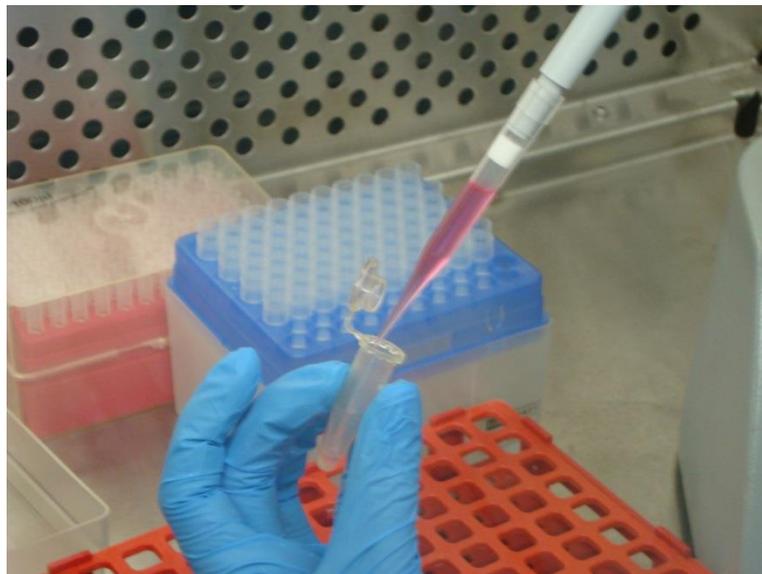


Figura No. 11: en la figura se observa procedimiento de Extracción de ADN de leucocitos

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA –PCR- Y RETROTRANSCRIPCIÓN (Ver figura No. 12)

### Listado de materiales y reactivos

Tubos Eppendorf de 1.5 mL  
Guates desechables  
Bata manga larga, que llegue como mínimo a la rodilla  
Descartador de puntas  
Bolsa roja, debidamente identificada con el símbolo de bioseguridad.  
Campana de flujo laminar  
Agua grado molecular  
Kit de retrotranscripción con transcriptasa reversa  
Taq polimerasa  
Buffer  
Cloruro de Magnesio  
Cebadores  
Agarosa  
Buffer TAE  
Escalera de 50 pb.  
Gel red

### METODOLOGÍA

El ARN obtenido durante la extracción, es sometido a una retrotranscripción, mediante el uso de una enzima transcriptasa reversa; con el fin de obtener el ADN complementario.

Posteriormente se realiza la –PCR- del gen quimérico BCR-ABL, para amplificar las copias del gen y por último se visualiza la amplificación en un gel de agarosa.

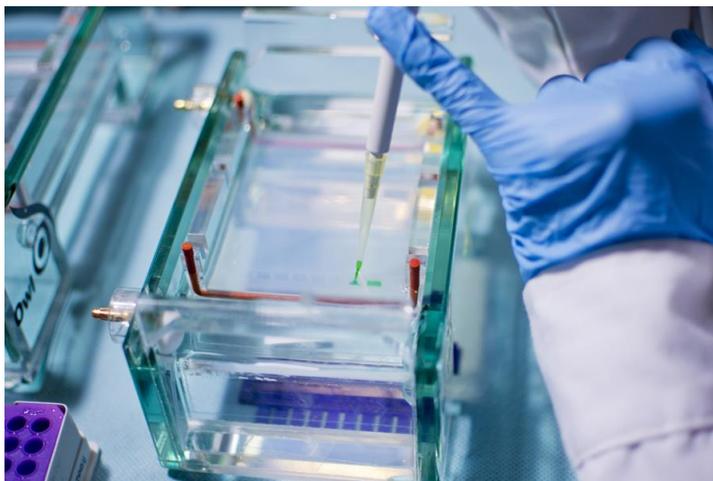


Figura No. 12: se muestra una electroforesis en gel de agarosa para visualizar la amplificación del gen BCR-ABL

## **PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR Y SECUENCIACIÓN DEL ADN (Ver figura No. 13)**

### **Listado de materiales y reactivos**

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Guates desechables

Bata manga larga, que llegue como mínimo a la rodilla

Descartador de puntas

Bolsa roja, debidamente identificada con el símbolo de bioseguridad.

Campana de flujo laminar

Agua grado molecular

Kit de purificación del ADN

Envío a secuenciación de Sanger a USA.

### **METODOLOGÍA**

Posterior a la amplificación del gen BCR-ABL, es necesario purificar dicho producto, con el fin de eliminar los restos de reactivos que quedaron en la reacción, esto se realiza por filtración y lavados. Luego las muestras purificadas han sido enviadas para su respectiva secuenciación a un laboratorio de Estados Unidos. Posteriormente se analizan los resultados mediante la utilización del software SEQUENCHER.



Figura No. 13: se muestra la purificación de productos de PCR para su respectiva secuenciación

**ANEXO No. 3: tabla 9. Cuantificación de copias de BCR-ABL a 75 pacientes candidatos al estudio y selección de 30 casos para estudio de mutaciones**

| Código  | Copias BCR   | de Copias ABL | de Ratio     | % Ratio      | % IS         |
|---------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| 27-LMC  | <3           | 74,693.98440  | INDETECTABLE | INDETECTABLE | INDETECTABLE |
| 75-LMC  | 5,032.7344   | 113,613.42970 | 0.044297003  | 4.429700268  | 3.588057217  |
| 80-LMC  | 30.9740      | 71,001.52340  | 0.000436244  | 0.043624416  | 0.035335777  |
| 20-LMC  | 27,563.5410  | 77,900.50000  | 0.353830091  | 35.38300909  | 28.66023737  |
| 92LMC   | 22,272.9082  | 62,422.49805  | 0.356808985  | 35.68089855  | 28.90152782  |
| 94-LMC  | 21.9982      | 80,596.33590  | 0.000272943  | 0.027294293  | 0.022108377  |
| 113-LMC | 23,026.1543  | 58,681.29690  | 0.392393412  | 39.23934118  | 31.78386636  |
| 129-LMC | 71.1333      | 39,016.52340  | 0.001823158  | 0.182315834  | 0.147675825  |
| 131-LMC | <3           | 58,835.31640  | INDETECTABLE | INDETECTABLE | INDETECTABLE |
| 146-LMC | 12.4002      | 30,042.95120  | 0.000412749  | 0.041274906  | 0.033432674  |
| 173-LMC | 514,184.99   | -             | **           | **           | **           |
| 213-LMC | 18.2743      | 170,979.34380 | 0.00010688   | 0.010688016  | 0.008657293  |
| 261-LMC | 27,269.06    | 43,904.79300  | 0.621095298  | 62.10952982  | 50.30871915  |
| 19-LMC  | 1,728.03     | 188,520.11    | 0.009166264  | 0.916626404  | 0.742467387  |
| 37-LMC  | 250.3605     | 65,454.59     | 0.003824949  | 0.382494949  | 0.309820909  |
| 39-LMC  | 1,358,527.13 | 1,188,379     | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 48-LMC  | 1,462.36     | 169,143.22    | 0.008645691  | 0.864569097  | 0.700300969  |
| 49-LMC  | 379,101.03   | 271,852       | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 196-LMC | 50,576.18    | 211,430.30    | 0.239209709  | 23.92097085  | 19.37598639  |
| 52-LMC  | <3           | 171,538.84    | Indetectable | Indetectable | Indetectable |
| 77-LMC  | 27.72        | 112,971.46    | 0.000245372  | 0.024537171  | 0.019875108  |
| 81-LMC  | 58.5194      | 52,617.38     | 0.001112169  | 0.111216866  | 9.00085662   |
| 99-LMC  | 11.4059      | 21,801.50     | 0.00052317   | 0.052317033  | 0.042376797  |
| 114-LMC | 655.6721     | 116,159.73    | 0.005644573  | 0.564457337  | 0.457210443  |
| 120-LMC | 130,177.57   | 80,278.95     | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 122-LMC | 430,497.47   | 354,227.13    | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 126-LMC | 179,593.56   | 253,767.53    | 0.707708987  | 70.77089872  | 57.32442797  |
| 135-LMC | 2,699.33     | 100,654.72    | 0.026817684  | 2.681768358  | 2.17223237   |
| 137-LMC | 11.758       | 63,452.42     | 0.000185304  | 0.01853042   | 0.01500964   |
| 160-LMC | 13,815.21    | 291,247.06    | 0.047434686  | 4.74346858   | 3.84220955   |
| 173-LMC | 173,893.45   | 163,216.94    | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 191-LMC | 33,126.83    | 50,149.19     | 0.660565626  | 66.05656258  | 53.50581569  |
| 194-LMC | 842.3725     | 79,503.13     | 0.010595464  | 1.059546401  | 0.858232585  |
| 195-LMC | 11.6711      | 111,313.29    | 0.000104849  | 0.010484912  | 0.008492778  |
| 199-LMC | 253,187.30   | 211,545.73    | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 215-LMC | 42,001.47    | 187,626.94    | 0.223856283  | 22.38562829  | 18.13235891  |
| 115-LMC | 37,454.27    | 103,554.84    | 0.361685336  | 36.16853358  | 29.2965122   |

Candidatos a estudio de mutaciones

| Código  | Copias BCR   | de Copias ABL | de Ratio     | % Ratio      | % IS         |
|---------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| 282-LMC | 3,536.84     | 189,309.52    | 0.018682846  | 1.868284639  | 1.513310558  |
| 311-LMC | 78,570.70    | 67,016.70     | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 314-LMC | <3           | 41,080.82     | Indetectable | Indetectable | Indetectable |
| 316-LMC | 160,054.41   | 449,754.94    | 0.355870259  | 35.58702592  | 28.825491    |
| 317-LMC | 756,717.50   | 389,426.53    | BCR>ABL      | BCR>ABL      | BCR>ABL      |
| 130-LMC | 91,033.02    | 202,565.05    | 0.449401438  | 44.94014382  | 36.40151649  |
| 40-LMC  | 61.8414      | 76,893.2109   | 0.00080425   | 0.080425046  | 0.065144287  |
| 47-LMC  | 51.0466      | 51,089.8945   | 0.000999153  | 0.099915258  | 0.080931359  |
| 60-LMC  | 3,055.87     | 110,675.6953  | 0.027611003  | 2.76110025   | 2.236491203  |
| 72-LMC  | 131.3974     | 58,967.3555   | 0.002228307  | 0.222830749  | 0.180492907  |
| 87-LMC  | 292.7784     | 81,937.6797   | 0.003573184  | 0.357318393  | 0.289427898  |
| 93-LMC  | 71.2906      | 73,199.9531   | 0.000973916  | 0.097391592  | 0.07888719   |
| 96-LMC  | <3           | 182,338.3281  | INDETECTABLE | INDETECTABLE | INDETECTABLE |
| 100-LMC | 1,377.3871   | 112,539.1406  | 0.012239183  | 1.223918268  | 0.991373797  |
| 102-LMC | 9.1032       | 33,652.6992   | 0.000270504  | 0.02705043   | 0.021910849  |
| 116-LMC | 271.1100     | 181,393.3281  | 0.001494597  | 0.149459742  | 0.121062391  |
| 123-LMC | 13.7351      | 121,022.3906  | 0.000113492  | 0.011349222  | 0.00919287   |
| 124-LMC | 25,360.4434  | 48,999.4922   | 0.517565433  | 51.75654331  | 41.92280008  |
| 139-LMC | <3           | 123,505.0156  | INDETECTABLE | INDETECTABLE | INDETECTABLE |
| 149-LMC | 6,866.2183   | 45,119.7695   | 0.152177601  | 15.21776014  | 12.32638572  |
| 157-LMC | 269.4131     | 109,586.3906  | 0.002458454  | 0.2458454    | 0.199134774  |
| 161-LMC | <3           | 105,333.6406  | INDETECTABLE | INDETECTABLE | INDETECTABLE |
| 175-LMC | 11.2101      | 89,499.9531   | 0.000125253  | 0.012525258  | 0.010145459  |
| 176-LMC | <3           | 49,786.8750   | INDETECTABLE | INDETECTABLE | INDETECTABLE |
| 207-LMC | 1,468.0034   | 167,147.4219  | 0.008782686  | 0.878268647  | 0.711397604  |
| 242-LMC | 25.2604      | 16,932.0645   | 0.001491868  | 0.149186769  | 0.120841283  |
| 277-LMC | 17.4200      | 72,889.8281   | 0.000238991  | 0.023899082  | 0.019358257  |
| 286-LMC | 488.0406     | 99,266.5938   | 0.004916464  | 0.491646365  | 0.398233556  |
| 291-LMC | 3,113.9817   | 149,437.2500  | 0.020838055  | 2.083805544  | 1.68788249   |
| 292-LMC | 8,776.2744   | 140,786.2344  | 0.062337589  | 6.233758888  | 5.049344699  |
| 319-LMC | 90,959.7812  | 373,354.9375  | 0.243628173  | 24.36281727  | 19.73388199  |
| 255-LMC | 96,027.4609  | 177,690.0469  | 0.540421158  | 54.04211579  | 43.77411379  |
| 166-LMC | 225,475.9688 | 226,358.5469  | 0.996100973  | 99.61009729  | 80.68417881  |
| 325-LMC | 14,455.3564  | 120,282.7188  | 0.120178165  | 12.01781648  | 9.734431347  |
| 278-LMC | <3           | 71,322.06250  | INDETECTABLE | INDETECTABLE | INDETECTABLE |
| 304-LMC | 41,436.91    | 77,094.80470  | 0.53747993   | 53.74799296  | 43.53587429  |
| 285-LMC | 15,781.5700  | 94,189.8516   | 0.167550641  | 16.75506409  | 13.57160191  |

Candidatos a estudio de mutaciones

#### ANEXO No. 4: GELES DE AMPLIFICACIÓN Y CROMATOGRAMAS

Como resultado se muestran a continuación las fotografías de los geles de electroforesis de los 30 pacientes; en donde se puede observar el número de paciente analizado, y que cada paciente fue analizado por triplicado. Ver figuras No. 14-23). La presencia de las bandas en cada una de las figuras muestran que el gen BCR-ABL se amplificó correctamente.

Figura No.14: Validación y estandarización de técnicas, amplificando las tres primeras muestras

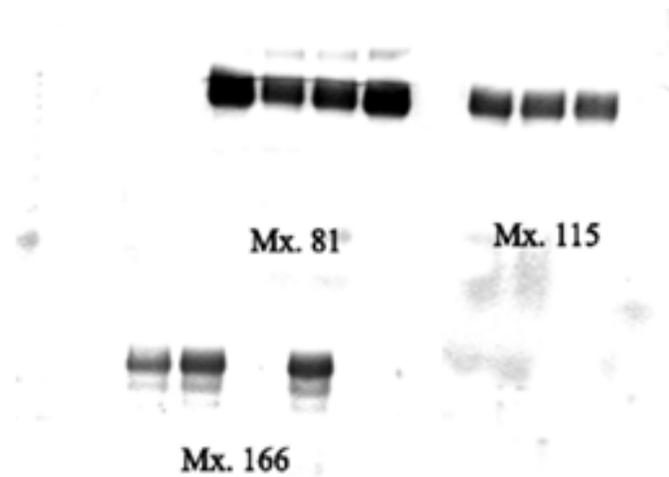


Figura No. 15: se observa la amplificación de las muestras No. LMC-149 y LMC-130

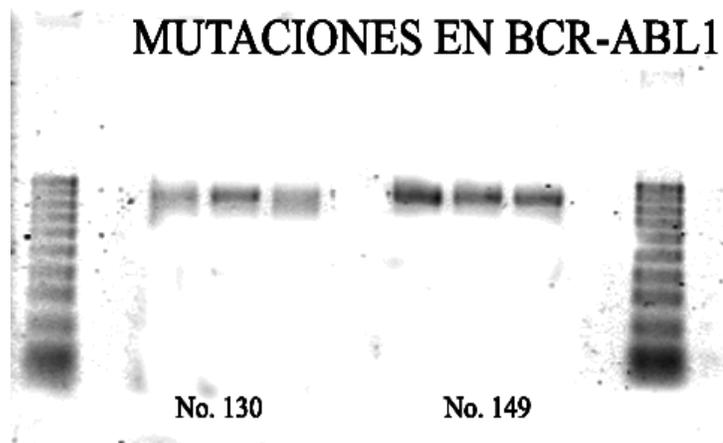


Figura No. 16: se observa la amplificación de las muestras No. LMC-191 y LMC-196

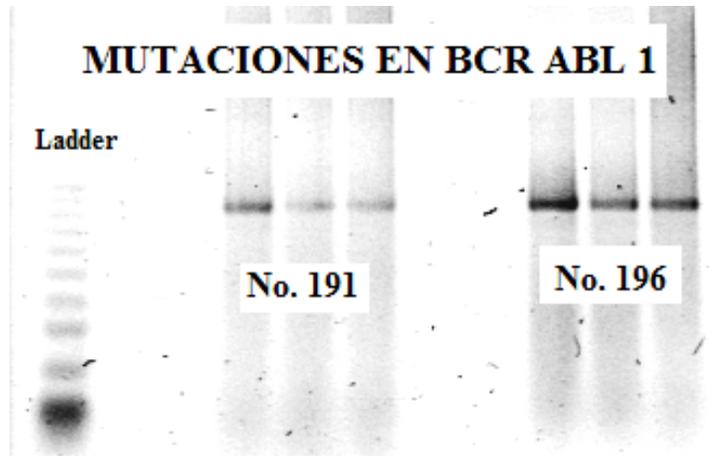


Figura No. 17: se observa la amplificación de las muestras No.LMC- 20 y LMC-70

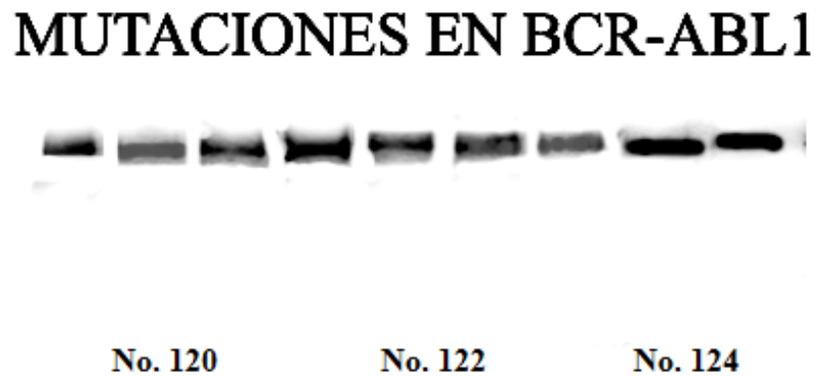


Figura No. 18: se observa la amplificación de las muestras No. LMC- 20 y LMC-70

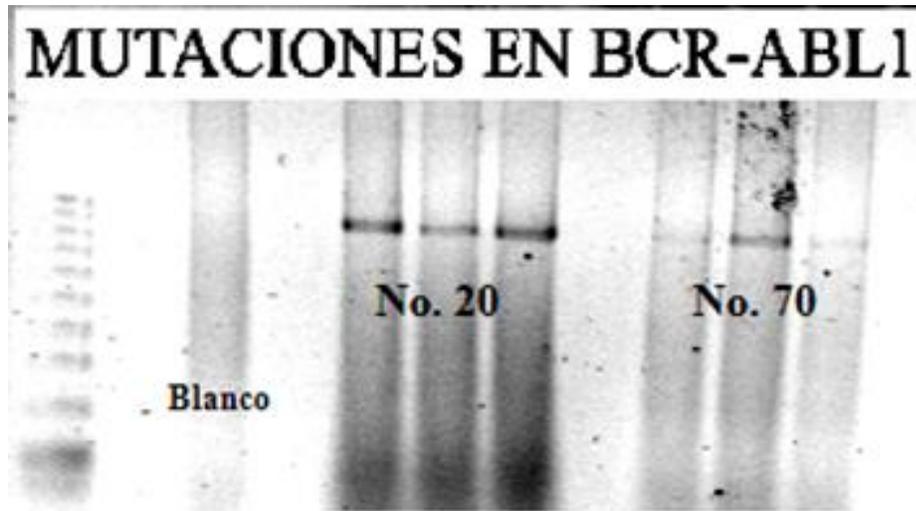


Figura No. 19: se observa la amplificación de las muestras No. 128 y 159

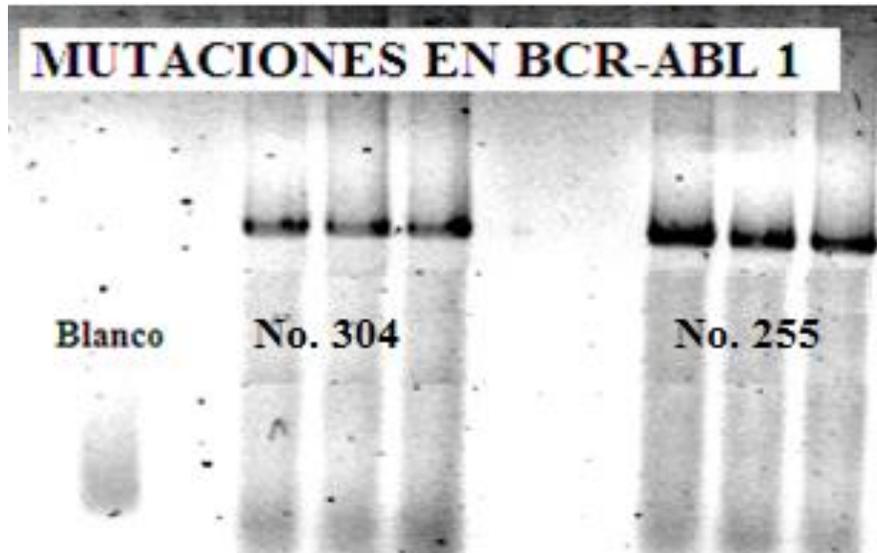


Figura No. 20: se observa la amplificación de las muestras No. LMC-160 y LMC-215

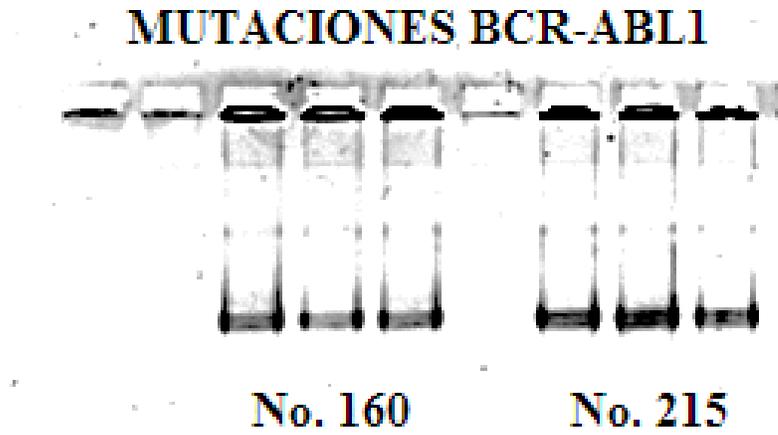


Figura No. 21: se observa la amplificación de las muestras No. 128 y 159

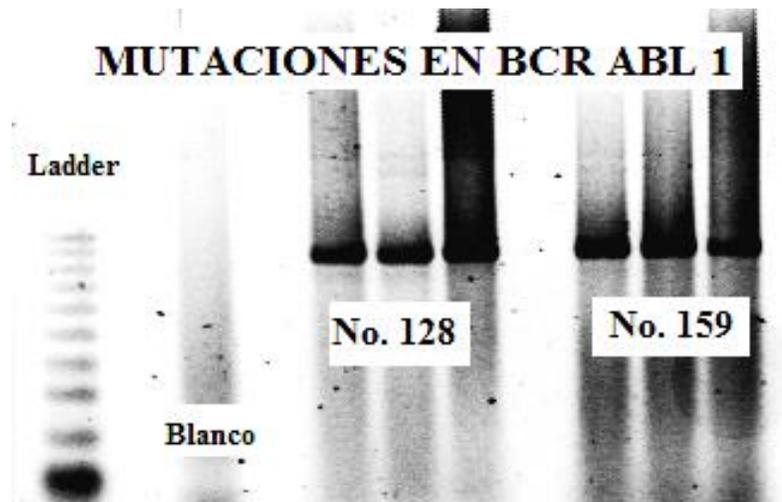


Figura No. 22: se observa la amplificación de las muestras No. 113 y 173

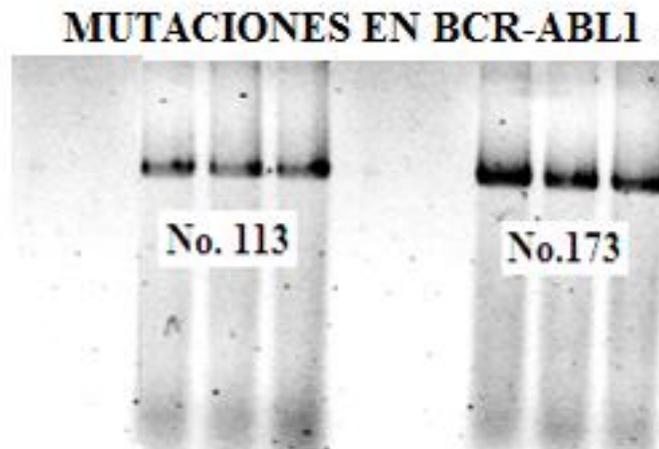


Figura No. 23: se observa la amplificación de las muestras No. 117 y 92

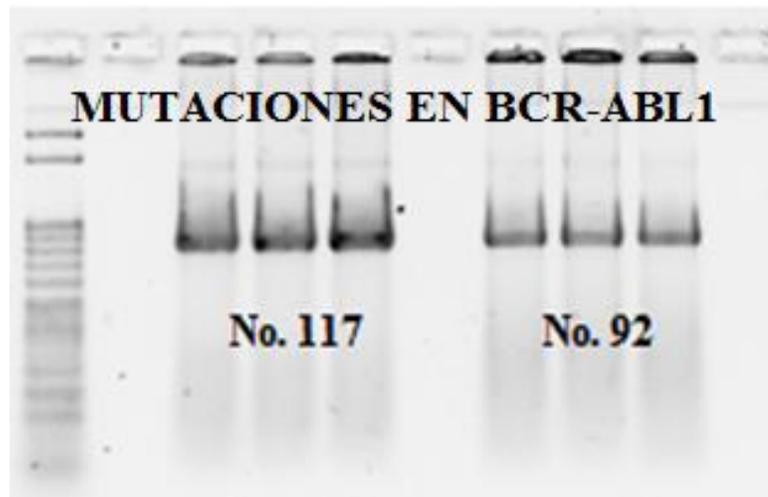


Figura No. 24: Se observa el cromatograma de la muestra No. 81 con usencia de mutaciones

# MUT-81

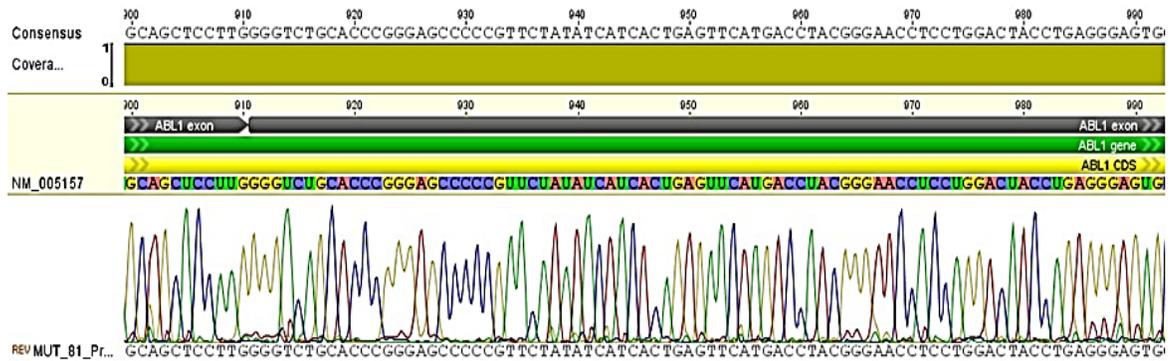


Figura No.25: Se observa el cromatograma de la muestra No. 115

# MUT-115

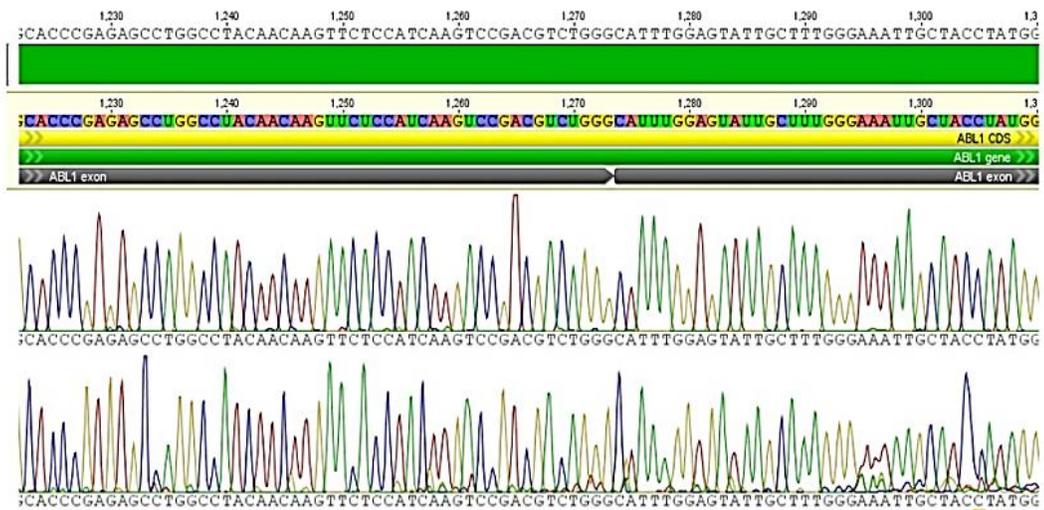


Figura No. 26: Se observa el cromatograma de la muestra No. 120

# MUT-120: WT

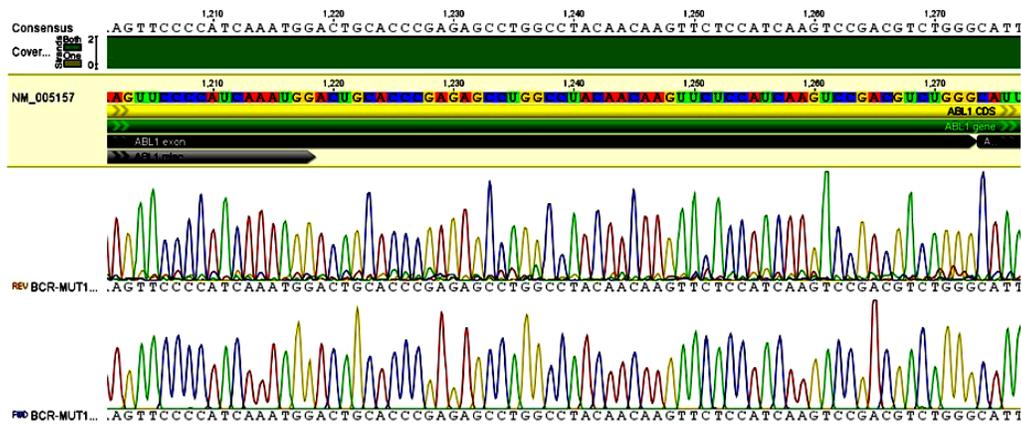


Figura No. 27: Se observa el cromatograma de la muestra No. 122

# MUT-124

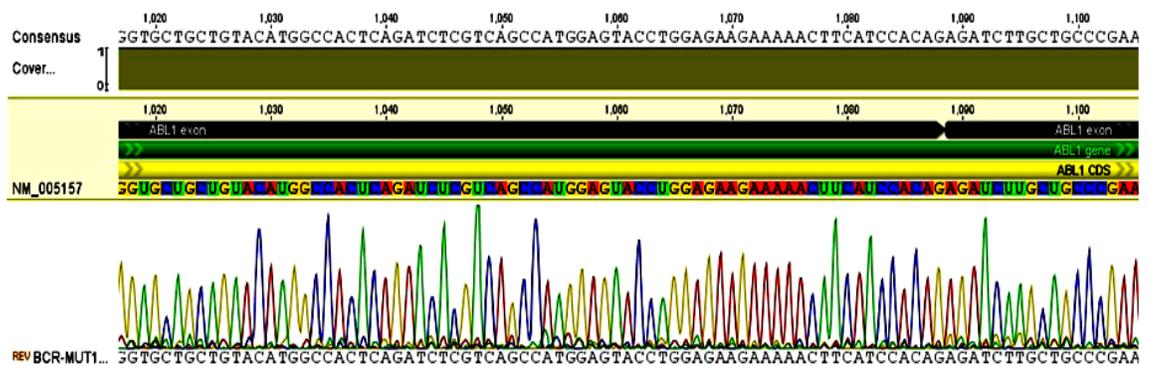


Figura No. 28: Se observa el cromatograma de la muestra No. 122

# MUT-122:WT

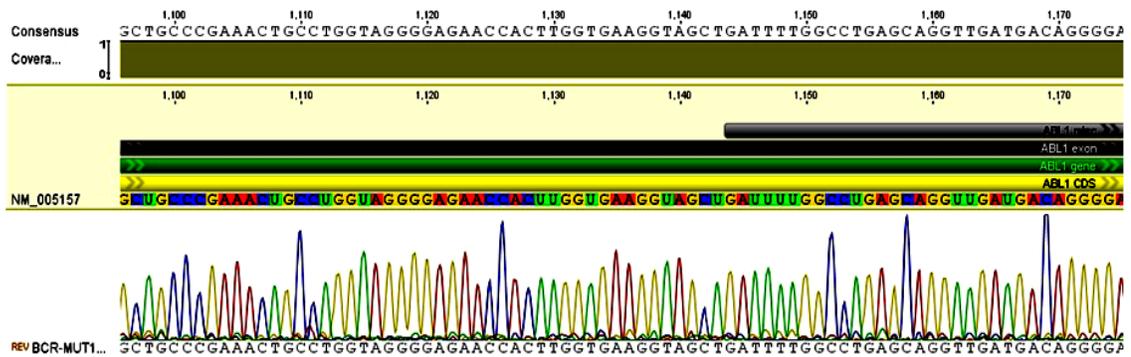


Figura No. 29: Se observa el cromatograma de la muestra No. 130

# MUT-149

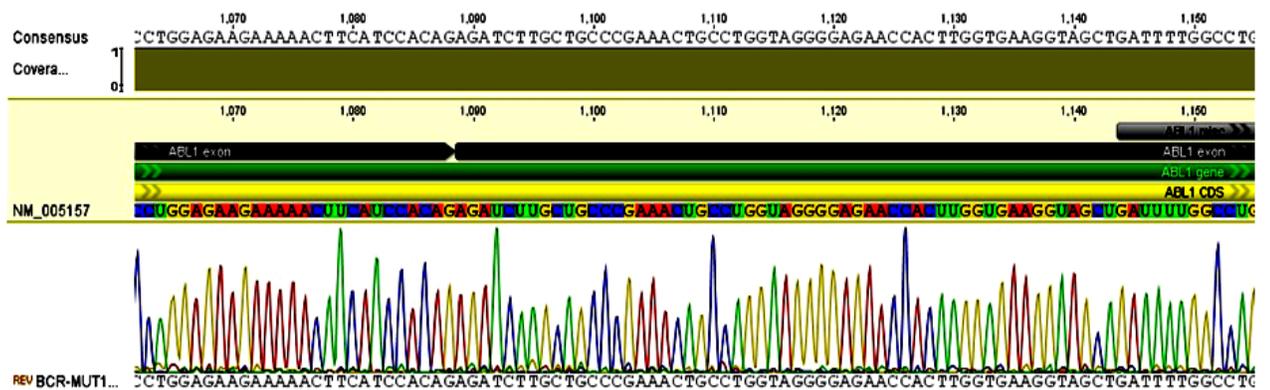


Figura No. 30: Se observa el cromatograma de la muestra No. 130

# MUT-130

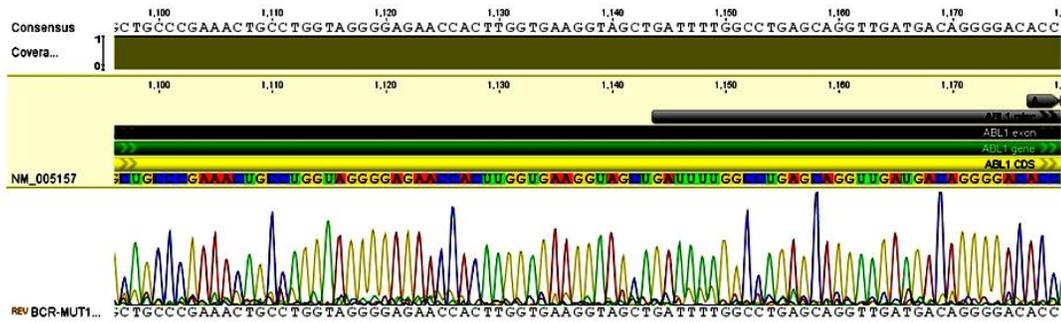


Figura No. 31: Se observa el cromatograma de la muestra No. 166

# MUT-166

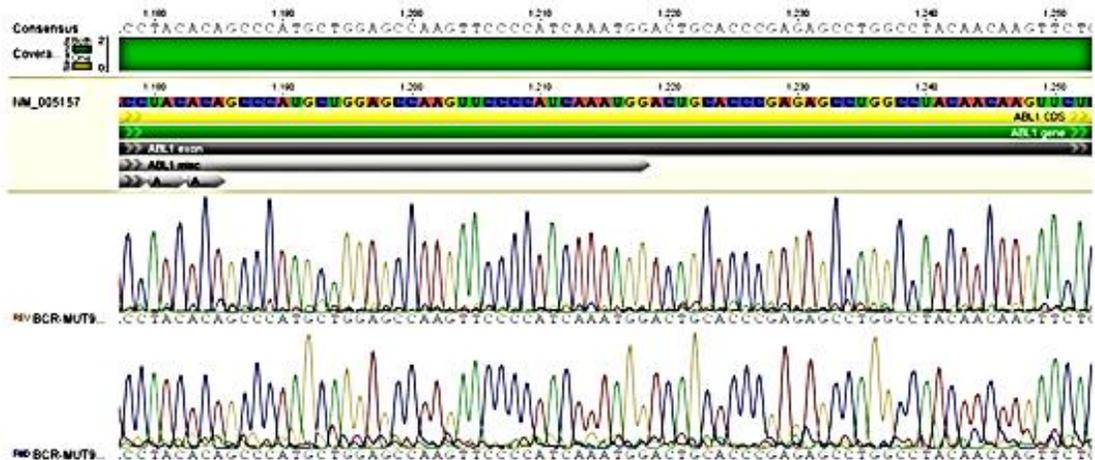


Figura No. 32: Se observa el cromatograma de la muestra No. 191

# MUT191

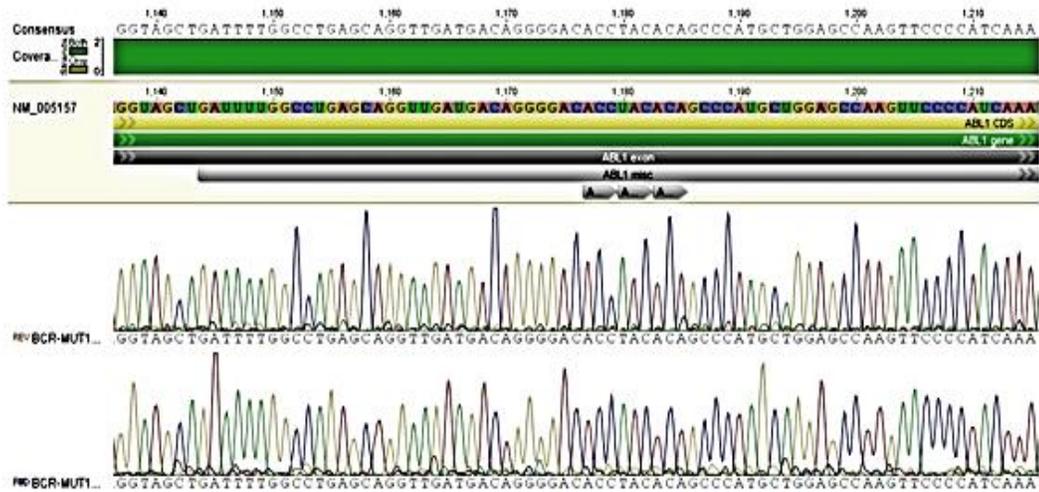


Figura No. 33: Se observa el cromatograma de la muestra No. 196

# MUT 196

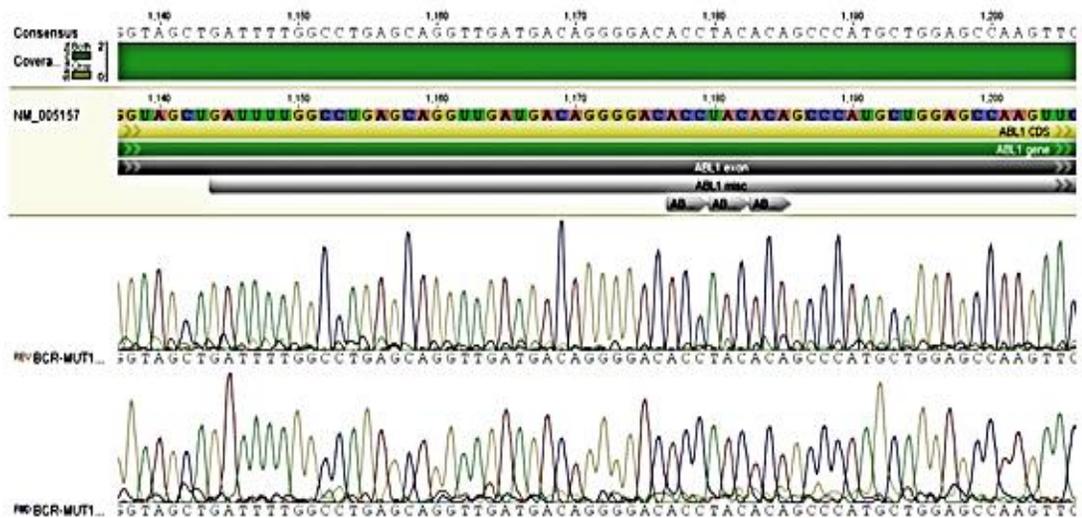




Figura No. 36: Se observa el cromatograma de la muestra No. 255

## MUT-255:WT

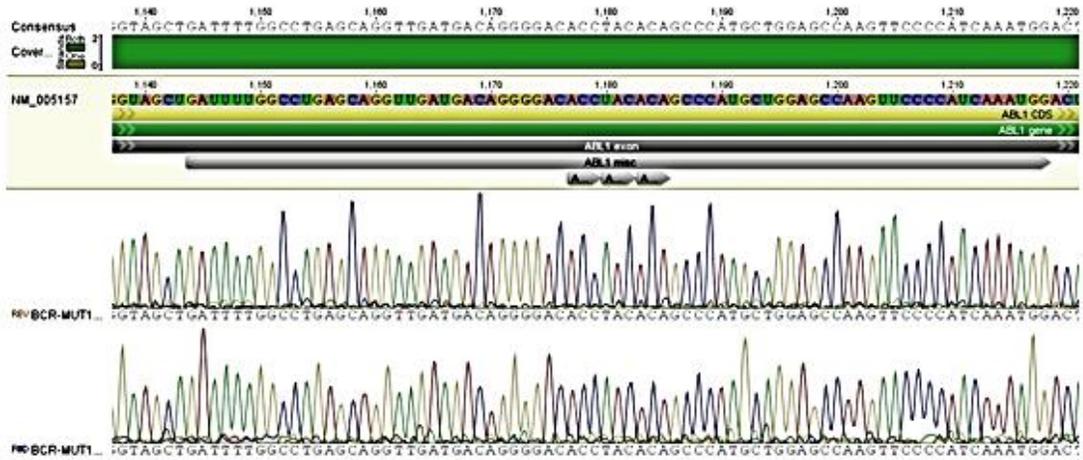


Figura No. 37: Se observa el cromatograma de la muestra No. 113

## MUT-113

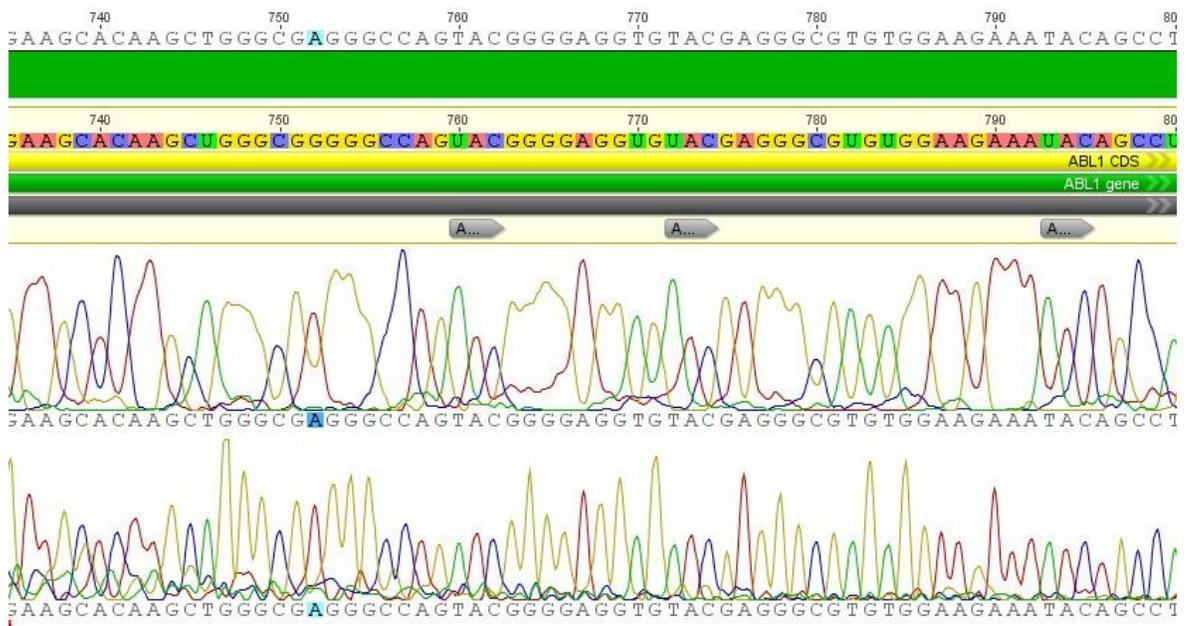


Figura No. 38: Se observa el cromatograma de la muestra No. 20

**MUT-20**



Figura No. 39: Se observa el cromatograma de la muestra No. 92

**MUT 92**

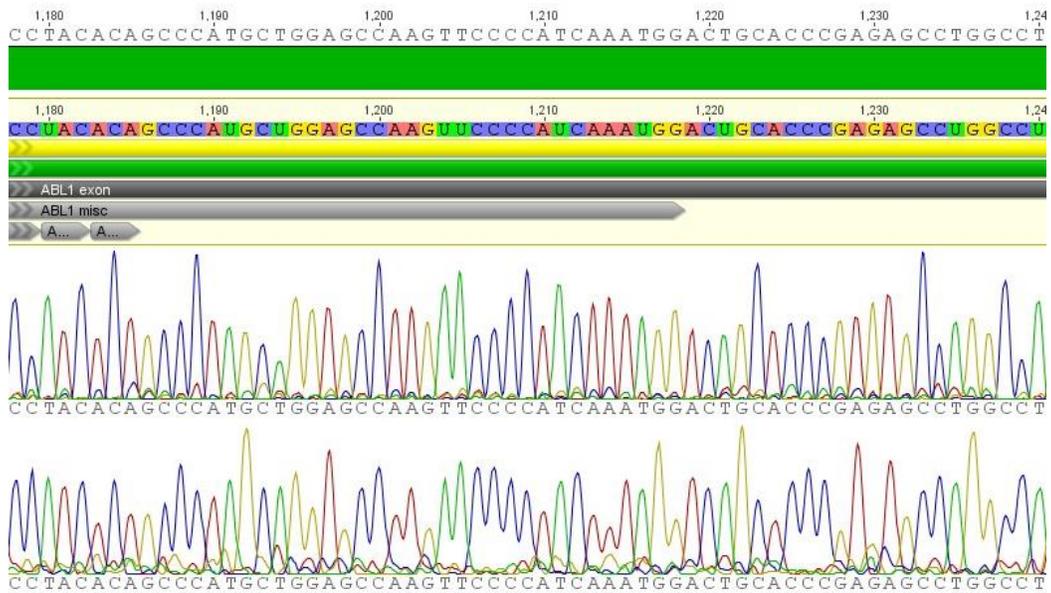


Figura No. 40: Se observa el cromatograma de la muestra No. 128

**MUT-128**



Figura No. 41: Se observa el cromatograma de la muestra No. 159

**MUT-159**

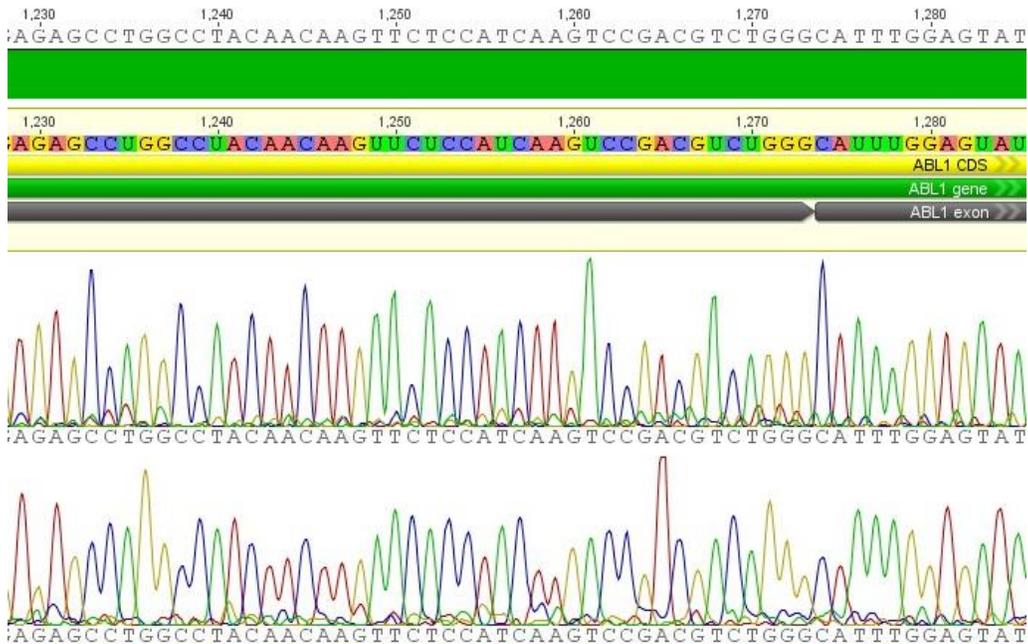


Figura No. 42: Se observa el cromatograma de la muestra No. 173

**MUT-173**

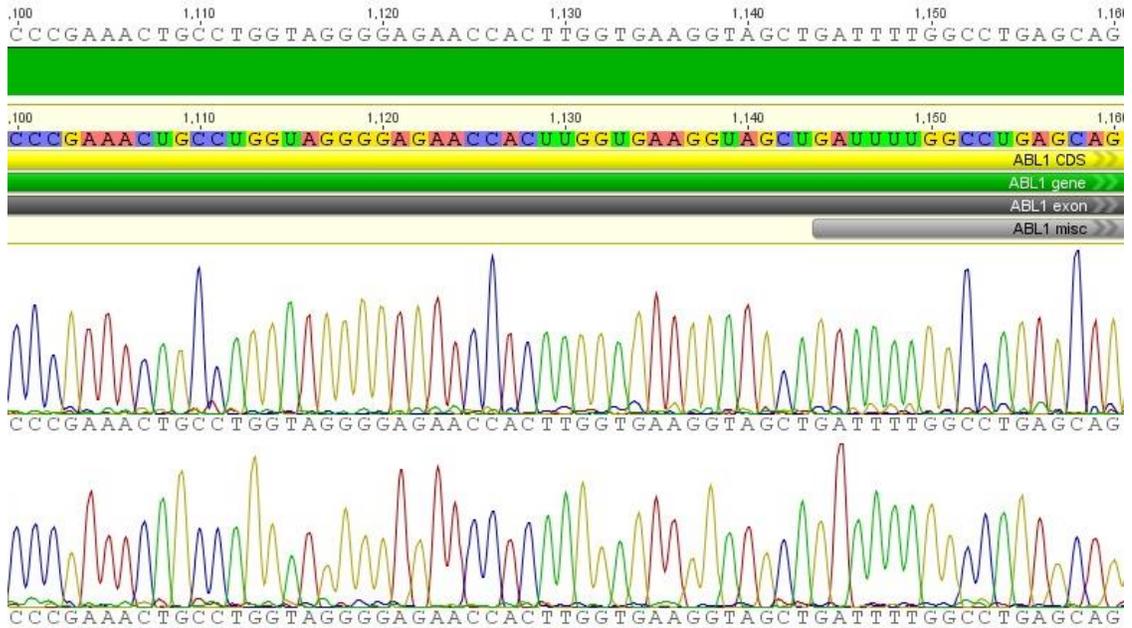


Figura No. 43: Se observa el cromatograma de la muestra No. 184

**MUT-184**

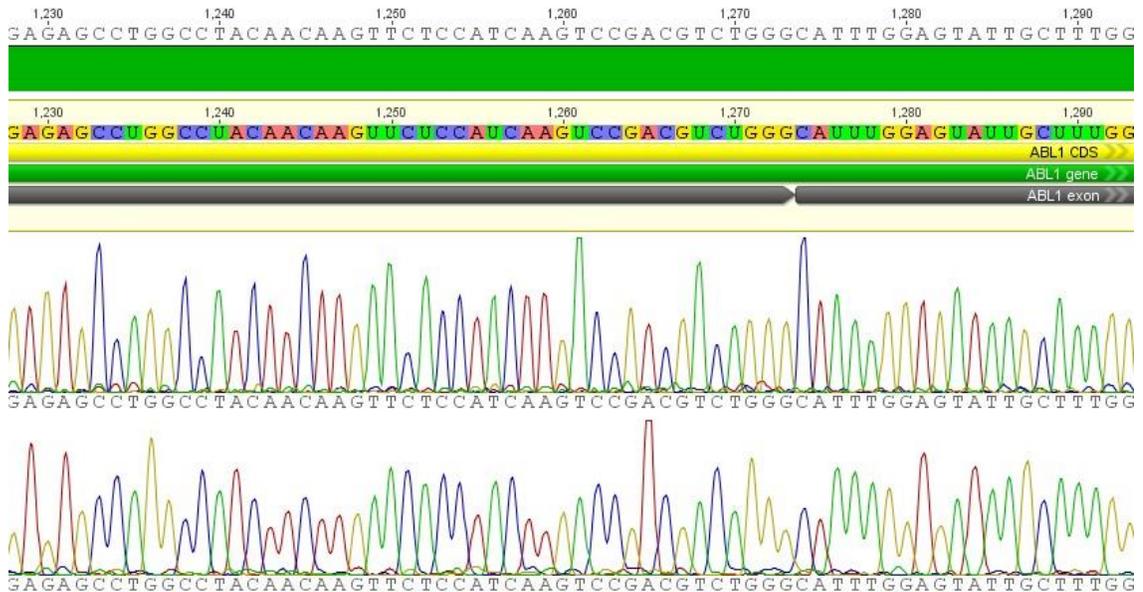


Figura No. 44: Se observa el cromatograma de la muestra No. 207

### MUT-207

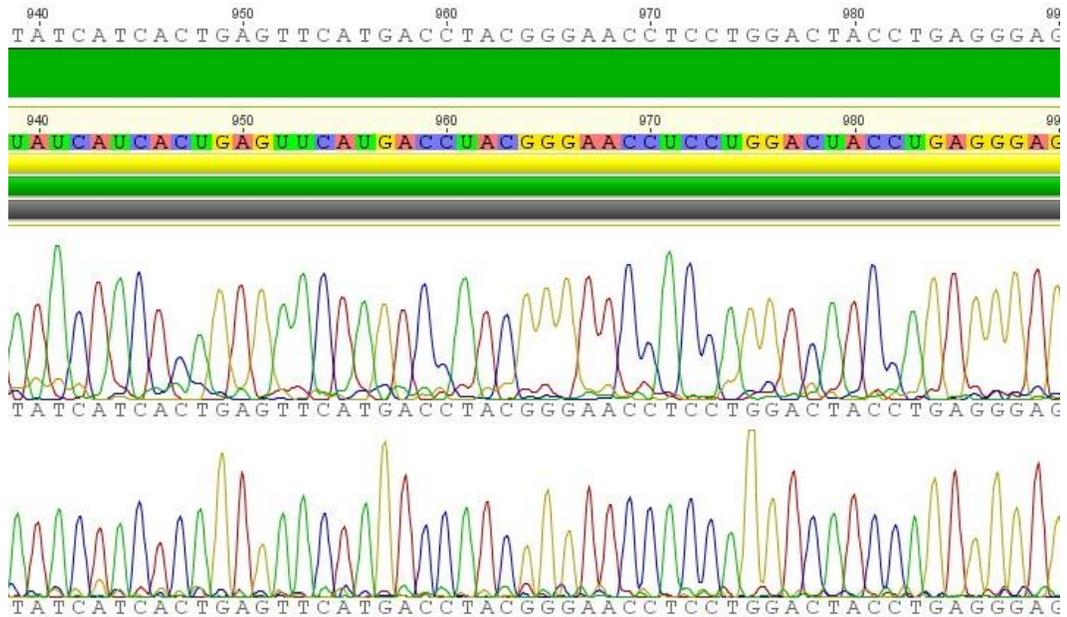
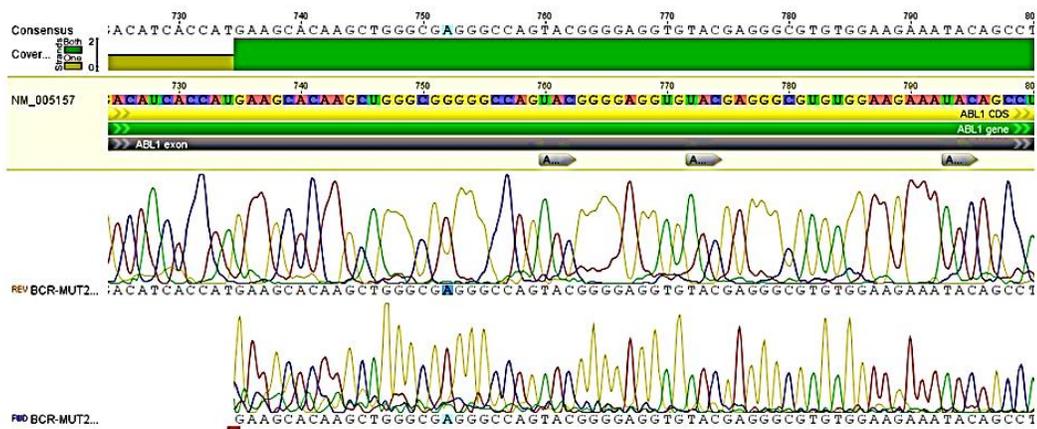


Figura No. 45: Se observa el cromatograma de la muestra No. 20

### MUT-20



c.752 G>A G250E ( DOMINIO P-LOOP)

Figura No. 46: Se observa el cromatograma de la muestra No. 160

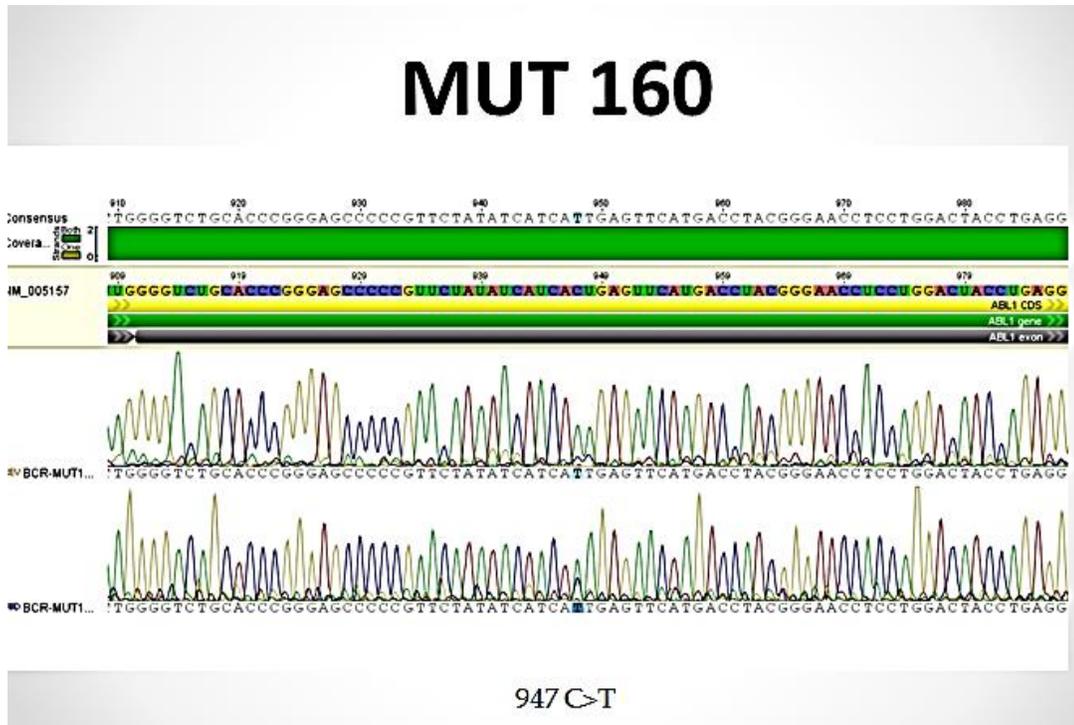


Figura No. 47: Se observa el cromatograma de la muestra No. 49

## MUT-49

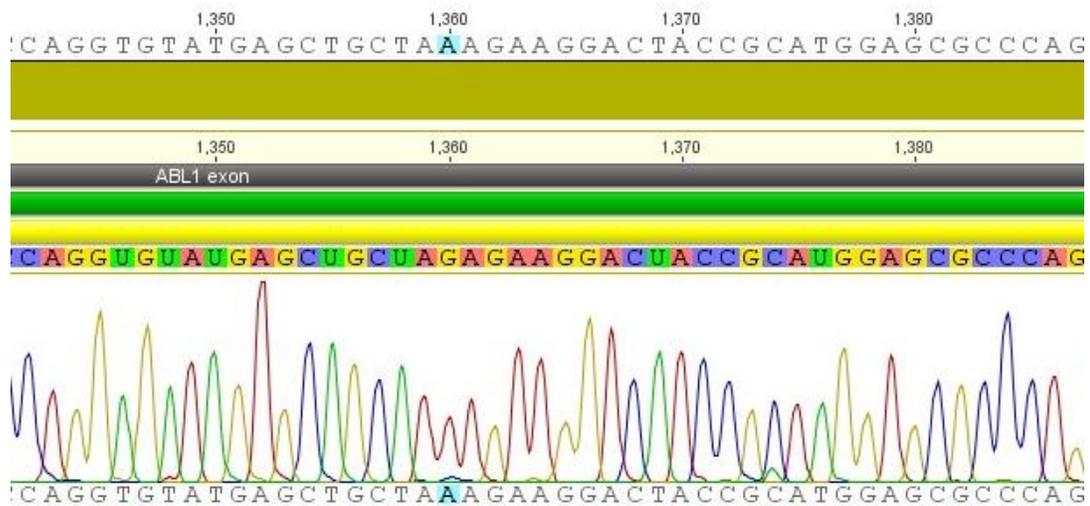


Figura No. 48: Se observa el cromatograma de la muestra No. 49

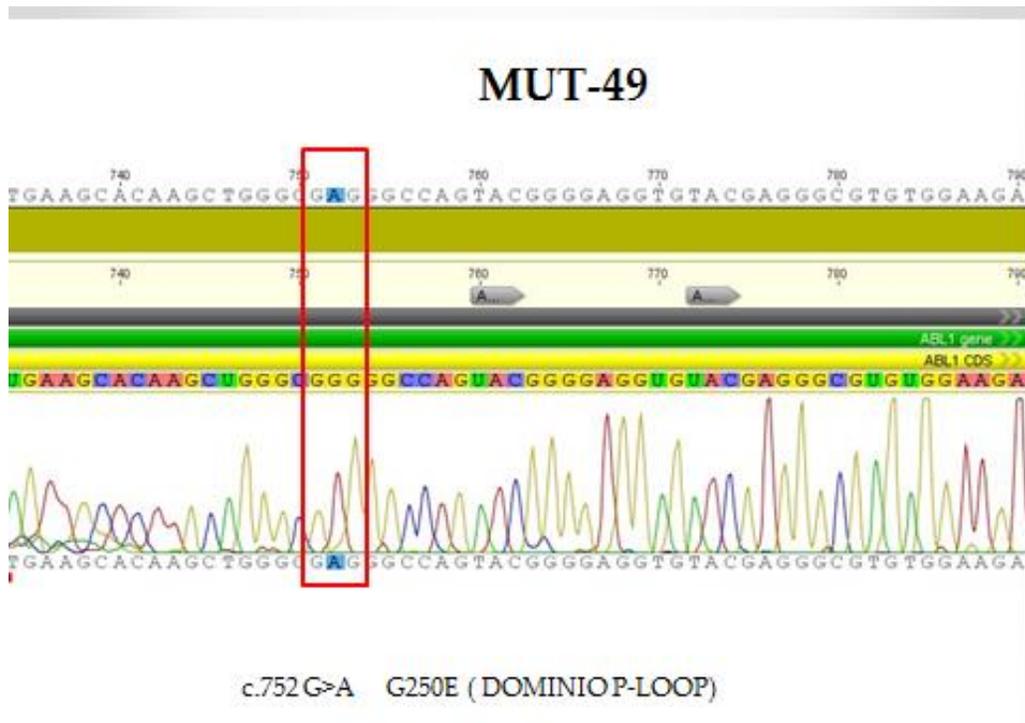


Figura No. 49: Se observa el cromatograma de la muestra No. 71

**MUT-71**

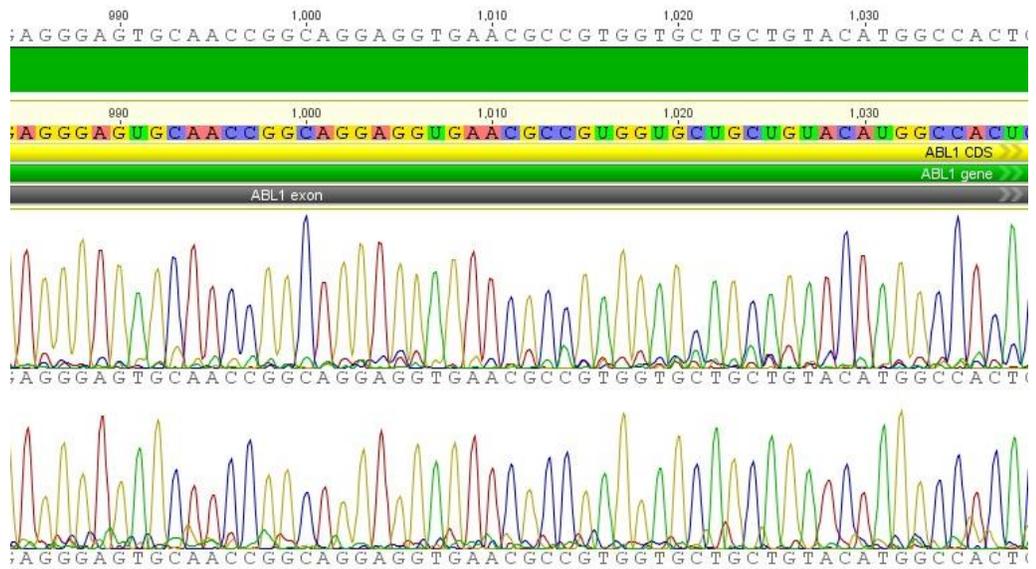


Figura No. 50: Se observa el cromatograma de la muestra No. 85

**MUT-85**

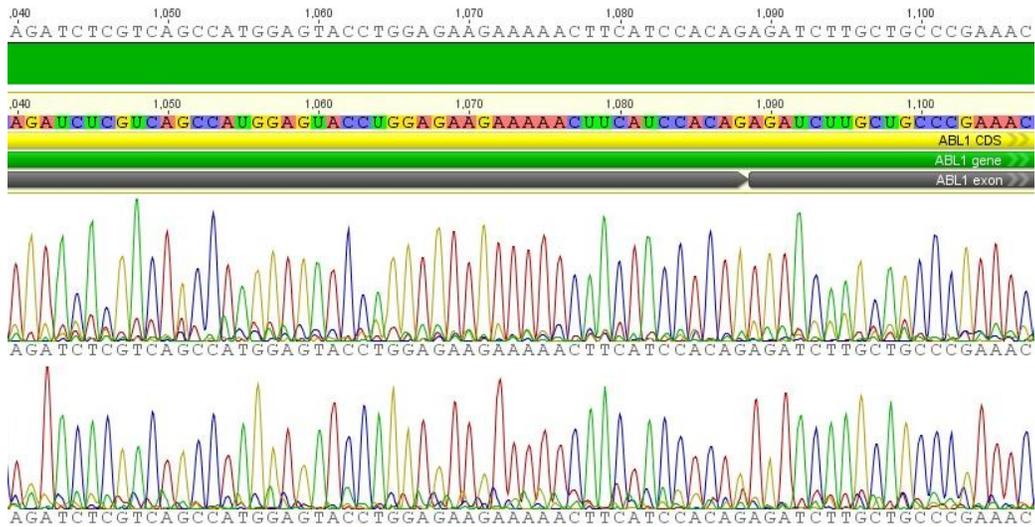


Figura No. 51: Se observa el cromatograma de la muestra No. 182

**MUT-182**

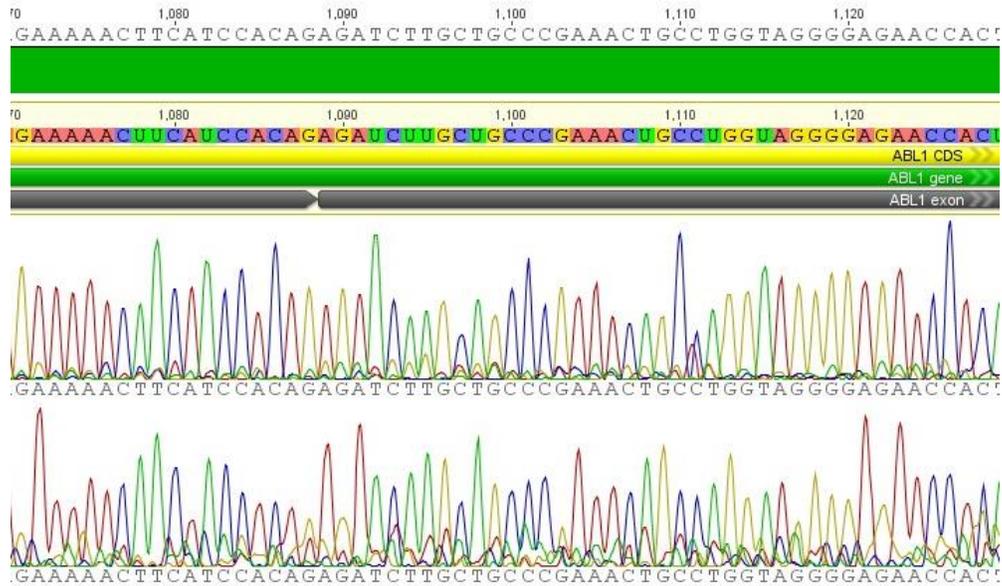


Figura No. 52: Se observa el cromatograma de la muestra No. 117

**MUT-117**

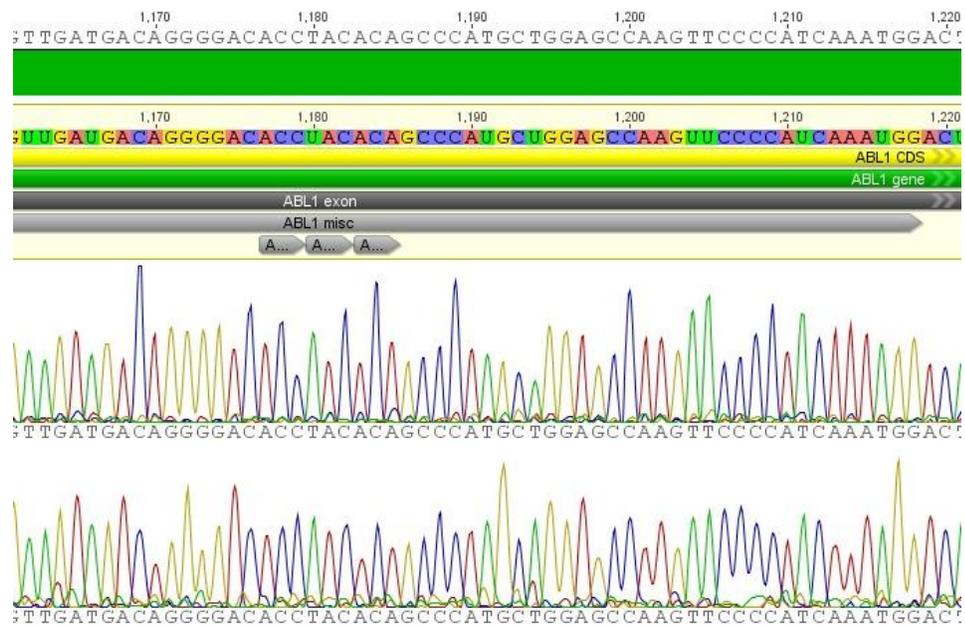


Figura No. 53: Se observa el cromatograma de la muestra No. 16

### MUT-16

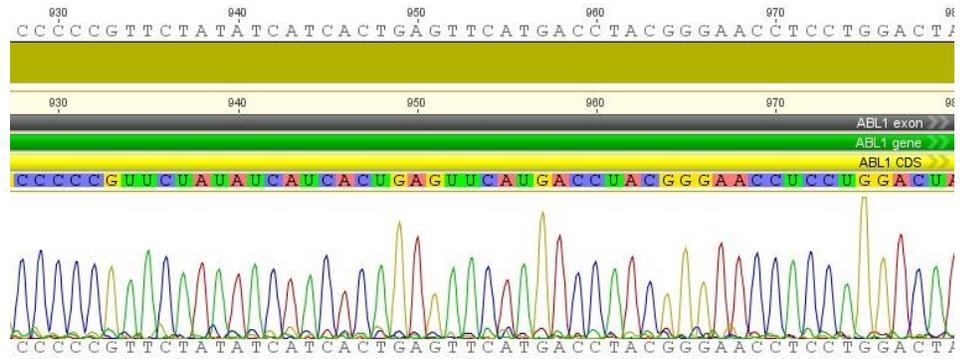
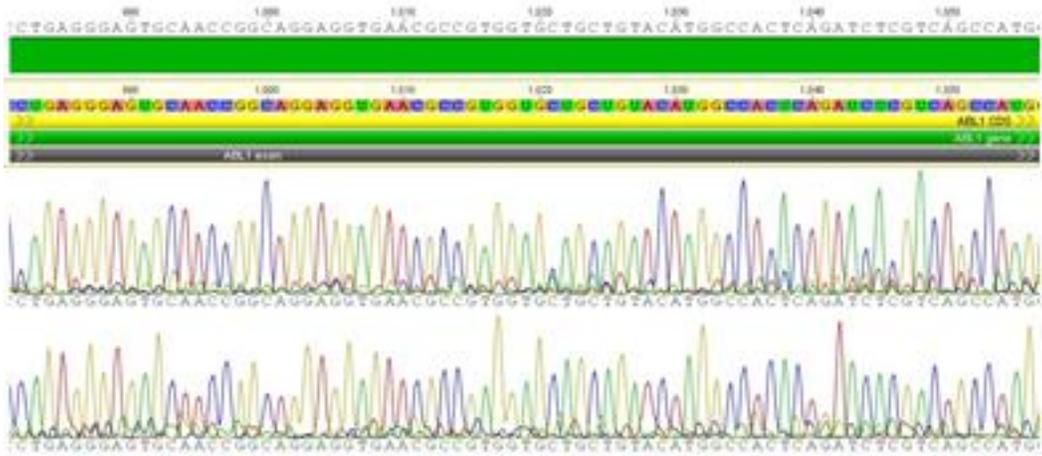


Figura No. 54: Se observa el cromatograma de la muestra No. 123

# MUT-123



## **ANEXO No. 5: Consentimiento informado para pruebas Genéticas**

### **1. Título del proyecto**

**Detección de mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL, como causa de resistencia al tratamiento con Imanitib; en pacientes con leucemia mieloide crónica.**

(Este estudio se basará en el análisis de mutaciones con el fin de determinar fallo de terapia y resistencia al tratamiento)

### **2. Investigador Principal**

Dra. Claudia Carranza

### **3. Institución**

INVEGEM

---

El presente documento es un consentimiento informado que le brindará a usted y su familia información importante sobre el presente estudio. Puede que el documento contenga palabras que usted no entienda. Por favor pregunte al investigador encargado o a cualquier personal del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente. Usted puede llevarse a su casa una copia de este consentimiento informado para pensar sobre este estudio o para discutir con su familia o amigos antes de tomar la decisión de participar en él.

## **INTRODUCCIÓN**

Usted ha sido invitado a participar en esta investigación. Antes de que usted decida participar en el estudio por favor lea este documento cuidadosamente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

## **PROPOSITO DEL ESTUDIO**

El propósito del presente estudio es determinar la presencia de mutaciones en el gen BCR-ABL y su asociación con resistencia al imatinib en pacientes con leucemia mieloide; lo cual le servirá al médico para establecer fallo a terapia y cambia de tratamiento.

Y por otro lado este estudio brindará información para futuros proyectos de investigación relacionados con la enfermedad que usted padece; que permitan conocer mejor los mecanismos de producción del cáncer y así facilitar la cura del mismo.

## **PARTICIPANTES**

Las personas que podrán participar en este estudio deben de tener un diagnóstico confirmado de leucemia mieloide crónica, y además cumplir con los siguientes criterios de inclusión:

### *Criterios de Inclusión*

- Pacientes de 0-99 años
- Diagnóstico confirmado de leucemia mieloide crónica
- Presencia de cromosoma philadelphia ( BCR-ABL)
- Tener tratamiento con Imatinib.
- No estar en respuesta molecular mayor ( > 0.1% en Escala internacional)

Criterios de exclusión:

- Paciente que presente otras formas de leucemia
- Pacientes sin presencia de cromosoma philadelphia.

Con el fin de detectar la presencia de mutaciones en el gen BCR-ABL, el presente estudio requiere su participación, ya que reúne los criterios de inclusión para colaborar con el estudio. **Su participación es completamente voluntaria y puede abandonar el estudio en cualquier momento sin ser penalizado.**

## **PROCEDIMIENTOS**

El cumplimiento de uno o más de los criterios de inclusión indican que su médico sospecha que usted tiene leucemia mieloide crónica philadelphia positivo, y por lo tanto se procede a la extracción de sangre periférica y médula ósea. La extracción de sangre periférica se llevará a cabo por venopunción (extracción de sangre de una vena )y la de médula ósea por punción al interior del hueso; la muestra extraída será enviada en un tubo con tapa morada al laboratorio de biología molecular de INVEGEM, para su respectivo análisis.

## **RIESGOS**

Los riesgos de la venopunción son mínimos y generalmente se relacionan a hematomas (moretes que se quitan con el tiempo) en el lugar de punción, los cuales no representan un riesgo para su salud y desaparecen en pocos días, sin necesidad de tratamiento. Además puede causar dolor, mareos y en raras ocasiones infecciones. Los riesgos de la extracción de médula ósea también son mínimos, pueden encontrarse en algunas ocasiones sangrado o infecciones, hematomas y dolor.

## **BENEFICIOS**

La determinación de la presencia mutaciones en el gen BCR-ABL, permite al médico conocer la resistencia al Imatinib por parte del paciente; y establecer el fallo de terapia, que sirva como base para cambio a terapia de segunda línea.

Y por último también su información ayudará en otros proyectos de investigación que ayuden a la cura y tratamiento del cáncer.

Además sus resultados contribuirán a mejor conocimiento de la leucemia mieloide crónica en Guatemala.

Sin importar el resultado del análisis, se le entregará una copia de los resultados como evidencia del análisis efectuado en el estudio.

## **COSTOS**

La presente prueba tiene un costo elevado, sin embargo por ser parte de este estudio se le realizará de forma gratuita.

## **PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD**

Si usted elige participar en este estudio, el investigador del estudio conseguirá información personal sobre usted. Esto puede que incluya la información que puede identificarle. También puede conseguir información sobre su salud incluyendo, expedientes médicos actuales y del pasado que pueden incluir resultados de laboratorios, placas o exámenes físicos

Los resultados de esta investigación pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en las reuniones médicas, pero **su identidad no será divulgada. La información de su salud será mantenida tan confidencial como sea posible bajo la ley.** Esta autorización servirá hasta el final del estudio, a menos que usted la cancele antes. Usted puede cancelar esta autorización en cualquier momento enviando un aviso escrito al Investigador Principal: Dra. Claudia Carranza Coordinadora de Laboratorios INVEGEM Tel. 40507444 Correo electrónico: [ccarranza@invegem.org](mailto:ccarranza@invegem.org)

Si usted cancela esta autorización, el Investigador Principal no usará ni divulgará su información personal ni de su salud.

La autorización para el uso y el acceso de la información protegida de la salud para los propósitos de la investigación es totalmente voluntaria.

## **PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIOS**

Su participación en este estudio es **voluntaria**. Usted puede decidir participar o retirarse del estudio en cualquier momento, su decisión no resultará en ninguna penalidad.

## **UTILIZACIÓN DE MUESTRAS Y RESULTADOS**

La muestra de médula ósea o sangre obtenida de usted será utilizada para el presente estudio; y no saldrá del país, el análisis se realizará en INVEGEM. Se podrá almacenar su muestra para futuros estudios dentro de las instalaciones de INVEGEM, y se podrá utilizar para otros estudios que ayuden al tratamiento del cáncer, siempre con la respectiva aprobación del comité nacional de ética en salud.

## **PREGUNTAS**

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio o sobre su participación usted puede contactar a:

Dra. Claudia Carranza Coordinadora de Laboratorios INVEGEM Tel. 40507444 Correo electrónico: [ccarranza@invegem.org](mailto:ccarranza@invegem.org) .

## **OTROS ASPECTOS DE INTERÉS:**

- Si existiera información de relevancia en el presente estudio, se le dará conocimiento del mismo.
- No se dará ningún tipo de compensación para la participación, su participación es totalmente voluntaria.
- Siempre se respetará la opinión de cada participante

- No existe ningún conflicto de interés con respecto al patrocinio del proyecto ni en el equipo investigador.

No firme este consentimiento a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y recibir contestaciones satisfactorias.

Si usted firma, aceptando su participación en este estudio, recibirá una copia del consentimiento con su firma, el sello de aprobación de INVEGEM y la fecha.

## DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Señores

Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas  
INVEGEM

Yo, \_\_\_\_\_ (nombre y apellidos) de \_\_\_\_ años edad y con cédula de vecindad o DPI \_\_\_\_\_ he sido informado/a sobre la participación en el proyecto **“Detección de mutaciones en el gen quimérico BCR-ABL, como causa de resistencia al tratamiento con Imanitib; en pacientes con leucemia mieloide crónica,** en el que se tomará una muestra de sangre periférica o médula ósea para la realización de las pruebas necesarias. El resultado de la prueba brindará información a mi médico sobre la respuesta al medicamento imatinib de mi enfermedad.

El procedimiento de extracción de sangre periférica o médula ósea constituye un procedimiento seguro para mi salud y sin complicaciones importantes o que afecten mi integridad física.

Autorizo el uso de la muestra de sangre periférica o médula ósea para la presente investigación y otras investigaciones que contribuyan a conocer más sobre el comportamiento y tratamiento de la enfermedad.

Por lo tanto, otorgo mi consentimiento para la extracción de sangre periférica o médula ósea y uso del resultado de mi prueba para la presente investigación. Comprendo que mis datos pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en reuniones médicas, pero mi identidad no será divulgada.

Fecha: \_\_\_\_\_

Firma del Paciente o huella digital: \_\_\_\_\_

Firma del médico/persona que realizó la extracción: \_\_\_\_\_

Sello de la  
institución

ANEXO No. 6:

Mutaciones más frecuentes que causan resistencia a Imatinib y otros inhibidores

|                                                         |                 | IC <sub>50</sub> fold increase (WT = 1) |          |           |           |
|---------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|----------|-----------|-----------|
|                                                         |                 | Bosutinib                               | Imatinib | Dasatinib | Nilotinib |
|                                                         | <b>Parental</b> | 38.31                                   | 10.78    | > 50      | 38.43     |
|                                                         | <b>WT</b>       | 1                                       | 1        | 1         | 1         |
| <b>P-LOOP</b>                                           | L248V           | 2.97                                    | 3.54     | 5.11      | 2.80      |
|                                                         | G250E           | 4.31                                    | 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      | 10.31     |
| <b>C-Helix</b>                                          | D276G           | 0.60                                    | 2.18     | 1.44      | 2.00      |
|                                                         | E279K           | 0.95                                    | 3.55     | 1.64      | 2.05      |
| <b>ATP binding region</b><br>(drug contact sites)       | V299L           | 26.10                                   | 1.54     | 8.65      | 1.34      |
|                                                         | T315I           | 45.42                                   | 17.50    | 75.03     | 39.41     |
|                                                         | F317L           | 2.42                                    | 2.60     | 4.46      | 2.22      |
| <b>SH2-contact</b>                                      | M351T           | 0.70                                    | 1.76     | 0.88      | 0.44      |
| <b>Substrate binding region</b><br>(drug contact sites) | F359V           | 0.93                                    | 2.86     | 1.49      | 5.16      |
| <b>A-LOOP</b>                                           | L384M           | 0.47                                    | 1.28     | 2.21      | 2.33      |
|                                                         | H396P           | 0.43                                    | 2.43     | 1.07      | 2.41      |
|                                                         | H396R           | 0.81                                    | 3.91     | 1.63      | 3.10      |
|                                                         | G398R           | 1.16                                    | 0.35     | 0.69      | 0.49      |
| <b>C terminal lobe</b>                                  | F486S           | 2.31                                    | 8.10     | 3.04      | 1.85      |

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| <b>Sensitive</b>            | ≤ 2     |
| <b>Moderately resistant</b> | 2.01-4  |
| <b>Resistant</b>            | 4.01-10 |
| <b>Highly resistant</b>     | > 10    |

JCO 2009, Redaelli, 269-71

**20. ORDEN DE PAGO (deberá estar contenida en una sola hoja)****LISTADO DE TODOS LOS INTEGRANTES DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN**

|                                             |  |
|---------------------------------------------|--|
| Contratados por contraparte y colaboradores |  |
| Dr. Mauricio Villegas                       |  |
| Licda. Mariana Herrera                      |  |

**CONTRATADOS POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN**

| Nombre                       | Categoría                           | Registro Personal | de Pago  |    |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------|----------|----|
|                              |                                     |                   | SI       | NO |
| <b>Dra. Claudia Carranza</b> | <b>Titular 1</b>                    | <b>20020184</b>   | <b>X</b> |    |
| <b>Lic. Darwin Alvarez</b>   | <b>Auxiliar de Investigación II</b> | <b>20140578</b>   | <b>X</b> |    |

| Nombre                       | Firma |
|------------------------------|-------|
| <b>Dra. Claudia Carranza</b> |       |
| <b>Lic. Darwin Alvarez</b>   |       |

---

Dra. Claudia Carranza, Coordinadora del Proyecto

---

Vo. Bo. Dr. Roberto Flores Arzú, Director, Instituto de Investigación de Ciencias Químicas y Biológicas

---

Vo. Bo. Dra. Hilda Valencia de Abril, coordinadora del PUIIS, Dirección General de Investigación

---

Vo. Bo. Julio Rufino Salazar, Coordinador General de Programas, Dirección General de Investigación