



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

Nombre del Proyecto

Detección de mutaciones en el gen de fusión *BCR-ABL1* con valor predictivo para la selección del tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica.

INFORME DE SERVICIO SOCIAL
QUE PRESENTA LA ALUMNA

Mabel Muciño Sánchez.

Matricula:2192799216

ASESORES

Asesor Interno: M. en C. German Castro Mejía.

No. Económico: 23759

Asesor Externo: M. en C. Miguel Angel Cid Soto.

Cédula: 09997484

México, CDMX.

Fecha: enero 2024.



Resumen

El presente documento describe las actividades realizadas por la Pasante de la Licenciatura en Biología durante su estancia en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). La leucemia mieloide crónica (LMC) es una de las enfermedades hemato-oncológicas más comunes en población adulta y se caracteriza por la presencia del gen de fusión *BCR-ABL1*. Actualmente, el tratamiento en la LMC consiste en el uso de un inhibidor altamente específico de la actividad de la oncoproteína BCR-ABL1, denominado imatinib. Pese al éxito de este tratamiento, un número importante de pacientes desarrollan resistencia al imatinib, debido principalmente a la presencia de mutaciones en el dominio cinasa del gen de fusión *BCR-ABL1*. El objetivo del proyecto al que me incorporé durante mi servicio social es la detección de mutaciones puntuales en el gen de fusión *BCR-ABL1* en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica resistentes al tratamiento. En este estudio se incluyeron 22 pacientes con diagnóstico previo de LMC que presentaron resistencia al tratamiento con imatinib y 8 líneas celulares derivadas de cáncer de mama. Durante mi estancia se realizó la extracción de RNA de estas muestras, seguida por la síntesis de DNA complementario y la amplificación de un fragmento del gen *GAPDH* por PCR punto final. Posteriormente, se realizó la amplificación de un fragmento de 863 pb, correspondiente al dominio de cinasa del gen de fusión *BCR-ABL1*, mediante PCR anidada en el caso de las muestras de LMC y por PCR convencional en el de las líneas celulares. Para la amplificación por PCR se probaron las enzimas Taq Gold y Phusion. Los amplicones obtenidos fueron analizados por secuenciación Sanger. Como parte de los resultados, se encontró que el protocolo de amplificación con el uso de la enzima Phusion fue más eficiente, debido a la alta fidelidad de la enzima, respecto a los resultados de Secuenciación. En cuanto a la detección de mutaciones, en muestras de LMC se encontraron las mutaciones F317L, E450K y F311I. Sin embargo, en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama no se encontró mutación alguna.

Palabras clave:

Leucemia Mieloide Crónica, mutaciones, gen de fusión *BCR-ABL1*, Inhibidores de Tirosina Cinasa TKIs.

Índice

1.Marco Institucional del programa o proyecto donde se insertan las actividades	4
2. Introducción	5
3. Antecedentes	14
4. Ubicación geográfica del programa o proyecto donde se realizaron las actividades del servicio social.	16
5. Objetivo general del proyecto:.....	17
6. Especificación y fundamento de las actividades a desarrollar	17
7. Impacto de las actividades del servicio social en programa o proyecto de adscripción	40
8. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social.	41
9. Fundamento de las actividades	42
10. Referencias	43

1.Marco Institucional del programa o proyecto donde se insertan las actividades

En el año 1999, la Fundación Mexicana para la salud (FUNSALUD) en conjunto con investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México, formularon un documento llamado “Desarrollo de la Medicina Genómica en México, Centro de Medicina Genómica (CEMEGEN)” el cual incluía un diagnóstico sobre la Medicina Genómica y su papel en las estrategias en salud pública en México.

En enero del 2002 se estableció formalmente el Consorcio Promotor del Instituto de Medicina Genómica, y para abril de 2004 la Cámara de Senadores, así como la Cámara de Diputados aprobó la creación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) como parte de los Institutos Nacionales de Salud. Como objetivo institucional, se estableció “Impulsar una Plataforma de Medicina Genómica en el país, mediante el desarrollo permanente de la investigación científica y la formación de recursos humanos, con el fin de contribuir al mejoramiento de la salud de los mexicanos”.

El INMEGEN tiene también como función sustantiva el desarrollo de proyectos de investigación enfocados en solucionar problemas importantes en el área de la salud pública. Una de estas líneas de investigación es la relacionada con las alteraciones genómicas presentes en enfermedades como la leucemia mieloide crónica (LMC) y es en este proyecto donde se insertaron las actividades desarrolladas durante mi Servicio Social.

2. Introducción

- La leucemia mieloide crónica

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) como una neoplasia mieloproliferativa caracterizada por una producción excesiva de células mieloides pobremente diferenciadas. Los pacientes con este tipo de enfermedad suelen empeorar lentamente con el tiempo, a medida que las células en exceso se acumulan en la sangre o la médula ósea (LLS, 2017).

La LMC representa el 15% de todas las leucemias diagnosticadas en adultos, con una incidencia a nivel mundial de 0.7- 1.0 por cada 100,000 personas al año, y una prevalencia aproximada de 3 millones de afectados (Jabbour, Kantarjian 2020). El diagnóstico usualmente ocurre a los 56 años en los países desarrollados, de acuerdo con estimaciones de EUTOS y el registro SIMPLICITY; mientras que en los países en vías de desarrollo con poblaciones más jóvenes la edad promedio al momento del diagnóstico es inferior a los 50 años (Sampaio MM et al., 2021). Esta enfermedad presenta un predominio ligeramente mayor entre los hombres que entre las mujeres. Es importante señalar que los pacientes mayores de 70 años, conforman más del 20% de los afectados. La LMC es una enfermedad rara en niños y adolescentes, representando entre el 2-3% de todas las leucemias en niños menores de 15 años y aproximadamente el 9% en adolescentes entre 15 y 19 años, con una incidencia anual promedio en niños menores de 15 años de 0.6-1 casos por millón y para pacientes de 15-19 años de edad de 2.1 casos por millón (Casanovas et al., 2019)

En México, la LMC representa aproximadamente el 10% de todas las leucemias, la edad promedio al momento del diagnóstico es de 45.8 años y alrededor de 57.8% de los afectados son varones. Sin embargo, no se tienen datos específicos sobre la prevalencia actual de la enfermedad en México (Meza-Espinoza et al., 2022).

Historia de la LMC

La LMC fue el primer tipo de Leucemia en ser reconocido, cuando entre 1841 y 1845, David Craigie, John Hughes Bannet y Rudolph Virchow reportaron hallazgos similares en autopsias de diferentes individuos, entre las que se incluía, hepatoesplenomegalia, fiebre, leucocitosis y una apariencia y consistencia inusual de la sangre (Sampaio MM et al., 2021).

Un avance importante en el área de la LMC ocurrió en 1872, cuando Ernest Neumann reconoció a la médula ósea como el tejido de origen de la leucemia. Casi cien años después, en 1960 David Hungerford y Peter Nowell describieron un cromosoma diminuto en células cultivadas a partir de la sangre de siete pacientes con leucemia mieloide crónica. Rápidamente, este cromosoma anormal fue reconocido por otros grupos de trabajo y denominado "Cromosoma Filadelfia" en

honor de la ciudad en Estados Unidos donde fue descubierto originalmente. Con la introducción de mejores técnicas de bandeado en los ensayos citogenéticos, Janet Rowley fue capaz de demostrar en 1973 que el cromosoma Filadelfia era de hecho un cromosoma 22 anómalamente pequeño (designado 22q-) y era el resultado de la translocación recíproca del material genético entre los cromosomas 9 y 22, designado como t (9;22) (Goldman, 2010). Como producto de esta translocación, el gen *ABL1* (del inglés *Abelson Murine leukemia*) en el cromosoma 9 se fusiona con el gen *BCR* (del inglés *breakpoint cluster region*) en el cromosoma 22. El gen de fusión *BCR-ABL1* codifica para una oncoproteína quimérica del mismo nombre con actividad anormalmente alta de tirosina cinasa (Jabbour, Kantarjian 2020). Actualmente es bien reconocido que la presencia del oncogen *BCR-ABL1* es la alteración central en la LMC.

Aunque Virchow sugirió el carácter neoplásico de la enfermedad, prácticamente no se sabía nada de su etiología hasta que se reconoció el incremento de la incidencia de la LMC entre los sobrevivientes que habían estado expuestos a la radiación emanada por las bombas atómicas que explotaron al final de la Segunda Guerra Mundial. Por otro lado, los pacientes tratados con radioterapia para linfoma o cáncer de mama parecen tener un riesgo significativamente mayor de desarrollar LMC. Sin embargo, la mayoría de los casos de LMC parecen ser esporádicos sin una causa predisponente conocida (Goldman, 2010).

Diagnóstico

Alrededor del 30 al 50% de los pacientes diagnosticados con LMC son asintomáticos, por lo que la sospecha de la presencia de la LMC usualmente ocurre durante la realización de exámenes de sangre rutinarios en individuos asintomáticos (Sampaio MM et al., 2021). El diagnóstico inicial de la LMC está basado en la examinación física e interrogatorio clínico (i.e anamnesis) realizado para identificar personalmente al paciente, seguido por pruebas de laboratorio. A través de la asociación de la información, es posible identificar el estadio de desarrollo de la enfermedad, así como dirigir una orientación y tratamiento adecuado. Tomando en cuenta que muchos de los pacientes son asintomáticos, para confirmar el diagnóstico clínico de la enfermedad son necesarias algunas pruebas, entre ellas un hemograma, un aspirado de médula ósea, así como ensayos citogenéticos y moleculares.

El hemograma al momento del diagnóstico muestra leucocitosis con maduración mieloide desplazada a la izquierda, revelando mielocitos y metamielocitos basófilos y eosinófilos inmaduros. Además, el recuento de plaquetas puede variar y también puede presentarse anemia. La baja actividad fagocítica es típica de la LMC lo que facilita la diferenciación de la afección de otros trastornos mieloproliferativos (Sampaio MM et al., 2021).

El aspirado de médula ósea es obligatorio en todos los casos cuando existe sospecha de LMC. Esta prueba puede proporcionar información importante, para confirmar el diagnóstico y determinar el estado de la enfermedad basado en los porcentajes de blastos y basófilos, así como de promielocitos, mielocitos y eosinófilos (Sampaio MM et al., 2021).

En cuanto a la citogenética, el hallazgo más importante es la translocación recíproca t(9;22) (q34.1;q11), que da origen al cromosoma Filadelfia (Ph). Esta translocación se encuentra presente en el 95% de los pacientes con LMC y las variantes de las translocaciones del cromosoma (Ph) pueden involucrar tres o más cromosomas. La citogenética también es de utilidad para detectar anomalías cromosómicas adicionales que son importantes para controlar la evolución clonal y la progresión de la LMC (Sampaio MM et al., 2021).

El análisis FISH (del inglés *Fluorescence in situ hybridization*) es una de las técnicas más utilizadas en aquellos casos que carecen de evidencia citogenética. Esta técnica se basa en la colocalización de grandes sondas genómicas específicas para los genes *BCR* y *ABL1* identificando rápidamente anomalías, mostrando reordenamientos *BCR-ABL1* y la t(9;22) no detectados en un cariotipo convencional aparentemente normal, revelando reordenamientos Ph negativos (Sampaio MM et al., 2021).

Cuando se combina con la citogenética convencional, el análisis FISH puede proporcionar información relevante sobre las deleciones de la fusión del gen *BCR-ABL1* y otras traslocaciones. Sin embargo, no es capaz de monitorear la evolución clonal de la enfermedad como lo hace la citogenética y los resultados dependen de sondas comerciales de alta calidad. El análisis FISH es de uso común en centros médicos y presenta una baja tasa de falsos positivos. La prueba FISH es costosa y no se encuentra disponible ampliamente, ya que requiere equipo y personal capacitado para poder realizar e interpretar el resultado de la prueba (Sampaio MM et al., 2021).

La reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa inversa (RT-PCR) se basa en la amplificación de DNA complementario (obtenido a partir del ARN mensajero), con la que se puede analizar la presencia de los transcritos *BCR-ABL1* en muestras de sangre. Las pruebas de PCR pueden ser cualitativas, proporcionando información sobre la presencia del transcrito *BCR-ABL1*, o cuantitativa para evaluar la cantidad del transcrito de *BCR-ABL1* durante el seguimiento molecular de la enfermedad (Sampaio MM et al., 2021).

Evolución clínica de la LMC

La evolución clínica de la enfermedad puede dividirse en tres fases: crónica, acelerada y blástica. Durante la fase crónica, si el sistema inmune de los individuos

es competente, puede mantenerse en un estado asintomático durante un largo periodo. Sin embargo, en esta fase también pueden manifestarse síntomas como anemia, esplenomegalia (crecimiento del bazo), fatiga, pérdida de peso, malestar general, fácil saciedad y plenitud. También puede presentarse con menor frecuencia dolor en el cuadrante superior izquierdo. Las manifestaciones menos comunes durante la fase crónica son priapismo (erección prolongada del pene), hemorragia, trombosis, hemorragia de retina y hepatomegalia (crecimiento del hígado). La esplenomegalia es la afección física más común asociada a la LMC, presente en un 50%-60% de los casos, mientras que la hepatomegalia se desarrolla en un 10%-20% de los pacientes (Sampaio MM et al., 2021). Aproximadamente el 85% de los pacientes son diagnosticados durante este periodo, mientras que el 40% de los afectados permanecen asintomáticos durante esta fase. Los pacientes que se encuentran en la fase crónica normalmente tienen menos del 10% de blastos en las muestras de sangre o médula ósea.

Durante la fase acelerada, los pacientes presentan síntomas más graves que pueden incluir dolor óseo, infiltrado cutáneo, linfadenopatía y empeoramiento de la anemia. Además la fiebre, artralgia y dolor abdominal también puede ocurrir como resultado de infarto esplénico. De acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la presencia de 10% -19% de blastos en el aspirado de médula ósea es característico de la LMC en fase acelerada (Sampaio MM et al., 2021).

La Crisis Blástica se manifiesta como una leucemia aguda, con un empeoramiento de los síntomas en las fases previas con sangrado, empeoramiento de la fiebre y las infecciones secundarias. De acuerdo con los criterios de la OMS, la crisis blástica es definida por la acumulación extramedular de blastos con una proporción mayor o igual a 20% de blastos en sangre periférica (Sampaio MM et al., 2021). Aproximadamente el 20% de los individuos progresa directamente de la fase crónica a fase blástica.

Tratamiento actual de la LMC

El tratamiento para la LMC ha cambiado con el paso del tiempo, conforme se han desarrollado nuevos medicamentos, especialmente aquellos que pueden proporcionar una relación balanceada entre el riesgo y beneficio.

Hacia finales del siglo pasado, la terapia farmacológica para la LMC se limitaba a agentes inespecíficos como el busulfán, la hidroxiurea, y el interferón alfa (IFN- α). Aunque la terapia con IFN- α resultó en la regresión de la enfermedad y mejoró la supervivencia de algunos pacientes, tuvo una eficacia modesta y muchas toxicidades asociadas a su uso. Con respecto al trasplante alogénico de células madre, éste es curativo pero conlleva riesgos de morbilidad. Por lo tanto, el trasplante alogénico es una opción solo para pacientes jóvenes con un adecuado

estado de salud y que cuenten con un donante apropiado (Jabbour, Kantarjian 2020).

El panorama terapéutico de la LMC cambió drásticamente con el desarrollo de inhibidores de la función de tirosina cinasa TKI (del inglés *Tyrosine kinase inhibitors*) que interfiere con la interacción entre la oncoproteína *BCR- ABL1* y el trifosfato de adenosin (ATP), bloqueando la proliferación celular de la célula leucémica.

Los TKIs son el tratamiento estándar actual de la LMC ya que han sido capaces de prolongar la supervivencia de los pacientes. Los principales TKI utilizados son el imatinib (TKI de primera generación), dasatinib, nilotinib, bosutinib (TKIs de segunda generación) y ponatinib (TKI de tercera generación). La mayoría de los pacientes con LMC en fase crónica reciben Imatinib como tratamiento de primera línea (1L) y logran un buen control de la enfermedad a largo plazo (A. Hochhaus et al., 2020).

Imatinib como tratamiento de primera línea en la LMC

El Imatinib fue el primer TKI en recibir aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de los pacientes con LMC en fase crónica. Aunque es un tratamiento eficaz en todas las fases de la LMC y ha resultado en una esperanza de vida normal para la mayoría de los pacientes tratados en fase crónica, la respuesta de los pacientes en crisis blástica sigue siendo insatisfactoria (Hehlmann, 2020).

Es un tratamiento de referencia, ya que produce respuestas citogenéticas y moleculares más efectivas y tiene menos efectos adversos que el interferón alfa (IFN- α). Actúa a través de la inhibición competitiva del sitio de unión de ATP de la oncoproteína *BCR-ABL1*, inhibiendo la fosforilación de proteínas implicadas en la transducción de señales celulares. Esta molécula inhibe eficientemente la función de cinasa de *BCR-ABL1*, pero también bloquea la función de tirosina cinasa del receptor al factor de crecimiento derivado de plaqueta receptor del factor de crecimiento (PGDFR) y del receptor c-kit tirosina cinasa (Jabbour, Kantarjian, 2020).

El imatinib induce una respuesta hematológica y citogenética completa en aproximadamente el 83% de los pacientes con LMC (Sampaio MM et al., 2021). Además, desde su introducción en el año 2001, la mortalidad anual de la LMC ha disminuido de 10%-20% a 1%-2% (Jabbour, Kantarjian, 2020).

Seguimiento de la respuesta al tratamiento

Los objetivos principales del tratamiento en la fase crónica de la LMC son evitar la progresión hacia la fase acelerada o a la crisis blástica, pero cuando no hay una respuesta favorable con alguno de TKI que se encuentran disponibles, es

conveniente hacer un cambio de tratamiento para que los pacientes alcancen una esperanza de vida similar a la de la población en general.

Existen recomendaciones precisas para monitorear la respuesta molecular mediante la evaluación periódica de los niveles del transcrito de *BCR-ABL1* a los 3, 6 y 12 meses posteriores al tratamiento. Para ello, se debe utilizar una RT-PCR cuantitativa en tiempo real y los resultados se deben informar en la escala internacional utilizando un gen de control apropiado, como *ABL1* o *GUSB* (Hochhaus et al., 2020). De acuerdo a la Red Europea contra la Leucemia (ELN) y la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO), aquellos pacientes que no alcancen niveles de *BCR-ABL1* menor o igual al 1% o una respuesta citogenética completa a los 12 meses de haber iniciado la terapia con imatinib deben considerarse como tratamiento fallido (Hochhaus et al. 2020).

Varios estudios han demostrado que la falta de adherencia al tratamiento con el Imatinib es frecuente y puede afectar significativamente los resultados de los pacientes. Un estudio Belga encontró que solo el 14% de los pacientes con LMC tomaron todo el Imatinib recetado, por lo tanto la falta de incumplimiento condujo a respuestas subóptimas. Otros estudios muestran que el 26% de los pacientes tratados con Imatinib a largo plazo tienen una tasa de adherencia inferior al 90% siendo este el factor más importante para determinar el logro de respuestas moleculares (Alves et al. 2021).

Adicionalmente, un estudio realizado en Estados Unidos identificó que de 267 pacientes el 31% con LMC tuvieron interrupciones del tratamiento con Imatinib al menos por 30 días consecutivos durante un periodo de seguimiento de un año y que debido a esta falta de adherencia aumentaron los costos de la atención médica. Otro estudio realizado en Qatar mostró una alta tasa de fracaso al tratamiento, debido a una mala adherencia, siendo los factores económicos la principal causa de esta situación (Alves et al., 2021).

Aunque se ha observado un enorme progreso en el tratamiento de la LMC, debido a la eficacia de los TKIs dirigidos a *BCR-ABL1*, cerca del 15 % de los pacientes presentan resistencia a estos fármacos (Sampaio MM et al., 2021). En estos casos, el trasplante de células madre es el único método que ha mostrado ser efectivo para curar a los pacientes. Sin embargo, esta alternativa se encuentra limitada por la disponibilidad de donantes.

Mecanismos de resistencia al tratamiento en *BCR-ABL1*

La resistencia a la terapia es un proceso complejo y multifactorial que culmina en la selección de un clon de cáncer con la capacidad de evadir el tratamiento. En la LMC, los mecanismos de resistencia a los TKIs se subdividen en dependientes e independientes de *BCR-ABL1*. Sin embargo, en las guías terapéuticas, sólo se toman en cuenta los mecanismos relacionados con *BCR-ABL1* para los ajustes de dosis o el cambio de TKI.

Resistencia dependiente de BCR-ABL1

En cuanto a la resistencia a fármacos dependiente de *BCR-ABL1*, las mutaciones en el dominio cinasa (KD) del gen de fusión corresponden al tipo más común de resistencia a los TKIs. Tales mutaciones promueven la modificación de la estructura de la proteína y pueden conducir a la estabilización de la conformación activa de *BCR-ABL1*, afectando la unión del fármaco y por lo tanto causar resistencia. Entre estas mutaciones se destacan las que ocurren en el dominio de unión al ATP; entre los aminoácidos 244 y 255, el dominio C-loop entre los aminoácidos 350 y 363 y el dominio A-loop entre los aminoácidos 381 y 402 (Sampaio MM et al., 2021).

Adicionalmente, dentro de los mecanismos de resistencia dependientes de *BCR-ABL1*, también se encuentra la amplificación del gen de fusión o su sobre-expresión. Ambos mecanismos tienen como resultado final un incremento en la abundancia de la proteína quimérica BCR-ABL1.

Resistencia independiente a BCR-ABL1

Entre los mecanismos de resistencia independiente de *BCR-ABL1*, la evidencia sugiere un potencial de *BCR-ABL1* para activar un mecanismo autócrino que confiere a la célula leucémica una autonomía parcial o completa a factores de crecimiento. Por ejemplo, las células CD34+ de la LMC producen interleucina (IL)-3 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que promueve la fosforilación de STAT5. Como resultado, estas células en proliferación están protegidas por GM-CSF contra imatinib y nilotinib a través de la vía JAK2/STAT5 (Sampaio MM et al., 2021).

Por otra parte, la resistencia a la LMC se ha relacionado con la sobre-expresión de varias proteínas, como la proteína de caja de cabeza de horquilla O1 (FOXO1), la proteína cinasa C Eta (PRKCH), la familia de cinasas SRC, la 6 Fosfofructo-2 cinasa/Fruccosa 2,6 Bisfosfatasa 3 (PFKFB3), la proteína Beta catenina, akirina-2, las cuales promueven la proliferación y supervivencia celular, así como la resistencia a la terapia con imatinib en la LMC. El locus 2 de progresión tumoral (Tpl2) que interactúa con varios componentes de señalización, factor nuclear kappa B (NF -KB y NF-kB- P65 y MEK/ERK debido a sus mecanismos de regulación y su acción sobre vías inflamatorias y reguladoras de muerte celular (Sampaio MM et al., 2021).

Los mecanismos independientes de *BCR-ABL1* pueden ocurrir incluso a través de transportadores de membrana. Dado que estos componentes son esenciales para la disponibilidad y la eficacia del tratamiento.

Mutaciones puntuales en BCR-ABL1 como mecanismo de resistencia al tratamiento con TKIs.

Actualmente, se han descrito más de 200 mutaciones en el KD con capacidad de generar resistencia al tratamiento. Entre estas mutaciones, la mutación T315I, que involucra el reemplazo de una treonina en la posición 315 por una isoleucina, es la más frecuente, ya que afecta del 4% al 15 % de los pacientes con LMC.

La frecuencia de las mutaciones aumenta con respecto a la progresión de la enfermedad, siendo más frecuentes en la fase blástica de la enfermedad. La aparición de estas mutaciones podría deberse a diversos mecanismos como, una inestabilidad genómica causada por *BCR-ABL1*, por la presión selectiva de clones mutantes o la presencia del fármaco en sí, que gradualmente supera las células mutantes resistentes al tratamiento. Las mutaciones puntuales en *BCR-ABL1* se pueden clasificar en cinco categorías: I) mutaciones en el bucle de unión a ATP, II) mutaciones que afectan directamente el punto de unión de los TKIs, III) mutaciones en el dominio catalítico (C-loop), IV) mutaciones en la activación y V) mutaciones en el bolsillo de miristato. Las mutaciones de bucle en el punto P, incluida la T315I han sido las más observadas en los pacientes resistentes, representando del 36% al 48% de los casos.

Conocer el mecanismo de resistencia justificó el desarrollo de TKIs de segunda y tercera generación, capaces de superar e inhibir muchas de las mutaciones en *BCR-ABL1*. Sin embargo, incluso con el uso de TKIs de nueva generación, algunas mutaciones como la T315I siguen siendo resistentes a todos los TKIs, excepto el ponatinib. Con la aprobación de los TKIs de segunda generación como tratamiento de primera línea para la LMC se esperan menos clones mutantes en comparación con los que surgen bajo tratamiento con Imatinib, ya que estos TKIs pueden unirse incluso en presencia de algunas mutaciones.

De acuerdo con las guías para el manejo de la LMC de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) de 2017, se recomienda realizar un análisis mutacional de *BCR-ABL1* para aquellos pacientes en los que falla Imatinib o un TKI de segunda generación usado como tratamiento de primera línea y en aquellos que progresan a la fase acelerada o fase blástica. Aunque entre el 30% y 40% de los pacientes con respuestas subóptimas albergan clones mutantes de resistencia de bajo nivel que no son detectados mediante secuenciación Sanger y que serán seleccionados a menos que se cambie la terapia (Alves et al., 2021).

La presencia de una mutación en *BCR-ABL1* no excluye la aparición de otras mutaciones en la misma secuencia. En algunos pacientes, se han identificado múltiples mutaciones en diferentes moléculas *BCR-ABL* (diferentes clones de LMC) a lo que se denomina mutación policlonal. Un problema actual en el tratamiento de la LMC son las mutaciones compuestas, dos o más mutaciones que ocurren en el mismo transcrito *BCR-ABL1*. Aunque las mutaciones de manera individual podrían ser sensibles a un TKI, la interacción entre ellas podría provocar resistencia. Un ejemplo es la mutación compuesta T315I/E255V, cada una de estas mutaciones, cuando se aísla, responde al tratamiento con Ponatinib, pero

cuando están juntas, presentan una mayor resistencia a este TKI de tercera generación (Alves et al., 2021).

Mutaciones en BCR-ABL1 e inhibidores de cinasa

Cada TKI presenta diferente sensibilidad a los distintos tipos de mutaciones en *BCR-ABL1*. Por ejemplo, el uso del TKI de segunda generación Dasatinib es recomendado cuando se presentan las mutaciones Y253H, E255V/K y F359V/I/C. El Dasatinib es un inhibidor dual de SRC/ABL1 y puede unirse a *BCR-ABL1* en estado activo e inactivo, mostró tener una potencia 300 veces mayor que Imatinib y también puede inhibir las cinasas de la familia SRC. Dasatinib presenta un perfil de toxicidad, que se asocia con derrame pleural e hipertensión pulmonar, por lo tanto se debe de considerar de acuerdo con las características de cada paciente (Alves et al., 2021).

Por otra parte los resultados de Nilotinib, de una modificación química de Imatinib e in vitro mostraron una potencia 30 veces mayor que el TKI de primera generación. Nilotinib se une a la conformación inactiva de *BCR-ABL1* como Imatinib, pero también apunta a el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGFR y c-KIT. Nilotinib presentó un perfil de resistencia diferente a las mutaciones puntuales de *BCR-ABL1*, siendo resistente a Y253H/F, E255K/V y T315I, pero es una opción para el tratamiento de segunda línea en caso de otras mutaciones (Alves et al., 2021).

El Radotinib es un TKI aprobado solo en Corea, muy similar a Nilotinib, presentó in vitro una Concentración Inhibitoria Media (IC50) de 34 nM. Los casos de resistencia a Radotinib se han asociado con mutaciones puntuales de *BCR-ABL1* entre ellas Y235H, E255V, T315I y T315M (Alves et al., 2021).

Bosutinib otro TKI de segunda generación, es un inhibidor dual de las cinasas SRC/ABL1 que se une a *BCR-ABL1* tanto en conformación activa e inactiva, cómo en el caso de Dasatinib. Bosutinib funciona para varias mutaciones identificadas, con excepción de las mutaciones puntuales *BCR-ABL1* como V299L y T315I (Alves et al., 2021).

El Ponatinib es el único TKI aprobado por la Red Europea para ser usado en presencia de la mutación T315I y también se puede utilizar para las mutaciones F317L/V/I/C, T315A y V299L. In vitro Ponatinib presenta 500 veces más potencia que el Imatinib y se une a la conformación inactiva de *BCR-ABL1*, la resistencia a este TKI de tercera generación, se encuentra asociada con la mutación compuesta de *BCR-ABL1*, incluida T315I (Alves et al., 2021).

Asciminib es el primer inhibidor STAMP dirigido específicamente a la bolsa de miristoilo ABL1, se ha designado como una terapia innovadora por parte de la FDA en 2021. De acuerdo con los resultados del ensayo ASCEMBL el objetivo es tratar la LMC con Cromosoma Filadelfia positivo en adultos en fase crónica previamente

tratados con dos o más TKI o aquellos pacientes que presenten la mutación T315I (Alves et al., 2021).

3. Antecedentes

En los últimos años, las mutaciones compuestas en el gen de fusión *BCR-ABL1* han surgido como una nueva amenaza para los pacientes con LMC al causar mayores grados de resistencia que involucran múltiples TKIs, incluido el ponatinib. Sin embargo, existen informes limitados sobre la asociación de mutaciones compuestas en *BCR-ABL1* y la progresión de la enfermedad en pacientes con LMC resistentes a imatinib

A pesar del enorme avance que se ha tenido con el uso del imatinib y el desarrollo de TKIs de nueva generación capaces de contrarrestar la función de la oncoproteína quimérica BCR-ABL1, la presencia de resistencia a estos medicamentos en muchos de los pacientes todavía sigue siendo un reto importante en el tratamiento de la LMC.

Cuando existe resistencia al tratamiento de primera línea con el imatinib, es conveniente realizar un cambio de tratamiento con alguno de los inhibidores de segunda generación como el nilotinib, el dasatinib y el bosutinib. Adicionalmente, es importante basarse en factores específicos de cada paciente, incluidos la citogenética, el perfil de mutaciones en el dominio de cinasa de *BCR-ABL1*, las comorbilidades, la edad, los antecedentes de eventos adversos (EA) con el tratamiento previo y el perfil de riesgo para EA del TKI de segunda generación que sea seleccionado (Hochhaus et al., 2020).

Algunas de las mutaciones descritas en *BCR-ABL1* no solamente confieren resistencia al imatinib, sino también a los TKI de segunda generación. Por ejemplo, las mutaciones Y253H, E255V, F3559V/C/I son resistentes al imatinib y al nilotinib; mientras que las mutaciones V299L, T315A, F317L/I/V/C, resistentes al imatinib también lo son al dasatinib. Entre las mutaciones más frecuentes se encuentran M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, F317L, M351T, E355T, F359V y H396R/P2. La mutación E255K localizada en la región P-loop y H396P en A-loop se han informado en pacientes con falla al tratamiento, debido a su insensibilidad al imatinib y sensibilidad intermedia a nilotinib y dasatinib (Vásquez Palacio et al., 2018)

Por otra parte, la detección de la mutación T315I en el gen de fusión *BCR-ABL1*, limita el tratamiento del paciente al uso del TKI de tercera generación Ponatinib o la búsqueda de un donante adecuado para un trasplante de médula ósea (Hochhaus et al., 2020).

En un estudio previo en 45 pacientes con LMC resistentes a imatinib se detectaron mutaciones en *ABL1* en 14 de los 45 pacientes resistentes. De las mutaciones identificadas, la M351T, Y253H, M244V, F359V, G250E y F311L respondieron al tratamiento con distintas dosis de nilotinib. Por otro lado, los pacientes resistentes al imatinib con las mutaciones L340L y D276A respondieron al tratamiento con dasatinib (Marcé et al., 2013).

En un estudio independiente se incluyeron 90 pacientes que respondieron a imatinib; en fase crónica 41, fase crónica tardía 33 y fase acelerada 16 pacientes. Se detectó que once pacientes (12,2 %) con LMC en fase tardía tenían un total de 24 tipos de mutaciones puntuales, de los cuales 8 (72,72 %) albergan sitios mutados compuestos. Cinco de los pacientes con mutaciones compuestas, progresaron a fases avanzadas de la enfermedad (Akram et al., 2017).

En un estudio independiente, realizado en seis instituciones en el sureste de Inglaterra, se examinaron 121 pacientes con LMC para detectar mutaciones puntuales en el KD en *BCR-ABL1* mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Imatinib fue el tratamiento de primera línea para 111 pacientes, nilotinib para siete pacientes y dasatinib para tres pacientes. Detectaron una mutación en 25 pacientes (21%) de 121 pacientes. (Kizilors et al., 2019).

En un estudio en Nepal se observaron 18 mutaciones diferentes de *BCR-ABL1* en 33 de 45 pacientes, siendo T315I la mutación más común, seguida de F359V y M244V. Dieciséis mutaciones mostraron una actividad intermedia para completar la resistencia a Glivec. Entre los 45 pacientes evaluados para detectar mutaciones en *BCR-ABL1*, cuatro se perdieron durante el seguimiento, 14 murieron y 27 se mantenían con vida. De los 27 pacientes supervivientes, 16 recibieron nilotinib, cinco con dasatinib y tres con ponatinib, mientras que 3 pacientes fueron remitidos a la India, uno de los cuales recibió un trasplante alogénico de médula ósea (Kayastha et al., 2017).

4. Ubicación geográfica del programa o proyecto donde se realizaron las actividades del servicio social.

a) Lugar de realización de Servicio Social.

Instituto Nacional de Medicina Genómica. Consorcio Oncogenómica y Enfermedades Óseas.



Figura 1. Ubicación del INMEGEN. Fuente: Google Maps 2023

5. Objetivo general del proyecto:

Detectar mutaciones puntuales en el gen de fusión *BCR-ABL1* en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica resistentes al tratamiento.

6. Especificación y fundamento de las actividades a desarrollar

Como parte de las actividades a desarrollar durante la estancia del servicio social, fue importante conocer y llevar a cabo distintas técnicas de biología molecular que se encuentran estrechamente ligadas con el objetivo principal del proyecto y que se detallan a continuación.

6.1 Características de los pacientes analizados

Durante el desarrollo de este trabajo se estudiaron un total de 22 pacientes diagnosticados previamente con LMC mediante cariotipo a partir de aspirado de médula ósea y la detección del transcrito *BCR-ABL1* mediante RT-PCR. Todos los participantes habían presentado resistencia al tratamiento con imatinib a una dosis de 400 mg/día. Cabe mencionar que todas las muestras usadas para este estudio se encontraban homogeneizadas en TRIzol y almacenadas a -80 °C. Adicionalmente se trabajó con ocho líneas celulares de cáncer de mama, entre ellas: HCC70, HCC-1806, MCF-7, MDA-MB 231, MDA- MB 468, BT-474, HCC1954 y HCC1937. Las líneas celulares permiten estudiar más a detalle el cáncer de mama, algunas son consideradas de menor riesgo maligno, mientras que otras son más invasivas. Este estudio fue aprobado por los comités locales de ética e investigación del Hospital General de México "Eduardo Liceaga" y el Instituto Nacional de Medicina Genómica de la Ciudad de México, se llevó a cabo de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki. Los pacientes proporcionaron un consentimiento informado, firmado.

6.2 Extracción de RNA a partir de muestras almacenadas en TRIzol.

A partir de una muestra de sangre periférica de 10 mL se extrajo el RNA total utilizando la técnica de TRIzol, la cual se lleva a cabo en tres fases: lisis celular, separación y aislamiento del RNA.

Antes de comenzar se procedió a limpiar la superficie de trabajo utilizando primero RNase Zap Wipes, después etanol al 70% y sanitas.

Fase de lisis celular: Inicialmente, las muestras de sangre periférica fueron centrifugadas a 1,000 g por 30 min para separarlas en un botón inferior de eritrocitos, una fase acuosa superior y una fase intermedia muy delgada donde se

encuentran las células sanguíneas nucleadas. Esta fase intermedia fue recuperada cuidadosamente por pipeteo y transferida a un tubo de centrifuga de 1.5 mL, donde se agregó 1 mL de TRIzol. La muestra fue homogeneizada por vórtex durante 10 segundos y almacenada a -80 °C. A partir de este paso es que inició nuestra participación en el estudio.

Fase de separación: Una vez homogeneizadas por vórtex, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas. Después, se añadieron 200 µL de cloroformo, utilizando una pipeta de 1000 µL para menor contaminación del reactivo. Las muestras fueron mezcladas por inversión suavemente durante 15 segundos. A continuación, se volvieron a incubar las muestras por 5 minutos a temperatura ambiente, para su posterior centrifugación a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. En este momento la mezcla se separó en una fase orgánica en la parte inferior, una interfase con restos celulares en la parte media, y una fase acuosa superior, incolora, donde se encuentran el RNA. La fase acuosa fue removida de la muestra y colocada en un nuevo tubo de 1.5 mL por pipeteo, inclinando el tubo a 45°, evitando cualquier contacto con la interfase.

Fase de aislamiento de RNA: Esta fase incluyó la precipitación, el lavado y la resuspension de RNA. Se añadieron 500 µL de isopropanol al 100% a la fase acuosa, mezclando por inversión durante 15 segundos, para posteriormente incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos a 4° C y se formó un sedimento tipo gel en la parte inferior- lateral del tubo (pellet).

Para el lavado de RNA, se removió el sobrenadante del tubo dejando solo el pellet de RNA. Se lavó el Pellet con 1 ml de etanol al 75%, se dió vortex ligero a la muestra y posteriormente se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos, a 4° C y se desechó el lavado. Se invirtió el tubo (boquilla hacia abajo) sobre papel absorbente y se dejó secar en esa posición por alrededor de 60 minutos. No sé dejó secar completamente porque el pellet podría perder solubilidad.

El pellet de RNA se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsas y DNAsas y se incubó en un termoblock (Thermostat Plus) durante 15 minutos, a una temperatura de 55-60°C. Finalmente, la muestra de RNA se separó en 3 alícuotas con 25 µL, 20 µL y 5 µL y fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

6.2. Cuantificación de muestras de RNA.

Al obtener el RNA es importante conocer la calidad y la concentración del RNA. A través de un espectrofotómetro se puede determinar, tanto la concentración como la pureza del RNA. Los ácidos nucleicos presentan un pico de absorbancia a 260 nm (nanómetros), con cuya absorbancia se puede conocer la concentración del

RNA. Por otro lado, con la absorbancia a 280 nm y 230 nm se puede conocer la cantidad de proteínas y solventes presentes en las muestras. De esta forma, se puede determinar la pureza de la muestra, cuando el resultado del cociente 260/280 es de 2.0- 2.2; mientras que el del cociente 260/230 es menor a 2.0.

Antes de comenzar se limpió la mesa de trabajo con etanol al 70%, al igual que la pipeta de 10 μ L. También se configuró la función del espectrofotómetro (Implen Nano NP80) para cuantificar el RNA. Se le dió vortex ligero a cada muestra y se centrifugaron brevemente. Para iniciar la cuantificación, se añadieron 2 μ L de agua en el sitio de medición del espectrofotómetro, para establecer el blanco de la lectura. Posteriormente se adicionaron 2 μ L de RNA en el sitio de medición del espectrofotómetro realizando el mismo procedimiento para todas las muestras. Previo a cada lectura se limpió con papel absorbente el sitio de medición del espectrofotómetro. Al finalizar la cuantificación de las muestras, se guardó el listado que se generó automáticamente para cada una de las cuantificaciones realizadas, en el mismo espectrofotómetro.

6.3. Evaluación de la integridad de las muestras de RNA en gel de agarosa.

Además de conocer su concentración es importante saber si el RNA se encuentra íntegro y la integridad se puede observar por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, que se utiliza comúnmente para separar las moléculas en función de su carga, tamaño y forma.

Anteriormente para poder observar los fragmentos separados se utilizaba la tinción con bromuro de etidio para poder visualizar tanto el ADN como el ARN, pero debido a que era altamente tóxico, fue sustituido por marcadores fluorescentes con menos toxicidad como el Gel Red.

Para la generación del gel de agarosa a una concentración de 1%, se colocó 1 g de agarosa en 100 mL del amortiguador TBE y se calentó unos minutos en el microondas hasta fundirse por completo. La agarosa así fundida se dejó enfriar a temperatura ambiente por unos minutos, para posteriormente ser colocada en un molde especial, donde se dejó solidificar por alrededor de 20 minutos después de haber colocado un peine en la parte superior del contenedor para la formación de los pozos. Pasados los 20 minutos, se retiró el peine y se armó la cámara de electroforesis junto con su fuente de poder, colocando el gel en el sitio de la cámara y se añadió el Buffer de corrida TBE 1X hasta que cubriera los pozos del gel. Se volvió a limpiar la mesa de trabajo y se colocó un pedazo de papel parafilm en el cual se colocaron a cada una de las muestra los siguientes reactivos: 5 μ L de Gel Red, 2 μ L de loading buffer y 2 μ L de la muestra de RNA. Una vez mezclados los reactivos con la muestra, se cargó directamente en cada uno de los pozos del gel de agarosa, al terminar de cargar las muestras, se conectó la cámara de

electroforesis y se le dio un tiempo de 20 minutos de corrida a 100v. Por último para poder visualizar los resultados, se realizó una lectura en el fotodocumentador.

6.4. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La PCR con transcripción inversa, conocida también como RT-PCR, es similar a la técnica de PCR convencional, con la diferencia de utilizar una cadena molde de RNA para sintetizar DNA complementario (cDNA), a partir del cual se puede amplificar las regiones de interés.

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se utilizaron los siguientes reactivos: Buffer RT 10x (2.0 μ L), Mezcla de dNTP 25X (100 mM) (0.8 μ L), Primers Random RT 10x (2.0 μ L), MultiScribe transcriptasa inversa (1.0 μ L), Inhibidor RNAsas (1.0 μ L) y agua libre de nucleasas (3.2 μ L) para un volumen total de 10 μ L por reacción, de acuerdo con el número requerido de muestras (Tabla 1).

Para preparar la mezcla de reacción (20 μ L), primero se descongelaron los reactivos del Kit High Capacity cDNA síntesis (Thermo Fisher). En lo que esto sucedía se elaboró el protocolo en la bitácora de trabajo. Al descongelarse todos los reactivos, en un tubo de 0.6 ml se preparó la mezcla maestra integrando cada reactivo del Kit, una vez hecha la mezcla se colocó en hielo y posteriormente se le dio vortex ligero y se centrifugó por unos segundos para homogeneizar todos los componentes de la mezcla.

Posteriormente, se agregaron 10 μ L de la mezcla maestra tomando en cuenta el número de muestras totales en tubos para PCR de 0.2 ml y se agregaron 500 ng de RNA en un volumen de 10 μ L, se taparon perfectamente cada uno de los tubos y se verificó que no tuvieran burbujas de aire que pudieran afectar el proceso de amplificación. Los tubos con las reacciones de síntesis de cDNA se colocaron inmediatamente en un termociclador, donde se estableció el volumen final por reacción de 20 μ L y se inició la síntesis con el programa mostrado en la figura 2. Una vez pasado el tiempo de termociclado, se guardaron los tubos de 0.2 ml en el refrigerador a 4° C.

Tabla 1. Reactivos del Kit High Capacity cDNA transcripción inversa

Reactivos	Volumen con inhibidor de RNasa	Volumen sin inhibidor de RNasa
Buffer RT 10x	2.0 μ L	2.0 μ L
Mezcla de dNTP 25X (100 mM)	0.8 μ L	0.8 μ L
Primers Random RT 10x	2.0 μ L	2.0 μ L
MultiScribe transcriptasa inversa	1.0 μ L	1.0 μ L
Inhibidor RNAsas	1.0 μ L	-
Agua libre de nucleasas	3.2 μ L	4.2 μ L
Total por reacción	10.0 μ L	10.0 μ L

Protocolo de amplificación en Termociclador.

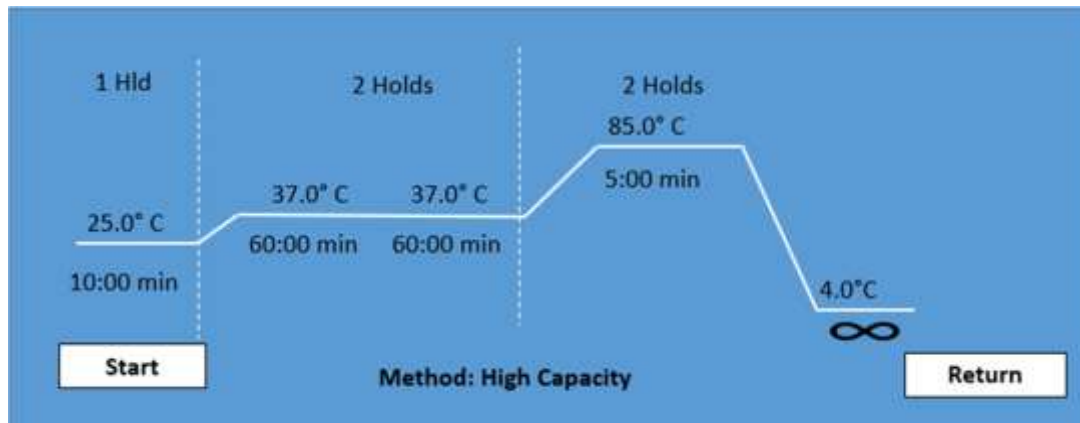


Figura 2. Diseño de la pantalla del Termociclador función High Capacity, elaboración propia.

6.5. PCR

La técnica de amplificación del DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar *in vitro* secuencias específicas de DNA o de DNA complementario (cDNA). La PCR se realiza mediante el uso de un par de oligonucleótidos iniciadores que son complementarios a secuencias del fragmento

de DNA a amplificar, una DNA polimerasa termosensible y un proceso de termociclado dividido en tres etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación.

El primer paso en la amplificación por PCR consiste en una etapa de desnaturalización del DNA molde, la cual ocurre generalmente a 94°C durante 10 minutos. Posteriormente, cada ciclo de amplificación se divide en 3 etapas: 1) **desnaturalización**, donde las cadenas de DNA se separan al calentar la muestra a 94°C, 2) **hibridación** o alineamiento de los iniciadores con las secuencias complementarias que flanquean la región a amplificar a una temperatura que puede ir de 56 a 64°C, y 3) **extensión** de la cadena en la cual la DNA polimerasa sintetiza nuevas cadenas de DNA complementarias a la cadena molde a partir de los oligonucleótidos iniciadores, lo cual ocurre a 72 °C (Orozco et al., 2004).

6.5.1. Amplificación de GAPDH por PCR

Para comprobar la correcta síntesis del cDNA se usaron primers de amplificación para un fragmento del gen endógeno *GAPDH*.

Antes de comenzar se limpió bien la mesa de trabajo con etanol al 70%. Se utilizaron los siguientes reactivos: Buffer 10x (2.5 µL), dNTP 2 mM (2.5 µL), MgCl 25mM (2 µL), Oligo GAPDH Forward (1 µL), Oligo GAPDH Reverse (1 µL), Enzima Taq Gold (0.2 µL), H₂O (14.8 µL), para un volumen final de 25 µL por reacción (Tabla 2). Los reactivos se dejaron descongelar en el recipiente que contenía hielo. Se redactó el protocolo en la bitácora de acuerdo al número de muestras. Cuando se descongelaron todos los reactivos se les dió un ligero vortex y se centrifugaron por unos segundos para obtener una mejor homogenización. Posteriormente se procedió a preparar la mezcla de reacción integrando todos los reactivos. Una vez hecha la mezcla, de acuerdo con el número de reacciones indicadas, se agregaron en cada tubo de 0.2 ml, 24 µL más 1 µL de cDNA para obtener un volumen final de 25 µL. Se programó el termociclador con las especificaciones mostradas en la figura 3. Antes de colocar los tubos con las muestras al termociclador se revisó que no hubiera burbujas. Al terminar con el tiempo establecido de termociclado, los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2.5% usando los reactivos previamente descritos para este procedimiento (i.e. Gel Red 5 µL, loading buffer 2 µL, marcador de peso molecular 5 µL, producto de PCR 5 µL). Una vez preparadas, las muestras fueron separadas a 100 voltios durante 20 minutos, al terminar el proceso los resultados fueron visualizados en un fotodocumentador.

Tabla 2. Reactivos utilizados en PCR GAPDH.

Reactivos	Volumen por reacción
Buffer 10x	2.5 μ L
dNTP 2 mM	2.5 μ L
MgCl 25mM	2 μ L
Oligo Gapdh (forward)	1 μ L
Oligo Gapdh (reverse)	1 μ L
Enzima Taq Gold	0.2 μ L
H2O	14.8 μ L
Total	24 μ L

Protocolo de amplificación en el Termociclador (30 ciclos) función GAPDH volumen total de 25 μ L.

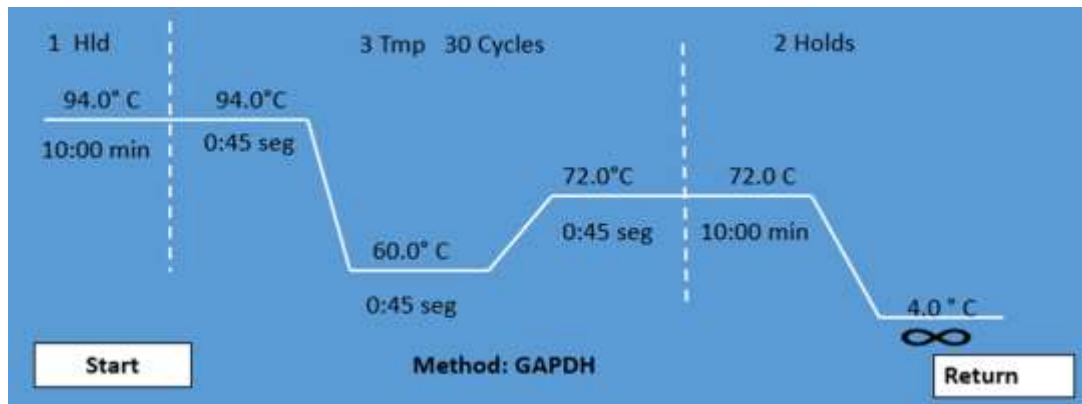


Figura 3. Diseño de la pantalla del Termociclador función GAPDH, elaboración propia.

6.5.2 PCR anidada para la amplificación de BCR-ABL1.

Para poder detectar la presencia de mutaciones que confieren resistencia al tratamiento en pacientes con LMC, se realizó una PCR anidada. Esta variante de la PCR convencional permitió amplificar el dominio de cinasa del gen de fusión *BCR-ABL1*, evitando la amplificación del dominio de cinasa del gen celular *ABL1*. La amplificación se realizó utilizando dos protocolos, el primero con la enzima Taq Pol y el segundo con la enzima Phusion. Para ello, en la primera PCR se utilizó el oligonucleótido iniciador BCR-ABL1-sec Forward y BCR-ABL1-sec Reverse, para la amplificación de un fragmento de 1546 pb correspondientes al gen de fusión *BCR-ABL1*. Para el protocolo de la enzima Taq Gold se utilizaron los siguientes reactivos: Buffer 10x 2.5 μ L, dNTPs (2 mM) 2.5 μ L, MgCl₂ 2 μ L, BCR-ABL sección (forward) 1 μ L, BCR-ABL sección (reverse) 1 μ L, Taq Gold Pol 0.2 μ L, H₂O 12.8 μ L, en total 22 μ L más 3 μ L de cDNA, un volumen total de 25 μ L por reacción (Tabla 3). El protocolo de amplificación en el termociclador se muestra en la figura 4. Por otra parte, con la enzima Phusion y se usaron los siguientes reactivos: Buffer 5x HF 4 μ L, dNTPs (10 mM) 0.4 μ L, 1 nM BCR-ABL1 sección (forward) 1 μ L, 1 nM BCR-ABL sección (reverse) 1 μ L, Phusion DNA pol 2 U/ μ L) 0.18 μ L y H₂O 10.42 μ L, y 3 μ L de cDNA sin diluir para un volumen final de 20 μ L (Tabla 5), con el protocolo de amplificación mostrado en la figura 5. En cada caso, se preparó la mezcla de reacción en un tubo de 0.6 ml, de acuerdo al número de reacciones e integrando cada uno de los reactivos, previamente mencionados. Una vez hecha la mezcla de reacción, se le dio un ligero vortex y se centrifugó unos segundos para homogenizarla y se conservó en hielo hasta su uso. Después, se añadieron 22 μ L de la reacción de Taq Gold o 17 μ L de la de Phusion en tubos de PCR de 0.2 ml y se agregaron 3 μ L de cDNA sin diluir. Todos los tubos de PCR 0.2 ml fueron cerrados y revisados con la finalidad de que no tuvieran burbujas de aire. Inmediatamente después, se llevaron al termociclador para su amplificación.

Al terminar con el tiempo establecido de la amplificación, se prepararon los reactivos necesarios (gel red 5 μ L, loading buffer 2 μ L y marcador de peso molecular 5 μ L, productos de PCR 5 μ L) para realizar la electroforesis y correr las muestras en un gel de agarosa previamente preparado a una concentración de 2.5%, a 100 voltios durante 20 minutos y poder visualizar los resultados en el fotodocumentador.

Se utilizó como control positivo la línea celular K562, de Leucemia Mieloide Crónica, que es una línea celular derivada de una paciente de 53 años con LMC Ph.

Tabla 3. Reactivos utilizados en PCR Taq Gold Pol 1546 pb

Reactivos	Volumen por reacción
Buffer 10x	2.5 μ L
dNTPs (2 mM)	2.5 μ L
MgCl ₂	2 μ L
BCR-ABL sección (forward)	1 μ L
BCR-ABL sección (reverse)	1 μ L
Taq Gold Pol	0.2 μ L
H ₂ O	12.8 μ L
Total	22 μ L

Protocolo en Termociclador 30 ciclos función (BCR-ABL Taq Gold Pol), para un volumen total de 25 μ L.

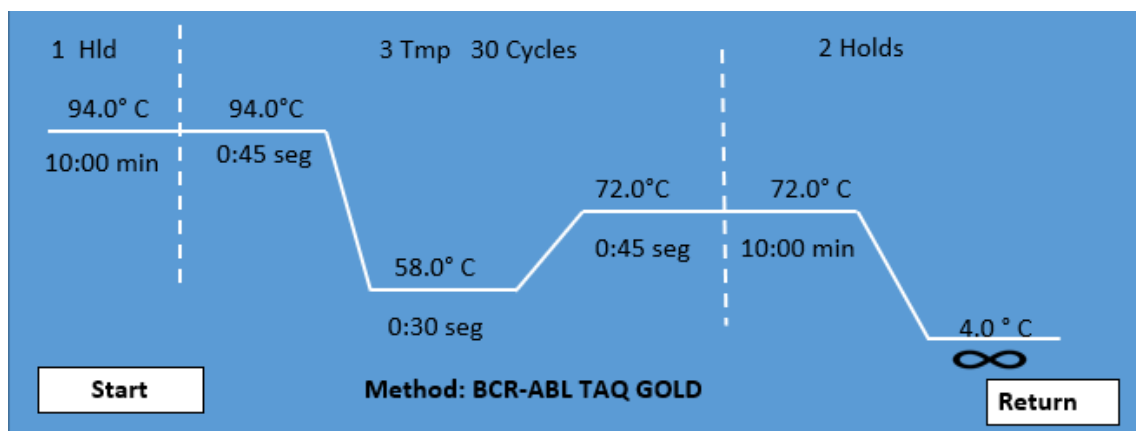


Figura 4. Diseño de la pantalla del Termociclador función BCR-ABL Taq Gold Pol, elaboración propia.

Tabla 4. Reactivos utilizados en PCR BCR-ABL PFU 1546 pb.

Reactivos	Volumen por reacción
Buffer 5x HF	4 μ L
dNTPs (10 mM)	0.4 μ L
1 nM BCR-ABL sección (forward)	1 μ L
1 nM BCR-ABL sección (reverse)	1 μ L
Phusion DNA pol 2 (U/ μ L)	0.18 μ L
H ₂ O	10.42 μ L
Total	17 μ L

Protocolo en Termociclador 30 ciclos función (BCR-ABL PFU), para un volumen total de 20 μ L.

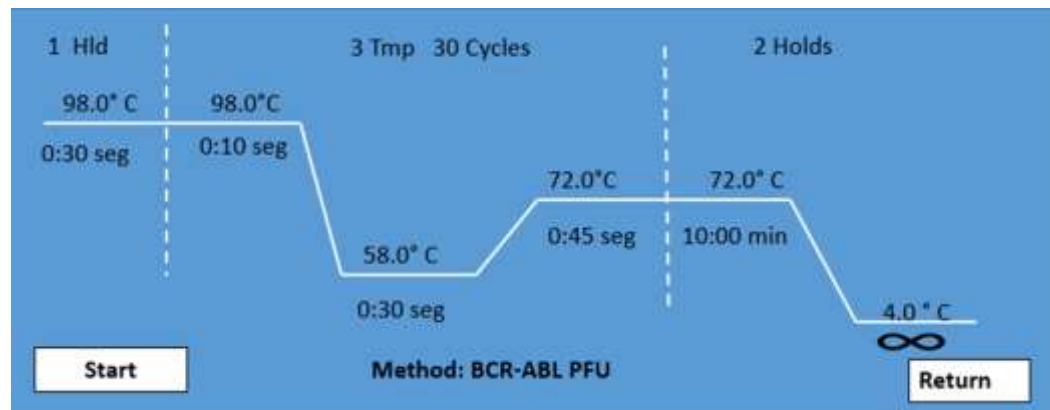


Figura 5. Diseño de la pantalla del Termociclador función BCR-ABL PFU, elaboración propia.

6.5.3. Amplificación por PCR del TKD en BCR-ABL1.

Para el desarrollo de la segunda parte de la PCR anidada se utilizaron nuevamente los dos protocolos de amplificación con las enzimas Taq Gold y enzima Phusion. Para amplificar un fragmento de 863 pb, correspondiente al dominio Kinasa de *ABL1*, se usaron los oligos TKD sección forward y BCR-ABL1 sección reverse. Para esta segunda PCR se utilizaron los siguientes reactivos con la enzima Taq Gold: Buffer (10x) 2.5 μ L, dNTPs (2 mM) 2.5 μ L, MgCl₂ 2 μ L, Oligo TKD sec (forward) 1 μ L, Oligo BCR-ABL sec (reverse) 1 μ L, enzima Taq Gold 0.2 μ L, H₂O 14.8 μ L, es decir 24 μ L por reacción más 1 μ L del producto de los amplicones de la PCR de 1546 pb, para obtener 25 μ L totales por reacción (Tabla 5). Mismos que fueron amplificados en el termociclador con las condiciones mostradas en la figura 6. En el caso de la PCR con la enzima Phusion los reactivos fueron los siguientes: Buffer 5x HF (phusion) 4 μ L, dNTPs (10 mM) 0.4 μ L, TKD sección (forward) 10 μ M (150 nM) 0.3 μ L, BCR-ABL sección (reverse) 10 μ M (150 nM) 0.3 μ L, Phusion DNA pol 2 U/ μ L) 0.15 μ L y H₂O 13.85 μ L (Tabla 6). El protocolo de amplificación se muestra en la figura figura 7. Se limpió la mesa de trabajo con etanol al 70%, así como el material de trabajo. Se preparó un recipiente con hielo frappé para poner a descongelar los reactivos. Para tener una mejor homogenización de los reactivos, previo a usarlos, se les dió un vórtex ligero a cada uno por unos segundos. Se rotuló un tubo de 0.6 ml, para preparar la mezcla maestra con los reactivos específicos del Kit de PCR de alta fidelidad Phusion. Una vez descongelados todos los reactivos, se preparó la mezcla de reacción, integrando cada reactivo en el volumen requerido de acuerdo con el número de reacciones totales. Hecha la mezcla de reacción, en tubos de 0.2 ml se agregaron 19 μ L en cada uno, para después añadir 1 μ L de cDNA templado de los amplicones de 1500 pb de cada una de las muestras y de esta manera obtener un volumen total de 20 μ L. Posteriormente se metieron los tubos de PCR 0.2 ml al termociclador, con las funciones adecuadas para su amplificación.

Al terminar con el tiempo establecido del termociclado, se prepararon los reactivos necesarios (gel red 5 μ L, loading buffer 2 μ L, marcador de peso molecular 5 μ L, así como los productos de PCR 5 μ L en un papel parafilm) mediante electroforesis se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 2.5% y poder visualizar los resultados en el fotodocumentador.

Tabla 5. Reactivos utilizados en PCR TKD con protocolo Taq Gold.

Reactivos	Volumen por reacción
Buffer 10 x	2.5 μ L
dNTPs (2 mM)	2.5 μ L
Mg Cl ₂	2 μ L
Oligo TKD sec (forward)	1 μ L
Oligo BCR-ABL sec (reverse)	1 μ L
Enzima Taq Gold	0.2 μ L
H ₂ O	14.8 μ L
Total	24 μ L

Protocolo de amplificación en Termociclador (30 ciclos) función TKD con Taq Gold, para un volumen de 25 μ L.

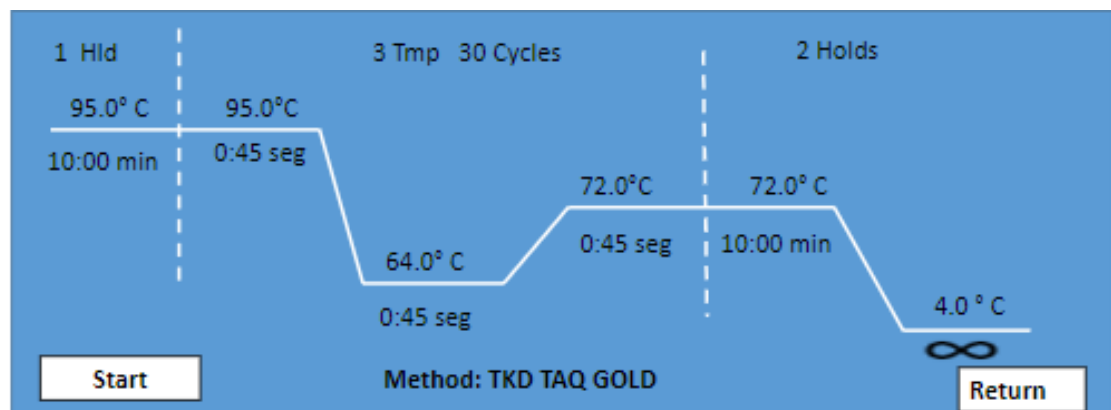


Figura 6. Diseño de la pantalla del Termociclador función Taq Gold, elaboración propia.

Tabla 6. Reactivos utilizados en PCR TKD con protocolo (PFU) 863 pb.

Reactivos	Volumen por reacción
Buffer 5x HF (phusion)	4 μ L
dNTPs (10 mM)	0.4 μ L
TKD sección (forward) 10 uM (150 nM)	0.3 μ L
BCR-ABL sección (reverse) 10 uM (150 nM)	0.3 μ L
Phusion DNA pol 2 U/ μ L)	0.15 μ L
H2O	13.85 μ L
Total	19 μ L

Protocolo de amplificación en Termociclador (30 ciclos) función TKD con Phusion, para un volumen total de 20 μ l.

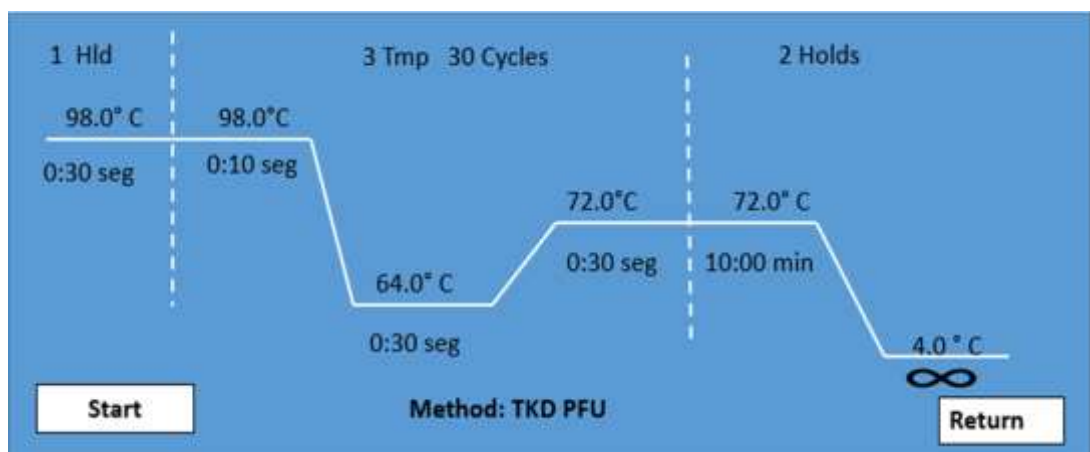


Figura 7. Diseño de la pantalla del Termociclador función TKD PFU, elaboración propia.

6.6. Purificación de productos de PCR.

Una vez obtenido el producto de PCR correspondiente al dominio de cinasa del gen de fusión *BCR-ABL1* para diferentes muestras de pacientes, cada amplicón fue purificado por medio del kit Qiaquick de Qiagen, para su posterior análisis por secuenciación Sanger. Primero, se transfirió la totalidad de los productos de PCR de cada muestra a un tubo de 1.5 mL y se añadieron 250 μ L del buffer de unión del kit. Después de mezclar reiteradamente la solución por pipeteo, el contenido se colocó en una columna de purificación para su centrifugación a 13,000 rpm por minuto. Después de centrifugar se retiró el contenido obtenido en un recipiente para desechos. El siguiente paso fue añadir 750 μ L de Wash Buffer a la columna de purificación. Se centrifugó a 13,000 rpm y se le retiró el sobrenadante de igual manera en el recipiente de desechos. Se realizó una segunda centrifugación a 13,000 rpm, pero sin agregar el Wash Buffer, una vez hecho eso, la columna de purificación se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL. Posteriormente, se añadieron 30 μ L de Buffer Elution EB (previamente se puso a calentar en un Thermo block a una temperatura de 42°C). Este paso se realizó con mucho cuidado con la finalidad de no tocar las paredes ni el filtro de la columna de purificación y con ello causar alguna contaminación. Posteriormente, se dejó reposar por un lapso de 2 minutos, pasado el tiempo se volvió a centrifugar a 13,000 rpm. La columna de purificación fue desechada y se conservó el producto purificado, el cual fue colocado en hielo.

Al obtener el producto purificado, se realizó una cuantificación utilizando el espectrofotómetro Implem NanoDrop para conocer la concentración de cada una de las muestras y por último se preparó un gel de agarosa a una concentración de 2.5% para llevar a cabo la electroforesis y correr cada uno de los productos y de esta manera visualizar la integridad de las bandas amplificadas, al realizar la lectura en el fotodocumentador.

6.7. Secuenciación Sanger.

La secuenciación de DNA consiste en la producción, por métodos enzimáticos o químicos, de una serie de fragmentos de DNA con diferencia de una sola base. La secuencia se determina por la resolución de electroforesis de los fragmentos generados.

El método de Sanger utiliza didesoxirribonucleótidos (ddNTPs) es decir, nucleótidos que carecen del grupo 3'-OH en la ribosa y que cuando la DNA polimerasa agrega uno de ellos durante la síntesis de DNA, esta se termina. En esta técnica se realizan cuatro mezclas de síntesis de DNA que contienen los siguientes reactivos: 1) la cadena sencilla del DNA que será secuenciada, 2) un oligonucleótido iniciador, 3) los 4 desoxirribonucleótidos (dNTPs) que forman el

DNA (uno de ellos marcado con ³⁰S, 4) una DNA polimerasa, y 5) un didesoxirribonucleótido particular marcador con un fluorocromo específico (ddATP, ddTTP, ddGTP, o ddCTP). Los fragmentos sintetizados tendrán tamaños diferentes dependiendo de la posición del ddNTP incorporado en la cadena, el cual también servirá para marcar cada fragmento amplificado con una fluorescencia particular. Finalmente, los fragmentos se separan por electroforesis y se determina la secuencia del DNA (Orozco et al., 2004).

Para la secuenciación Sanger, se enviaron a secuenciar las líneas celulares de cáncer de mama, así como el set de las 22 muestras de LMC a la Unidad de Secuenciación del INMEGEN.

Análisis

Las secuencias obtenidas se analizaron con el software Poly Peak Parser <http://yosttools.genetics.utah.edu/PolyPeakParser/> utilizando la secuencia de referencia del gen ABL1 para realizar el alineamiento, posteriormente se corroboraron los datos de las secuencias con el genoma de referencia Genome Browser on Human (GRCh38/hg38) en el software <https://genome.ucsc.edu/index.html>, para estas muestras no se presentó ninguna mutación significativa.

Resultados

Como parte de las actividades desarrolladas, primero comencé a realizar las técnicas de extracción, cuantificación, síntesis de cDNA y PCR con dos muestras independientes de la línea celular K562. Esta línea expresa el transcrito correspondiente al gen de fusión *BCR-ABL1*, por lo que fue utilizada como control de amplificación.

Se trabajó con dos muestras de la línea celular K562 y una más como control positivo que se encontraba almacenada, con la intención de corroborar que al desarrollar las técnicas se obtuviera la amplificación de la misma, para obtener una mejor certeza en los resultados. Al trabajar con muestras de RNA siempre es conveniente hacer limpieza del espacio donde se va a trabajar, así como del material que se va a utilizar, debido a que es muy susceptible a contaminación por agentes del ambiente, por tanto, primero se limpió la mesa de trabajo con un líquido especial removedor de RNAsas y después etanol al 70%. Primero se realizó la cuantificación de RNA para conocer la concentración de cada una de las muestras a amplificar (Tabla 8A). Sabiendo la concentración de cada muestra de RNA, mediante electroforesis se corrigieron las muestras en un gel de agarosa al 1% para observar la integridad de RNA de cada una de ellas (Figura 8A). Después se realizó síntesis de cDNA y se corroboró la correcta síntesis del cDNA a través de la amplificación por PCR de un fragmento del gen endógeno GAPDH. Se utilizó K562 en una dilución 1:4 como control positivo, las dos muestras de K562 cDNA 1, cDNA 2, el control negativo de la RT y el control negativo (NTC) de la PCR (Tabla 8B). Mediante electroforesis se visualizó la integridad de las bandas en un gel de agarosa al 2.5% (Figura B). También se realizó PCR TKD con el kit de alta fidelidad de la enzima Phusion para las muestras K562, cDNA 1, cDNA 2 y el NTC de la PCR (Tabla 8C) y se visualizó la integridad de las bandas de 863 pb en un gel de agarosa al 2.5% (Figura 8C).

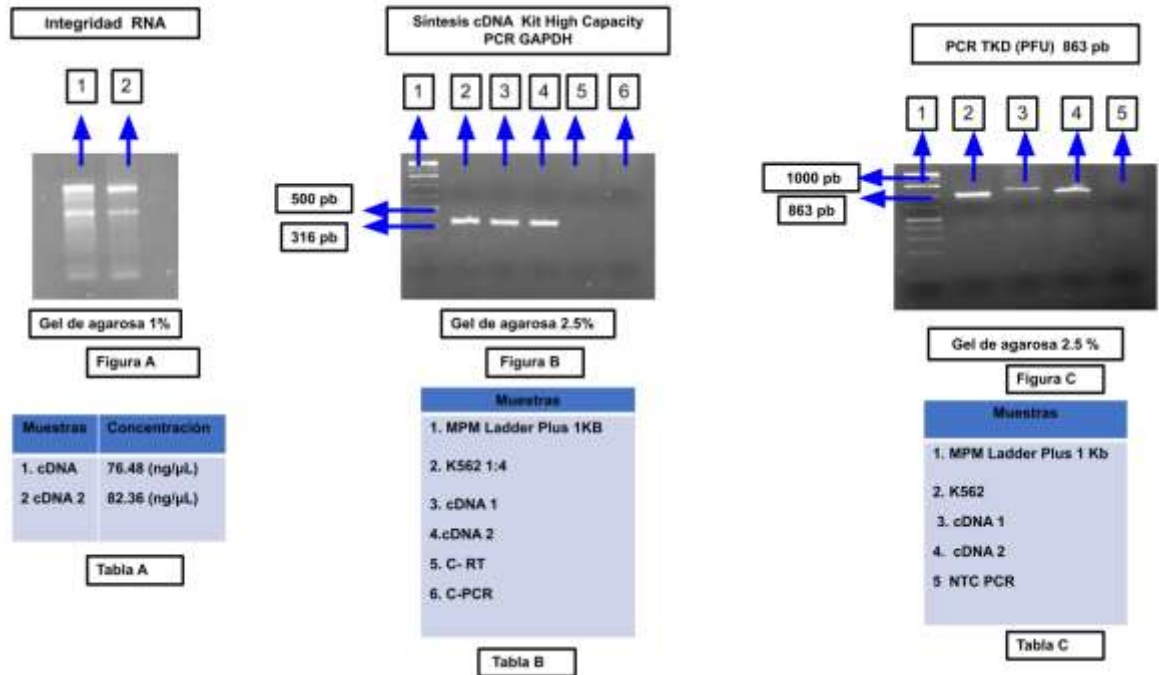


Figura 8. Integridad de RNA, Síntesis de cDNA , PCR GAPDH y PCR TKD Pfu, elaboración propia.

Una vez estandarizadas las técnicas a utilizar se trabajó con ocho muestras de líneas celulares de Cáncer de mama, nuevamente se realizó la cuantificación de RNA (Tabla 9A) y el análisis de su integridad por la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1%. (Figura 9A). También se trabajó con 22 muestras de pacientes con LMC resistentes al tratamiento con imatinib, en la tabla 9B se observa la concentración de las muestras de RNA obtenidas y en la Figura 9B su integridad. De las 16 muestras provenientes de pacientes diagnosticados con LMC solamente las muestras LDS-92 (pozo 2), HJ62 (pozo 12), HJ73 (pozo 13), LDS-46 (pozo 14), LDS-47 (pozo 15) mostraron una buena integridad en el gel de agarosa, al observarse las bandas correspondientes a los RNA ribosomales de las subunidades mayor y menor, así como la de los RNAs de transferencia.

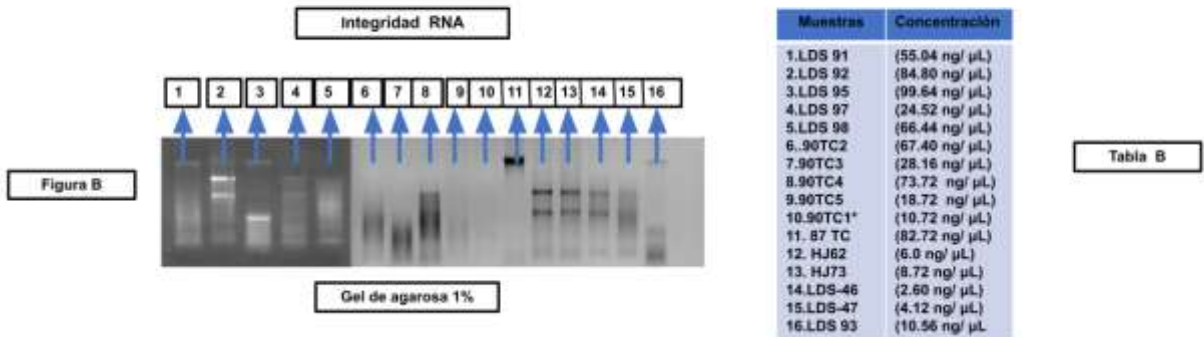
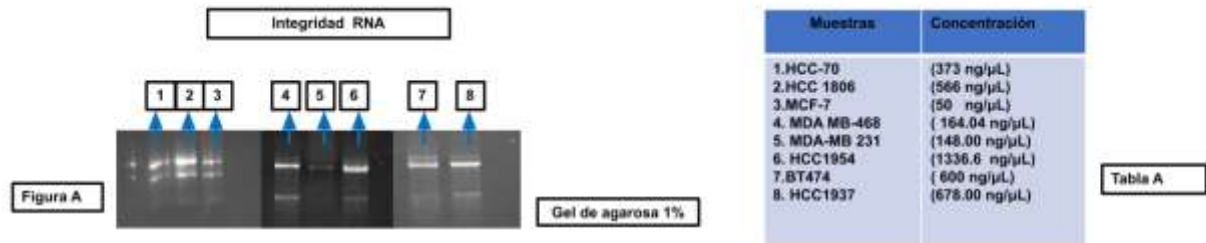


Figura 9. Integridad de RNA de líneas celulares de cáncer de mama (Figuras A), Integridad de RNA de muestras de Leucemia Mieloide Crónica (Figura B), elaboración propia.

Posteriormente identificadas las muestras con buena integridad de RNA se procedió a realizar la síntesis de cDNA y la amplificación del fragmento de GAPDH por PCR para corroborar que realmente hubiera presencia de cDNA. Posterior a la amplificación por PCR se visualizó cada una de las bandas de las líneas celulares de un tamaño aproximado de 316 pares de bases pb en la Figura 10A, en el orden descrito en la Tabla 10A. En el caso de las muestras de LMC, éstas se muestran en Figura 10B, en el orden descrito en la Tabla 10B. Con excepción de la muestra correspondiente la línea celular MCF-7, la banda de GAPDH se observan en todas las muestras analizadas.

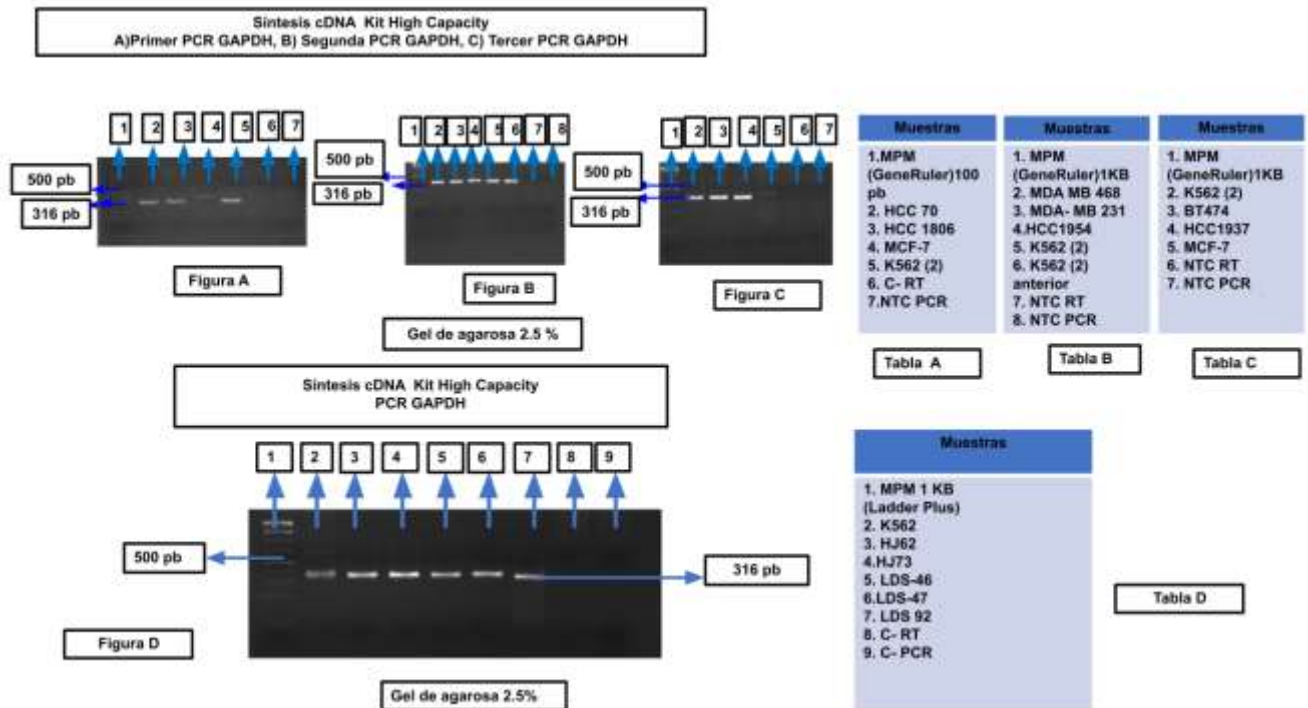


Figura 10. Síntesis de cDNA, PCR GAPDH líneas celulares de cáncer de mama (Figuras A, B, C) Síntesis de cDNA, PCR GAPDH muestras de Leucemia Mieloide Crónica (Figura D), elaboración propia.

A continuación, se amplificó el fragmento de 863 pares de bases correspondiente al TKD de BCR-ABL1 para las muestras HCC70, MDA MB- 468, MD AMB-231, BT-474 y HCC-1937 de Cáncer de Mama, con el protocolo para la enzima Taq Gold y para la enzima Phusion. Se utilizó K562 en una dilución 1:4 como control positivo. Los resultados obtenidos con el protocolo de Taq Gold se observan en la Figura 11A, y la purificación de estos fragmentos en la Figura 11B. Se puede observar la amplificación del producto esperado de 863 pb en todas las muestras analizadas, cuya concentración presentó un rango de 9 a 22 ng/uL después de ser purificados por columnas.

Con el protocolo de la enzima Kit de PCR de alta fidelidad Phusion también se observaron los fragmentos esperados de 863 pb en cada una de las muestras (Figura 11C), con una mejor concentración de los productos de PCR purificados con un rango de 13 a 19 ng/uL (Tabla 11D).

Sabiendo la concentración de los productos purificados se realizaron las diluciones necesarias para poder enviar a secuenciar. Previamente se elaboró el formato en el que se establece la concentración de 10 (ng/μL,) y volumen de 10 μL por

muestra, así como los primers TKD sec forward y BCR-ABL sec reverse 10 µL de cada uno. Al cabo de dos semanas se envían los resultados de esa secuenciación.

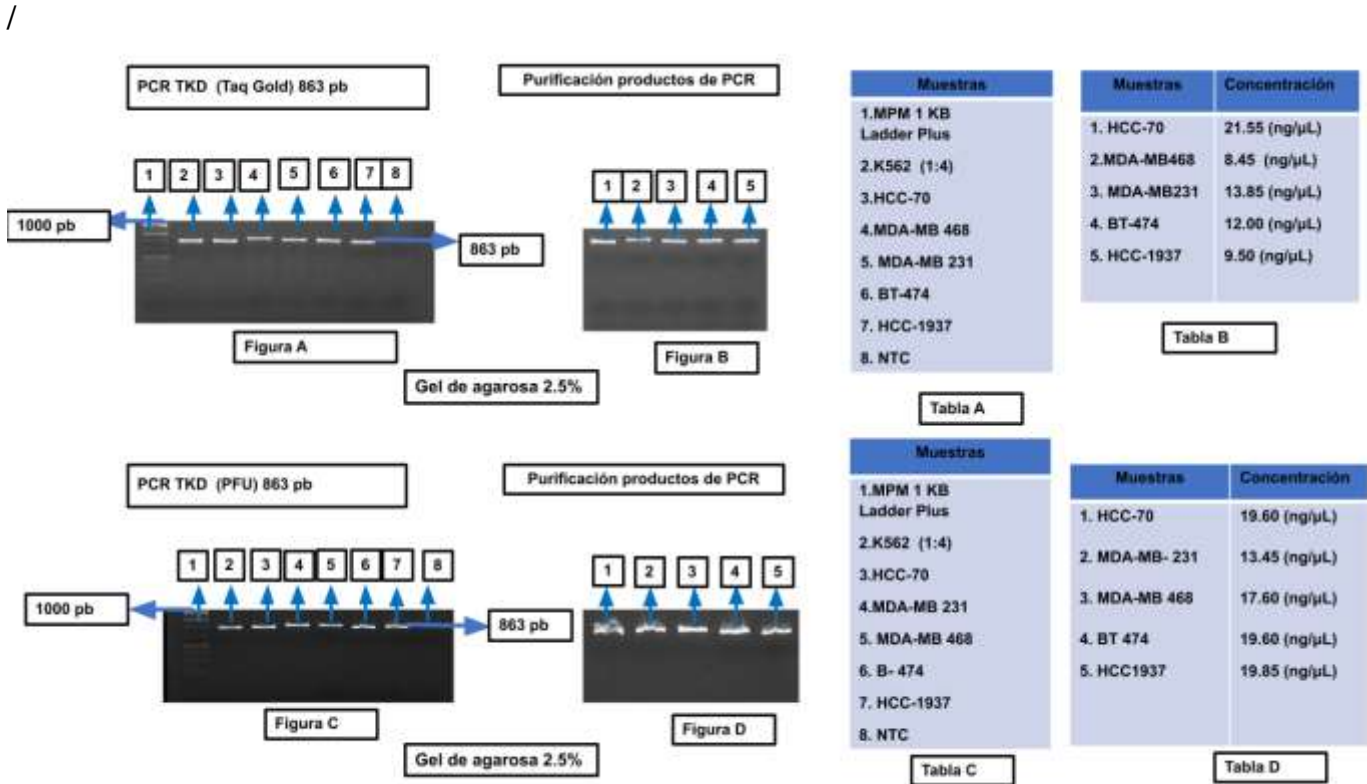


Figura 11. PCR TKD con protocolo Taq Gold y Phusion de Alta Fidelidad, purificación de productos de PCR, elaboración propia.

A continuación, se amplificó por PCR un fragmento de 1546 pb correspondiente al gen de fusión *BCR-ABL1* con el protocolo del Kit de PCR de alta fidelidad y enzima Phusion en las muestras de LMC. Al visualizar las bandas en el gel solo se observó la amplificación del control positivo correspondiente a la muestra K562 ubicado en el pozo 2 (Figura 12C). Posteriormente, se realizó la PCR correspondiente al TKD 863 pb usando 1 µL de la reacción de PCR inicial del fragmento de 1546 pb. Al realizar la lectura del gel de agarosa en el fotodocumentador se observó la amplificación de la muestra correspondiente al control positivo K562 (pozo 2), así como de las muestras LDS-47 (pozo 5), LDS-46 (pozo 6) y LDS-92 (pozo 7) (Figura 12D). Estas tres muestras fueron purificadas con el Kit Qiaquick de Qiagen de Purificación, cuantificadas en el espectrofotómetro y separadas en un gel de agarosa al 2.5% (Figura 12E).

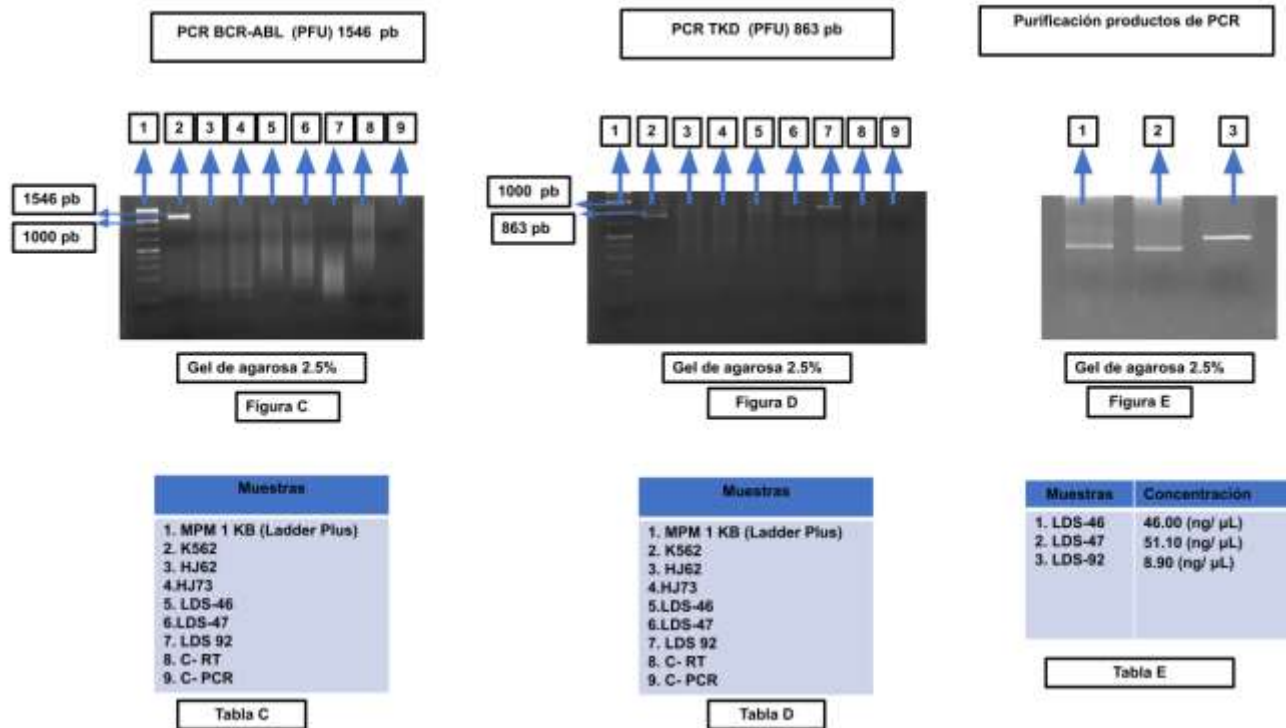


Figura 12. PCR BCR-ABL, PCR TKD, Purificación de productos de PCR, elaboración propia.

Resultados de Secuenciación Sanger.

En cuanto a las líneas celulares derivadas de cáncer de mama, se analizaron las secuencia de cinco muestras, entre ellas; HCC70, MDA-MB 231, MDA-MB 468, BT 474 y HCC1937, en el software Poly Peak Parser, después con la secuencia de referencia del gen ABL1 se realizó el alineamiento, estos resultados se corroboraron con las secuencias del genoma de referencia Genome Browser on Human (GRCh38/hg38) se revisaron a detalle y no se observaron mutaciones significativas (Figuras 13 y 14).

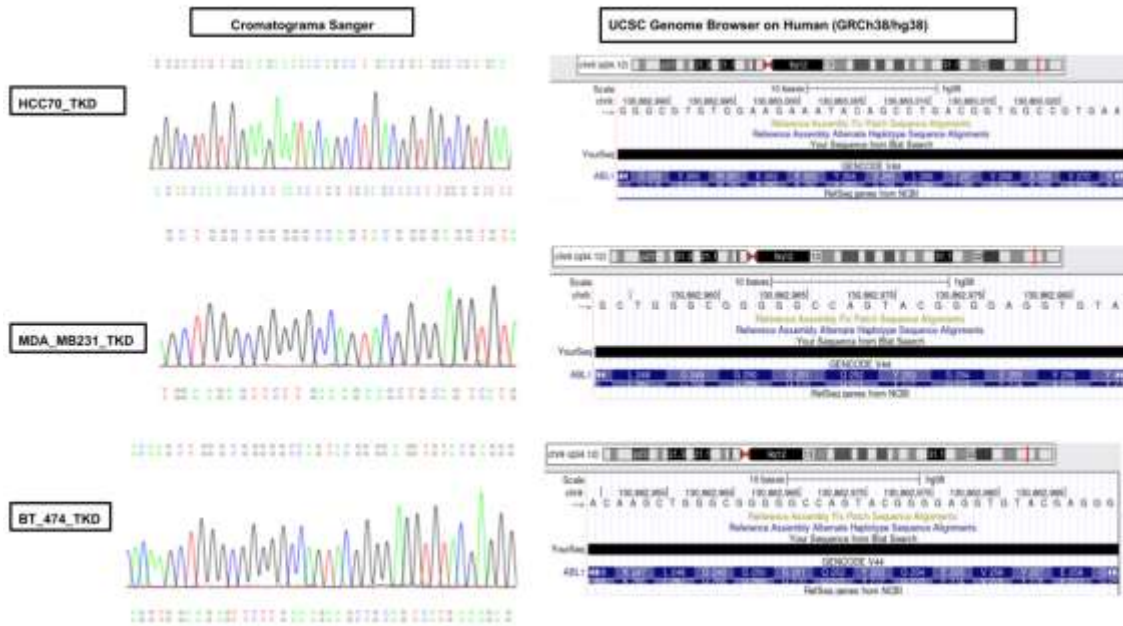


Figura 13. Electroferogramas Sanger y alineamiento de secuencias de líneas celulares de cáncer de mama, elaboración propia.

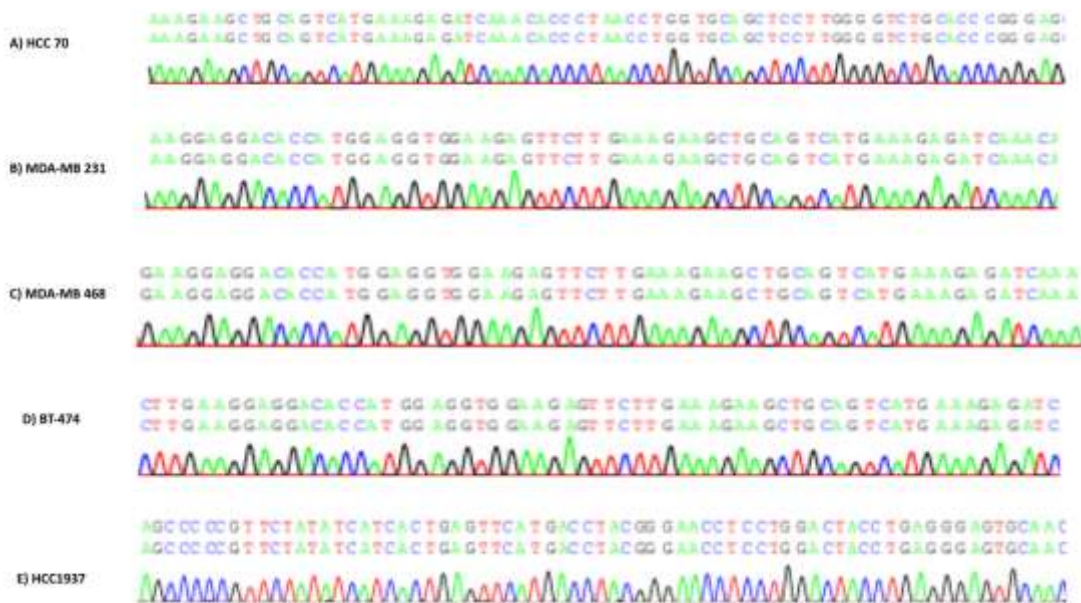


Figura 14. Electroferogramas representativos de las líneas celulares de cáncer de mama, elaboración propia.

Por otro lado, en las muestras de LMC se detectaron las mutaciones F311I, F317L y E450K. Las mutaciones F311I así como F317L se ubican en la región SH3 contact y la mutación E450K se ubica en el sitio A-loop (Figura 15).

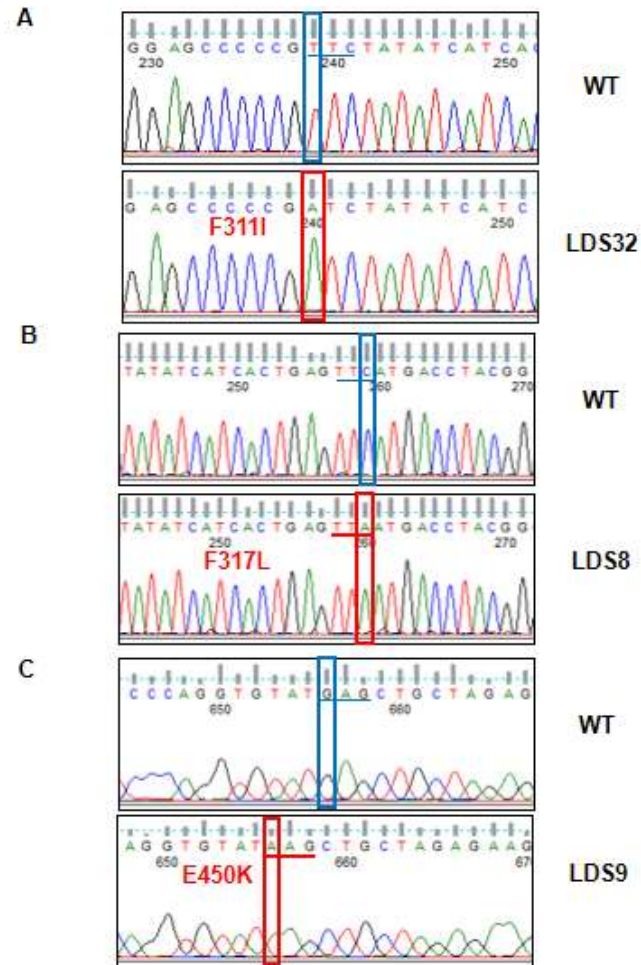


Figura 15. Electroferogramas que muestran las mutaciones detectadas por Secuenciación Sanger. Tomado de (Martínez-Castillo et al., 2023)

7. Impacto de las actividades del servicio social en programa o proyecto de adscripción

Durante la estancia de servicio social, me enfrenté a diversas situaciones que por momentos detenían las actividades para realizar las técnicas de biología molecular, una de esas situaciones fue la contaminación de la enzima ADN polimerasa Phusion al igual que algunos de los reactivos del Kit de PCR de alta fidelidad Phusion, siendo la más utilizada para amplificar fragmentos tanto para PCR BCR-ABL de 1546 pb (pares de bases), así como TKD de 863 pb.

Debido a esta situación y con la finalidad de aprovechar el tiempo, estuve trabajando con dos protocolos de amplificación, uno con la enzima Taq Gold la cual se utiliza para amplificar diversos protocolos, entre ellos; PCR GAPDH que nos sirve para corroborar que realmente haya presencia de cDNA, una vez realizada la síntesis de cDNA. También nos sirve para amplificar fragmentos de PCR BCR- ABL y TKD. Pero para el tipo de proyecto en el que fui asignada, específicamente es más conveniente utilizar el Kit Phusion con sus respectivos reactivos, en las concentraciones y volúmenes idóneos, debido a que es una enzima de alta fidelidad que brinda una mayor certeza en los resultados.

8. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social.

En el tiempo en que realice el servicio social, los resultados fueron satisfactorios, ya que mi principal objetivo fue aprender técnicas de biología molecular, lo cual se logró adecuadamente. Las técnicas que aprendí a realizar fueron la extracción de RNA, cuantificación de DNA y RNA, síntesis de cDNA RT-PCR, así como PCR anidada y convencional para detectar transcritos del gen de fusión *BCR-ABL1*. Entre las herramientas o equipos moleculares con los que me familiaricé durante mi estancia de servicio social se encuentran: Micropipetas de diversos calibres de 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 1000 μ L, Mini Centrífuga, Agitador Vórtex, Cámara de electroforesis, Espectrofotómetro Implem, Termociclador, Thermo block.

En la medida de lo posible trabajé en todo momento con la seriedad y responsabilidad que implica llevar a cabo distintas técnicas, ya que el servicio social es fundamental para el desarrollo profesional.

Realicé una búsqueda de información en la base de datos de PubMed, de artículos relacionados con la enfermedad Leucemia Mieloide Crónica, con la finalidad de leer, comprender la información y elaborar los puntos importantes de la introducción, así como los antecedentes del Informe.

Pude realizar actividades relacionadas con mi formación académica, esto me permitió un mejor desarrollo de mi creatividad y fomento de seguridad en mi persona.

Tuve la oportunidad de conocer y explorar un campo de trabajo diferente a lo habitual, de la formación académica dentro de un aula de clases. Interactuar con distintas personas y aprender a trabajar en equipo es indispensable porque te ayuda a madurar tanto personalmente como profesionalmente ya que encuentras un compromiso laboral con obligaciones y responsabilidades reales.

Si bien el INMEGEN es un instituto de alto prestigio y el personal que labora es muy atento, considero que es de suma importancia seguir haciendo difusión en las distintas universidades para que más jóvenes realicen su servicio social y exploren un nuevo panorama en el campo de la ciencia y la medicina genómica, porque actualmente se requiere de muchos conocimientos para poder atender las distintas problemáticas de salud pública que enfrenta día con día la población mexicana.

9. Fundamento de las actividades

Realizar mi servicio social en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) me permitió adentrarme al método científico al poder contribuir al desarrollo de un proyecto de investigación, siendo este uno de los pilares fundamentales del Sistema Modular en la UAM- Xochimilco.

Por otra parte, la estancia académica, así como el desarrollo de cada una de las actividades que realice en el laboratorio de Oncogenómica y Enfermedades Óseas, se encuentran vinculadas con el “Módulo procesos celulares fundamentales” que nos permite comprender el comportamiento de las células y sus componentes, los métodos empleados en biología y genética molecular han revolucionado el estudio de los seres vivos, en la actualidad se puede investigar a detalle la estructura y función de las diferentes moléculas que constituyen a un organismo.

El continuo avance de la ciencia ha permitido identificar moléculas alteradas responsables de algunas enfermedades humanas. Al estudiar los procesos celulares fundamentales, desde la perspectiva, célula, hombre y sociedad, podemos identificar problemas relevantes de nuestra sociedad que nos permitan implementar investigaciones para un mejor control en diversas enfermedades que hoy en día afectan en gran medida a la población a nivel nacional y mundial.

En el caso de la LMC es importante realizar pruebas y estudios citogenéticos, con la finalidad de confirmar el diagnóstico de la enfermedad, detectar la fase en la que se encuentra el paciente para comenzar el tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa, en primer instancia puede ser el Imatinib pero cuando los pacientes presentan resistencia al tratamiento, se realizan pruebas para detectar alteraciones en el gen de fusión de *BCR-ABL1*, también se pueden identificar mutaciones específicas en *BCR-ABL1* que se encuentren asociadas con la resistencia al tratamiento, esto permite seleccionar otro medicamento con mayor potencia que inhiba la resistencia y actúe contra ciertas mutaciones del dominio cinasa de *ABL1* ya que algunas son más agresivas que otras, pero si se detectan a tiempo la calidad de vida de los pacientes puede mejorar con el tratamiento adecuado.

10. Referencias

1. INMEGEN <https://www.inmegen.gob.mx/>
2. Leucemia mieloide crónica- LeuKemia & Lymphoma Society. Disponible en: [Leucemia mieloide crónica](#)
3. Jabbour, E. Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. ANNUAL CLINICAL UPDATES IN HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES.2020;95:691–709.
4. Sampaio MM, Santos MLC, Marques HS, Gonçalves VLS, Araújo GRL, Lopes LW, Apolonio JS, Silva CS, Santos LKS, Cuzzuol BR, Guimarães QES, Santos MN, de Brito BB, da Silva FAF, Oliveira MV, Souza CL, de Melo FF. Chronic myeloid leukemia-from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. World J Clin Oncol 2021; 12(2): 69-94
5. Casanovas, A. P. D´Aloi, K., Elena, G., Recondo, E., Verón, D., Caferri, H., Kaltembach, B., Cosentini, M. L., Espina, B., Hernandez, N., Arbesu, G., Alderete, S., Gómez, S., Bietti, J., Tomasetti, M., & Cafferata, C. (2019). Leucemia mieloide crónica en Pediatría. Una aproximación a la situación actual en Argentina. Revista Hematología, 23(3), 35–40.
6. Meza-Espinoza, J. P. González- García, J.R. Contreras - Gutiérrez, J. A. Picos-Cárdenas, V. J. Leucemia mieloide crónica: Un artículo de divulgación científica.Rev Med UAS. 2022. Vol.12 (3).
7. Goldman, J.M. Chronic Myeloid Leukemia: A Historical Perspective. Seminars in Hematology, Vol 47, No 4, October 2010, pp 302–311.
- 8.Andreas, Hochhaus; Massimo Breccia; Giuseppe Saglio; Valentín García-Gutiérrez; Delphine Réa; Jeroen Janssen; Jane Apperley. Expert opinion—management of chronic myeloid leukemia after resistance to second-generation tyrosine kinase inhibitors.Leukemia (2020) 34:1495–1502.
9. Hehlmann, R. Chronic Myeloid Leukemia in 2020. HemaSphere (2020) 4:5.
10. Alves, R.; Gonçalves, A.C. Rutella, S.; Almeida, A.M.; De Las Rivas, J.; Trougakos, I.P.; Sarmiento Ribeiro, A.B. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia—From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. Cancers 2021, 13, 4820.
11. Shiseki M, Yoshida C, Takezako N, Ohwada A, Kumagai T, Nishiwaki K, Horikoshi A, Fukuda T, Takano H, Kouzai Y, Tanaka J, Morita S, Sakamoto J, Sakamaki H, Inokuchi K. Dasatinib rapidly induces deep molecular response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients who achieved major molecular response with detectable levels of BCR-ABL1 transcripts by imatinib therapy. Int J

Clin Oncol. 2017 Oct;22(5):972-979. doi: 10.1007/s10147-017-1141-y. Epub 2017 May 26. PMID: 28550414; PMCID: PMC5608785.

12. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, Shah NP, Chuah C, Casanova L, Bradley-Garelik B, Manos G, Hochhaus A. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 10;34(20):2333-40. doi: 10.1200/JCO.2015.64.8899. Epub 2016 May 23. PMID: 27217448; PMCID: PMC5118045.

13. Yu W, Du X, Wang W, Lou J, Liu P, Meng L, Jin J. Efficacy and Safety of Generic Dasatinib in Patients With Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: A Multicenter Prospective Study in China. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2022 Sep;22(9):e867-e873. doi: 10.1016/j.clml.2022.05.002. Epub 2022 May 21. PMID: 35842355.

14. Saydam G, Haznedaroglu IC, Kaynar L, Yavuz AS, Ali R, Guvenc B, Akay OM, Baslar Z, Ozbek U, Sonmez M, Aydin D, Pehlivan M, Undar B, Dagdas S, Ayyildiz O, Akin G, Dag IM, Ilhan O. Frontline nilotinib treatment in Turkish patients with Philadelphia chromosome-positive chronic Myeloid Leukemia in chronic phase: updated results with 2 years of follow-up. *Hematology*. 2018 Dec;23(10):771-777. doi: 10.1080/10245332.2018.1498167. Epub 2018 Jul 11. PMID: 29996726.

15. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, Mauro MJ, Chuah C, Kim DW, Dyagil I, Glushko N, Milojkovic D, le Coutre P, Garcia-Gutierrez V, Reilly L, Jeynes-Ellis A, Leip E, Bardy-Bouxin N, Hochhaus A, Brümmendorf TH. Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J Clin Oncol*. 2018 Jan 20;36(3):231-237. doi: 10.1200/JCO.2017.74.7162. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29091516; PMCID: PMC5966023.

16. Cortés J, Apperley J, Lomaia E, Moiraghi B, Undurraga Sutton M, Pavlovsky C, Chuah C, Sacha T, Lipton JH, Schiffer CA, McCloskey J, Hochhaus A, Rousselot P, Rosti G, de Lavallade H, Turkina A, Rojas C, Arthur CK, Maness L, Talpaz M, Mauro M, Hall T, Lu V, Srivastava S, Deininger M. Ponatinib dose-ranging study in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a randomized, open-label phase 2 clinical trial. *Blood*. 2021 Nov 25;138(21):2042-2050. doi: 10.1182/blood.2021012082. PMID: 34407543; PMCID: PMC9728404.

17. Hanley MJ, Diderichsen PM, Narasimhan N, Srivastava S, Gupta N, Venkatakrisnan K. Population Pharmacokinetics of Ponatinib in Healthy Adult Volunteers and Patients With Hematologic Malignancies and Model-Informed Dose Selection for Pediatric Development. *J Clin Pharmacol*. 2022 Apr;62(4):555-567. doi: 10.1002/jcph.1990. Epub 2021 Dec 16. PMID: 34699069; PMCID: PMC9300170.

18. Palacio, G. V., Ramirez, G. C., Muskus, C. E., Torres, J. D., & Aya, C. A. Detección de mutaciones en el dominio tirosina quinasa de BCR-ABL1 en pacientes colombianos con leucemia mieloide crónica LMC, resistentes al imatinib. *Revista Colombiana de Cancerología*. 2018 22(1), 8-17.
19. Marcé S, Zamora L, Cabezón M, Xicoy B, Boqué C, Fernández C, Grau J, Navarro JT, Fernández de Sevilla A, Ribera JM, Feliu E, Millá F. Frequency of ABL gene mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib and results of treatment switch to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Med Clin (Barc)*. 2013 Aug 4;141(3):95-9.
20. Akram AM, Iqbal Z, Akhtar T, Khalid AM, Sabar MF, Qazi MH, Aziz Z, Sajid N, Aleem A, Rasool M, Asif M, Aloraibi S, Aljamaan K, Iqbal M. Presence of novel compound BCR-ABL mutations in late chronic and advanced phase imatinib sensitive CML patients indicates their possible role in CML progression. *Cancer Biol Ther*. 2017 Apr 3;18(4):214-221. doi: 10.1080/15384047.2017.1294289. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28278078; PMCID: PMC5450736.
21. Kizilors A, Crisà E, Lea N, Passera R, Mian S, Anwar J, Best S, Nicolini FE, Ireland R, Aldouri M, Pocock C, Corbett T, Gale R, Bart-Smith E, Weston-Smith S, Wykes C, Kulasekararaj A, Jackson S, Harrington P, McLornan D, Raj K, Pagliuca A, Mufti GJ, de Lavallade H. Effect of low-level BCR-ABL1 kinase domain mutations identified by next-generation sequencing in patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2019 May;6(5):e276-e284.
22. Kayastha GK, Ranjitkar N, Gurung R, Kc RK, Karki S, Shrestha R, Rajbhandari P, Thapa RK, Poudyal B, Acharya P, Roberts DJ, Hayes B, Zimmerman M, Basnyat B. The use of Imatinib resistance mutation analysis to direct therapy in Philadelphia chromosome/BCR-ABL1 positive chronic myeloid leukaemia patients failing Imatinib treatment, in Patan Hospital, Nepal. *Br J Haematol*. 2017 Jun;177(6):1000-1007. doi: 10.1111/bjh.14683. Epub 2017 May 3. PMID: 28467002.
23. Berman E, Jhanwar S, Hedvat C, Arcila ME, Wahab OA, Levine R, Maloy M, Ma W, Albitar M. Resistance to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia and the splice variant BCR-ABL1(35INS). *Leuk Res*. 2016 Oct;49:108-12. doi: 10.1016/j.leukres.2016.08.006. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27658269; PMCID: PMC5625826.
24. Kantarjian HM, Jabbour E, Deininger M, Abruzzese E, Apperley J, Cortes J, Chuah C, DeAngelo DJ, DiPersio J, Hochhaus A, Lipton J, Nicolini FE, Pinilla-Ibarz J, Rea D, Rosti G, Rousselot P, Shah NP, Talpaz M, Srivastava S, Ren X, Mauro M. Ponatinib after failure of second-generation tyrosine kinase inhibitor in resistant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2022 Nov;97(11):1419-1426. doi: 10.1002/ajh.26686. Epub 2022 Aug 30. Erratum in: *Am J Hematol*. 2023 Jun;98(6):991. PMID: 36054756; PMCID: PMC9804741.

25. Orozco, L. Alcántara, MA. González, A. Diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias. La Frontera: Genética molecular de la enfermedad. Ed JP Luna, E. Orozco; México. Instituto Politécnico Nacional 2004; 2: 1-20

26. Martínez-Castillo M, Gómez-Romero L, Tovar H, Olarte-Carrillo I, García-Laguna A, Barranco-Lampón G, De la Cruz-Rosas A, Martínez-Tovar A, Hernández-Zavala A, Córdova EJ. Genetic alterations in the BCR-ABL1 fusion gene related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2023 Aug;131:107325. doi: 10.1016/j.leukres.2023.107325. Epub 2023 May 24. PMID: 37302352.

Anexo 1. PROTOCOLO PARA REALIZAR EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE CÉLULAS CONSERVADAS EN TRIZOL.

Materiales y equipos

- Agua libre de DNAsas y RNAsas
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol al 75%
- Un tubo de 1.5 ml por cada muestra a procesar
- Gradilla para tubos de 1.5
- Pipeta de 1000 μ L
- Pipeta de 200 μ L
- Puntas de 1000 y 200 μ L
- Recipientes para hielo frappé
- Hielo frappé
- Recipiente para desechos de cloroformo
- Kimwipes
- RNase Zap Wipes
- Centrifuga modificadora de temperatura.
- Vortex
- Thermostat Plus

Anexo 2. PROTOCOLO PARA REALIZAR CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE RNA.

Materiales

- Guantes
- Centrífuga
- Vortex
- Pipeta de 10 μ L
- Puntas para pipeta de 10 μ L
- Kimwipes

- Sanitas
- Agua libre de nucleasas
- Espectrofotómetro (IMPLEN)

Anexo 3. PROTOCOLO PARA REALIZAR ELECTROFORESIS DE MUESTRAS DE RNA.

Para observar la integridad de las muestras de RNA, se preparó un gel de agarosa al 1%, también se utilizaron los siguientes materiales y reactivos.

Material

- Camara de electroforesis
- Fuente de poder
- Pipeta de 10 μ L
- Puntas nuevas para pipeta de 10 μ L
- Guantes nuevos
- Buffer de carga (Loading buffer)
- Buffer de corrida (TBE 1X)
- Gel Red

Anexo 4. PROTOCOLO PARA REALIZAR SÍNTESIS DE cDNA (KIT HIGH CAPACITY)

Se utilizó el KIT HIGH CAPACITY de Transcripción Inversa (RT) de cDNA de alta fidelidad.

Materiales

- Agua libre de nucleasas
- Puntas de pipetas
- Pipetas de 10 μ L, 20 μ L y 200 μ L.
- Vortex
- Centrífuga
- Guantes desechables
- Tubos de reactivos con tapa.

Anexo 5. PROTOCOLO PARA REALIZAR PCR GAPDH.

Una vez que se realizó la síntesis de cDNA fue necesario corroborar que realmente hubiera presencia de cDNA mediante una PCR

Materiales

- Recipiente para hielo
- Hielo frappe
- Pipetas de 10 μ L, 20 μ L, 100 o 200 μ L.
- Puntas nuevas para pipetas
- Vortex
- Centrífuga
- Tubos de 0.2 ml
- Tubos de 0.6 ml
- Gradilla

Anexo 6. PROTOCOLO PARA REALIZAR PCR BCR-ABL (1546 pb) CON KIT DE PCR DE ALTA FIDELIDAD PHUSION.

Materiales

- Guantes nuevos
- Pipetas de 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L.
- Puntas nuevas con filtro, para pipetas de 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L.
- Vortex
- Centrífuga
- Recipiente para hielo
- Hielo frappe
- Tubos 0.6 ml
- Tubos 0.2 ml

Anexo 7. PROTOCOLO PARA REALIZAR PCR TKD (863 pb)

Materiales y reactivos

- Guantes nuevos
- Pipetas de 10 μ L , 20 μ L y 200 μ L.
- Puntas nuevas de 10 μ L , 20 μ L y 200 μ L.
- Vortex
- Centrífuga
- Recipiente para hielo
- Hielo frappe
- Gradilla
- Tubos 0.6 ml
- Tubos 0.2 ml

Anexo 8. Protocolo para purificación de productos de PCR, Kit Qiaquick de Qiagen de Purificación (250).

Materiales y reactivos

- Recipiente para hielo frappe
- Hielo frappe
- Tubos de 1.5 ml
- Gradilla
- Guantes estériles
- Pipeta de 1000 μ L, 200 μ L.
- Puntas nuevas para pipetas
- Buffer Bading
- Wash Buffer
- Buffer Elution EB
- Centrífuga
- Columnas nuevas para purificar.