

HEMATO-ONCOLOGÍA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y
TRATAMIENTO DE LEUCEMIAS

Mayela Aragón-González*
Carmen Aragón-González**

SUMMARY

During the last years, with molecular biology advances, it has been possible the detection of fusion genes that present encoder sequences of transcription factors. This way it has been demonstrated that the BCR-ABL fusion gene is responsible of mieloproliferation in Cronical Mielocytic Leukemia. In Acute Promielocytic Leukemia it has to do with chromosomal translocations that involves the Retinoic Acid's alpha receptor over 17's chromosome, forming the PML-RAR α , a fusion gene that inhibits cellular differentiation and originates lethal proliferation of immature promielocytes of this pathology.

Currently there are proof that show several steps involved in the Leukemia initiation, and based on molecular genetic advances there have been identified several pathological mutations. In this review we analyze the leukemias genomical topicality, its treatment from genetical therapy point of view, as well as the reference of a new indirect marker, the Zap 70.

INTRODUCCIÓN

La leucemia fue descubierta en el mundo hace casi 200 años, por lo que puede considerarse un problema reciente. Desde su

descripción inicial, las leucemias han sido foco de una impresionante investigación médica, debido a varias razones: sus dramáticas manifestaciones clínicas, su frecuencia e impacto en la niñez, su hallazgo en animales, la sencillez de los análisis de la sangre periférica y de la médula ósea que permitieron comprender mejor la hematopoyesis, y su forma de tratamiento, adaptada posteriormente a otros tipos de neoplasias en el ser humano.¹² En los últimos años se han logrado importantes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con una hemopoyesis normal y

*Microbióloga Química Clínica, Especialista en Química Clínica, Laboratorio de Hematología Especializada, Hospital México, Caja Costarricense del Seguro Social, San José, Costa Rica.

** Microbióloga Química Clínica, Laboratorio Clínico, C.A.I.S. Puriscal, Caja Costarricense del Seguro Social, San José, Costa Rica.

con el desarrollo de neoplasias hematológicas.⁹ El mecanismo de daño más frecuente, es la translocación cromosómica balanceada; ésta alteración citogenética a nivel molecular ocurre básicamente a través de dos mecanismos, uno de ellos involucra la fusión del marco de lectura de dos distintos genes, en donde el extremo 5' pertenece a un gen y el extremo 3' a otro gen; el rearreglo molecular origina un gen de fusión cuyo producto es una proteína quimérica con actividad oncogénica que interfiere con la diferenciación terminal. En el segundo mecanismo, todo el marco de lectura de un gen queda bajo el control de un promotor externo que induce la expresión aberrante del protooncogen.¹⁵ Los avances en las técnicas del bandeo cromosómico y en los métodos de cultivos permitieron el desarrollo de la citogenética convencional y ha permitido empezar a comprender la biología en los cambios cromosómicos de la leucemia. Los oncogenes leucémicos fueron descubiertos con la aplicación de retrovirus para inducir leucemia experimental en animales. Estos genes localizados en ciertas regiones del rearreglo cromosómico en el cáncer humano fueron involucrados en la patogénesis de las enfermedades humanas, oncogenes tales como el MYC en Linfoma de Burkitt y el BCR-

ABL en la Leucemia Mieloide Crónica.¹² Las translocaciones e inversiones cromosómicas son las aberraciones cromosómicas descritas en leucemia humana y la clonación en sus "puntos de fractura" han permitido identificar más de 100 oncogenes, donde su producto oncogénico alterará el programa normal en la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. Además de los rearreglos cromosómicos también pueden ocurrir mutaciones puntuales que afectan los factores de transcripción como C/EBP alpha, GATA1 y AML1 o afectar receptores de tirosina quinasas como el FLT3 y el c-KIT.¹¹

GENÉTICA MOLECULAR DE LAS LEUCEMIAS

La Leucemia Mielocítica Crónica (LMC) es la primera neoplasia maligna que se relaciona con una anomalía cromosomal: el cromosoma Filadelfia, que es el resultado de una translocación genética entre la región 5' del gen BCR del cromosoma 22 que se fusiona con la región 3' del gen ABL ubicado en el cromosoma 9, creando el gen de fusión BCR-ABL con alta actividad tirosin quinasa, éste es un evento molecular crítico en el desarrollo de algunas leucemias crónicas y agudas siendo el responsable de la mieloproliferación observada en la LMC.^{7, 16} Los análisis de

bando cromosómico siguen siendo el estándar de oro para la investigación de las aberraciones en las leucemias, estos han llevado al descubrimiento de más de 100 translocaciones en cromosomas y la identificación de una serie de ganancias y pérdidas cromosómicas en las células leucémicas, de esta forma la comprensión de los mecanismos implicados en las leucemias han cambiado. A nivel molecular, muchas de estas translocaciones cromosómicas dan lugar a la expresión desregulada de oncogenes, por ejemplo MYG en la Leucemia Linfoide Aguda (LLA). Por otra parte las translocaciones pueden dar lugar a la creación de proteínas de fusión quimérica, muchas de las cuales alteran los programas de transcripción de diferenciación del bloque de células. Por ejemplo en la Leucemia Mielocítica Aguda (LMA), t(8:21) e inv(16) crearon el gen de fusión LMA 1-ETO, la cual consiste en una de las aberraciones genéticas más comunes que puede ser causante del bloqueo de la diferenciación de las células mieloides y representa del 5 al 12% de los casos de LMA y 33% de los casos cariotípicamente anómalos de leucemias mieloblásticas agudas con maduración. Sin embargo aberraciones como éstas, no son por sí mismas suficiente causa de una leucemia mieloides. Por otra parte se ha demostrado

que la actividad constitutiva de las moléculas de señalización, como los miembros de la familia de FLT3 o RAS pueden inducir el fenotipo mieloproliferativo complementario.¹¹ En el caso de la Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), pertenece al subtipo morfológico M3 de la Leucemia Mieloblástica Aguda y se asocia con translocaciones cromosómicas que involucran el receptor alfa para el ácido retinoico ($\text{RAR}\alpha$) sobre el cromosoma 17.^{22, 25} La proteína $\text{RAR}\alpha$ es un factor de transcripción dependiente del ligando (RA o ATRA) que generalmente bloquea la expresión de genes en ausencia de dichos ligandos.⁶ En la LPA humana hay un bloqueo en la diferenciación normal de los granulocitos, el cual origina una acumulación letal de promielocitos inmaduros.^{13, 19} En la actualidad hay pruebas que evidencian que hay varios pasos implicados en el inicio de la leucemia, y con base en los avances en genética molecular muchas mutaciones patológicamente reconocidas han sido identificadas en ambas leucemias mieloides.

TRATAMIENTO DE LAS LEUCEMIAS

La LPA fue uno de los primeros tumores malignos en ser tratados con éxito con una terapia blanco molecular específica, el ácido trans-retinoico (ATRA). El

blanco específico del ATRA es la transformación potencial del gen de fusión productor PML-Rar α cuyo efecto consiste en la diferenciación terminal de los blastos sin efectos citotóxicos colaterales. Al combinar la quimioterapia con ATRA se obtienen los mejores resultados con una mejoría de aproximadamente 70% de los pacientes.²³ De esta forma el tratamiento de la LPA con retinoides constituye la primera demostración dramática de que la terapia de diferenciación es muy eficiente en una enfermedad maligna avanzada.¹⁷ El Imatinib es el tratamiento de elección para los pacientes con LMC en fase crónica, es un inhibidor de tirosin kinasa.⁶ Estudios recientes realizados después de la introducción del Imatinib, han demostrado que es necesaria la monitorización molecular por estudios cuantitativos una vez alcanzada la remisión citogenética completa, para poder estratificar la respuesta al tratamiento y detectar una pérdida temprana de la respuesta lograda.^{2, 8} Nuevas drogas han demostrado ser eficaces en el tratamiento de las leucemias, incluyendo numerosos inhibidores de la tirosina quinasa (por ejemplo los inhibidores de FLT3 como PKC412), inhibidores de farnesiltransferasa (tepifarbid), agentes desmetilantes (decitabina), inhibidores de la histona deacetilasa (el ácido valproico)

y anticuerpos monoclonales (el anti -CD33 gemtuzumab ozogamicina). Mientras estos agentes están siendo investigados en ensayos clínicos de tratamiento, la combinación de terapias con fármacos citotóxicos con o sin trasplante de células madre sigue siendo el estándar de oro en el tratamiento y ha incrementado la tasa de cura en las leucemias especialmente en la LLA en niños, con una tasa de curación de más del 80%. Sin embargo la tasa de curación para adultos sigue siendo muy inferior, señalando de esta forma la necesidad de la incorporación tratamientos con terapias blanco molecular específica.¹¹

EFFECTOS MOLECULARES DE LAS DROGAS ANTILEUCÉMICAS

La leucemia fue una de las primeras enfermedades en las cuales la tecnología de los microarreglos de ADN fue aplicada en el monitoreo de los efectos de las drogas, analizando el efecto del ácido trans retinoico (ATRA) en el tratamiento de líneas celulares derivadas de LPA. Estos análisis mostraron que los genes regulados por ATRA incluyen miembros de la vía del factor de necrosis tumoral (TNF), esto sugiere que esta vía tiene interacción con la señalización de ATRA y desempeña un papel en

la regulación de la supervivencia celular en respuesta al ATRA. Los microarreglos de ADN también han sido utilizados con éxito para evaluar la sensibilidad de la LMC al imitinib que como ya se mencionó, tiene como blanco la actividad tirosin quinasa del gen de fusión BCR-ABL. Utilizando líneas celulares que presentan diferentes expresiones de genes, que interactúen con el imitinib, se puede llegar a identificar resistencia a éste fármaco, lo que sugiere que líneas alternativas podrían mantener viabilidad y promover el crecimiento, independientemente del BCR-ABL.²⁴ Del mismo modo, Rosenwald y colaboradores han investigado las consecuencias moleculares del tratamiento con fludarabine en pacientes con LLC usando microarreglos de ADN. Tanto in vitro como in vivo la exposición a fludarabine que es un análogo de las purinas y que se utiliza actualmente en el tratamiento de la LLC, tiene como blancos el gen p53 y genes involucrados en la reparación del ADN. Esto provee una explicación molecular de la resistencia a la droga y al curso agresivo de la enfermedad visto en pacientes con LLC que tienen el gen p53 mutado. Lo anterior sugiere la importancia de tratar solamente a los pacientes que tendrán una respuesta positiva a la terapia con fludarabine.²¹

DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS CONTRA LAS LEUCEMIAS

En la actualidad el enfoque de la genómica que incluye la tecnología de los microarreglos de ADN, juega un papel importante en el descubrimiento objetivo de drogas, proporcionando una importante herramienta para la optimización y la validación clínica de nuevos compuestos. Mientras que en el inicio, el proceso de perfiles genéticos permitía la identificación y priorización de terapias diana potenciales, actualmente el perfil genético ayuda al descubrimiento de drogas y toxicología. Por lo tanto los diversos enfoques de la bioinformática se utilizan para deducir el perfil de expresión del mecanismo de acción de diversas drogas así como los efectos deseados. Sin embargo es importante tener en cuenta las limitaciones de la evaluación de las respuestas a través de las mediciones de ARNm solamente. Aún así, los perfiles de expresión génica proporcionan una herramienta poderosa en la farmacogenética que promete mejorar la predicción de pronóstico y respuesta a los fármacos.²⁶

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES INDIRECTOS DE LA LEUCEMIA

Muchos grupos han demostrado que los perfiles de expresión génica permiten la identificación de señales específicas que correlacionan con el pronóstico de la enfermedad ya sea este favorable o no. Investigaciones recientes han permitido la identificación de marcadores indirectos como factor pronóstico. En la Leucemia Linfocítica Crónica B (LLC-B) la proteína ZAP-70 y Syk que representan los primeros en ser clínicamente implementados. La ZAP-70 es una proteína de 70 kDa con actividad tirosina kinasa, que se asocia con la subunidad Z del receptor de las células T (RCT). Las siglas que la representan provienen de su caracterización en inglés: Zeta-associated protein-70 kDa. El otro miembro de esta familia es la Syk, que es una proteína de 72 kDa que se purificó a partir del bazo porcino. Su abreviatura procede del término con que se identificó en inglés: Spleen tyrosine kinase.^{1, 4} En los linfocitos B, la Syk desempeña una importante función relacionada con la transducción de señales dependientes de su receptor de membrana. La ZAP-70 se expresa normalmente en las células T y NK, mientras que la Syk lo hace en los linfocitos

B y raramente en otras células del sistema hematopoyético. La ZAP-70 y la Syk tienen funciones prácticamente equivalentes en los linfocitos T y B, respectivamente. En estas células son elementos fundamentales para la ejecución de una cascada de señales en la que intervienen diferentes pasos de fosforilación y desfosforilación que activan otras proteínas kinasas, las cuales transfieren al núcleo de la célula la información necesaria para la activación del linfocito y el desarrollo de sus funciones efectoras.^{3,5} Después que el RCT es estimulado por un antígeno, se activa un sistema de PTK que induce la fosforilación de residuos de tirosina ubicados en determinados sitios de la cadena Z, los que se convierten así en puntos de unión con la ZAP-70. Mientras no se haya unido a la cadena Z, la ZAP-70 permanece inactiva. Después que se une con esta cadena, su activación ocurre rápidamente, por la fosforilación de un residuo tirosina presente en su estructura. Aunque todos los pasos en que interviene la ZAP-70 activada no están totalmente esclarecidos, se considera que ella es una PTK clave en la fosforilación de diversas proteínas que le sirven de sustrato y que intervienen en la cascada de señales que se desencadena por la estimulación del RCT.^{3,4,14} Los linfocitos B normales no expresan la ZAP-70. Sin embargo,

estudios genéticos realizados en la LLC-B, con empleo de microarreglos de ADN, mostraron un patrón característico en la expresión de un pequeño número de genes, entre los que está el de ZAP-70²⁰. Se observó que las LLC-B que no tenían mutaciones en los genes IgVH expresaban ZAP-70, lo que no sucedió en los casos con mutaciones en los genes IgVH. Por lo tanto, se planteó correlación entre la expresión de esta proteína y el estado mutacional de estos genes^{5,20,27}, aunque esta correlación no es absoluta, pues se han comprobado casos con mutaciones en los genes IgVH y alta expresión de la ZAP-70. Sin embargo, esto se considera una situación excepcional, y por lo tanto, se acepta la expresión de la ZAP-70 como un indicador adecuado del estado mutacional de los genes IgVH y con un valor pronóstico similar en la LLC-B⁵. Al contrario de lo que se ha señalado en relación con la expresión de CD38, la de la ZAP-70 se mantiene sin variación durante todo el tiempo que dura la enfermedad. Se ha comprobado que la estimulación del receptor de las células B en las LLC-B que expresan la ZAP-70, provoca una fosforilación de las PTK citosólicas significativamente mayor que la que se obtiene en las que no expresan ZAP-70.⁵ Este hecho sugiere que la expresión de esta proteína se asocia con

un aumento de la transducción de señales estimuladoras de los linfocitos B que podría contribuir a la evolución más agresiva que pueden tener las LLC-B sin mutaciones en los genes IgVH. Más recientemente, el estudio de la expresión de la ZAP-70 se ha simplificado, y además de su determinación mediante retrotranscripción con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se puede realizar por citometría de flujo y por inmunohistoquímica. Estas nuevas posibilidades contribuyen a que la determinación de la expresión de ZAP-70 se haga más factible en la práctica clínica habitual, lo que proporciona un valioso indicador pronóstico más simple que la caracterización del estado mutacional de los genes IgVH.^{5,18,27}

CONCLUSIONES

Durante la última década, las leucemias han sido un área atractiva de la investigación, usando pruebas como los microarreglos de ADN, lo que ha permitido identificar blancos moleculares para el desarrollo de compuestos químicos inductores de la diferenciación terminal o inhibidores de oncoproteínas. Los perfiles de expresión génica han contribuido con una nueva faceta importante para la exploración de neoplasias hematológicas. Con el conocimiento existente en la

hematopoyesis y la genética de las leucemias hay una guía en la interpretación de datos y se facilita la generación de hipótesis biológicamente significativas. Esta tecnología contribuye a una clasificación leucémica molecular completa lo que permitirá un tratamiento específico para cada leucemia lo que permitirá a los médicos discernir los casos con un riesgo elevado de recaída o una alta probabilidad de la resistencia a la terapia.

RESUMEN

En los últimos años con los avances en la biología molecular se ha podido llegar a detectar en las leucemias de nuevo diagnóstico genes de fusión los cuales presentan secuencias codificadoras de factores de transcripción. De esta manera se ha demostrado que el gen de fusión BCR-ABL es el responsable de la mieloproliferación en la Leucemia Mielocítica Crónica. En el caso de la Leucemia Promielocítica Aguda se relaciona con translocaciones cromosómicas que involucra el receptor alfa de ácido retinoico sobre el cromosoma 17, formándose el gen de fusión PML-RAR α , la cual inhibe la diferenciación celular originando la proliferación letal de promielocitos inmaduros de esta patología. En la actualidad hay pruebas que evidencian que

hay varios pasos implicados en el inicio de la leucemia, y con base en los avances en genética molecular muchas mutaciones patológicamente reconocidas han sido identificadas. En esta revisión se analiza lo que se conoce en la actualidad de la genómica de las leucemias, su tratamiento desde el punto de vista de la terapia génica, así como la mención de un nuevo marcador indirecto como lo es el ZAP-70.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bolen JB. Nonreceptor tyrosine protein kinases. *Oncogene* 1993;8:2025-31.
2. Branford S, Rudzki Z, Harper A, Grigg A, Taylor K, Durrant S, et al. Imatinib produces significantly superior responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*. 2003. Natur Publishin Group 0887.6924-03, <http://www.nature.com>
3. Chan AC, Irving BA, Fraser JD, Weiss A. The α Chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70 kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9166-70.
4. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992;71:649-62.
5. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai K R, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:4609-14.
6. Collins S. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia* 2002; 16: 1896-1905.
7. Deininger M, Goldman J, Melo J. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343-3356.
8. Druker BJ. Imatinib mesylate in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 963-971.
9. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002, 99: 3089-3101.
10. Hehlmann R, Berger U, Pfirmann M, Heimpel H, Hochhaus A, Hasford J, et al. Drug treatment is superior to allografting as first-line therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007; 109: 468-492.
11. Huntington F, Willard & Geoffrey S. Ginsbur. *Genomic and Personalized Medicine*. 2009; 70: 844-855.
12. Jiménez B. R. Historia e Investigación de la Leucemia en Costa Rica. *Revista Biológica Tropical*, 2004. 52: 559-569.
13. Kakizuka A, Miller W, et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor. *Cell* 1991; 66: 663-674.
14. Kane LP, Lin J, Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12:242-9
15. Look A. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278:1059-1064.
16. Lucas C, Harris R, Giannoudis A, Davies A, Knight K, Watmough S, Wang L & Clark R. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Hematologica*. 2009; 94 (10): 1362-1367.
17. Martínez M, Zafra G, Reynoso E, Astudillo H, Nambo M, Benitez L, Martinez A, Rivera R, Gariglio P. La Hemato-oncología molecular y las nuevas estrategias terapéuticas específicas en leucemia. *Gac Méd Méx*, 2006; 142 (2): 145-149.
18. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic

- leukaemia. *Lancet* 2004;363:105-11.
19. Pandolfi P, Alcalay M, Longo L, et al. Molecular genetics of the t(15-17) of acute promyelocytic leukemia (APL). *LEUKEMIA* 1992; 6 (Suppl 3): 120S – 122S.
20. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-47.
21. Rosenwald A, Chuang E, Wiestner A, Alizadeh A, Arthur D, Mitchell J, Marti G, Fowler D, Wilson W, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood*. 2004; 104: 1428-1434.
22. Rowley J, Golomb H, Dougherty C. 15/17 translocation a consistent chromosomal change in acute promyelocytic. *Lancet* 1977; 1: 549-550.
23. Tallman M, Andersen J, Schiffer C, et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1997; 337: 1021-1028.
24. Tamayo P, Slonim D, Mesinovic J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander E, Golub T. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: Methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 2907-2912.
25. The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocations of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990; 347: 558-561.
26. Walgren R, Meucci M, McLeod H. Pharmacogenomic discovery approaches: will the real genes please stand up?. *J Clin Oncol*. 2005; 23:7342-7349.
27. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-51.