

MUTACIONES EN EL GEN *BCR-ABL1* EN UN PACIENTE PERUANO CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA RESISTENTE A TERAPIA

MUTATIONS IN THE *BCR-ABL1* GENE IN A PERUVIAN PATIENT WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA RESISTANT TO THERAPY

César Ortiz^a, Yubell Álvarez^b, Kenny Dongo-Pflucker^c, Emilio Valdivia^d, Julio Mendoza^c, Silvia Dávila^b, Pamela Mora-Alfárez^e

Resumen

Introducción: El gen de fusión *BCR-ABL1* está presente en al menos la cuarta parte de pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda de células B. Su detección determina la viabilidad del tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) que se controla mediante la cuantificación de transcritos de *BCR-ABL1*. Algunos pacientes no responden o recaen al tratamiento debido a la presencia de mutaciones en el dominio tirosina quinasa del gen *BCR-ABL1*. **Reporte de caso:** Se reporta un paciente con *BCR-ABL1* que logra una respuesta molecular luego de iniciado la terapia con imatinib; sin embargo, recae después de quince meses cambiándose el tratamiento a dasatinib. El cambio no permitió una respuesta molecular a la terapia. Retrospectivamente, se realizó la búsqueda de mutaciones en el *BCR-ABL1* encontrándose tres mutaciones de resistencia a terapia (E459K, E255K y V299L). **Conclusiones:** La aparición de mutaciones durante el tratamiento con TKIs tiene un fuerte impacto en el progreso de la enfermedad, siendo relevante la búsqueda de mutaciones ante recaída o persistencia de transcritos del *BCR-ABL1*.

Palabras Claves Proteínas de fusión, bcr-abl. Leucemia. Resistencia al tratamiento. Mutación. Análisis de secuencias. (Fuente: DeCS BIREME)

Abstract

Context: The fusion gene *BCR-ABL1* is present in at least the fourth part of B-cell acute lymphoblastic leukemia adult cases. Patients with this fusion gene are candidates to tyrosine kinase inhibitors treatment, and the response to this therapy can be measure by quantification of *BCR-ABL1* transcripts. Some patients relapse because the presence of mutations in the tyrosine kinase domain of *BCR-ABL1*. **Case report:** This is a report of a patient with *BCR-ABL1* who initially achieved molecular response with imatinib therapy, relapsing after fifteen months. The treatment was changed to dasatinib, but the patient doesn't achieve molecular response. Retrospectively, we analyzed the tyrosine kinase domain of *BCR-ABL1* and we found three mutations (E459K, E255K and V299L). **Conclusions:** We conclude that gain of mutations during treatment with TKIs has strong impact in the progress of disease, being relevant the detection of *BCR-ABL1* mutations in relapsed patients or in case of *BCR-ABL1* persistence.

Key words Fusion proteins, bcr-abl. Leukemia, B-cell. Drug resistance. Mutation. Sequence analysis. (source: MeSH NLM)

Laboratorio de Biología Molecular. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Lima, Perú.

a Biólogo Genetista Biotecnólogo.

b Biólogo.

c Biólogo con mención en Biología Celular y Genética.

d Biólogo. Magister en Biotecnología y Biomedicina.

e Médico con especialidad en Genética.

Correspondencia:

Nombre completo: César Alexander Ortiz Rojas. Dirección: Francisco de Toledo 159, Urb. Cercado. Santiago de Surco. Lima, Perú. Teléfono: (51) 961714929. E-mail: cesar.alexander04@gmail.com

Introducción

Los pacientes con leucemia linfática aguda de células B (LLA-B) acumulan alteraciones genéticas en los linfocitos B que bloquean la diferenciación celular. Las alteraciones más frecuentes en LLA-B son las translocaciones recíprocas, como la translocación t(9;22) o cromosoma Filadelfia que contiene al gen BCR-ABL1. Este gen de fusión es la característica genética de la leucemia mieloide crónica (LMC); y además, está presente en el 25-40% y 3-5% de los casos de LLA-B adultos y pediátricos, respectivamente.^{1,2} El BCR-ABL1 se puede traducir en las variantes p190 y p210, estando la primera asociada a pronóstico desfavorable y baja tasa de supervivencia a largo plazo.^{3,4} La detección del cromosoma Filadelfia o del gen de fusión BCR-ABL1 determina el inicio de la terapia con inhibidores de tirosina quinasa (TKIs), fármacos que bloquean la actividad quinasa de la proteína quimérica responsable de la carcinogénesis. En Perú el TKI más utilizado es el imatinib, empleado como tratamiento de primera línea, mientras que dasatinib y nilotinib suelen ser indicados ante falta de respuesta o recaída.⁵ A pesar de la alta tasa de respuesta a los TKIs algunos pacientes son resistentes o adquieren resistencia durante la terapia, y a diferencia de la LMC que tiene parámetros que definen falla al tratamiento, no existe un consenso para LLA-B, excepto la pérdida de respuesta molecular mayor (MMR) definida como niveles indetectables de transcritos de BCR-ABL1.^{3,4} Un mecanismo frecuente de resistencia al tratamiento con TKIs es la adquisición de mutaciones en el dominio quinasa (TKD) del BCR-ABL1, tales como G250E, E255K/V o T315I que son frecuentes en LLA-B. Estas mutaciones lideran la pérdida de afinidad entre el fármaco y el BCR-ABL1, por lo que la búsqueda de estas mutaciones es indicado en pacientes con resistencia al tratamiento o pérdida de respuesta molecular.^{5,6} En el presente reporte se describe un caso con resistencia a imatinib y dasatinib, donde el análisis genético por qRT-PCR y secuenciamiento evidenció la adquisición de mutaciones durante la terapia.

Reporte de caso

Paciente mujer de 28 años de edad proveniente de Lima, es atendida en el Departamento de

Medicina del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en mayo 2013. El análisis hematológico e inmunofenotipo fueron compatibles con LLA-B. El conteo leucocitario y porcentaje de blastos en médula ósea fueron 120.99 x 10³/L y 66%, respectivamente. El perfil de inmunofenotipo en sangre periférica describió 55% de población celular linfoide B inmadura con fenotipo aberrante, expresándose los marcadores: CD19, CD79A, CD45, CD38 parcial, CD13, CD123, CD66C, HLADR, CD20, CD10, CD24, CD7 y CD34; fenotipo compatible con LLA-B. La prueba de RT-PCR confirmó la presencia del gen BCR-ABL1 variante p190. La expresión de BCR-ABL1 al momento del diagnóstico fue de 124,3%, determinado por qRT-PCR, respecto al gen control ABL1.

El paciente inició tratamiento con una dosis de 600 mg diarios de imatinib, logrando respuesta molecular completa (0% de BCR-ABL1) en el sexto mes. En el décimo quinto mes el paciente recae con 200% de expresión de BCR-ABL1; el tratamiento con imatinib se suspendió y se cambió a una dosis diaria de 100 mg de dasatinib. En el vigésimo sexto mes el paciente mostró elevado recuento de blastos y leucocitos en sangre, y 11.4% de transcritos de BCR-ABL1 (Figura 1). El tratamiento con dasatinib fue suspendido y cambiado a vincristina y prednisona. El paciente fallece semanas después de su último control.

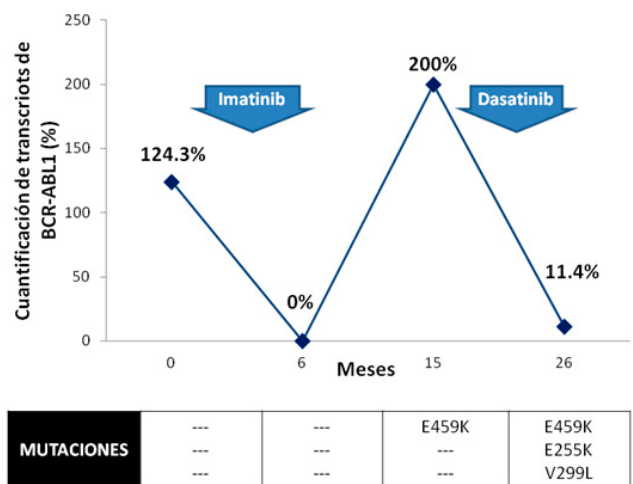


Figura 1. Cuantificación de BCR-ABL1 (%) y mutaciones de resistencia. Se observa el perfil de expresión del BCR-ABL1 al inicio de la enfermedad y durante las terapias con imatinib y dasatinib, así como las mutaciones adquiridas en el dominio quinasa del BCR-ABL1 (E459K, E255K y V299L). Los datos de expresión son relativos al gen constitutivo ABL1.

Se realizó un análisis retrospectivo por secuenciación directa de transcritos del BCR-ABL1 p190, para evaluar el dominio tirosina quinasa del gen de fusión. Se incluyó la muestra al inicio de la enfermedad (tomada previo al tratamiento) y la de los respectivos controles. Se detectó la mutación E459K en la muestra del décimo quinto mes, previamente descrita como resistente a TKIs⁷. En la muestra del vigésimo sexto mes se encontraron dos mutaciones adicionales: E255K y V299L, ambas descritas como resistentes a dasatinib (Figure 1 y 2).^{8,9}

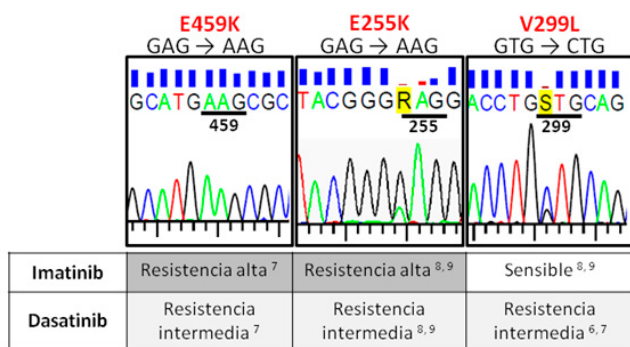


Figura 2. Mutaciones E459K, E255K y V299L, y sus efectos sobre la terapia. La resistencia a TKIs generada por las mutaciones se dividen en tres: resistencia alta (pérdida de afinidad total entre el TKI y el BCR-ABL1), resistencia intermedia (efecto parcial del fármaco sobre la proteína) y sensibilidad al tratamiento (la mutación no compromete el efecto del fármaco). R: adenina o guanina; S: guanina o citocina.

Discusion

El gen de fusión BCR-ABL1 está presente en más del 25% de casos LLA-B adultos y hasta en un 5% de casos pediátricos,^{1,2} y su presencia determina el inicio del tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (TKIs). El primer TKI utilizado fue el imatinib, el cual se emplea como terapia de primera línea, mientras que en caso de resistencia el tratamiento puede cambiar a TKIs de segunda generación (dasatinib y nilotinib).¹⁰ El uso de TKIs corresponde a una terapia blanco que bloquea la actividad quinasa del BCR-ABL1, favoreciendo la remisión de la enfermedad. Sin embargo, muchos pacientes recaen luego de haber logrado la remisión completa, por lo que el trasplante de proge-

nitores hematopoyéticos (TPH) sigue siendo la terapia de referencia en esta enfermedad.^{10,11}

Un paciente con LLA-B BCR-ABL1 positivo y en tratamiento con TKIs, es controlado mediante técnicas de hematología, citogenética, inmunofenotipo y biología molecular, con las cuales se busca evidencia de enfermedad mínima residual (EMR). La técnica de biología molecular recomendada para el control es la qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa sobre retrotranscritos), mediante la cual se cuantifican los transcritos de BCR-ABL1 respecto a un gen de expresión constitutiva.¹² La metodología para la cuantificación de BCR-ABL1 fue estandarizada por un grupo de laboratorios de referencia internacional, en el contexto del Programa Europeo contra el Cáncer (EAC, siglas en inglés). Usando esta técnica se espera encontrar que los pacientes con BCR-ABL1 y en tratamiento con TKIs hayan alcanzado respuesta molecular completa, es decir, que no se detecten transcritos de BCR-ABL1.

La resistencia al tratamiento con TKIs está considerada como una de las causas más comunes de recaída, pudiendo originarse a partir de varios mecanismos. Los principales son: (i) adquisición de mutaciones en el TKD del BCR-ABL1, (ii) alteraciones citogenéticas adicionales al cromosoma Filadelfia y (iii) amplificación génica del BCR-ABL1.⁵ El primero es el mecanismo más frecuente, reportado en el 40% de los casos de LLA-B al diagnóstico y hasta en un 90% de los casos en recaída,^{13,14} y es analizado por secuenciamiento Sanger, metodología de oro para el análisis de mutaciones.

En el presente reporte analizamos un caso de LLA-B con expresión BCR-ABL1, que alcanzó respuesta molecular por el tratamiento con imatinib. En la muestra al diagnóstico no se detectaron mutaciones en el TKD del BCR-ABL1; sin embargo, al décimo quinto mes el paciente recae con 200% de BCR-ABL1, encontrándose la mutación E459K. A pesar de que aún no se ha establecido el tipo de TKI ni el nivel de resistencia que confiere la E459K, estudios de modelamiento de proteínas indican que genera un efecto desestabilizante en la conformación del dominio quinasa del BCR-ABL1, el cual interactúa con el imatinib. Además,

mediante ensayos in vitro se ha encontrado que el E459K es la razón de resistencia alta a imatinib y respuesta intermedia a dasatinib (Figura 2).^{7,15} Debido a la recaída el paciente inicia tratamiento con dasatinib, pero no logra respuesta molecular, encontrándose 11,4% de transcritos de BCR-ABL1. El análisis de mutaciones mostró dos variantes adicionales: E255K y V299L; ambas descritas por conferir resistencia intermedia a dasatinib.^{8,9} Estos hallazgos indicarían que el paciente fue adquiriendo mutaciones durante los tratamientos con TKIs.¹⁶ Finalmente se debe considerar que la LLA-B es una neoplasia caracterizada por inestabilidad genómica, es decir, la probabilidad de que otros genes estén alterados en las células neoplásicas es alta, además de alteraciones citogenéticas adicionales.¹⁶ Por ello, el cariotipo es fundamental para categorizar riesgo y para el control de la LLA-B; sin embargo, en el caso analizado no se contó con la citogenética, pudiendo estos datos haber explicado la agresividad de la enfermedad, además de las mutaciones encontradas.

Finalmente, la ganancia de mutaciones durante el tratamiento con TKIs tiene un fuerte impacto en la progresión de la enfermedad, por lo que la detección de mutaciones en el BCR-ABL1, especialmente en un paciente en recaída, debe ser evaluado en adición a la cuantificación de transcritos de este gen de fusión.

Contribuciones de autoría:

CO, YA y DPK participaron en la concepción y diseño de trabajo, obtención de resultados, análisis e interpretación de los datos, revisión crítica del manuscrito y aprobación de la versión final. EV, SD, JF y PMA colaboraron en la revisión crítica del artículo y la aprobación de su revisión final.

Fuente financiadora:

Autofinanciado.

Conflictos de Interés:

Los autores declaran no tener conflictos de interés en el diseño, desarrollo y publicación del trabajo.

Referencias

1. Ghazavi F, Van Roy N, Poppe B, Speleman F, et al. The molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology*. 2015. En impresión.
2. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984; 36:93–9.
3. Maino E, Sancetta R, Viero P, Imbergamo S, Scattolin A, et al. Current and future management of Ph/BCR-ABL positive ALL. *Expert Reviews Anticancer Therapy*. 2014; 14(6): 723-740.
4. Mitterbauer G, Nemeth P, Wacha S, Cross N, Schwarzinger I, et al. Quantification of minimal residual disease in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia using quantitative competitive polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology*. 1999; 106:634-643.
5. Ottmann O y Pfeifer H. Management of Philadelphia chromosome– positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Hematology*. 2009; 371-381.
6. Pfeifer H, Wassmann B, Pavlova A, et al. Kinase domain mutations of BCR-ABL frequently precede imatinib-based therapy and give rise to relapse in patients with de novo Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood*. 2007;110:727-734
7. Cioch M, Lewandowski K, Gniot M, Dmoszynska A. Complete molecular remission with platelets number normalization after dasatinib therapy in patient with cml complicated by thrombocytopenia and resistant to imatinib due to an E459K mutation. *Haematologica* 2010; 95[suppl.2]:547, abs. 1357.
8. Jonas D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Molecular Diagnostic*. 2009; 11(1): 4-11.
9. Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, Magistrini V, Perini P, et al. Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib against 18 imatinib resistance BCR/ABL mutants. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 469-471.

10. Leoni V, Biondi A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(3):295-299.
11. Aricò M, Schrappe M, Hunger SP, et al. Clinical Outcome of Children With Newly Diagnosed Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Treated Between 1995 and 2005. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(31):4755-4761.
12. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318-57.
13. Jones D, Thomas D, Yin CC, et al. Kinase domain point mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia emerge after therapy with BCR-ABL kinase inhibitors. *Cancer*. 2008; 113:985-994.
14. Pfeifer H, Wystub S, Wassmann B, et al. Minimal residual disease and mutational status prior to and after SCT for patients with philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). 50th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, CA. 2008.
15. Vajpai N, Strauss A, Fendrich G, Cowan-Jacob SW, Manley PW, et al. Solution conformations and dynamics of ABL kinase inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J Biol Chem*. 2008;283(26):18292-18302.
16. Sierra J, Cepero V y Giordano S. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. *Molecular Cancer*. 2010; 9:75