

Duplicación del exón 2 del gen ABL1 en un paciente con leucemia mieloide crónica Filadelfia negativo

Duplication in exon 2 of the ABL1 gene in a patient diagnosed with philadelphia negative chronic myeloid leukaemia

Paladino MI⁽¹⁾, Alonso MB⁽¹⁾, Alonso CN⁽²⁾, Rubio PL⁽²⁾, Alonso LM⁽³⁾, Verón DA⁽⁴⁾, Riccheri C⁽⁵⁾.

⁽¹⁾Bioquímica, Sector Hemato-Oncología / Biología Molecular, Sección Bioquímica Hematológica, Servicio de Bioquímica, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas", Prov. Buenos Aires. Argentina.

⁽²⁾Bioquímica Laboratorio de Biología Molecular, Servicio Hematología-Oncología, Hospital de Pediatría SAMIC "Prof. Dr. Juan Pedro Garrahan". C. A. de Buenos Aires. Argentina.

⁽³⁾Bioquímica, Jefa de Sección Bioquímica Hematológica, Servicio de Bioquímica, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas", Prov. Buenos Aires. Argentina.

⁽⁴⁾Médico Hematólogo del Servicio de Pediatría, Sección Hematología y Oncología. Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas", Prov. Buenos Aires. Argentina.

⁽⁵⁾Médica Hematóloga del Servicio de Pediatría, Sección Hematología y Oncología. Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas", Prov. Buenos Aires. Argentina. Chairman LLA Pediátrica. Grupo Argentino de Tratamiento de Leucemias Agudas (GATLA).

mipaladino@hotmail.com

Fecha de recepción: 19/08/2015
Fecha de aprobación: 1/12/25015



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 19 n° 3: 221-226
Septiembre - Diciembre 2015

Palabras clave: leucemia mieloide crónica, Filadelfia negativo, alteraciones del gen ABL1, técnicas moleculares.

Keywords: chronic myeloid leukemia, Philadelphia negative, ABL1 gene alterations, molecular techniques.

Resumen

La leucemia mieloide crónica se caracteriza por la presencia de la traslocación $t(9;22)(q34;q11)$, que origina el transcrito de fusión *BCR-ABL1* y que se traduce en una proteína tirosina quinasa constitutivamente activada, blanco de drogas inhibitoras. La detección de *BCR-ABL1* por RT-PCR es imprescindible para documentar el diagnóstico y monitorear la respuesta al tratamiento. La detección por RT-

PCR del transcrito de un gen constitutivo como el *ABL1* se utiliza para evitar resultados falsos negativos. Presentamos el caso de un paciente con cuadro clínico compatible con leucemia mieloide crónica en crisis blástica que, en ausencia del transcrito de fusión *BCR-ABL1*, presentó una alteración peculiar en el gen *ABL1* que podría tener un rol protagónico en el desarrollo de la enfermedad.

Abstract

The Chronic myeloid leukemia is characterized by the presence of *t(9;22)(q34;q11)*, which generates the *BCR-ABL1* fusion transcript and the corresponding protein. This event encodes for a deregulated form of *ABL1* that arises as a target for inhibiting drugs. The *BCR-ABL1* detection by RT-PCR is needed to document the diagnosis and to monitor the response

to treatment. RT-PCR detection of a constitutive gene transcript such as *ABL1* is necessary to prevent false negative results. We present the case of a patient with signs and symptoms compatible with chronic myeloid leukemia in blast crisis in the absence of the *BCR-ABL1* fusion transcript with a peculiar *ABL1* gene alteration that could play a leading role in the development of the disease.

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo clonal de células madre hematopoyéticas. Es reconocida por sus características clínicas, morfológicas y su progresión natural a leucemia aguda cuando no se instaura tratamiento⁽¹⁾. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la LMC como una neoplasia mieloproliferativa crónica⁽¹⁾. El diagnóstico se realiza mediante la evaluación del hemograma, la observación del frotis de sangre periférica, el cálculo del score de la fosfatasa alcalina leucocitaria, la biopsia de médula ósea, la presencia de la *t(9;22)* que origina el cromosoma Filadelfia (Phi) puesta en evidencia mediante técnicas citogenéticas y/o el transcripto de fusión *BCR-ABL1* detectable por técnicas moleculares (RT-PCR).

Actualmente las técnicas de biología molecular constituyen una herramienta esencial para realizar el diagnóstico y presentan la sensibilidad adecuada para el monitoreo de la respuesta al tratamiento.

El cromosoma Phi se observa en el 95% de las LMC siendo la primer alteración genética específica identificada en un cáncer humano (*Nowell y Hungerford, 1960*)⁽²⁾; y subsecuentemente fue evidenciada la *t(9;22)* que le da origen (*Rowley, 1973*)⁽³⁾. La traslocación crea una fusión del gen *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) en el brazo largo del cromosoma 22 banda 11 (*Groffen et al, 1984*)⁽⁴⁾ con el gen *ABL1*

(*ABL protooncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*, también llamado *Abelson Murine Leukaemia*) en el brazo largo del cromosoma 9 banda 34 (*Heisterkamp et al, 1983*)⁽⁵⁾.

BCR es una proteína de señalización que contiene dominios de múltiple regulación. Los principales puntos de ruptura a nivel del gen *BCR* son tres: la región mayor (ubicada aproximadamente entre los exones 12 a 16), la región menor (entre los dos exones alternativos y el exón 2) y la región micro (ubicada en el intrón 19). *ABL1* es una tirosina quinasa no receptor estrechamente regulada. El sitio de ruptura más frecuente del gen *ABL1* se encuentra en el intrón 1 y, menos frecuentemente, en el 2. La mayoría de los pacientes con diagnóstico de LMC cromosoma Phi+ presentan el transcripto de fusión correspondiente a la región mayor de *BCR*, que origina una proteína de 210 KDa: P210.

El producto de fusión resulta en una proteína que conserva los dominios SH3-SH2-SH1 de la enzima tirosina quinasa *ABL1*, pero desregulada y activa en forma constitutiva, con localización intracitoplasmática⁽⁶⁾. A consecuencia de esto fosforila continuamente una variedad de proteínas intracelulares efectoras, activando de este modo las vías de señalización, alterando por último la proliferación y diferenciación celular⁽⁶⁾ (**Tabla I**).

Tabla I: Mecanismos de acción resultantes de la presencia del transcripto *BCR-ABL1*

- Adhesión celular alterada: integrina b1 variante, regulación ascendente de la integrina a6.
- Activación de señales mitogénicas: vías de las quinasas RAS, MAP, JAK-STAT y PI3 quinasa.
- Resistencia a la apoptosis: interacción con proteínas reparadoras del ADN y resistencia al daño genético.
- Degradación de proteínas inhibitorias del ciclo celular.

Adaptado de Wetzel M et al. Journal of Clinical Investigation. 1993; 92:1925-1939

Las enzimas que intervienen en procesos de señalización, como es el caso de la tirosina quinasa codificada por el *ABL1*, son a menudo reguladas por dominios accesorios que funcionan en tándem. Los dominios SH3-SH2 de esta proteína ejercen su efecto inhibitorio mediante su ensamble con el sitio catalítico en el dominio SH1 estabilizando su estado inactivo. Algunas alteraciones producidas en el complejo de autoinhibición modificarían este correcto montaje resultando en una mayor actividad de la tirosina quinasa, generando el proceso leucemogénico⁽⁷⁾.

Como se mencionó, la *t(9;22)(q34;q11)* está presente en el 95% de los casos de LMC^(1,2,3). En el 5% restante de los pacientes con LMC, en general está involucrado un cariotipo complejo o traslocaciones crípticas⁽⁸⁾ que no pueden identificarse por citogenética convencional. Sin embargo, la presencia de *BCR-ABL1* se demuestra por técnicas moleculares como hibridación *in situ* con sondas fluorescentes o mediante la búsqueda del transcripto de fusión por retrotranscripción seguido de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Dado el reducido número de pacientes con diagnóstico de LMC cromosoma Phi(-) y ausencia de rearrreglos clásicos del *BCR-ABL1*, el criterio diagnóstico es aún debatido. Es por ello que la OMS propone la agrupación de varias entidades en neoplasias mieloproliferativas crónicas/síndromes mielodisplásicos donde se incluye a la LMC "atípica", debiendo diferenciarse de otros síndromes con similares características incluidos en esta clasificación⁽¹⁾.

El objetivo del presente trabajo es comunicar el caso de un paciente con cuadro clínico y hematológico de LMC en crisis blástica, con ausencia del transcripto de fusión *BCR-ABL1* y duplicación del exón 2 del

transcripto del gen *ABL1*. Asimismo proponer a la duplicación del exón 2 del transcripto del gen *ABL1* como posible mecanismo leucemogénico debido a su detección a lo largo de la evolución observada en el paciente.

Es además nuestro propósito resaltar la importancia de utilizar las técnicas convencionales de biología molecular (RT-PCR cualitativa) y al *ABL1* como gen control al momento diagnóstico.

Materiales y Métodos

Se procesaron muestras de sangre periférica (SP) colectadas por punción venosa o de médula ósea por punción-aspiración (PAMO) de un paciente de sexo masculino de 16 años con diagnóstico de LMC en crisis blástica linfoide que logra la remisión hematológica completa con poliquimioterapia sistémica acorde al protocolo GATLA-ALLIC 2002 más inhibidores de tirosina quinasa (TKI). Consolida con trasplante de progenitores hematopoyéticos con donante emparentado histoidéntico, recae a los 6 meses posteriores al trasplante y fallece tres meses después de la última determinación del transcripto luego de una internación prolongada en cuidados intensivos por aplasia secundaria al tratamiento y múltiples complicaciones infecciosas que obligaron a interrumpir el tratamiento oncológico durante 2 meses, evidenciándose finalmente signos de progresión de enfermedad con reaparición de blastos en SP.

En la **Tabla II** se detallan los datos de laboratorio más relevantes al ingreso y en la recaída. Tanto las muestras de SP como de PAMO fueron anticoaguladas con K₃EDTA 5,4mg y remitidas al laboratorio de biología molecular para la búsqueda del transcripto de fusión *BCR-ABL1* mediante retrotranscripción (RT) seguida de PCR de punto final (cualitativa).

Tabla II: Principales datos de laboratorio observados en el paciente

10/12/2009 (Diagnóstico): Leucocitos: 364.000/ μ L; células mieloides en todos sus estadios madurativos (10% de basófilos); 60.000 plaquetas/ μ L; índice de fosfatasa alcalina bajo. CMF: 33% de blastos compatibles con LLA B común
13/01/2012 (Recaída): CMF: 85% de blastos compatibles con LLA B común con igual patrón que el hallado el 10/12/2009.

CMF: resultado de la inmunofenotipificación por citometría de flujo;

LLA B: leucemia linfoblástica aguda de estirpe B.

El proceso de obtención de ácido ribonucleico (ARN) a partir de leucocitos se realizó por el método de aislamiento con isotiocianato de guanidina-fe-

nol-cloroformo (*Chomczynski & Sacchi, 1987*)⁽⁹⁾. Las muestras que así lo requerían fueron previamente enriquecidas en células mononucleares por centri-

fugación en gradiente de densidad ($\rho=1,077\pm 0,001$) tipo Ficoll-Hypaque. La integridad del ARN obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución tampón TBE (Tris-borato-EDTA) 0,5X. Posteriormente, se retrotranscribió a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) utilizando hexámeros al azar⁽¹⁰⁾. La calidad del material obtenido y la eficiencia de la RT se verificaron por amplificación del gen constitutivo *ABL1* por PCR de punto final utilizando cebadores específicos

Fw-ABL-E2-5'-ACCTTTTCGTTGCACTGTATGAT-3'

y

Rv-ABL-a3-5'-TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT-3' que amplifican una porción del mismo comprendida entre los exones 2 y 3. El tamaño del producto de amplificación esperado es de 168 pares de bases (pb). Para la búsqueda del transcripto *BCR-ABL1* p190/210 se llevaron a cabo reacciones de PCR de punto final siguiendo los lineamientos del informe Biomed 1⁽¹⁰⁾. En cada una de estas PCR se procesó paralelamente un control positivo de muestra con el transcripto de fusión, un control negativo de muestra y un control negativo de reactivo.

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% en solución tampón TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X con un marcador de peso molecular 100 bp. Las electroforesis

se realizaron en cubas electroforéticas horizontales y los gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio se revelaron en transiluminador de luz ultravioleta. El producto de amplificación de *ABL1* de mayor tamaño al esperado fue secuenciado utilizando la química BigDye Terminator y secuenciador automático modelo ABI-3130 (Applied Biosystems).

Resultados

No fue posible detectar los transcriptos de fusión *BCR-ABL1* tanto en el momento del diagnóstico como en la recaída. En ambos momentos se observó, en cambio, una doble banda en el gel de agarosa para el transcripto del gen *ABL1* (**Figura 1**) que no se detectaba durante el período de remisión. La posterior secuenciación de la banda de mayor tamaño obtenida (342 pb) demostró la presencia de la duplicación completa del exón 2 en el transcripto del gen *ABL1* (**Figura 2**).

La **Tabla III** resume la cinética observada de la duplicación del exón 2 del transcripto del gen *ABL1* a lo largo de la evolución clínica del paciente, en la cual se pone de manifiesto la asociación de esta alteración con la patología. Puede verse, además, la ausencia constante del transcripto *BCR-ABL1* en las diferentes etapas de la enfermedad (diagnóstico, remisión y recaída). El estudio citogenético fracasó al diagnóstico. Sin embargo, fue normal en la recaída.

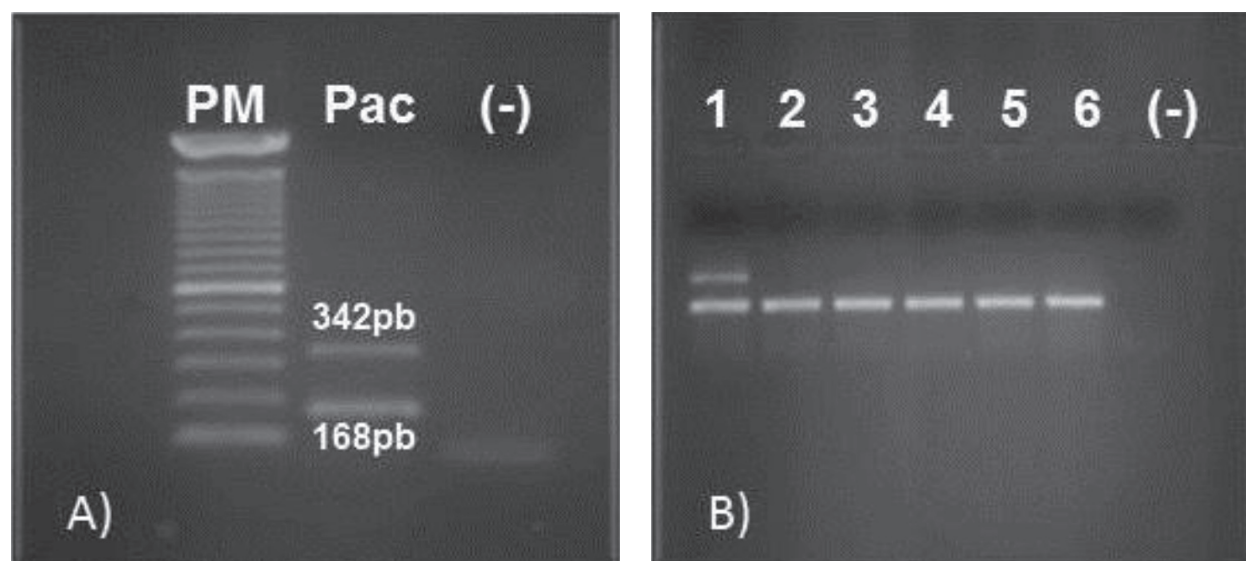


Figura 1: Visualización de la doble banda en gel de agarosa 2% en buffer TAE. A) Diagnóstico: la banda de 168 pb identifica la amplificación en el transcripto del gen *ABL1* con cebadores en exones 2 y 3. La de mayor tamaño (342pb) corresponde a la duplicación del exón 2 del gen *ABL1* del paciente. B) Recaída: calle 1 paciente con la duplicación del exón 2 en el transcripto del gen *ABL1*; calles 2 a 6 pacientes sin la duplicación. PM: Peso Molecular de 100pb; Pac: Paciente; (-): Control negativo de reactivos.

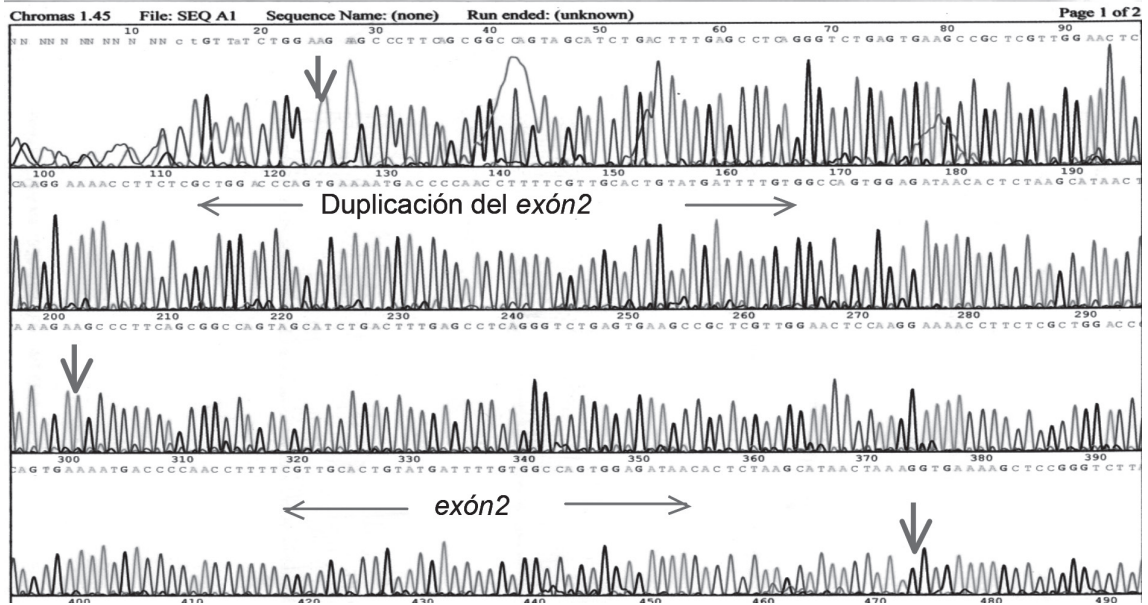


Figura 2: Secuencia que muestra la duplicación del exón2 del transcripto del gen ABL1 al momento del diagnóstico.

Tabla III: Cinética de la duplicación del exón 2 del transcripto ABL1 a lo largo de la evolución clínica del paciente

Fecha	10/12/09	16/12/09	05/05/10	13/06/11	14/07/11	13/01/12	30/01/12	05/03/12	04/04/12	03/05/12	19/06/12	09/08/12
Muestra	SP	PAMO	PAMO	SP	PAMO	SP	PAMO	PAMO	PAMO	PAMO	PAMO	PAMO
Dup Exón2	D	D	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND
BCR-ABL1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	LMC en Crisis Blástica		Control		Trasplante	Recaída	Control					

SP: Sangre Periférica; PAMO: Aspirado de Médula Ósea; BCR-ABL1: Transcriptos de Fusión BCR-ABL1 (incluidos p190/p210); Dup Exón 2: Duplicación del Exón 2 del transcripto ABL1; D: Detectado; ND: No Detectado; NR: No Realizado.

Discusión

El hallazgo de la duplicación del exón 2 del transcripto del gen ABL1 en ausencia del transcripto de fusión BCR-ABL1 permite suponer una modificación en la conformación alostérica de la proteína que alteraría la capacidad de los dominios regulatorios SH3-SH2 de autoinhibir la quinasa ejerciendo su acción sobre el dominio SH1, resultando este fenómeno en una quinasa constitutivamente activa, constituyendo éste un posible mecanismo leucemogénico. La duplicación del exón 2 mantiene el marco de lectura de la proteína normal, resultando

una proteína ABL1 de mayor tamaño, incluyendo la duplicación de los aminoácidos del exón 2. No fue posible demostrar fehacientemente cuál sería la consecuencia de este cambio estructural en la función de la proteína ABL1, pero la detección de esta alteración se determinó inicialmente en el clon leucémico del diagnóstico y posteriormente en la recaída de la enfermedad. Buscamos correlacionar el resultado negativo de las PCRs para el transcripto de fusión BCR-ABL1 con los hallazgos citogenéticos para descartar un falso resultado negativo. El fracaso del estudio citogenético al diagnóstico limitó este

intento. Sin embargo, cuando el paciente recayó en su enfermedad, la reaparición de la duplicación del exón 2 del transcripto *ABL1* y la no detección del transcripto de fusión fueron avalados por un resultado citogenético normal.

Finalmente, concluimos que en el presente caso la PCR de punto final para la amplificación del transcripto del gen *ABL1* aportó un marcador para el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Se destaca la importancia de certificar la presencia del transcripto *BCR-ABL1* por PCR cualitativa en todos los casos con sospecha de LMC al momento del diagnóstico para evitar resultados falsos negativos en el monitoreo posterior de la enfermedad por PCR cuantitativa. Además, en aquellos casos de LMC cromosoma Phi (-), sería conveniente extender el estudio mediante otras técnicas moleculares y la búsqueda de alteraciones como la del presente reporte, que involucran los dominios regulatorios de esta tirosina quinasa en el gen *ABL1*.

Declaración de conflictos de intereses:

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

- 1 WHO Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by Swerdlow S H, Campo E et al. Working Group for Editorial and Consensus Conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, October 25-17, 2007.
- 2 Wetzler M, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsch-Ginsberg C, Beran M, and Kurzrock R. Subcellular localization of *BCR*, *ABL* and *BCR-ABL* proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1925-1939.
- 3 Corbi-Verge C, Marinelli F, Zafra-Ruano A, Ruiz-Sanz J, Luque I, Faraldo-Gómez JD. Two-state dynamics of the SH3-SH2 tandem of Abl kinase and the allosteric role of the N-cap. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Sep 3;110(36):E3372-80.
- 4 Nowell PC, Hungerford DA. *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.* *Science* 1960; 132:1497.
- 5 Rowley JD. *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.* *Nature* 1973; 243:290
- 6 Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003 Oct 9;349(15):1451-64.
- 7 van Dongen J.J.M., Macintyre E.A., Gabert J.A. y col. *Standardized RT-PCR analysis of fusion transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia.* *Leukemia* 1999; 13:1901-1928.