

VIAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A BCR-ABL EN LA PROGRESION DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRONICA

LEYDY MAGALY MORENO GUERRERO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de

BACTERIOLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ
2010

VIAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A BCR-ABL EN LA PROGRESION DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRONICA

LEYDY MAGALY MORENO GUERRERO

Dra. Ingrid Schuler Ph.D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Dra. Luz Amparo Maldonado
Directora Carrera de Bacteriología

VIAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A BCR-ABL EN LA PROGRESION DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRONICA

LEYDY MAGALY MORENO GUERRERO

Dra. Sandra Quijano Gómez MSc. PhD.
Directora

Dra. Viviana Rodríguez MSc. Cd. Ph.D
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No 13 de julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN	3
3. MARCO TEORICO	5
3.1. Leucemia mieloide crónica (LMC)	5
3.1.1. Definición	5
3.1.2. Epidemiología	5
3.1.3. Características de la enfermedad	6
3.1.4. Manifestaciones Clínicas	7
3.1.5. Fase crónica de la enfermedad	7
3.1.6. Fase acelerada	8
3.1.7. Crisis blástica	8
3.1.8. La traslocación t(9;22)	9
3.1.9. El gen ABL	11
3.1.10. El gen BCR	11
3.1.11. Efectos de BCR – ABL en el crecimiento y supervivencia celular	12
3.1.12. Evolución clonal	15
3.1.13. Parámetros clínicos y biológicos utilizados para el estudio de LMC	16
3.1.14. Tratamiento de la LMC y factores biológicos asociados a inducción de resistencia	19
3.1.15. Monitoreo post-tratamiento con Imatinib	20
4. CONCLUSIONES	21
5. BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia, que se debe a una alteración genética conocida como cromosoma Filadelfia que corresponde a la traslocación recíproca del cromosoma 9 y 22 -t(9;22), dando lugar a la proteína de fusión BCR-ABL. Esta proteína de fusión activa múltiples vías de señalización celular conduciendo a una elevada tasa proliferativa de las células de linaje mieloide, alteraciones en el ciclo celular, resistencia a la apoptosis y mayor supervivencia¹. Esta anomalía está implicada directamente en la inducción de la enfermedad que cursa a nivel clínico por tres fases: fase crónica, fase acelerada y crisis blástica, siendo esta última la más agresiva debido a la acumulación en la célula tumoral de nuevas alteraciones genéticas adquiridas durante el proceso de evolución clonal, haciendo a la célula resistente al tratamiento con agentes quimioterapéuticos y con inhibidores de la actividad tirosina quinasa de las proteínas Bcr y Abl^{1,2,3}.

Ante esta situación es importante estudiar las vías de señalización celular que son activadas por las tirosina quinasas Bcr-Abl en las células tumorales de la LMC y en las diferentes fases de la enfermedad y determinar los factores responsables de resistencia al tratamiento en las células tumorales. Por otra parte, es de relevancia establecer los parámetros clínicos y biológicos que deben ser considerados en los pacientes con LMC para la realización del diagnóstico y para el seguimiento de la enfermedad desde la fase crónica hasta la crisis blástica lo que podría contribuir a explicar el comportamiento relativamente heterogéneo de la LMC Ph⁺.

1.- INTRODUCCIÓN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC), es un ejemplo de neoplasia en el que la enfermedad es inducida por una proteína con potente actividad oncogénica conocida como BCR-ABL que estimula y aumenta la inestabilidad genómica en células progenitoras de linaje mieloide y linfoide conduciéndolas a una disminución en su capacidad para reparar lesiones a nivel de ADN, lo que lleva a la acumulación de mutaciones en genes reguladores del ciclo celular y la apoptosis. La acumulación de mutaciones en estos genes favorece la evolución de la enfermedad a fases clínicas más agresivas y de peor pronóstico que conducen a la muerte del paciente. La LMC representa aproximadamente el 15%-20% de todas las leucemias del adulto y tiene una incidencia de 1-2 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y por año. Su incidencia máxima se reporta en individuos entre 30 y 60 años de edad y con ligero predominio en hombres con una relación varón/mujer de 2,0/1,2^{1,2,3}. Se ha descrito que alrededor de la mitad de los pacientes cursan asintomáticos al momento del diagnóstico y la mediana de supervivencia global es de 4-6 años con una tasa de supervivencia global a 5 años del 39%, con un rango que oscila desde menos de un año hasta más de diez años⁴.

En la actualidad se conoce que la t(9;22) representa el evento oncogénico común en la mayoría de los pacientes con LMC; promoviendo la supervivencia celular y la proliferación a través de la transducción de señales intracelulares y es responsable de la transformación maligna y de la evolución a variantes agresivas de la enfermedad^{1,5}. Debido a esta alteración genética la enfermedad cursa por tres fases principales: la fase crónica que representa la etapa inicial de la LMC, en que la mayoría de los pacientes son diagnosticados y por lo general, tiene un comienzo insidioso, continua la fase acelerada que es una etapa intermedia de la LMC, con alto riesgo de evolución a crisis blástica, caracterizada por resistencia a la terapia y por último la crisis blástica que representa la etapa final de evolución de la LMC, que puede o no puede ir precedido por una "fase acelerada" y es de

muy mal pronóstico, con empeoramiento de los signos y síntomas clínicos y con un recuento de blastos en MO y SP superior al 20% de la celularidad total^{3,6}.

Debido a las múltiples anormalidades celulares inducidas por Bcr y Abl, diferentes inhibidores de la actividad tirosina quinasa de estas dos proteínas han sido utilizados como estrategia terapéutica en estos pacientes desde la fase crónica y se ha evaluado tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” su potencial para modificar el fenotipo maligno de las células tumorales de la LMC⁵. Actualmente el tratamiento de elección para la fase crónica es el inhibidor de la tirosina quinasa, mesilato de imatinib (2-fenilaminopirimidina) que induce una respuesta hematológica durable en la fase crónica de la enfermedad con mínimos efectos tóxicos con una tasa de respuesta del 85-90% de los pacientes en fase crónica⁷. Sin embargo, la persistencia de BCR-ABL en pacientes con respuesta citogenética completa (ausencia de cromosoma filadelfia evaluada en metafases por cariotipo convencional) plantea la posibilidad de que el tratamiento con mesilato de imatinib por sí solo no puede prevenir la progresión de la enfermedad. Los mecanismos responsables de la transición de la fase crónica a la crisis blástica se pueden deber a un aumento en la actividad desenfrenada de BCR-ABL en células madre hematopoyéticas, y la progresión de la enfermedad a crisis blástica se puede deber a la acumulación de anormalidades genéticas dependientes o independientes del aumento de transcritos BCR-ABL en la célula^{8,9}.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo nos hemos propuesto estudiar las vías de señalización celular activadas por BCR-ABL en las células tumorales de la leucemia mieloide crónica en las diferentes fases de la enfermedad. Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar las principales vías de señalización activadas por BCR-ABL.
2. Describir las alteraciones celulares inducidas por BCR-ABL en la fase crónica, acelerada, y crisis blástica.
3. Determinar los factores responsables de resistencia al tratamiento en células tumorales en fases avanzadas de la enfermedad.

4. Conocer los parámetros clínicos y biológicos que deben ser considerados en los pacientes con LMC para la realización del diagnóstico y para el seguimiento de la enfermedad.

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa caracterizada por la proliferación desordenada y el bloqueo madurativo de células de linaje mieloide en la médula ósea (MO) manifestándose en tejidos periféricos. Esta enfermedad representa el 15%-20% del total de casos nuevos de leucemia en adultos y desde el punto de vista citogenético, en el 90-100% de los pacientes con LMC se produce la translocación t(9;22) (también conocida como cromosoma Filadelfia –Ph-), en la que el gen ABL localizado en el brazo largo del cromosoma 9 se transloca al cromosoma 22 y el gen BCR localizado en el brazo largo del cromosoma 22 se transloca al cromosoma 9, de esta forma, esta translocación ocasiona una sobre-expresión de estas proteínas en las células mieloides desde el progenitor más inmaduro (CD34+) hasta las células más diferenciadas. Los genes BCR-ABL están implicados en la activación de múltiples vías de señalización celular (vías PI-3K-Akt, NFκB, JAK-STAT, Ras-MAPK, entre otras), debido a su actividad tirosina quinasa aberrante que es responsable en la LMC de la proliferación anormal del linaje mieloide en MO induciendo desequilibrios en los procesos de diferenciación celular, adhesión y apoptosis, por lo que se ha descrito que BCR-ABL funciona como un factor de crecimiento independiente de señales derivadas del medioambiente^{1,6}.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se encuentran relacionadas con la presencia de los transcritos BCR-ABL y su actividad tirosina quinasa, induciendo en los pacientes hiperleucocitosis con recuentos de leucocitos superiores a $100 \times 10^9/L$ neutrofilia, eosinofilia, basofilia, trombocitopenia o trombocitosis, anemia y esplenomegalia, entre otras^{1,9}. Esta enfermedad se presenta en diferentes fases de evolución que incluyen la fase crónica en la

que se diagnostican la mayoría de los pacientes y su tratamiento con el medicamento imatinib (inhibidor de la tirosina quinasa ABL) es en general eficiente, y las formas agresivas como consecuencia de la evolución clonal que incluyen las fases acelerada y crisis blástica con células tumorales que adquieren un fenotipo resistente a los tratamientos citotóxicos y al imatinib con una alta tasa de mortalidad^{1,9}. Esta resistencia al tratamiento puede resultar de mecanismos dependientes de BCR/ABL tales como la sobre-expresión y la adquisición de mutaciones en sitios críticos de los dominios quinasa de BCR y ABL o de mecanismos independientes que incluyen otras alteraciones genéticas (p. ej. mutaciones en JAK2, c-MYC, PP2A, INK4A +8, +13, monosomía 7), la activación de alguna tirosina quinasa (TK) alternativa, la sobre-expresión de genes de resistencia a drogas (MDR, P-gp, LRP) y la presencia de células Ph+ quiescentes insensibles al imatinib⁸.

Ante esta situación, es importante profundizar en los mecanismos celulares en los que los transcritos BCR-ABL y sus productos de corriente abajo de la cascada de señalización influyen en la activación de distintas vías que conducen a la evolución desde la fase crónica (de mejor respuesta al tratamiento) hasta la progresión de la enfermedad en las fases acelerada y crisis blástica (de peor pronóstico) y conocer los parámetros clínicos y biológicos que se deben emplear en estos pacientes para la realización de un diagnóstico, seguimiento y manejo terapéutico adecuado.

3.- MARCO TEORICO

3.1- LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (LMC)

3.1.1- Definición

La LMC es una neoplasia mieloproliferativa de origen clonal caracterizada por la proliferación desordenada y el bloqueo madurativo de células de linaje mieloide en la médula ósea (MO) incluyendo las series hematopoyéticas granulocítica, eritroide, megacariocítica y linaje linfoide⁸, manifestándose en tejidos periféricos a manera de expansión de la serie granulocítica en MO, sangre periférica (SP) y otros tejidos incluyendo el bazo y el hígado entre otros. Debido a la translocación cromosómica t(9;22) (q34; q11) (cromosoma Filadelfia –Ph-) presente en la mayoría de casos de LMC, se fusionan los genes el BCR presente en el cromosoma 22q y el gen recíproco ABL presente en el cromosoma 9^{1,3}.

3.1.2- Epidemiología

La LMC representa el 15%-20% de todas las leucemias del adulto y tiene una incidencia de 1-2 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año. Su incidencia máxima se reporta en individuos entre 30 y 60 años de edad y con ligero predominio en hombres con una relación varón/mujer de 2,0/1,2^{1,2,3}. La translocación t(9;22) se detecta en un 90%-95% de los casos y cerca de un 5% a un 10% de estos pueden presentar una translocación variante que afecta al cromosoma manifestando otras alteraciones genéticas. La mayoría de los pacientes en la fase crónica responden favorablemente a la terapia con el Inhibidor de tirosina quinasa (imatinib), pero si durante el curso clínico de la enfermedad hay progresión clonal la supervivencia de los paciente se reduce en la fase acelerada a un 50% y en la crisis blástica a un 20%^{2,3}. La mortalidad ajustada por edad es de 0,6 por cada 100.000 habitantes/año y la gran mayoría de los sujetos que fallecen por LMC tienen más de 55 años (74,7%) y se ha estimado que el 0,16% (1 de cada 619 hombres y mujeres) de las personas que nacen en la actualidad tendrán la enfermedad en algún momento de sus vidas y que el 0,06% morirán a causa de ella^{3,4,7}.

3.1.3- Características de la enfermedad

Las primeras descripciones de las manifestaciones clínicas de la LMC apareció en 1845 por Bennett y Virchow. Veinte años más tarde, Virchow utilizó por primera vez el término "Leucemia" para describir las manifestaciones en la SP, en 1960 el descubrimiento de Nowell y Hungerford sobre el cromosoma filadelfia (Ph) en donde se describe la pérdida del material genético del brazo largo del cromosoma 22 lo cual se inicia la nueva era de investigación de anomalías genéticas de los tumores¹. Ante el descubrimiento de esta anomalía se identifica la translocación recíproca de los cromosomas 9 y 22 dando a lugar a la unión de los genes BCR-ABL los cuales codifican una proteína anormal con función tirosina quinasa que es responsable de la activación de las vías de transducción de señales que conducen a la proliferación anormal de células hematopoyéticas de la MO y las manifestaciones clínicas y morfológicas de la LMC^{1,3,5}.

Diferentes estudios han demostrado la presencia del cromosoma Ph en los compartimentos mielóide, monocítico, eritroide y megacariocítico, entre las células "natural killer" (NK) y los linfocitos B y rara vez, en linfocitos T. Además, algunos reportes han descrito crisis blásticas que involucran precursores de la serie eritroide, megacariocítica y de línea T^{6,10} lo que junto con las habituales crisis blásticas granulomonocíticas y linfoides B¹¹, apoyaría la noción de que la t(9;22) ocurre en una célula progenitora hematopoyética pluripotencial con capacidad de diferenciación hacia las diferentes líneas celulares hematopoyéticas^{6,12,13}.

El inicio de la enfermedad es gradual, con evolución a lo largo de un periodo de meses o años, la cual se caracteriza por cursar por 3 fases relevantes desde el punto de vista clínico con distinto valor pronóstico y diferente respuesta terapéutica e incluyen las fases crónica, acelerada y crisis blástica^{1,3,14}.

3.1.4- Manifestaciones Clínicas

El inicio clínico de la fase crónica por lo general es insidioso. En consecuencia, en algunos pacientes se establece el diagnóstico mientras que otros permanecen asintomáticos durante las pruebas de detección sistemáticas para conocer el estado de salud¹; por otra parte otros pacientes presentan fatiga, malestar general y pérdida de peso o tienen síntomas como consecuencia de la esplenomegalia, que incluyen dolor o tumoración en el cuadrante superior izquierdo del abdomen¹⁵. Otros síntomas están relacionados con la disfunción plaquetaria o de granulocitos, como son infecciones recurrentes, trombosis o hemorragia, accidentes vasculares cerebrales, infarto de miocardio, trombosis venosa, priapismo, trastornos visuales e insuficiencia pulmonar^{1,16}. Los pacientes además cursan con leucocitosis ($>50 \times 10^9/L$) granulocítica con basofilia y eosinofilia asociadas a esplenomegalia y una disminución de la fosfatasa alcalina granulocítica (FAG). Los casos de LMC con progresión a fase acelerada y/o a crisis blástica presentan empeoramiento de los síntomas e incluyen un aumento progresivo del número de leucocitos en SP asociado al desarrollo de trombocitosis o trombocitopenia y/o complicaciones trombóticas o hemorrágicas, anemia, esplenomegalia y hepatomegalia crecientes y dolorosas, fiebre, dolores óseos y/o desarrollo de lesiones óseas destructivas^{1,16}.

3.1.5- Fase crónica de la enfermedad: Representa la etapa inicial de la LMC, en que la mayoría de los pacientes son diagnosticados (aproximadamente el 85% de los casos). El análisis del aspirado medular muestra una MO hiper celular, con un aumento de la serie granulocítica y una relación mielo/eritroide anormalmente elevada (alrededor de 25:1 vs 3:1 en MO normal). Dentro de la serie granulocítica de MO predominan los mielocitos y metamielocitos junto con $<5\%$ de blastos, asociados a basofilia, eosinofilia, y frecuente trombocitosis. El porcentaje de linfocitos de MO se encuentra disminuido respecto a lo observado en sujetos normales. En SP se observa leucocitosis (alrededor de $50-100 \times 10^9/L$), en particular a expensas de granulocitos en diferentes etapas de maduración, así como basofilia y eosinofilia. El recuento de blastos es inferior al 2%. La evolución de la

fase crónica a la fase acelerada y posteriormente, a la crisis blástica, puede ocurrir durante un período ≥ 1 año, o aparecer bruscamente ("crisis blástica"). A nivel molecular se detecta la presencia de t(9;22) en aproximadamente 90-95% de los casos^{1,17}.

3.1.6- Fase acelerada: Es una etapa intermedia o de transición entre las fases crónica y crisis blástica de la LMC, con alto riesgo de evolución a crisis blástica cuya duración puede oscilar entre 3-18 meses. Estos casos se caracterizan por resistencia a la terapia y por manifestaciones clínicas que incluyen fiebre, anemia, esplenomegalia, dolores óseos, incremento significativo del recuento de leucocitos y del porcentaje de blastos (entre el 10-19% de la celularidad total en MO y SP), basofilia ($>20\%$ en SP), trombocitopenia, cambios displásicos mayores en la serie granulocítica^{1,3} y los pacientes empiezan a manifestar infecciones, trombosis y/o hemorragia. Estos casos tienen evidencia molecular de evolución clonal^{3,17} con alteraciones de genes reguladores del ciclo celular y/o la apoptosis como P53, RAS, c-MYC, P16, y JAK2, entre otros¹.

3.1.7- Crisis blástica: Representa la etapa final de evolución de la LMC, que puede o no puede ir precedido por una "fase acelerada" y es de muy mal pronóstico, con empeoramiento de los signos y síntomas clínicos como anemia severa, infecciones a repetición, hemorragias y trombos, alteraciones multiorgánicas por infiltración celular tumoral, aumento en la esplenomegalia, lesiones óseas múltiples y niveles de calcio sérico elevado^{1,3} en conjunto con un recuento de blastos en MO y SP superior al 20% de la celularidad total^{3,6}. En general en estos pacientes se considera que el cromosoma filadelfia induce cambios genéticos secundarios conducentes a la progresión de la enfermedad adicionales al cromosoma Ph^{5,6,16}. Aproximadamente en el 75% de los casos, los blastos son de origen mieloide con características clínicas y biológicas compatibles con leucemia mieloide aguda (LMA); el 25% pueden transformarse a leucemia linfóide aguda de linaje B (LLA-B) y con menor frecuencia, a leucemia aguda bifenotípica^{1,17}. Otras anomalías genéticas incluyen la trisomía 8, la aparición de un isocromosoma 17 asociado casi

exclusivamente a crisis blásticas mieloides, un cromosoma Ph extra, trisomía 19, alteraciones en P53, RB1, c-MYC, p16^{INK4A}, y RAS^{1,14}.

3.1.8- La traslocación t(9;22)

El producto de fusión del material génico que resulta de la t(9;22) desempeña un papel esencial en la aparición de la LMC¹⁶. En ella se ven involucrados el protooncogen ABL y el gen BCR cuyo reordenamiento origina un gen de fusión BCR/ABL con elevada actividad tirosina quinasa y capacidad oncogénica^{1,18}.

En el gen BCR (del inglés "breakpoint cluster region"), localizado en el brazo largo del cromosoma 22 a nivel de 22q11 se han descrito tres regiones de ruptura distintas: 1) la región mayor o MBCR, localizada entre los exones 12 a 16 (originalmente descritos como exones b1-b5); 2) la región menor o mBCR, ubicada entre los exones e2' y e2 y; 3) la región micro o μ BCR, que se sitúa en el exón 19^{3,19} (Figuras 1 y 2).

En la t(9;22)(q34;q11) una parte del gen ABL (del inglés "Abelson") localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34), es transferida e insertada dentro del gen BCR en el cromosoma 22 originando el gen de fusión BCR/ABL; a su vez, una parte del gen BCR se transloca al cromosoma 9 formando el gen de fusión recíproco ABL/BCR (figura 1). Los puntos de ruptura más frecuentes en el gen BCR ocurren en los exones 1(e1), 12(b2), 13(b3) y 19(e19), mientras que el punto de rotura en el gen ABL habitualmente se produce en el exón 2 (a2), dando lugar a los reordenamientos e1a2, b2a2 o b3a2 y e19a2 (figura 2). Los productos de estos reordenamientos corresponden a proteínas de fusión de 190 KDa (p190bcr/abl), de 210 KDa (p210 bcr/abl) y de 230 KDa (p230bcr/abl), respectivamente^{18,19}. El reordenamiento e1a2 (proteína de 190 kDa) es característico de la LLA de precursores B, aunque puede encontrarse también de forma excepcional (<1%) en la LMC. Por el contrario, los reordenamientos b2a2, b3a3 son característicos de la LMC (proteína de 210 kDa), detectándose únicamente en alrededor de 20-30% de las LLA de precursores B del adulto con t(9;22)⁹(figura 2). A su vez, la variante del reordenamiento BCR/ABL en la que el

punto de ruptura del gen BCR está situado en el exón e19 se ha asociado a una variante rara de la LMC, la LMC-neutrófila^{3,6,11}.

La proteína de fusión bcr-abl de 210 kDa es la predominante en LMC y está involucrada en la transmisión de señales mitogénicas, adherencia defectuosa de las células hematopoyéticas a las células del estroma medular como a proteínas de la matriz extracelular y una disminución de la respuesta a los estímulos apoptóticos^{16,20}. La función tirosina quinasa de bcr-abl activa la transmisión de señales mediante la liberación del ATP de un grupo fosfato que se une con las diferentes proteínas que le sirven de sustratos. Un gran número de sustratos pueden ser fosforilados por la proteína Bcr-Abl. Adicionalmente, debido al proceso de autofosforilación de la proteína Bcr-Abl, múltiples proteínas citosólicas y nucleares pueden interactuar físicamente con Bcr-ABL induciendo su activación^{19,20,21}. Por otro lado participa en la activación de las vías reguladas por Jak- Stat^{22,23}, PI3K³², Ras, y las Jun quinasas^{24,42}.

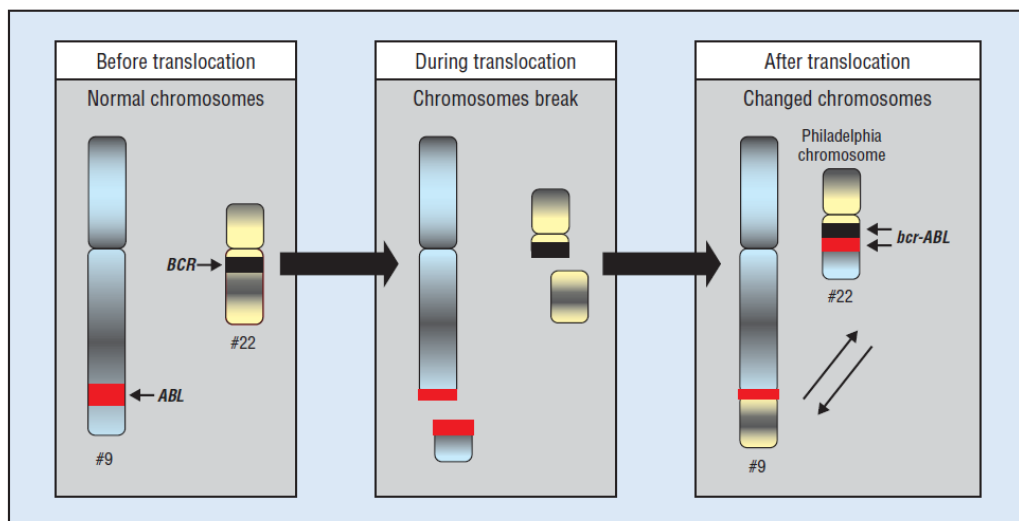


Figura 1. Cromosoma Filadelfia Ph -t(9;22)-. Tomado de Hazlehurst L et al. 2009 (17).

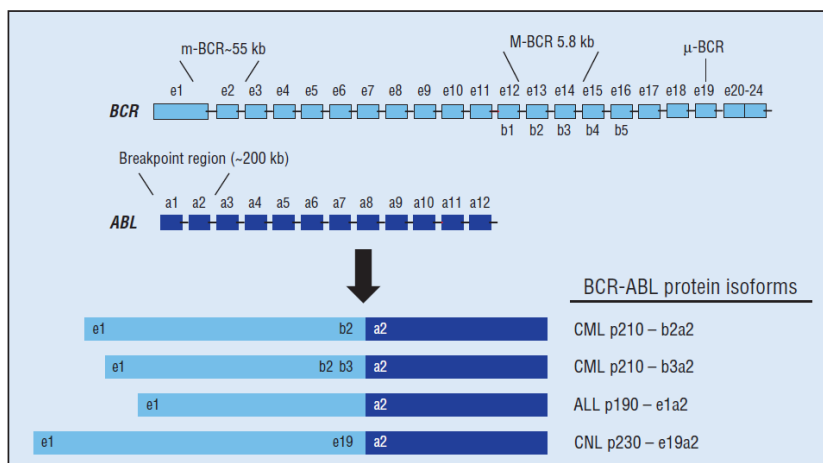


Figura 2. Esquema de los puntos de ruptura que ocurren en los exones de los genes BCR y ABL y los genes de fusión BCR-ABL que se originan. Tomado de Hazlehurst L et al. 2009 (17).

3.1.9- El gen ABL

El gen ABL codifica para una proteína nuclear y citoplasmática de 145 kDa⁸, que se ha descrito como un protooncogen implicado en los procesos celulares de crecimiento, diferenciación, división, adhesión, inducción de apoptosis y de respuesta a estrés³. A nivel estructural, en la región N-terminal de la proteína se han caracterizado tres secuencias homólogas de las codificadas por el gen SRC, -regiones SH1, (*SRC homology 1*), SH2 y SH3-. Las regiones SH3 y SH2 permiten la interacción de ABL con otras proteínas y regulan positiva y negativamente la actividad tirosina quinasa característica de la región SH1 (figura 3)^{3,25}.

3.1.10- El gen BCR

El gen BCR localizado en el cromosoma 22 (región q11), codifica una proteína de 160 Kd que normalmente se encuentra en citoplasma y núcleo (figura 2). Esta proteína se encuentra implicada en vías de señalización como la fosforilación y activación de guanósín trifosfato, GTP²². Bcr tiene actividad serina, treonina quinasa con actividad enzimática en el primer exón, esta por lo tanto puede autofosforilarse así como a los principales sustratos y por con

siguiente propagar señales celulares. Bcr también interactúa con las proteínas G que son importantes en la señalización intracelular, crecimiento y desarrollo celular (Figura 3)^{3,22}.

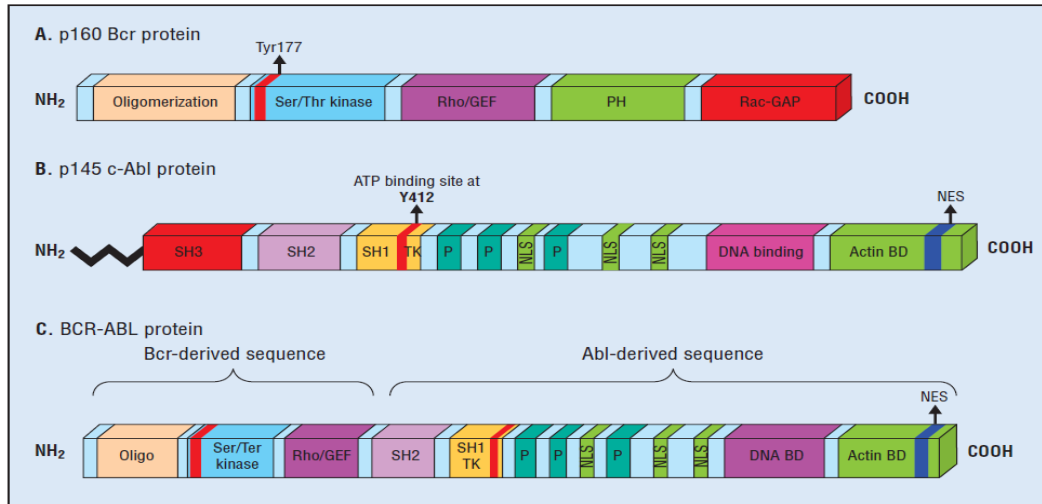


Figura 3. Representación esquemática de los dominios de las proteínas normales Bcr (p160) (parte A), Abl (p145) (parte B) y de la proteína BCR-ABL aberrante (parte C). Tomado de Hazlehurst L et al. 2009 (17).

3.1.11- Efectos de BCR – ABL en el crecimiento y supervivencia celular

La progresión a la fase acelerada y crisis blástica está relacionada con la activación constitutiva de múltiples señales de transducción intracelular que confieren la independencia del clon y la resistencia al tratamiento con los inhibidores de tirosina quinasa¹⁹.

Dentro de los efectos de BCR-ABL en la célula, se pueden presentar alteraciones en la adhesión al estroma celular y a la matriz extracelular, con cambios significativos en la expresión de moléculas de adhesión celular de la familia de las integrinas conduciendo a la liberación desde la médula ósea de células inmaduras hacia la periferia²⁶. Se ha descrito que las células progenitoras Bcr-Abl positivas presentan plegamiento en sus membranas y formación de filopodios, lo que contribuye a una incrementada motilidad celular^{3,14,26}.

BCR-ABL también está asociado con los complejos de adhesión focal como la actina, paxillina y FAK, con activación de CRKL-FAK-PYK2 conduciendo a una disminución en la adhesión celular⁸. En relación al compartimiento de las células progenitoras mieloides CD34+ BCR-ABL+, se ha demostrado que estas células presentan una tasa proliferativa superior a la observada en las células CD34⁺ normales⁶. De igual manera, se sabe que esta misma subpoblación celular adquiere la capacidad de secretar al medio extracelular factores de crecimiento autocrinos como la interleuquina 3 (IL-3) favoreciendo los cambios en la proliferación celular con expansión clonal de estos progenitores²⁷. Otros hallazgos que soportan la elevada tasa proliferativa de estas células están relacionados con la activación permanente de señales mitógenas implicadas en los procesos de activación y división celular¹⁷. BCR-ABL activa la vía Ras¹⁴ que a su vez activa la cascada de las proteínas quinasa inductoras de mitosis (MAPK) y mediante la fosforilación y posterior activación de la vía PI3K-Akt³². Al interactuar con la proteína anormal BCR/ABL (Figura 4), las proteínas de la vía RAS¹⁴ se unen al complejo promotor del crecimiento GRB-2/Gab2, lo que ocasiona la acumulación del factor de recambio guanosindifosfato/guanosintrifosfato (GDP/GTP) factor de cambio SOS, que promueve la acumulación de GTP, encargado de inhibir la apoptosis e incrementar la proliferación celular¹⁴. La PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) está conformada por dos subunidades reguladoras, la p110 que es la subunidad catalítica y la p85 que es la subunidad reguladora con un dominio SH3 y dos dominios SH2^{3,31}. Esta vía es fundamental en la regulación del ciclo celular, diferenciación, transcripción, transducción y apoptosis. Participa en la regulación del metabolismo lipídico y en la generación de segundos mensajeros lipídicos relacionados con la transducción de señales^{3,28,32}. PI3k se encuentra activada en la tercera parte de los casos de LMC resistentes al tratamiento y su nivel de activación es directamente proporcional a la cantidad de proteína anormal ABL^{9,33}. El efecto inhibitorio de la apoptosis inducido por Bcr-Abl se debe además por el bloqueo de la liberación de citocromo C a nivel mitocondrial, inhibiendo la activación de la procaspasa 9 mediado por la vía PI3K-Akt^{9,33}.

También BCR-ABL influyen en la activación directa de los factores de transcripción STAT1 y STAT5 implicados en la expresión de niveles incrementados de c-Myc, ciclina D1 y de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (MCL-1 y BCL-xL) contribuyendo a la resistencia a apoptosis (Figura 4)^{11,20,22, 28,29}.

Por otra parte, se ha demostrado que BCR-ABL activa la quinasa dependiente de ciclina CDK2 a través de la vía PI3k-Akt induciendo la progresión del ciclo celular desde G1 a S³⁰. Este hallazgo se correlaciona con la capacidad de BCR-ABL de bloquear la función de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p21 y p27^{Kip1}^{3,7,14,34}. Una vez se inicia la vía Akt esta activa una serie de sustratos que favorecen la supervivencia celular como las proteínas FoxO, BAD, y la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β). Akt al fosforilar la proteína Bad suprime su actividad pro-apoptótica ya que cuando se fosforila, BAD es secuestrado en el citoplasma por la proteína adaptadora 14-3-3, permitiendo la supervivencia celular^{3,14,35,36}.

Por otro lado en la LMC, se han descrito alteraciones asociadas a pérdida de función de p53 representan una de las anomalías genéticas más habituales, estando presentes en la mayoría de las neoplasias humanas, en más de 50% de los casos. Habitualmente, los mecanismos por los que se produce la alteración de P53 incluyen la inactivación de los genes supresores de tumor P14^{ARF} o P53 y/o la hiperactividad del oncogén MDM2 ubiquitina a p53 induciendo su degradación e indirectamente en el citoplasma marcando a p53 para su ubiquitinización y degradación³⁹. De esta manera, la inactividad de p53 se asocia con a la progresión de la enfermedad^{14,17,39}.

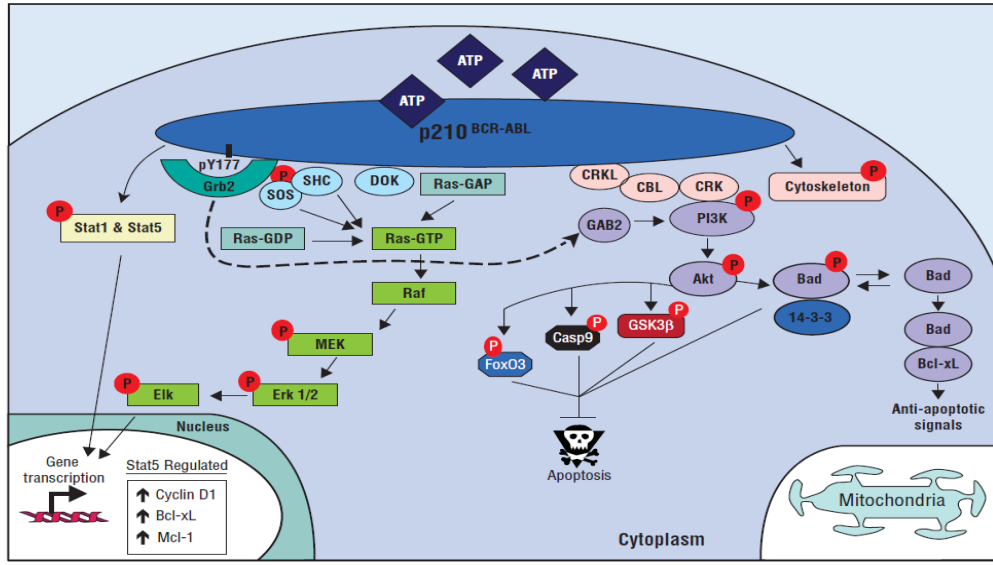


Figura 4. BCR-ABL. Vías de señalización involucradas en el crecimiento y supervivencia celular. Tomado de Hazlehurst L et al. 2009 (17).

3.1.12 Evolución clonal

La progresión de la enfermedad a variantes más agresivas se debe a la adquisición de nuevas anomalías genéticas que conducen a la resistencia a los inhibidores de tirosina quinasa¹⁴. Se ha descrito que los niveles de expresión elevados de la proteína de fusión Bcr-Abl en las células progenitoras promueven cambios genéticos secundarios que permiten la transición a la crisis blástica. BCR-ABL están implicadas en el aumento de los niveles endógenos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y aumentan la cantidad de radicales libres induciendo daños a nivel del ADN, dando lugar a transversiones en pares de bases del (GC → TA) y transiciones (GC → AT). Por lo tanto BCR-ABL inducen mutaciones en los genes responsables de mantener la integridad genómica. Esto podría estar asociado con la aparición de nuevas anomalías cromosómicas que caracterizan la progresión de la LMC. Las más frecuentes son trisomía 8 (33%), otro cromosoma Ph adicional (30%), isocromosoma 17 (20%), la trisomía 19 (12%), la pérdida del cromosoma Y (8% de los

varones), la trisomía 21 (7%) y monosomía 7 (5%). La detección de estas anomalías ha sido de gran utilidad en el seguimiento de la enfermedad como marcadores de progresión^{1,14,15}.

3.1.13 PARAMETROS CLINICOS Y BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LMC

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los siguientes criterios para realizar el seguimiento de los pacientes desde la fase crónica de la enfermedad: (1) Leucocitosis persistente >10.000 leucocitos/uL ($10 \times 10^9/L$) y / o esplenomegalia persistente; (2) Trombocitosis persistente, con un recuento plaquetario $>1.000 \times 10^3/\mu L$ ($1.000 \times 10^9/L$); (3) Trombocitopenia persistente con un recuento de plaquetas $<100 \times 10^3/uL$ ($100 \times 10^9/L$); (4) Evidencia citogenética de evolución clonal después del diagnóstico inicial del cariotipo; (5) basofilia con $>20\%$ de basófilos en sangre periférica; y (6) Recuento de blastos del 10%-19% en sangre o médula ósea. También se debe tener en cuenta la resistencia a los fármacos (no respuesta hematológica después de la terapia de inducción). Los criterios de la OMS para la LMC en crisis blástica incluyen los siguientes: (1) Recuento de blastos igual o superior al 20% en sangre periférica o en médula ósea, y (2) infiltración extramedular de blastos^{1,10}. Por otra parte es fundamental implementar en los pacientes las siguientes pruebas diagnósticas (Tabla 1):

Tabla 1. Pruebas de apoyo diagnostico de rutina empleadas para diagnostico y seguimiento de pacientes con leucemia mieloide crónica

Pruebas diagnosticas	Características	Fase Crónica	Fase Acelerada	Crisis Blastica
Exploración Física Signos y síntomas	Valoración del paciente y documentación de signos y síntomas asociados a LMC que incluyen:	Fatiga, malestar general, pérdida de peso, esplenomegalia, dolor o tumoración en el cuadrante superior izquierdo del abdomen ¹⁵ .	Fiebre, anemia, dolores óseos, hemorragias, y esplenomegalia ¹ .	Anorexia, fiebre, astenia, diaforesis nocturna, dolores óseos. La esplenomegalia puede ser dolorosa y a menudo se asocia a adenopatías y hepatomegalia. Infiltración extramedular por blastos leucémicos (hueso, piel, SNC, pulmón, etc) ^{10,17} .
Análisis de sangre periférica	Realizar hemograma y frotis de sangre periférica para evaluar la morfología celular e identificar blastos.	Hiperleucocitosis (>100 x 10 ⁹ /L), neutrofilia, monocitosis, eosinofilia y basofilia, recuento de blastos inferior al 2%, trombocitosis. Disminución de la fosfatasa alcalina ^{1,15} .	Recuento de blastos de 10-19% de la celularidad total, basofilia >20% en SP y Trombocitopenia. <100x10 ⁹ /L ^{1,15} .	Recuento de blastos en MO y SP superior al 20% de la celularidad total ^{1,15} .
Biopsia y aspirado de médula ósea	Análisis de la celularidad de la MO, descripción de los cambios displásicos asociados a la enfermedad que incluyen disgranulopoyesis y dismegacariopoyesis en donde se ve reflejado. Disminución significativa de precursores eritroides. La reticulina se ve aumentada lo cual suele favorecer la mielofibrosis ²⁹ . Análisis inmunofenotípico por citometría de flujo (recuento de células CD34+, análisis de bloqueos madurativos y de fenotipos aberrantes.	Valorar recuento de blastos (<5%). Se observa neutrofilia, monocitosis, eosinofilia y basofilia, recuento de blastos inferior al 2%, trombocitosis. Disminución de la fosfatasa alcalina ^{1,15} .	Presencia de blastos de 10 -19% de la celularidad total en MO ^{1,15} .	Recuento de blastos en MO superior al 20% de la celularidad total ^{1,15} .

<p>Citogenética</p>	<p>Análisis de cambios numéricos y estructurales evaluando metafases en cultivo a partir de muestras de médula ósea y/o sangre periférica. Busca identificar el cromosoma Filadelfia o el gen de fusión <i>BCR-ABL</i>. Y usualmente se usa para el diagnóstico y monitoreo de la LMC.</p> <p>Hibridación in situ fluorescente (FISH) es una prueba que se utiliza para identificar el gen de fusión <i>BCR-ABL</i> mediante el empleo de sonda fluorescentes dirigidas contra los genes BCR y ABL. Prueba sensible y rápida realizada en células en metafase ó interfase útil para el seguimiento de la enfermedad⁴².</p>	<p>Detección de anomalías citogenéticas como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - t(9;22) (cromosoma Filadelfia). - Pérdida adicional del cromosoma 9 (der9) en un 10 % de los casos¹⁷. 	<p>Detección de anomalías citogenéticas como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - t(9;22) cromosoma Filadelfia. - Trisomía 8 y 19. - Isocromía 17q - Doble cromosoma Ph^{14,17}. 	<p>Detección de anomalías citogenéticas como:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Isocromía i(17q) en el 20% de los casos. - Trisomía 8 en el 40% de los casos. - t(3;21) (q26;q22) y t(7;11)(p15;p15) (inferiores al 5% de los casos)^{10,14,17}.
<p>Diagnostico Molecular</p>	<p>Permite la detección de la oncoproteína BCR-ABL mediante métodos basados en RT-PCR.</p> <p>La reacción en cadena por la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) es una prueba altamente sensible (1 célula anormal/1.000.000 de células normales) que permite detectar anomalías moleculares que incluyen traslocaciones, mutaciones, etc. Los pacientes que reciben tratamiento también pueden monitorizarse por PCR.</p> <p>Esta prueba también puede realizarse en una muestra de sangre o en células de médula ósea o en cualquier tejido afectado por la enfermedad⁵.</p>	<p>Este método permite la detección confiable de la traslocación típica BCR-ABL, que genera proteínas de fusión de 190 kDa (p190bcr/abl), de 210 kDa (p210 bcr/abl) y de 230 kDa (p230bcr/abl), respectivamente^{18,19}. El reordenamiento e1a2 (proteína de 190 kDa) es característico de la LLA de precursores B, aunque puede encontrarse también de forma excepcional (<1%) en la LMC. Por el contrario, los reordenamientos b2a2, b3a3 son característicos de la LMC (proteína de 210 kDa), detectándose únicamente en alrededor de 20-30% de las LLA de precursores B del adulto⁹.</p>		

3.1.14 Tratamiento de la LMC y factores biológicos asociados a inducción de resistencia

El tratamiento para la LMC debe iniciarse una vez sea diagnosticado. La terapia convencional de la LMC en fase crónica ha variado a lo largo de los años y constaba de fármacos anti-neoplásicos y anti-mieloproliferativos como el busulfán, hidroxiurea, interferón alfa y una vez lograda la remisión de la enfermedad trasplante alogénico de MO⁸. Sin embargo, en la actualidad se emplean los inhibidores de tirosina quinasa (ITK) como el imatinib, dasatinib y nilotinib^{41,42}.

El mecanismo de acción de los ITK es bloquear el dominio funcional tirosina quinasa y el dominio de unión a ATP de BCR-ABL. El imatinib es una 2-fenilaminopirimidina que induce remisión hematológica en el 95% y remisión molecular en el 60% de los pacientes en fase crónica como (en pocos casos) fase acelerada o Blástica⁴³. Fue el primer inhibidor de tirosina quinasa cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la actividad quinasa de BCR-ABL uniéndose a los aminoácidos adyacentes donde se une el ATP en el sitio activo. Esta inhibición permite la disminución en la proliferación celular e induce el proceso de apoptosis^{42,43}.

La resistencia a imatinib se define como la ausencia de respuesta hematológica, molecular o citogenética significativa, que a menudo se debe a mutaciones puntuales en el dominio tirosina quinasa de ABL. Estas mutaciones han sido caracterizadas ya que incluyen más de 50 en diferentes puntos, entre ellas están Gly250, Tyr253, Glu255, Thr315, Met351 y Phe359, que representan el 60-70% de todas las mutaciones confiriendo resistencia^{3,8,44,45}.

Análisis de cariotipo post-tratamiento con imatinib demuestran que el 60%-70% de los pacientes logran una completa desaparición de las células con cromosoma Ph positiva en medula ósea y mantienen un estado de respuesta citogenética completa (CCyR) de 5 años. Sin embargo, un pequeño número de pacientes no responden al imatinib en la fase inicial (resistencia primaria), mientras que otros responden al inicio del tratamiento y luego

desarrollan resistencia en fases avanzadas (resistencia secundaria). La resistencia primaria puede estar relacionada, al menos en parte, con la heterogeneidad biológica de la enfermedad (por ejemplo, por aumento en los niveles de BCR-ABL1) La Resistencia secundaria se puede deber a la adquisición de mutaciones en el dominio quinasa BCR-ABL (como la mutación T315I). En los últimos años, se han creado dos nuevos inhibidores de la tirosina quinasa (TKIs) como el dasatinib y nilotinib, los cuales son inhibidores potentes. Ambos de "segunda generación" son eficaces para inducir o restaurar la CCyR en el 40% - 50% de los pacientes que al parecer han fracasado en el tratamiento primario con imatinib. Sin embargo, aproximadamente el 20% de los pacientes con LMC en fase crónica no responden tanto a imatinib y ni a un posterior tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación lo cual indica un mal pronóstico, debido a un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. El paciente que no responde a la terapia moderna debe proceder, si es posible, el trasplante alogénico de células madre antes de la recaída^{13,17,26}.

3.1.15 Monitoreo post-tratamiento con Imatinib

Una vez que el paciente inicia el tratamiento con imatinib se debe realizar un análisis de cariotipo, pruebas moleculares (RT-PCR) de las células de MO y de respuesta hematológica. Si el paciente está respondiendo hematológicamente (restauración de la hematopoyesis), los niveles de transcritos BCR-ABL se deben evaluar por lo menos trimestralmente para confirmar la presencia o ausencia del cromosoma Ph. Cuando se alcanza la remisión citogenética completa, se debe continuar el seguimiento molecular en intervalos de 3 meses y el análisis citogenético de médula ósea puede reducirse a intervalos de 12 meses a menos que haya evidencia de progresión en la enfermedad. La mayoría de mutaciones con la excepción particular de la mutación puntual T315I, son susceptibles a tratamiento con las nuevas generaciones de PTKIs^{1,45,47}.

4.- CONCLUSIONES

- (1) El evento inicial en la LMC es la adquisición del cromosoma Ph en las células madre pluripotenciales.
- (2) Desde la fase crónica de la enfermedad Bcr-Abl causa inestabilidad genética, incremento en la proliferación, y bloqueos en la diferenciación celular y apoptosis.
- (3) La progresión a fases avanzadas de la enfermedad se acompaña de cambios genéticos dependientes de Bcr-ABL (mutaciones puntuales) o independientes de Bcr-Abl (trisomías, deleciones, mutaciones en genes supresores de tumor).
- (4) El uso clínico de inhibidores de tirosina quinasa en casos sensibles como resistentes ha mejorado la supervivencia de los pacientes.
- (5) Se debe realizar un seguimiento estricto de los pacientes después de iniciado el tratamiento para valorar la respuesta hematológica, citogenética y molecular según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Vardiman James W. MD. *Chronic Myelogenous Leukemia, BCR-ABL1+*. American journal of clinical pathology, 2009; 132(2): 250-260.
2. Bengio Raquel, Gargallo Patricia, Barreyro Paula, Bitton Roberto, Larripa Irene. *Leucemia Mieloide Crónica. Mecanismos Genéticos de resistencia al imatinib*. Medicina, 2007; 67(2): 71 – 74.
3. Radich Jerald P. *The Biology of CML Blast Crisis*. American Society of Hematology, 2007; 384 -391.
4. Raul Hernando Murillo Moreno, et al. *Anuario estadístico. Ministerio de la Protección social*. Revista Colombiana de Cancerología, 2006; 10(4): 257-266.
5. Melo Junia V, Hughes Timothy P, Apperley Jane F. *Chronic Myeloid Leukemia*. American Society of Hematology. 2003; 132- 152.
6. Primo Daniel, Flores Juan, Quijano Sandra, et al. *Impact of BCR/ABL gene expression on the proliferative rate of different subpopulations of haematopoietic cells in chronic myeloid leukaemia*. British journal of haematology, 2006; 135(1): 43-51.
7. Goldman John M, Melo Junia V. *Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment*. The new England journal of medicine, 2003;349 (15):1451 -64.
8. Weisberg Ellen, Manley Paul W, W Sandra. Cowan-Jacob, Hochhaus Andreas, Griffin James D. *Second generation inhibitors of BCR- ABL for the treatment of imatinib resistant chronic myeloid leukaemia*. Nature reviews cáncer, 2007; 7(5):345 -356.
9. Savona Michael, Talpaz Moshe. *Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia*. Nature reviews cancer, 2008; 8(5): 341-350.
10. Cervantes F, et al. *'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features*. British journal of haematology,1998; 100(1): 123-128.
11. Quintás Cardama Alfonso, Cortes Jorge. *Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia*. Blood, 2009; 113(8): 1619-1630.

12. Takahashi Naoto, Miura Ikuo, Saitoh Konhki, Miura Akira B. *Lineage involvement of stem cells bearing the philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization*. Blood, 1998; 92(12): 4758-4763.

13. Haferlach Torsten, et al. *Which compartments are involved in Philadelphia-chromosome positive chronic myeloid leukaemia? An answer at the single cell level by combining May-Grunwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization techniques*. British journal of haematology, 1997; 97(1): 99-106.

14. Calabretta Bruno, Perrotti Danilo. *The biology of CML blast crisis*. Blood, 2004; 103(11): 4010-4022.

15. Melo Junia V, Barnes David J. *Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer*. Nature reviews cancer, 2007; 7(6): 441-453.

16. Fauci Anthony S, Braunwald Eugene, Kasper Dennis L, Hauser Stephen L, Longo Dan L. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 17^a edición, México, D.F. McGRAW–HILL Interamericana editores, S.A. 2009: 683,686.

17. Hazlehurst Lori A., PhD, Bewry Nadine N., PhD, Nair Rajesh R., PhD, Pinilla-Ibarz Javier, MD, PhD. *Signaling Networks Associated With BCR-ABL–Dependent Transformation*. Cancer Control, 2009;16,(2): 100-107.

18. Mitelman Felix, Johansson Bertil and Mertens Fredrik. *The impact of translocations and gene fusions on cancer causation*. Nature reviews cancer, 2007; 7(4): 233-245.

19. Melo Junia V. *The diversity of BCR - ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype*. Blood 1996; 88(7): 2375-84.

20. Melo Junia V, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM. *The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia*. Blood, 1993;81(1): 158-65.

21. Keam Susan J. *Dasatinib In Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia*. Adis drug profile, 2008; 22(1): 59-69.

22. Yu Hua, Pardoll Drew, Jove Richard. *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nature reviews cancer, 2009; 9(11):798-809.

23. Levine Ross L, Pardanani Animesh, Tefferi Ayalew, Gilliland Gary. *Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders*. Nature reviews cancer, 2007; 7(9): 673-683.

24. Lopez Otín Carlos, Hunter Tony. *The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer*. Nature reviews cancer, 2010;10(4): 278,292.
25. Cohen George B, Ren Ruibao, Baltimore David. *Modular binding domains in signal Transduction proteins*. Cell Press.1995; 80(2): 237-248.
26. Perrotti, Danilo, Jamieson Catriona, Goldman John, Skorski Tomas. *Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation*. The Journal of Clinical Investigation. 2010; 120(7):2254- 2264.
27. Zhang Xiaowu, Ren Ruibao. *Bcr-Abl Efficiently Induces a Myeloproliferative Disease and Production of Excess Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Mice: A Novel Model for Chronic Myelogenous Leukemia*. Blood, 1998; 92(10):3829-3840.
28. Gesbert Franck, Sellers William, Signoretti Sabina, Loda Massimo, Griffin James. *BCR/ABL regulates expression of the cyclindependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway*. The journal of biological chemistry. 2000; 275(50):39223-39230.
29. Jamieson Catriona H. *Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells*. American Society of Hematology, 2008: 436- 442.
30. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. *Chronic myelogenous leukemia: Mechanisms underlying disease progression*. Leukemia, 2002; 16(8):1402-1411.
31. Tom D Bunney, Matilda Katan. *Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN*. Nature reviews cancer, 2010; 10(5):342- 352.
32. Engelman Jeffrey A. *Targeting PI3K signalling in cancer opportunities, challenges and limitations*. Nature reviews cancer, 2009; 9(8): 550- 562.
33. Malarkey Kevin, Belham Christopher M, Paul Andrew, Graham Anne. *The regulation of tyrosine kinase signaling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors*. Biochem. 1995; 309(2):361-375.
34. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. *Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy*. Leukemia, 2003; 17(3): 590–603.

35. Brunet A, Kanai F, Stehn J, et al. *14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport*. The journal of Cell Biology. 2002; 156(5):817-828.
36. Obsilova V, Vecer J, Herman P, et al. *14-3-3 protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4*. Biochemistry, 2005; 44(34):11608-11617.
37. Trejo Cordova Alfredo, Navarro Maldonado Maria del Carmen, Rosado Garcia Adolfo. *Catenina Beta: características estructurales y funcionales*. Contactos, 2009; 75:15–20.
38. Ajoy K. Samanta, Sandip N. Chakraborty, Yan Wang, Ellen Schlette, E. Premkumar Reddy, Ralph B. Arlinghaus. *Destabilization of Bcr-Abl/Jak2 Network by a Jak2/Abl Kinase Inhibitor ON044580 Overcomes Drug Resistance in Blast Crisis Chronic Myelogenous Leukemia (CML)*. Genes Cancer, 2010; 1(4):346–359.
39. Sherr Charles J, McCormick Frank. *The RB and p53 pathways in cancer*. cancer cell, 2002; 2(2):103-112.
40. Deininger Michael W. N, Goldman John M, Melo Junia V. *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*. Blood, 2000; 96(10): 3343, 3356.
41. Naka Kazuhito, Hoshii Takayuki, Hirao Atsushi. *Novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells*. Cancer Science, 2010; 101(7):1577-1581.
42. Zhang Jianming, Yang Priscilla, Gray Nathanael S. *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nature reviews cancer, 2009; 9(1): 28-39.
43. Kantarjian Hagop, Melo JV, Tura S, Giralto S, Talpaz M. *Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies*. American Society of Hematology, 2000:90-109.
44. Skorski T. *Oncogenic tyrosine kinases and the DNA damage response*. Nature reviews cancer, 2002; 2(5):351-60.
45. Hochhaus A, La Rosse. *Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance*. Leukemia, 2004; 18(8):1321-1331.
46. Barnes David J. Schultheis Beate, Adedeji Simisade, Melo Junia V. *Dose-dependent effects of Bcr-Abl in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia*. Oncogene, 2005; 24(42):6432-6440.

47. An Xin, Tiwari Amit K, Sun Yibo, Ding Pei-Rong, Ashby Jr Charles R, Chen Zhe-Sheng. *BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review*. *Leukemia*, 2010; 34(10):1255-1268.