



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Marcadores de susceptibilidad y de respuesta farmacogenética
en Leucemia Mieloide Crónica**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Natalia Weich

Directora: Dra. Ariela F. Fundia

Directora: Dra. Irene B. Larripa

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética Hematológica, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2016

Fecha de Defensa: 7 de marzo de 2017

Agradecimientos

A las Dras. Ariela Fundia e Irene Larripa, directoras de este trabajo, por confiar, brindarme su apoyo, conocimientos y por su compromiso invaluable al trabajo y a mi formación en investigación que me permitieron llevar adelante esta Tesis.

A los Dres. Richard Clark y Munir Pirmohamed por permitirme realizar la estadía de tres meses en su lugar de trabajo y contribuir económicamente para que eso sea posible. A todo el grupo de trabajo del Departamento de Farmacología en especial a la Dra. Andrea Davies ya que sin su ayuda, apoyo y enseñanza este trabajo no hubiera sido posible.

A los médicos hematólogos por las muestras de pacientes que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

A mis compañeros de trabajo de acá y de allá en especial a Andrea, Athina, Ana, Giusy, Eunice y Elinor por su apoyo, amistad y por los muy buenos momentos compartidos.

Al Estado Nacional por contribuir desde pequeña en mi formación permitiendo que la mayor parte de mis estudios sean realizados con fondos públicos en educación. En especial, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a la Universidad de Buenos Aires por inculcarme la pasión por la ciencia.

Al FONCyT, CONICET y la Academia Nacional de Medicina por becarme durante estos años de desarrollo de este trabajo. Al Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET por permitirme realizar este trabajo de Tesis en esta institución.

A mis hermanas Bárbara y Vanina en especial a mis sobrinos Iván, Emi, Julia, y Benicio por hacerme olvidar de los malos momentos y que solo su alegre compañía tenga sentido haciendo que los problemas desaparezcan.

A mis amigos Mica, Lau, Jime y Juan por escucharme, bancarme, darme su apoyo y simplemente por su amistad que me permitió divertirme en los momentos más necesarios.

A mis amigos Mari, Ta, Sol, Nico, Titan, por su amistad, apoyo, fuerza y diversión que fue fundamental durante estos años de trabajo.

A mis padres Mabel y Enrique

A Alejandro por todo su cariño, su apoyo en los momentos más difíciles y por darme las fuerzas necesarias en los momentos más difíciles.

ABREVIATURAS

A: Adenina
ABC: ATP Binding Cassette
ABL: Abelson
ADN: Ácido desoxiribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
ASK1: apoptosis signal-regulating kinase
BCR: Breakpoint cluster region
C: Citosina
CB: Crisis blástica
CYP: citocromo P450
dbSNP: Base de datos de SNP
EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg.
EUTOS: *European Treatment and Outcome Study*.
FA: Fase Acelerada
FC: Fase Crónica
GSTs: Glutación S transferases
hOCT: human Organic Cation Transporter
HR: Hazard ratio
IC: Intervalo de confianza
IS: International scale
ITK: Inhibidor de Tirosina Kinasa
JNK: c-Jun N-terminal kinase 1
LD: *Linkage Disequilibrium*
LMA: Leucemia mieloide Aguda
LMC: Leucemia mieloide Crónica
MDR: Multidrug resistance
NQO: Quinona óxido-reductasa
OR: Odds ratio
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PgP: Glicoproteína de permeabilidad
Ph: Philadelphia
Ph+: Philadelphia positivas
RCM: Respuesta Citogenética Mayor
RHC: Respuesta Hematológica Completa
RMM: Respuesta Molecular Mayor
rs: *SNP reference number*
RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
SLE: Sobrevida libre de Evento
SLF: Sobrevida libre de Fallo
SNP: Polimorfismo de nucleótido único
T: Timina
t: Traslocación
TK: Tirosina Kinasa
tRMM: tiempo hasta la Respuesta Molecular Mayor
U: Uracilo
V: Voltios

Producción científica

Las publicaciones científicas obtenidas con parte de los resultados del presente trabajo se detallan a continuación:

1. Stella F*, **Weich N***, Panero J, Fantl DB, Schutz N, Fundia AF, Slavutsky I. Glutathione S-transferase P1 mRNA expression in plasma cell disorders and its correlation with polymorphic variants and clinical outcome. *Cancer Epidemiol.* 2013, 37(5):671-4. * estos autores contribuyeron igualmente en este estudio.
2. Fundia AF, **Weich N**, Crivelli A, La Motta G, Larripa IB, Slavutsky I. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in celiac disease and their correlation with genomic instability phenotype. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014; 38(3):379-84.
3. **Weich N**, Nuñez MC, Galimberti G, Elena G, Acevedo S, Larripa I, Fundia AF. Polymorphic variants of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genes in childhood acute leukemias: a preliminary study in Argentina. *Hematology.* 2015, 20(9):511-6.
4. **Weich N**, Ferri C, Moiraghi B, Bengió R, Giere I, Pavlosky C, Larripa I, Fundia A. TP53 codon 72 polymorphism predicts chronic myeloid leukemia susceptibility and treatment outcome. *Blood Cells Mol Dis.* 2016, 59:129-33.
5. **Weich N**, Ferri C, Moiraghi B, Bengió R, Giere I, Pavlosky C, Larripa I, Fundia A. GSTM1 and GSTP1, but not GSTT1 genetic polymorphisms are associated with chronic myeloid leukemia risk and treatment response. *Cancer Epidemiol.* 2016, 44:16-21.
6. **Weich N**, Roisman A, Cerliani B, Araoz V, Chertkoff L, Richard S, Slavutsky I, Larripa I, Fundia A. Gene polymorphism profiles of drug-metabolizing enzymes GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in an Argentinean population *Annals of Human Biology.* 2016 [en prensa].

Resumen

La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por el rearreglo *BCR-ABL1* sin embargo no se conocen los factores genéticos que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar diversos polimorfismos genéticos a fin de identificar nuevos marcadores de susceptibilidad y de respuesta farmacogenética en LMC. Se evaluaron 23 polimorfismos en los genes *CYP1A1*, *CYP1B1*, *ABCB1*, *ABCC3*, *hOCT1*, *NQO2*, *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1* y *TP53* en 141 pacientes con LMC bajo tratamiento con inhibidores de tirosina kinasa (ITKs). Se demostró que la combinación de los genotipos *GSTP1*-GG con *GSTM1*-nulo o *GSTT1*-nulo son factores de riesgo para la enfermedad y que el polimorfismo en *TP53* es un factor protector. Por otro lado, se encontró que los polimorfismos en los genes *NQO2*, *ABCB1* y el haplotipo de *NQO2*, se asociaron con mal pronóstico y con falta de respuesta a los ITKs. Además, los pacientes con 2 o más copias de *GSTM1* mostraron peor respuesta al tratamiento. Por último, se determinó un score genético estableciendo que los portadores de 3-4 genotipos de riesgo de los genes *CYP1B1*, *TP53*, *NQO2* y *GSTP1* tienen significativamente menor supervivencia libre de eventos. A su vez, los portadores de 1-2 genotipos de riesgo de los genes *ABCB1* y *GSTP1* tienen mayor riesgo de fallar al tratamiento. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que los polimorfismos evaluados son co-factores de susceptibilidad al desarrollo de LMC y además son biomarcadores con valor pronóstico y predictivo de la eficacia del tratamiento con ITKs.

Palabras claves: leucemia mieloide crónica, inhibidores de tirosina kinasa, polimorfismos, susceptibilidad, farmacogenética.

**Title: Susceptibility and pharmacogenetic response markers in Chronic Myeloid
Leukemia**

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is associated to *BCR-ABL1* oncogene however genetic factors that may influence disease susceptibility and treatment response are still unknown. The aim of this study was to characterize several genetic polymorphisms in order to identify susceptibility and pharmacogenetic markers in CML. Genetic polymorphisms in *CYP1A1*, *CYP1B1*, *ABCB1*, *ABCC3*, *hOCT1*, *NQO2*, *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *TP53* genes were evaluated in 141 patients with CML treated with tyrosine kinase inhibitors (TKIs). The combinations of *GSTP1*-GG with *GSTM1*-null or *GSTT1*-null genotypes were risk factors for disease susceptibility but the polymorphism in *TP53* has a protective role for CML development. Moreover, genetic polymorphisms in *NQO2*, *ABCB1* and the haplotypes in *NQO2*, were associated with poor prognosis and lack of response to TKIs. In addition, patients with 2 or more copies of *GSTM1* showed worse treatment response. Finally, a genetic score was determined showing that patients with 3-4 risk genotypes of *CYP1B1*, *TP53*, *NQO2* and *GSTP1* genes had a significantly lower event free survival. Moreover, patients carrying 1-2 risk genotypes of *ABCB1* and *GSTP1* genes are more likely to fail TKI treatment. In conclusion, this study suggests that the genetic polymorphisms of these genes are involved in the disease susceptibility and are prognostic and predictive biomarkers of ITKs treatment efficacy.

Keywords: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, polymorphisms, susceptibility, pharmacogenetics.

INDICE

INTRODUCCIÓN	11
1. Leucemia Mieloide Crónica	12
1.1 Perspectiva histórica	12
1.2 Epidemiología	14
1.3 Etiología	15
1.4 Manifestaciones Clínicas	16
1.5 Fisiopatología	17
1.6 Vías de señalización reguladas por BCR-ABL1	19
1.7 Sistemas de Pronóstico.....	21
1.8 Tratamiento con Inhibidores de Tirosina Kinasa (ITKs).....	21
1.8.1 Tratamiento de Primera línea.....	22
1.8.2 Tratamiento de segunda y tercera línea.....	23
1.8.3 Efectos Adversos.....	24
1.8.4 Respuesta al tratamiento	25
1.8.5 Definición de las respuestas a ITKs	27
1.8.6 Resistencia a los ITKs	28
2. Susceptibilidad a LMC	30
3. Farmacogenética	34
3.1 Variabilidad en la respuesta al tratamiento	34
3.2 Farmacocinética y Farmacodinamia.....	35
4. Rol de la variabilidad genética en la susceptibilidad y en la respuesta farmacogenética en LMC.	37
4.1 Polimorfismos Genéticos.....	37
4.1.1 Polimorfismos de Nucleótido Único	38
4.1.2 Variación en número de copias	40
4.2 Genes citocromo P450	40
4.3 Genes Transportadores	42
4.3.1 Familia de proteínas ABC (<i>ATP Binding Cassette</i>).....	42
4.3.1.1 Gen ABCB1 (MDR1)	44
4.3.1.2 Gen ABCC3.....	46
4.3.2 Gen SLC22A1 (hOCT1).....	46
4.4 Gen <i>NQO2</i>	49
4.5 Glutathion-S-Transferasas	51
4.6 Gen <i>TP53</i>	53
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	56
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. Poblaciones Estudiadas	60
1.1 Controles	60
1.2 Pacientes con LMC.....	60
2. Extracción de ácidos nucleicos	61

2.1 Lisis celular.....	61
2.2 Extracción de ADN genómico por método de Salting out.....	62
2.3 Extracción de ADN genómico por el método de DNAzol.....	62
2.4 Control cuali-cuantitativo de los ácidos nucleicos.....	62
3. Polimorfismos genéticos estudiados.....	63
4. Métodos de Genotipificación.....	64
4.1 Polimorfismos de delección de <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	64
4.2 Ensayo de variación del número de Copias de <i>GSTM1</i> Y <i>GSTT1</i>	65
4.3 PCR-RFLP para el polimorfismo <i>GSTP1</i> rs1695.....	67
4.4 PCR-RFLP para el polimorfismo <i>TP53</i> rs1042522.....	68
4.5 PCR Múltiple para los polimorfismos en <i>ABCB1</i>	69
4.6 PCR-Pirosecuenciación.....	73
5. Análisis estadístico.....	78
RESULTADOS.....	80
1. Características clínicas de los pacientes.....	81
2. Descripción de los polimorfismos estudiados en los pacientes con LMC.....	83
2.1 Equilibrio de Hardy Weinberg.....	83
2.2 Distribución de las frecuencias genotípicas de los SNPs en los pacientes con LMC.....	84
2.3 Distribución de los polimorfismos en los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	86
3. Susceptibilidad a LMC.....	90
3.1 Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas de los genes GSTs y TP53.....	90
3.1.1 Distribución de los genotipos GSTs y TP53 de acuerdo a la edad y sexo.....	91
3.2 Modelos genéticos de penetrancia.....	93
3.3 Combinación de polimorfismos GSTs y susceptibilidad a LMC.....	94
4. Asociación de los polimorfismos con el índice de Sokal, Fase de enfermedad y presencia de mutaciones en <i>BCR-ABL1</i>.....	96
4.1 Sokal y fase de la enfermedad.....	96
4.2 Mutaciones en <i>BCR-ABL1</i>	99
5. Asociación de los polimorfismos genéticos con la respuesta al tratamiento.....	102
5.1 Respuesta Citogenética.....	102
5.2 Respuesta Molecular.....	104
5.3 Tiempo hasta la RMM (tRMM).....	107
5.4 Sobrevida libre de Fallo al tratamiento (SLF).....	109
5.5 Sobrevida libre de Eventos (SLE).....	112
6. Análisis de haplotipos.....	117
6.1 Cálculo del Desequilibrio de Ligamiento.....	117
6.2 Haplotipos de <i>NQO2</i> y su asociación con los parámetros clínicos y la respuesta al tratamiento.....	118
7. SNP Score.....	121

RESUMEN DE RESULTADOS.....	124
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES.....	149
REFERENCIAS	151

Introducción

1. Leucemia Mieloide Crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC), es una neoplasia mieloproliferativa crónica de carácter clonal con origen en células madre hematopoyéticas pluripotentes común a las tres series hematopoyéticas. Aunque se caracteriza fenotípicamente por la proliferación de la línea mieloide, puede considerarse una verdadera panmielopatía en la que se ven afectados tanto monocitos, eritroblastos y megacariocitos, como linfocitos B y T. La característica distintiva de la LMC es la alteración citogenética conocida como cromosoma *Philadelphia* (Ph), resultante de la translocación recíproca t(9;22) (q34;q11), que produce un gen híbrido *BCR-ABL1*, el cual desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad (Faderl et al., 1999). La LMC debe ser considerada como una de las historias más exitosas de la medicina del cáncer del siglo pasado (Mughal et al., 2016).

1.1 Perspectiva histórica

La LMC es la primera enfermedad neoplásica en la que se identificó una alteración genética característica. Fue descrita clínicamente por primera vez a mediados del siglo XIX en forma independiente, y prácticamente al mismo tiempo, por John H Bennett en Escocia y Rudolph Virchow en Alemania (Piller, 2001). Las características clínicas y la evolución de la enfermedad fueron progresivamente bien documentadas en el siglo siguiente. Sin embargo, hasta 1960 no se produjeron importantes avances en cuanto al conocimiento de la patología ni tampoco en el tratamiento de la misma. En 1960, el trabajo de Peter Nowell y David Hungerford condujo al descubrimiento de un cromosoma del grupo G con delección parcial del brazo largo en dos pacientes con leucemia y que fue llamado cromosoma *Philadelphia* (Ph) en honor a la ciudad donde fue descrito por primera vez (Nowell & Hungerford, 1960). Este descubrimiento fue la primera anomalía citogenética descrita en una enfermedad maligna humana. Posteriormente, se estableció que la LMC es una enfermedad clonal derivada de células madre mediante la demostración del polimorfismo en el locus de la glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa, ligado al cromosoma X (Fialkow & Garler, 1976). El siguiente paso crucial en la caracterización de la LMC fue posible gracias a la introducción de

técnicas de bandeo G, lo que permitió a Janet Rowley demostrar que el cromosoma Ph era, de hecho, un cromosoma 22 más corto (22q-) y que estaba acompañado de un cromosoma 9q+ anormal (**Figura1**), originados como resultado de la translocación recíproca t(9;22) (q34;q11)(Rowley, 1973).

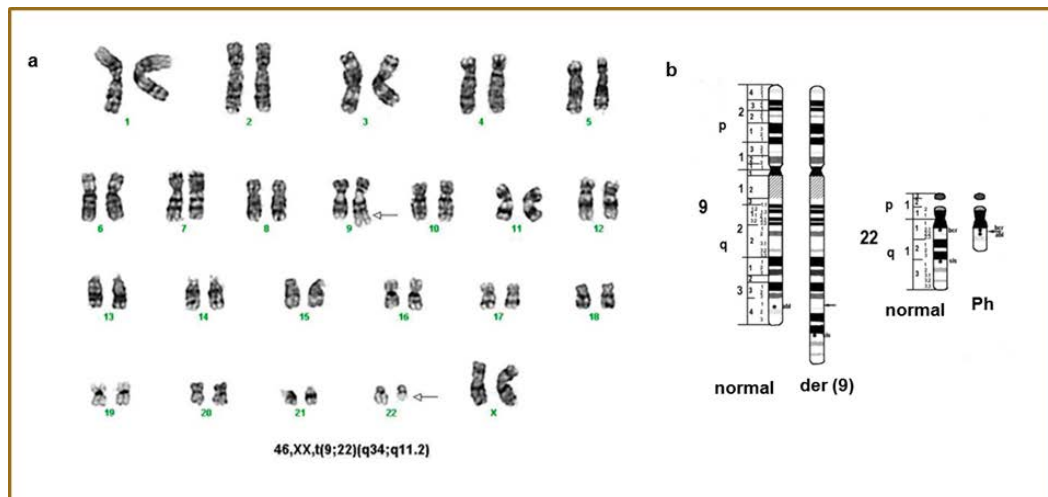


Figura 1. Cromosoma *Philadelphia*. a) Cariotipo señalando los cromosomas 9q+ y 22q- o Ph; b) Formación del cromosoma *Philadelphia* y la translocación t(9;22)(q34;q11.2). Se muestra el ideograma de bandas G de los cromosomas 9 y 22. Los segmentos translocados están enmarcados en los ideogramas del der (9) y del Ph. La translocación resulta en un cromosoma 9 un poco más largo [der (9)] y un cromosoma 22 más corto [der (22)], que se denomina el cromosoma Philadelphia (Ph).

El trabajo de Rowley, al descifrar el cromosoma Ph, sirvió de marco para desentrañar la arquitectura genómica, la estructura y función del oncogén que induce la LMC, el cual será posteriormente conocido como *BCR-ABL1*. Diversos estudios moleculares permitieron demostrar que el oncogén Abelson (*ABL1*), que normalmente se localiza en el cromosoma 9, es translocado al cromosoma 22. Mientras que los puntos de ruptura en el cromosoma 9 abarcaban una gran región genómica, en el cromosoma 22 se localizaban en una región genómica relativamente pequeña que por lo tanto fue llamada "*breakpoint cluster region*" o *BCR* (Groffen et al., 1984; Heisterkamp et al., 1982). Para mediados de los 80, se había revelado la estructura molecular del oncogén *BCR-ABL1*. El siguiente gran paso hacia la comprensión de la LMC fue descubrir que el *BCR-ABL1* era una tirosina kinasa y que esta actividad era crucial para su capacidad de transformar las células (Lugo et al., 1990). A partir de entonces, la idea de que el gen de fusión *BCR-ABL1* tenía un rol central en la LMC fue generalmente aceptada y

estableció una base científica para orientar el tratamiento hacia la actividad de kinasa del *BCR-ABL1*. En la década de 1990 se profundizó la comprensión de la compleja red de señalización en la que interviene la kinasa *BCR-ABL1*, con contribuciones de muchos laboratorios (Mughal et al., 2016). La **Figura 2** muestra los principales logros obtenidos a partir de los estudios genéticos así como también la evolución de las diferentes estrategias terapéuticas. El uso de hidroxiaurea en 1969 permitió controlar el recuento leucocitario de los pacientes. El trasplante alogeneico utilizado a partir de 1975, es una herramienta potencialmente curativa para la LMC aunque es un procedimiento de alta complejidad y con alta mortalidad. Años más tarde, el interferón *alpha* (IFN α) fue la primera droga que demostró una remisión citogenética más durable y reproducible (Talpaz et al., 1987) hasta el desarrollo de los nuevos agentes terapéuticos como imatinib, dasatinib y nilotinib, los cuales serán explicados más adelante.

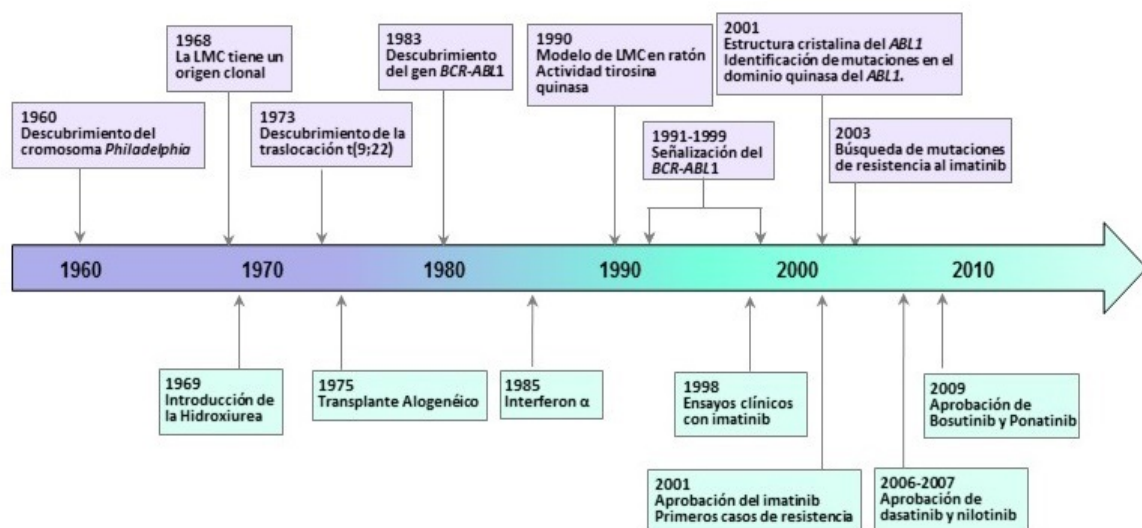


Figura 2. Avances en el estudio y tratamiento de la leucemia mieloide crónica

1.2 Epidemiología

La LMC es una enfermedad rara, se estima que la incidencia es de 1-1,5 casos nuevos por 100.000 habitantes y año. Sin embargo, se calcula que la prevalencia es de 10-12 casos por 100.000 habitantes, debido al incremento en la supervivencia de los pacientes registrados en la última década, permitiendo que los pacientes con LMC tengan tasas de supervivencia comparables a la de la población general (Höglund et al.,

2015). La LMC representa el 15-20 % del total de leucemias en los individuos adultos (Siegel & Naishadham, 2012).

En la población occidental, la edad media de los pacientes al momento del diagnóstico es 55-65 años de edad, pero puede aparecer a cualquier edad, aunque menos del 10% de los casos se producen por debajo de los 20 años. Sin embargo, en Asia, África, el sur y este de Europa, y América Latina, el promedio de edad de la LMC es significativamente más baja, con un promedio 38-41 años en diferentes países (Mendizabal & Garcia-Gonzalez, 2013). La enfermedad afecta a ambos sexos, con un ligero predominio masculino, mostrando una relación hombre: mujer de 1,3: 1 (Höglund et al., 2015; Rohrbacher & Hasford, 2009).

1.3 Etiología

El único factor de predisposición que se conoce para la LMC es la exposición a dosis altas de radiación ionizante, como lo demuestran los estudios de los sobrevivientes de las explosiones de las bombas atómicas Hiroshima y Nagasaki (Bizzozero & Johnson 1966; Holmberg 1992). Por otro lado, diversos estudios han estimado la relación entre el desarrollo de leucemia y la exposición a agentes leucemógenos químicos, como benceno y agentes alquilantes. Se han reportado casos esporádicos de LMC asociados al tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II del ADN, los cuales principalmente predisponen a leucemia aguda (Felix, 1998; Pedersen-Bjergaard et al., 1997; Relling et al., 2003). Por otro lado, algunos estudios han sugerido que la exposición ocupacional al benceno no genera un mayor riesgo de desarrollar LMC (Khalade et al., 2010; Lamm et al., 2009), si bien un metaanálisis reciente sugiere lo contrario (Vlaanderen et al., 2012). A pesar de los resultados obtenidos a partir de los diversos estudios epidemiológicos, en la actualidad se considera que en la mayoría de los pacientes con LMC no se conoce ninguna causa predisponente.

1.4 Manifestaciones Clínicas

La mayoría de los pacientes con LMC se diagnostica con frecuencia por un hallazgo accidental cuando se realizan análisis de sangre por otras razones. Alrededor de un tercio de los pacientes son asintomáticos, aunque otros suelen tener síntomas leves como fatiga, pérdida de peso, o sudores (Hehlmann et al., 1993). No es raro que los pacientes informen malestar abdominal o saciedad temprana debido a la esplenomegalia.

La LMC es una enfermedad tri-fásica, presentando predominantemente una **fase crónica** (FC) de alrededor de 5-7 años, pero que puede abarcar desde unos pocos meses a más de 20 años. Los pacientes presentan leucocitosis intensa, con mieleemia, basofilia y un porcentaje variable de blastos circulantes. El recuento de plaquetas también está elevado en aproximadamente el 50% de los pacientes (**Tabla 1**). Si la enfermedad no se trata adecuadamente puede progresar a una **fase acelerada** (FA). Se consideran como criterios de progresión al incremento de blastos circulantes o de basófilos, las citopenias no atribuibles al tratamiento y el deterioro clínico del paciente, por aparición de fiebre, sudoración, dolores óseos, dolor abdominal, crecimiento progresivo del bazo, púrpura o aumento de infecciones y aparición de anomalías cromosómicas asociadas (Cervantes et al., 1990). La duración media de la fase acelerada históricamente fue de alrededor de 2-3 años, y es seguida por el desarrollo de la **crisis blástica** (CB), frecuentemente terminal. La CB de la LMC se define por la presencia de más de 20% de blastos en sangre periférica o en médula ósea. Esta fase se caracteriza por un cuadro de insuficiencia medular similar al de las leucemias agudas y el paciente generalmente es refractario al tratamiento (Cervantes et al., 1990; Kantarjian et al., 1987). La CB puede ser de origen mieloide (aproximadamente 70% de los casos) o linfoide (30%), con un espectro de características clínicas que incluyen leucocitosis, citopenia y dolor óseo, entre otros síntomas (Hughes et al., 2014). Los diferentes criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) empleados para diferenciar las fases de la LMC se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Fases de la Leucemia Mieloide Crónica según la OMS

Fase Crónica	Fase Acelerada	Crisis blástica
<p><i>En Sangre Periférica (SP).</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucocitosis neutrofilica con precursores mieloides. • Blastos 1-3%. • Eosinofilia, basofilia, plaquetas normales o aumentadas. • Fosfatasa alcalina leucocitaria ausente. <p><i>En Médula ósea (MO)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Hiper celular • Hiperplasia mieloide • Blastos más promielocitos (<10% de la celularidad total) • Leve aumento de fibras de reticulina 	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos 10-19% en SP y/o células nucleadas en MO. • Basófilos $\geq 20\%$. • Trombocitopenia persistente • Aumento del tamaño del bazo y de leucocitos • Evidencia citogenética de evolución clonal 	<ul style="list-style-type: none"> • Blastos $\geq 20\%$ en SP y/o en MO. • Proliferación blástica extramedular. • Clusters de blastos en MO

Adaptado a partir de la Guías de Diagnóstico y Tratamiento de la Sociedad Argentina de Hematología, 2015.

No todos los pacientes siguen esta progresión gradual, y a veces la CB se puede desarrollar repentinamente en la FC o estar presente al diagnóstico, lo cual se ha reportado en aproximadamente el 5% de los casos. La respuesta al tratamiento y la supervivencia global en la fase avanzada de la LMC es relativamente pobre, por lo cual uno de los objetivos principales del tratamiento de los pacientes en FC es prevenir la progresión a la fase avanzada (Hughes et al., 2014).

1.5 Fisiopatología

El cromosoma Ph generado por la translocación recíproca t(9;22) (q34;q11) resulta en la yuxtaposición de las secuencias 3' del gen *ABL1* (9q34) a la región 5' del gen *BCR* (22q11.2) (Heisterkamp et al., 1985) (**Figura 3**). La consecuencia molecular de esta translocación es el reemplazo del primer exón del *ABL1* con secuencias del gen *BCR*, dando origen al gen de fusión *BCR-ABL1* (Heisterkamp et al., 1983). Por consiguiente, la traducción del gen quimérico *BCR-ABL1* en una proteína de fusión anormal con actividad Tirosina kinasa (TK) incrementada es considerada responsable del proceso leucemogénico (Hughes et al., 2014).

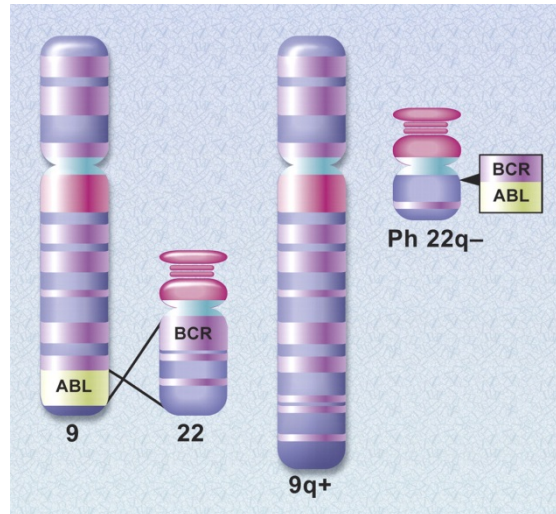


Figura 3. Formación del gen de fusión *BCR-ABL1*. Diagrama esquemático de la translocación entre los cromosomas 9 y 22 que produce la yuxtaposición de los genes *ABL1* y *BCR* en el cromosoma 22 deleciónado.

El gen *ABL1*, homólogo al oncogén viral de leucemia murino Abelson (*v-abl*), está constituido por 11 exones y codifica una tirosina kinasa no-receptor de 145 kDa. Las funciones del gen *ABL1* son bastante diversas y el cuadro emergente es complejo. La proteína *ABL1* normal se localiza en el núcleo y el citoplasma donde participa en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Sawyers et al., 1994) e interviene en el proceso de mielopoiesis, en la respuesta celular al estrés genotóxico y en la transmisión de señales intracelulares (Lewis & Schwartz, 1998; Yuan et al., 1999). El gen *BCR* comprende 23 exones que ocupa una región de 135 kb en el cromosoma 22 y codifica una fosfoproteína con un peso molecular de 160 kDa. La proteína *BCR* se expresa en múltiples tejidos humanos y se localiza en el citoplasma de células quiescentes o alrededor de los cromosomas de células en mitosis, lo cual sugiere su posible participación en la regulación del ciclo celular (Wetzler et al., 1995).

Los puntos de ruptura dentro del gen *ABL1* pueden ocurrir en un área aproximada de 200 kb en el extremo 5' del gen (Melo, 1996), involucrando habitualmente el exón 2 (a2). Los puntos de ruptura del gen *BCR* se localizan en diferentes regiones afectando más frecuentemente los exones: 1(e1), 13(b2), 14(b3) y 19(e19). De esta forma se pueden generar los reordenamientos e1a2, b2a2 o b3a2 y e19a2 que corresponden a proteínas de fusión de diferente peso molecular: *BCR/ABL1*^{P190} (190

kDa), $BCR/ABL1^{P210}$ (210 kDa) y $BCR/ABL1^{P230}$ (230 kDa) (Fainstein et al., 1987; Groffen et al., 1984; Saglio et al., 1990) (Figura 4). Los tres rearrreglos de $BCR-ABL1$ se asocian con diferentes tipos de leucemias siendo la proteína p210 la más común en la mayoría de los casos de LMC (Jorgensen & Holyoake, 2001). La proteína p190 se expresa comúnmente en la leucemia linfoblástica aguda Philadelphia positivo (LLA Ph+) (Hirsch-Ginsberg et al., 1988), ocasionalmente, en leucemia mieloide aguda (LMA) (Schaefer-Rego et al., 1988) y es rara en la LMC (Melo et al., 1994; Selleri et al., 1990). Por último, la p230 se asocia a la LMC neutrofílica, un síndrome mieloproliferativo semejante a la LMC caracterizado por síntomas clínicos leves (Emilia et al., 1997; Selleri et al., 1990).

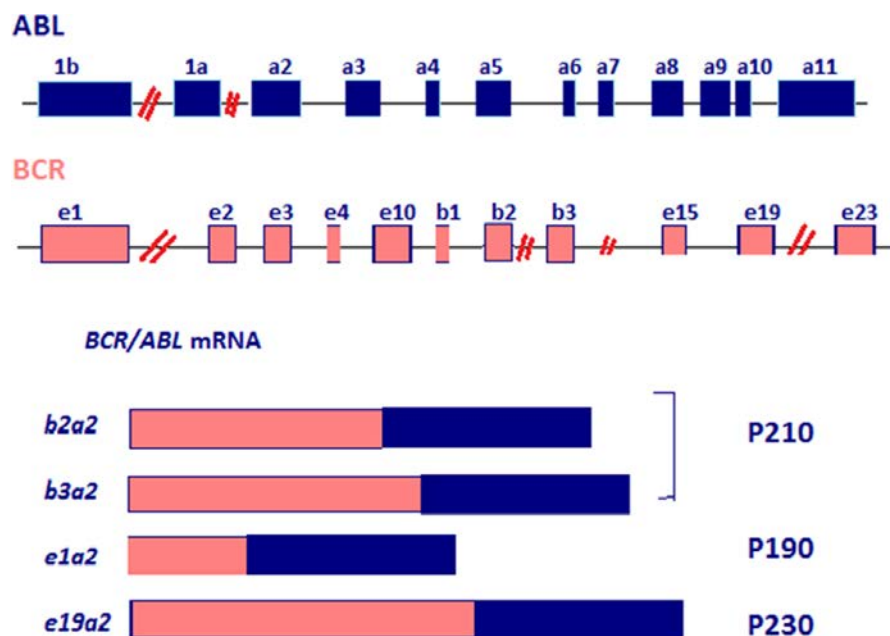


Figura 4: Estructura de los genes *BCR* y *ABL1* y las proteínas de fusión. Se muestra el esquema de los puntos de ruptura dentro de los genes *BCR* y *ABL1* y se ilustran las proteínas de fusión correspondientes a los diferentes rearrreglos (Bennour et al., 2016).

1.6 Vías de señalización reguladas por *BCR-ABL1*

La proteína *BCR-ABL1* incluye varios dominios importantes de sus contrapartes *BCR* y *ABL1* que confieren propiedades biológicas específicas (Hughes et al., 2014). La característica más importante del *BCR-ABL1* en relación a su acción leucemogénica es el hecho de la hiperactividad del dominio TK del *ABL1*. Además, la localización de la proteína *ABL1* es nuclear, mientras que la oncoproteína de fusión *BCR-ABL1* se ubica en

el citoplasma quedando espacialmente disponible para activar numerosas señales de supervivencia (Hazlehurst et al., 2009). Las células que expresan la oncoproteína *BCR-ABL1* muestran fosforilación aberrante de varias proteínas, incluyendo proteínas adaptadoras del citoesqueleto y factores de transcripción. Como tal, la proteína *BCR-ABL1* kinasa conduce directa o indirectamente a la activación de múltiples vías celulares tal como se ejemplifica en la **Figura 5** (Hughes et al., 2014).

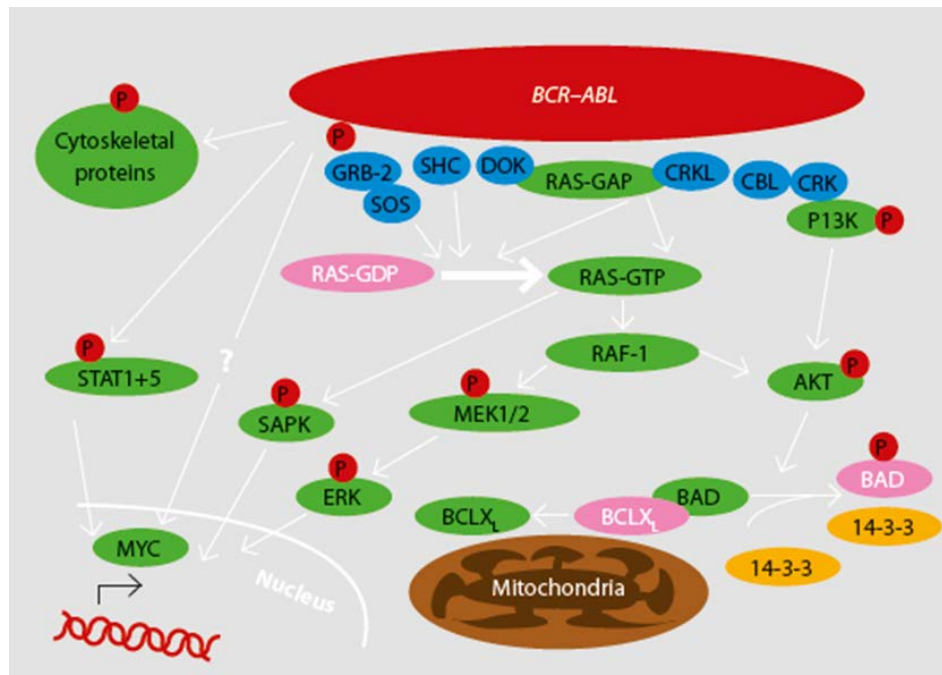


Figura 5. Vías de señalización activadas por la oncoproteína *BCR-ABL1* en la LMC. Se muestra un esquema simplificado considerando que se ha reportado la activación de diversas vías de señalización por parte de *BCR-ABL1* (Hughes et al., 2014).

La activación de estas vías celulares conduce, en última instancia, a una proliferación celular incrementada, disminución de la adherencia al estroma de la médula ósea, disminución de la respuesta a los estímulos apoptóticos, y aumento de la inestabilidad genómica (Deininger & Goldman, 2000). Estos cambios biológicos básicos son responsables del fenotipo celular de la LMC en fase crónica, y allanan el camino para la transformación de la enfermedad.

1.7 Sistemas de Pronóstico

Existen varios sistemas pronósticos que permiten predecir la supervivencia en pacientes con diagnóstico de LMC. Los índices Sokal, Hasford y EUTOS (*European Treatment and Outcome Study*) sirven para evaluar el riesgo del paciente en el momento previo al tratamiento (Hasford et al., 2011; Hasford et al., 1998; Sokal et al., 1984). Si bien, hay que tener en cuenta los tres sistemas de pronóstico al decidir el tratamiento, el índice de Sokal es el más comúnmente utilizado (Baccarani et al., 2013). Estos índices son útiles como valor pronóstico permitiendo agrupar a los pacientes en grupos de bajo, intermedio y alto riesgo. El índice de Sokal se obtiene empleando criterios definidos al diagnóstico (edad, tamaño del bazo, recuento de plaquetas y porcentaje de blastos). El índice de Hasford utiliza los mismos parámetros que Sokal incluyendo el porcentaje de eosinófilos y el EUTOS considera el tamaño del bazo y el porcentaje de basófilos. Para los tres sistemas de puntuación el grupo de alto riesgo se asocia con mayor riesgo de progresión a FA o CB.

1.8 Tratamiento con Inhibidores de Tirosina Kinasa (ITKs)

En los últimos años, el desarrollo de los Inhibidores de Tirosina Kinasa (ITKs) permitió modificar el curso de la enfermedad y actualmente se convirtieron en el tratamiento de elección para los pacientes con LMC. El primer inhibidor utilizado en el tratamiento de la LMC fue el Imatinib, un derivado de la 2-fenilaminopirimidina que comenzó a utilizarse en ensayos clínicos a partir de 1998. Posteriormente, se desarrollaron otros ITKs de segunda y tercera generación entre los que se incluyen nilotinib, dasatinib, y ponatinib. Los ITKs son pequeñas moléculas que actúan a través de la inhibición competitiva del sitio de unión al ATP de la oncoproteína *BCR-ABL1*. De este modo, inhiben la autofosforilación del *BCR-ABL1* y la fosforilación de proteínas implicadas en la transducción de señales celulares, provocando el arresto del crecimiento y la apoptosis de las células Ph+.

1.8.1 Tratamiento de Primera línea

Actualmente se disponen de 3 ITKs recomendados para el tratamiento de pacientes con LMC en primera línea.

- **Imatinib**

El mesilato de imatinib fue el primer inhibidor utilizado para el tratamiento de pacientes con LMC en FC. El imatinib inhibe eficientemente la forma inactiva del *BCR-ABL1*, pero también bloquea el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (en inglés, PDGFR) y la tirosina kinasa KIT (Jabbour & Kantarjian, 2016). La dosis habitual es de 400 mg/día aunque puede elevarse a 600 y 800 mg/día. Un estudio internacional de randomización de imatinib 400 mg/día o INF- α junto con citarabina, conocido como IRIS, estableció que las respuestas fueron significativamente mejores en los pacientes tratados con Imatinib luego de un seguimiento de 19 meses. Aunque los resultados con este ITK fueron muy buenos, sólo el 55% de los pacientes incluidos en el estudio IRIS permanecieron en terapia a los 8 años de seguimiento (O'Brien et al., 2003). Esto subrayó la necesidad de un tratamiento adicional para los pacientes que habían fracasado o eran intolerantes al imatinib.

- **Dasatinib**

Es un inhibidor de segunda generación que es 350 veces más potente que el imatinib *in vitro* siendo la dosis habitual empleada de 100 mg/día (Jabbour & Kantarjian, 2016). El mismo puede inhibir tanto la conformación activa como inactiva del *BCR-ABL1* proporcionándole un espectro más amplio de actividad. También puede inhibir la actividad de la familia de las Src kinasas, lo que puede traer consecuencias importantes en la vía de señalización celular (Jabbour & Kantarjian, 2016). Este ITK se evaluó inicialmente en pacientes no respondedores a imatinib. Sin embargo, posteriormente se consideró como tratamiento de primera línea. Los resultados del estudio sugieren que los pacientes recién diagnosticados con LMC bajo tratamiento con dasatinib 100 mg/día obtienen la respuesta más rápida respecto de los pacientes con imatinib 400 mg/día (Kantarjian et al., 2012).

- **Nilotinib**

Es un análogo estructural del imatinib que inhibe la forma inactiva del *BCR-ABL1*. Su afinidad *in vitro* por el sitio de unión a ATP es de 30 a 50 veces superior comparado con imatinib (Weisberg et al., 2005). Se recomienda una dosis habitual de 400 mg/día. Este inhibidor también puede bloquear la actividad del factor de crecimiento derivado de plaquetas (en inglés, PDGFR) y la kinasac-KIT (Jabbour & Kantarjian, 2016). El nilotinib demostró inicialmente la capacidad de respuesta hematológica y citogenética en pacientes que habían fracasado con imatinib. A su vez, un importante estudio internacional como tratamiento de primera línea reveló que los pacientes con dos dosis distintas de nilotinib (300 mg/12hs o 400 mg/12 hs) obtienen mejor respuesta a los 12 meses respecto de los tratados con imatinib 400 mg/día (Saglio et al., 2010).

Aunque se reconoce que el nilotinib y el dasatinib son más potentes e inducen remisiones más rápidas y profundas, todavía no hay pruebas sólidas de un mejor resultado si se utiliza un ITK de segunda generación en primera línea de tratamiento (Baccarani et al., 2015).

1.8.2 Tratamiento de segunda y tercera línea

Un cambio de terapia es obligatorio en caso de falta de respuesta al tratamiento, así como en caso de efectos secundarios y/o tóxicos que impidan una dosificación óptima, o afecten la calidad de vida del paciente. Para el cambio de tratamiento se puede utilizar cualquier ITK disponible siendo la secuencia lógica de la siguiente manera: desde imatinib a cualquier otro ITK disponible y aprobado (dasatinib, nilotinib, ponatinib); desde nilotinib a (dasatinib, ponatinib) y desde dasatinib a (nilotinib, ponatinib) (Baccarani et al., 2015).

El Ponatinib es otro ITK aprobado a finales del año 2012 para el tratamiento de adultos con LMC en FC, FA o CB que sean resistentes o intolerantes a Imatinib, Dasatinib o Nilotinib. La unión de Ponatinib e Imatinib son similares, excepto que Ponatinib se une a la molécula sin interactuar con la posición 315 del bolsillo kinasa (O'Hare et al., 2012). De esta forma el Ponatinib ha demostrado actividad inhibitoria frente al *BCR-ABL1* nativo y a una variedad de mutaciones de *BCR-ABL1*, en particular la T315I. Un

estudio ha informado que el Ponatinib fue capaz de inducir la respuesta citogenética y molecular en pacientes resistentes a 2 ya menudo a 3 ITKs. Al año, el 63% de los pacientes en FC seguía recibiendo tratamiento básico y el 91% de los respondedores mantenían la respuesta citogenética (Baccarani et al., 2015).

1.8.3 Efectos Adversos

Los ITKs han revolucionado el tratamiento de la enfermedad permitiendo alcanzar una tasa de supervivencia global del 85%. Sin embargo, en muchos casos se han reportado efectos adversos durante el tratamiento. A pesar que los efectos secundarios con ITKs son comunes, el número de pacientes que interrumpe la terapia por esta causa es relativamente bajo (Caldemeyer et al., 2016). En la **Tabla 2** se resumen los principales efectos adversos relacionados con la terapia de los ITKs.

Tabla 2. Principales efectos adversos relacionados con la terapia de los ITKs.

Imatinib	Dasatinib	Nilotinib	Ponatinib
Retención de líquido, náuseas, vómitos, diarrea. Falla cardíaca, toxicidad hematológica	Diarrea. Toxicidad gastrointestinal y hematológica. Derrames pleurales	Toxicidad gastrointestinal y hematológica. Derrames pleurales. hipertensión, hiperglucemia e hipercolesterolemia	Oclusión vascular, hipertensión, pancreatitis, erupciones cutáneas graves, insuficiencia cardíaca y hepatotoxicidad, trombosis.

Los efectos secundarios son una preocupación importante a fin de garantizar que los pacientes reciban una dosis adecuada evitando la interrupción de la terapia y complicaciones que puedan influir en la calidad de vida (Kekäle et al., 2015). El resultado final para lograr un tratamiento adecuado depende de la eficacia del ITK y de la tolerancia del fármaco en el individuo (Rea, 2015).

1.8.4 Respuesta al tratamiento

En la LMC es necesario el monitoreo de la respuesta para permitir una evaluación temprana de la eficacia o fracaso del tratamiento definiéndose tres niveles de respuesta: hematológica, citogenética y molecular (**Figura 6**). Los criterios de respuesta en cada caso son la normalización del recuento de blancos, la reducción y eliminación del cromosoma Ph+ y la reducción de los niveles de expresión del *BCR-ABL1*, respectivamente (Hamad et al., 2013).

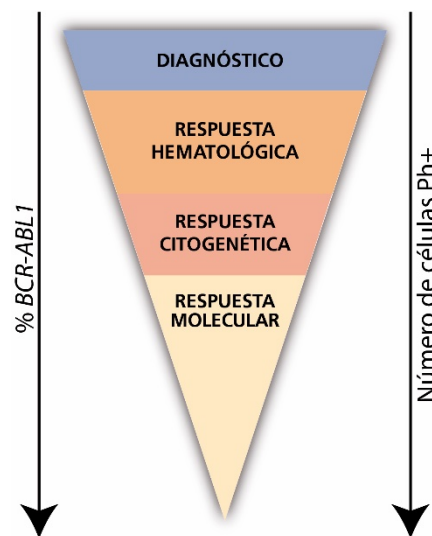


Figura 6. Seguimiento de la respuesta a la terapia en LMC. Se definen tres niveles de control de la enfermedad. Respuesta hematológica, Respuesta Citogenética y Respuesta Molecular. (Hamad et al., 2013)

- Respuesta Hematológica

La Respuesta hematológica completa (RHC) se logra cuando los recuentos de glóbulos blancos y plaquetas recuperan los niveles normales y no se detectan células en estadios inmaduros en sangre periférica.

- Respuesta Citogenética

El análisis se realiza con un mínimo de 20 metafases con bandeado y de acuerdo al porcentaje de células Ph positivas se define: Respuesta Citogenética Nula (RCN) cuando se observan más del 95% de células Ph+, Respuesta Citogenética Mínima

(RCMin) entre el 66-95% de células Ph+, Repuesta Citogenética Menor (RCMe) entre el 36-65% de células Ph+, Repuesta CitogenéticaParcial (RCP) entre 1-35% de células Ph+ y Respuesta Citogenética Completa (RCC) cuando no se observan células Ph+ (0%). La Respuesta Citogenética Mayor (RCM) incluye a la RCC y a la RCP.

- Respuesta Molecular

La detección de los niveles *BCR-ABL1* se realiza mediante la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real. Este procedimiento es la principal forma de monitoreo de respuesta en todo el mundo. De este modo, un consenso internacional realizado en octubre de 2005 en Bethesda (Hughes & Branford, 2006) propuso armonizar los valores de transcriptos *BCR-ABL1* a la escala internacional (IS, *international scale*). Para ello de forma arbitraria se consideró que el valor basal corresponde al 100% y por lo tanto la Respuesta Molecular Mayor (RMM) en IS es de 0,1% dado que equivale a 3 logaritmos de reducción. La conversión de los valores *BCR-ABL1* a la IS se realiza mediante la aplicación de un factor de conversión específico de cada laboratorio. Esta conversión es necesaria teniendo en cuenta la alta variabilidad inter-laboratorios debido a los numerosos pasos pre-analíticos y analíticos que requiere el estudio. La RMM es el gran objetivo en la terapia de la LMC, aunque, en la actualidad, se busca obtener respuestas moleculares más profundas de ≥ 4 logaritmos (RM4.0), $\geq 4,5$ logaritmos (RM4.5) y ≥ 5 logaritmos (RM5.0) (Tabla 3) (Cross et al., 2012).

Tabla 3. Criterios de respuesta molecular.

%BCR- ABL1/ABL1	Reducción (log)	Respuesta Molecular	Copias del gen ABL1^a
$\leq 0,001$ o indetectable	≥ 5.0	RM 5.0	≥ 100.000
$\leq 0,0032\%$ o indetectable	≥ 4.5	RM 4.5	≥ 32.000
$\leq 0,01\%$ o indetectable	≥ 4.0	RM 4.0	≥ 10.000
0,01-0,1%	≥ 3.0	RMMayor	
0,1-1%	≥ 2.0	RMMenor	
1 -10%	≥ 1.0	RMMínima	
>10%	<1.0	RMNula	

^a Para la RM4.0, RM4.5 y RM5.0 se debe tener en cuenta el número de copias del gen *ABL1* para evitar falsos negativos.

1.8.5 Definición de las respuestas a ITKs

Un grupo de expertos internacionales bajo el patrocinio de la *European LeukemiaNet*, establecieron a nivel internacional tres grados de respuesta al tratamiento con ITKs (óptima, *warning* y falla) (**Tabla 4**). Estas definiciones son sumamente importantes porque proporcionan una guía para el hematólogo. El monitoreo en los tiempos indicados (3, 6 y 12 meses) es una herramienta imprescindible para la evaluación de las respuestas y la detección de recaídas tempranas. La respuesta óptima significa una buena respuesta al tratamiento. La situación de advertencia o “*Warning*” implica que las características de la enfermedad y la respuesta al tratamiento requieren mayor supervisión para permitir cambios oportunos en la terapia. Por último, la falla al tratamiento significa que el mismo debe cambiarse porque el paciente está en un riesgo significativo de progresión y muerte.

Tabla 4. Definición de la respuesta con ITKs de primera línea.

	Óptima	<i>Warning</i> (Advertencia)	Falla
Al diagnóstico	NA	Riesgo alto o anormalidades cromosómicas adicionales	NA
3 meses	BCR-ABL1 \leq 10% y/o Ph+ \leq 35%	BCR-ABL1 >10% y/o Ph+ 36-95%	No RHC y/o Ph+ >95%
6 meses	BCR-ABL1 <1% y/o Ph+ 0%	BCR-ABL1 1-10% y/o Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 >10% y/o Ph+ >35%
12 meses	BCR-ABL1 \leq 0,1%	BCR-ABL1 >0,1-1%	BCR-ABL1 >1%

NA: no aplicable

Por otro lado, la falla secundaria al tratamiento se produce en caso de la pérdida de respuesta hematológica, citogenética y/o molecular alcanzada, por la presencia de anormalidades adicionales al *BCR-ABL1* a nivel citogenético y por la presencia de mutaciones en *BCR-ABL1* (Baccarani et al., 2015).

1.8.6 Resistencia a los ITKs

Los ITKs pueden inducir respuestas duraderas en la mayoría de los pacientes, sin embargo, un 35% de los pacientes tratados con imatinib exhiben falla al tratamiento (Giles et al., 2013; Khorashad et al., 2013). También se observa resistencia con nilotinib y dasatinib (Hochhaus & Saglio, 2013; Kantarjian et al., 2012). Una de las causas más conocida de resistencia se debe a la presencia de mutaciones puntuales en el gen *BCR-ABL1* que origina cambios de aminoácidos en la proteína quimérica alterando su conformación y reduciendo la afinidad por los ITKs (Weisberg et al., 2007). De este modo la pérdida de especificidad del *BCR-ABL1* por el inhibidor conducirá al crecimiento de clones leucémicos resistentes portadores de mutaciones. No obstante, esto puede ser contrarrestado, generalmente mediante un cambio de ITK (Baccarani et al., 2015). El conocimiento de la mutación involucrada en la resistencia provee una guía para la elección del tratamiento de segunda y/o tercera línea. Se ha descrito un amplio espectro de mutaciones en el dominio kinasa *BCR-ABL1* con una frecuencia muy heterogénea y con diferente grado de relevancia clínica (O'Hare et al., 2012). En la **Figura 7** se describen las mutaciones reportadas las cuales han mostrado conferir resistencia para cada ITK. La mutación T315I es resistente a todos los ITKs de primera y segunda generación sin embargo la evaluación preclínica del Ponatinib ha demostrado ser un potente inhibidor de *BCR-ABL1*^{T315I}. Por el contrario, la mutación compuesta *BCR-ABL1*^{E255V/T315I} ha mostrado conferir resistencia a este inhibidor (O'Hare et al., 2012) (**Figura 7**). De este modo, la combinación de la terapia con ITKs y otros agentes puede ser necesaria para hacer frente a mutantes compuestos altamente resistentes.

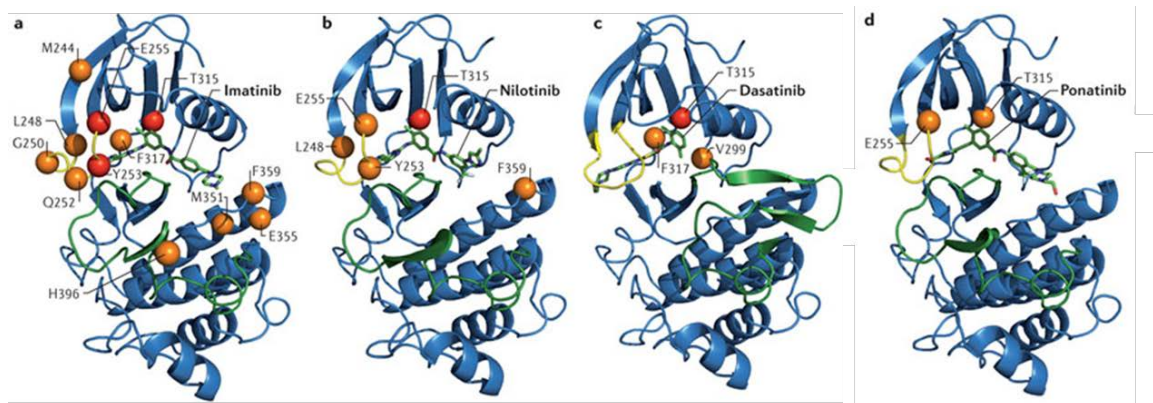


Figura 7. Se indica la presencia de ciertas mutaciones en el dominio kinasa del *BCR-ABL1* las cuales confieren resistencia a los ITKs. Se muestra la estructura cristalina del gen en complejo con Imatinib, Nilotinib, Dasatinib y Ponatinib. Los residuos resaltados confieren resistencia al ITK *in vitro*, pero con diferentes niveles: resistencia moderada (naranja) y resistencia alta (roja). Cada ITK es susceptible a un conjunto diferente de mutaciones siendo alguna de ellas parcialmente superpuestas para cada ITK. En comparación con el imatinib, los otros ITKs tienen menos vulnerabilidad a mutaciones en el dominio kinasa y proporcionan una opción potencial para cada mutación puntual (O'Hare et al., 2012).

Además de las mutaciones en *BCR-ABL1* existen varios mecanismos de resistencia a los ITKs como la amplificación génica la cual implica múltiples copias del reordenamiento *BCR-ABL1*, llevando a un desplazamiento de la relación inhibidor/blanco terapéutico. La sobreexpresión implica el aumento desregulado de los transcritos *BCR-ABL1* permitiendo que el clon leucémico proliferé aún en presencia de ITKs. Asimismo, existen mecanismos de resistencia independientes del *BCR-ABL1* (Figura 8). Varias vías están implicadas en la resistencia independiente entre ellas, la activación de las kinasas LYN, PI3K y SRC las cuales parecen estar involucradas en la resistencia y contribuyen a la progresión de la enfermedad (Balabanov et al., 2014). La activación constitutiva de las kinasas MAPK y JAK-STAT se ha visto en algunos pacientes que desarrollan resistencia a los ITKs (O'Hare et al., 2012). Muchas de estas vías son normalmente activadas por *BCR-ABL1*, pero la actividad de estas enzimas se rige por mecanismos independientes de la kinasa *BCR-ABL1* (O'Hare et al., 2012). Alteraciones en el transporte de los ITKs puede resultar en una concentración subóptima de la droga y por consiguiente desencadenar resistencia al tratamiento. La concentración intracelular de las drogas está determinada por bombas activas de ingreso y egreso (Hamad et al., 2013). Los eventos primarios implicados en la resistencia

independientes de *BCR-ABL1* todavía no son del todo comprendidos, sugiriendo que existen otros mecanismos que podrían influir en la falta de respuesta.

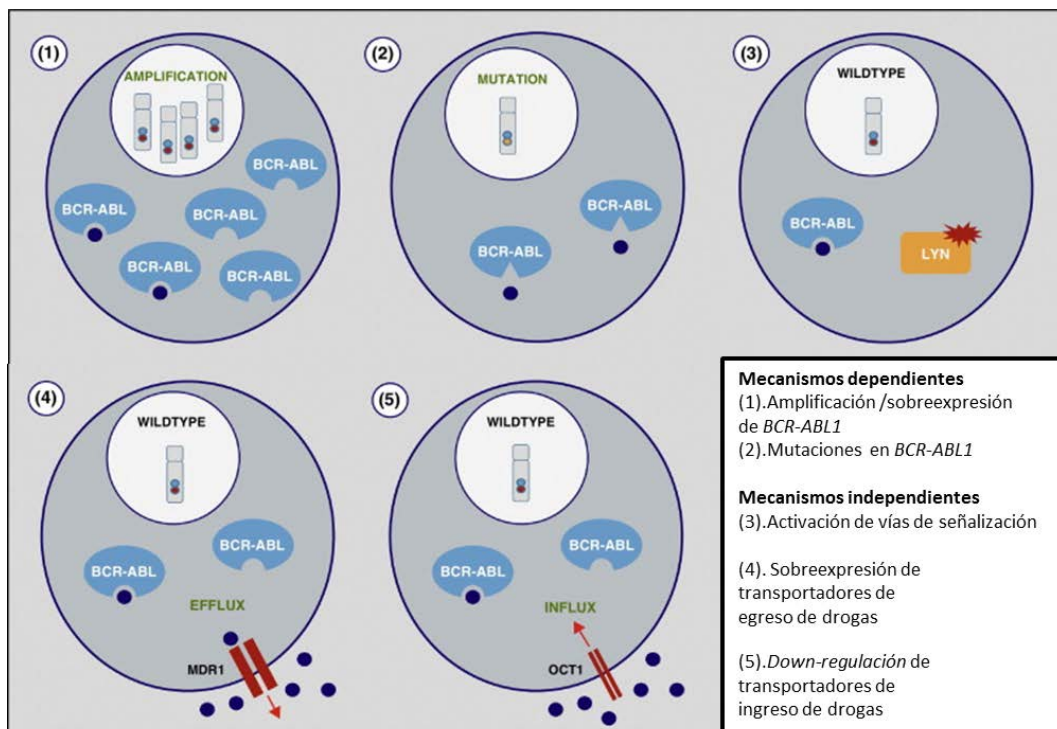


Figura 8. Principales mecanismos de resistencia a los ITKs. (Balabanov et al., 2014)

2. Susceptibilidad a LMC

El mantenimiento de la integridad del genoma es un proceso fundamental para la homeostasis celular a fin de garantizar la transmisión de la información genética intacta. Sin embargo, el genoma está sujeto a constantes agresiones de agentes genotóxicos los cuales pueden conducir a la inestabilidad genómica. El daño al ADN se puede producir por factores endógenos causados principalmente como consecuencia del metabolismo celular debido a la generación de metabolitos intermediarios de capacidad reactiva (ROS, hidrólisis y metilación, entre otros) o por factores exógenos por la exposición a xenobióticos, carcinógenos, radiación UV, entre otros factores. La inestabilidad genómica se define como un estado en donde hay un aumento en el daño al ADN originado por mayor exposición a factores endógenos y exógenos, por fallas en los mecanismos de respuesta al daño del ADN o por ambos mecanismos (Pawlowska & Blasiak, 2015). Los mecanismos de respuesta al daño contemplan aquellos procesos que se encargan de monitorear la integridad del

genoma, los cuales, en forma coordinada junto con la correcta reparación del ADN, son fundamentales para evitar el desarrollo neoplásico (Jeggo et al., 2016). En general, se considera que el proceso de reparación del ADN es un sistema fiel pero propenso a errores ya que en ciertas circunstancias pueden ser una posible fuente de generación de aberraciones cromosómicas (Sakofsky et al., 2012). La reparación incorrecta del genoma puede conducir a la formación de lesiones cromosómicas estables las cuales no son censadas por los mecanismos de control de respuesta al daño al ADN teniendo consecuencias perjudiciales (Chakraborty et al., 2013; Pawlowska & Blasiak, 2015). Las aberraciones cromosómicas son una de las causas más relevantes en la etiología de diversas neoplasias hematológicas, incluyendo leucemias. La comprensión de los mecanismos involucrados en la adquisición de aberraciones cromosómicas como las translocaciones en las células progenitoras leucémicas es fundamental para comprender las causas de las neoplasias hematológicas (Aplan, 2006; Chakraborty et al., 2013).

Si bien la patogénesis de la LMC se caracteriza por la presencia del cromosoma *Philadelphia*, los mecanismos responsables del origen de la translocación todavía no son conocidos (Aplan, 2006). Se ha postulado que los genes *ABL1* y *BCR* son blanco de factores aún desconocidos que causan roturas de doble cadena en el ADN y cuya reparación por recombinación homóloga y no homóloga da como resultado la generación del gen quimérico *BCR-ABL1* (Aplan, 2006; Chakraborty et al., 2013; Skorski, 2007). Por otro lado, se ha propuesto que para que la translocación *BCR-ABL1* tenga lugar, los cromosomas involucrados tienen que estar espacialmente cerca dentro del núcleo (Neves et al., 1999; Iarovaia et al., 2014). No se conoce si esta proximidad se produce en el momento en que se generan las roturas de doble cadena (Meaburn et al., 2007) o si la translocación se origina por la colisión entre los cromosomas dañados, que se mueven libremente en el núcleo (Glukhov et al., 2013). Se ha demostrado la cercanía espacial de los loci *ABL1* y *BCR* en células CD34+ de médula ósea (Neves et al., 1999) brindando apoyo a esta teoría como posible causa de la translocación (Aplan, 2006). Otros estudios sugieren que la recombinación entre secuencias repetitivas *Alu* localizadas cerca de los genes *BCR* y *ABL1* es lo que conduce a la translocación (Jeffs et al., 1998). Por otro lado, se ha sugerido que el origen de la translocación se debe a que

cerca de ambos genes se producen deleciones submicroscópicas (Kolomietz et al., 2001) o bien pequeñas inversiones (González et al., 2015).

A pesar de las distintas hipótesis propuestas acerca del origen del reordenamiento *BCR-ABL1*, ninguna de ellas ha sido corroborada. Todavía no se conocen los factores que inducen a que los cromosomas se rompan y por qué fallan los mecanismos de reparación del ADN (Skorski, 2007). Teniendo en cuenta que los acontecimientos que derivan en la transformación maligna son complejos y multifactoriales (Bruzzoni-Giovanelli et al., 2015), se ha postulado que existen anomalías moleculares aún desconocidas previas a la translocación, las cuales son necesarias para desarrollar la LMC (Soverini et al., 2015). Además, la presencia de células Ph⁺ en individuos sanos sugiere que el *BCR-ABL1* es esencial pero no suficiente como para iniciar el proceso leucémico (Hwan et al., 2009). Teniendo en cuenta que la acumulación de anomalías citogenéticas y moleculares adicionales al *BCR-ABL1* también contribuyen con la progresión de la enfermedad (Skorski, 2007) y que el *BCR-ABL1* por sí solo no es suficiente para explicar toda la gama de respuestas clínicas durante la enfermedad (Kolomietz et al., 2001), se sugiere la existencia de otros factores genéticos aún desconocidos que contribuyen tanto al proceso leucémico como a la iniciación de la translocación *BCR-ABL1*.

En una célula no tumoral existen mecanismos de detoxificación y de respuesta al daño al ADN que protegen de los efectos nocivos de compuestos endógenos y exógenos. Sin embargo, por fallas en estos procesos, en una etapa temprana del desarrollo tumoral se generan mutaciones en el ADN que directa o indirectamente producen la activación de oncogenes los cuales generan aumento de la replicación y estrés oxidativo. Si bien el estrés oxidativo induce un aumento de daño al ADN, mutaciones y/o rearrreglos cromosómicos, las células son capaces de tolerar ciertos cambios en el ADN gracias a que los mecanismos de respuesta al daño evitan que la célula dañada proliferen (**Figura 9**). Sin embargo, cuando se desregulan estos mecanismos, se rompe el equilibrio existente necesario para mantener la homeostasis celular generando un aumento de mutaciones y rearrreglos cromosómicos como por ejemplo el *BCR-ABL1* (**Figura 9**). La desregulación de los mecanismos de respuesta al daño junto con el aumento de la

proliferación así como una disminución en la apoptosis dado por el rearreglo *BCR-ABL1*, contribuyen con el fenotipo maligno.

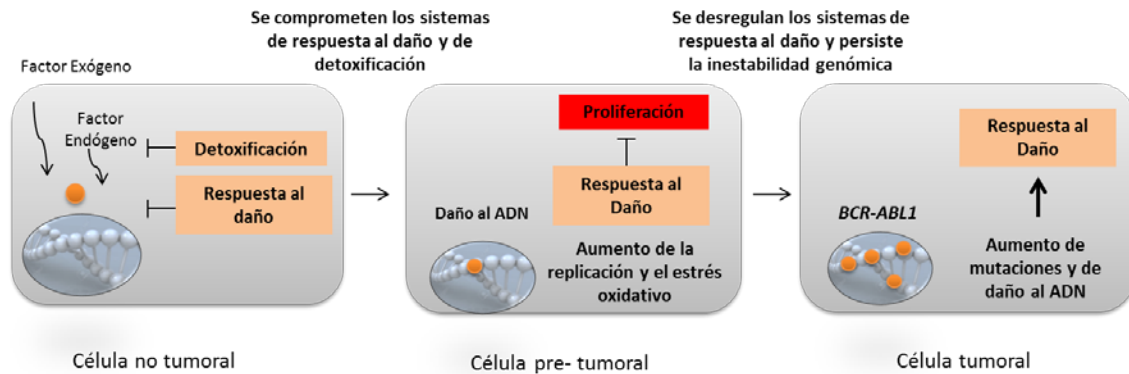


Figura 9. Mecanismos de detoxificación celular y de respuesta al daño en la inestabilidad genómica. La desregulación de estos sistemas permite que la inestabilidad genómica persista contribuyendo a generar alteraciones cromosómicas y el desarrollo tumoral.

En los últimos años han ido en aumento los estudios de investigación en los que se rastrea todo el genoma (GWAS, del inglés *Genome-wide Association Study*) a fin de identificar polimorfismos relacionados con la predisposición a la LMC (Bruzzoni-Giovanelli et al., 2015; Hwan et al., 2009). Si bien estos estudios son un poderoso enfoque para identificar genes de susceptibilidad subyacentes a la enfermedad, también es posible restringir la búsqueda de polimorfismos genéticos en genes de los que se sospecha que pueden llegar a tener alguna implicancia funcional directa o indirectamente en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y en la patogénesis de la LMC. Teniendo en cuenta que el mantenimiento de la integridad del genoma es un proceso fundamental para la homeostasis celular, el estudio de polimorfismos en genes involucrados en la detoxificación de agentes genotóxicos así como también en la respuesta al daño al ADN, puede ser útil para identificar marcadores genéticos que puedan influir en la susceptibilidad a la LMC.

3. Farmacogenética

3.1 Variabilidad en la respuesta al tratamiento

Las terapias farmacológicas están asociadas habitualmente con importantes diferencias interindividuales en la respuesta al tratamiento, tanto en la eficacia como en la aparición de efectos secundarios o colaterales. Las causas de esta variabilidad son multifactoriales, sin embargo, existen factores condicionantes los cuales son considerados frecuentemente y que pueden afectar la respuesta a las drogas (**Figura 10**). Entre estos, los factores ambientales y/o factores fisiológicos como la edad, sexo, embarazo, etnia, hábitos dietéticos, ingesta de alcohol, el hábito de fumar, alteraciones de la función renal y/o hepática (Ma & Lu, 2011). A su vez, las posibles interacciones con alimentos u otros fármacos administrados simultáneamente deben ser considerados al prescribir el medicamento (**Figura 10**). Sin embargo, los factores genéticos heredados de forma estable son una de las variables principales que condicionan la efectividad y toxicidad de un fármaco (Pirmohamed, 2006). Los polimorfismos genéticos y mutaciones pueden afectar la expresión y/o actividad de enzimas claves que participan en los procesos **farmacocinéticos** y **farmacodinámicos** de muchas drogas, teniendo implicancias fundamentales en la variabilidad interindividual en la respuesta a drogas (Angelini et al., 2013).



Figura 10. Variabilidad en la respuesta a drogas. Los factores ambientales, fisiológicos y genéticos, así como las interacciones con otras drogas, influyen en la variabilidad en la respuesta al tratamiento entre los distintos individuos. CNV. *copy number variation*

La genética es responsable de un 20 a un 95 % de la variabilidad en la respuesta terapéutica y la toxicidad (Evans & McLeod, 2003). Es bien sabido que la variación en la respuesta clínica es siempre específica del paciente y representa un desafío para optimizar la dosificación de la terapia farmacológica.

3.2 Farmacocinética y Farmacodinamia

La variabilidad en la respuesta a las drogas está determinada principalmente por las propiedades **farmacocinéticas y farmacodinámicas** de los fármacos prescritos, que están influidas, directa o indirectamente, por polimorfismos genéticos (Ahmed et al., 2016). Los polimorfismos pueden alterar los diferentes procesos involucrados desde la ingesta oral de la droga hasta su llegada a la célula blanco causando variabilidad en la eficacia y/o en la toxicidad. La **farmacogenética** es la disciplina que estudia el efecto de las variaciones en la secuencia de ADN en la respuesta a los fármacos (Weinshilboum, 2003). El progreso de la farmacogenética en los últimos años facilitó la caracterización de marcadores genéticos con valor pronóstico en diversas enfermedades (Rodríguez-Antona & Taron, 2015; Sim & Ingelman-Sundberg, 2011) y al mismo tiempo, ha mejorado la comprensión de los efectos adversos (Collins et al., 2016). La **farmacocinética** es el estudio de la evolución en el tiempo de un fármaco dentro del organismo teniendo en cuenta los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (**Figura 11**). Generalmente, los fármacos son administrados oralmente, se absorben en el intestino y son metabolizados en el hígado. Gracias a la actividad de diversas enzimas hepáticas, se producen metabolitos activos que en muchos casos, son los que realmente ejercen su actividad. Es por ello, que el metabolismo hepático es un proceso determinante de los niveles plasmáticos de las drogas.

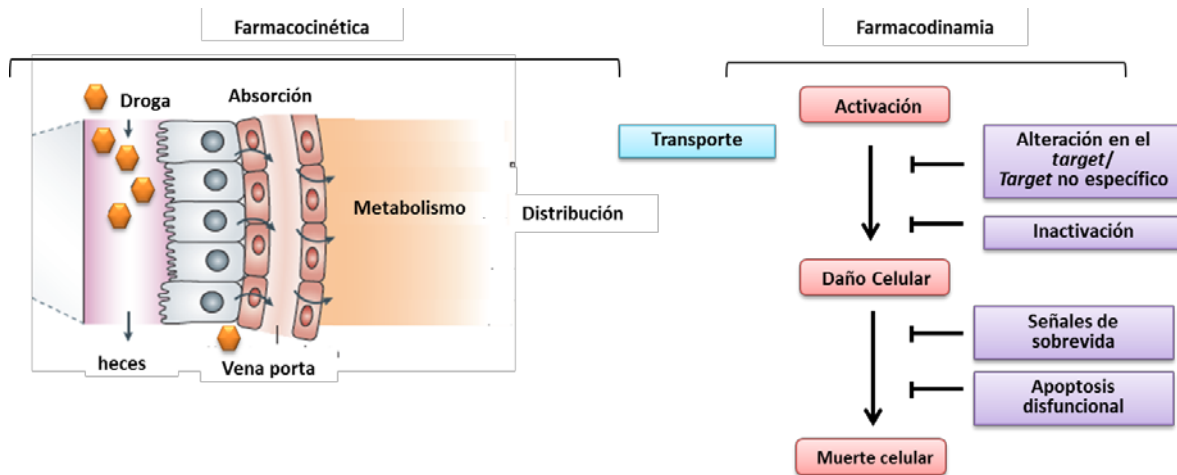


Figura 11. Mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos de las drogas. La farmacocinética involucra los procesos de absorción, metabolismo y distribución de las drogas. La farmacodinamia de muchas drogas está determinada por la inactivación o la falta de activación así como también las alteraciones en el target y/o la unión inespecífica a otras proteínas. A su vez, la activación de señales de sobrevida o la incapacidad de inducir apoptosis pueden afectar en la respuesta al tratamiento. Adaptado de Holohan et al., 2013.

Los procesos de absorción, metabolismo y distribución pueden limitar la cantidad de droga administrada que finalmente queda disponible para el tumor. Sin embargo, la actividad anticancerígena de los fármacos también se ve afectada por diversos mecanismos que ocurren dentro de la célula tumoral conocidos colectivamente como **farmacodinamia** (Figura 11). La farmacodinamia estudia los mecanismos de acción de los fármacos y los efectos que producen en la célula blanco, teniendo en cuenta que el efecto de la droga se relaciona con la concentración disponible. En este contexto, el efecto de las drogas anticancerígenas para inducir la muerte celular está determinado por el transporte, inactivación, falta de activación así como también la alteración en el *target* y/o la unión inespecífica a otras proteínas. Se considera que uno de los elementos críticos que determina la biodisponibilidad de las drogas y consecuentemente la respuesta terapéutica es su distribución por medio de las proteínas transportadoras, las cuales median el ingreso/egreso de las drogas a las células. La actividad excesiva de estas enzimas es uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a diversos agentes quimioterapéuticos utilizados comúnmente (Holohan et al., 2013).

Otro de los mecanismos determinantes de la farmacodinamia de las drogas es la inactivación y/o la falta de activación de los fármacos que se produce en muchos tumores a fin de disminuir los niveles de droga disponible y evitar de esta forma el daño celular (Holohan et al., 2013) (**Figura 11**). Además, muchas drogas necesitan ser convertidas a sus respectivos metabolitos activos para cumplir su función, por lo tanto la disminución de la activación de las drogas es uno de los procesos involucrados en la resistencia (Longley & Johnston, 2005). Los procesos de activación e inactivación de los fármacos son complejos y específicos de cada droga y pueden ser factores determinantes en la falta de respuesta al tratamiento de los pacientes.

Asimismo, la adquisición de alteraciones en el *target* molecular de la droga (**Figura 11**), impide que el fármaco sea capaz de ejercer su función. A su vez, los fármacos pueden interactuar con otras moléculas distintas a su *target* molecular específico, disminuyendo la cantidad de droga disponible dentro de la célula. Además, la activación de las señales de supervivencia y la falla en la inducción de la muerte celular programada también son mecanismos que influyen en la respuesta al tratamiento (**Figura 11**).

Los diversos mecanismos los cuales influyen en la farmacocinética y farmacodinamia de los ITKs pueden afectar en la respuesta al tratamiento. El estudio de la variabilidad interindividual permite identificar posibles marcadores farmacogenéticos los cuales podrían predecir para cada individuo la falta de eficacia al tratamiento con ITKs desarrollando guías de tratamiento personalizado.

4. Rol de la variabilidad genética en la susceptibilidad y en la respuesta farmacogenética en LMC.

4.1 Polimorfismos Genéticos

La variabilidad genética interindividual es uno de los factores que podrían influir en la susceptibilidad a desarrollar una LMC así como también en la respuesta al tratamiento. En la secuencia de ADN existe una alta heterogeneidad principalmente

dada por la presencia de polimorfismos genéticos que ocurren en promedio cada 1.000 pares bases (Deenen et al., 2011). Se define que la presencia de un polimorfismo debe ser mayor al 1% de lo contrario se refiere a una mutación. Los polimorfismos genéticos son variaciones “neutrales” ya que por sí solos no son causantes del fenotipo anormal pero pueden influir en la susceptibilidad a distintas enfermedades y en la respuesta a fármacos.

4.1.1 Polimorfismos de Nucleótido Único

El polimorfismo de nucleótido único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) es la alteración genética más común (Brookes, 1999; Sachidanandam et al., 2001; Sebat et al., 2004). En la mayoría de los casos un SNP posee dos formas alternativas (alelos), aunque puede haber SNPs trialélicos e incluso tetraalélicos. Los alelos se pueden clasificar según su frecuencia observada en las poblaciones, en alelo mayor y en alelo menor. Además, desde un punto de vista filogenético, se clasifican como alelo salvaje o ancestral (en inglés, *wild type*) y alelo mutante. Se cree que los alelos mutantes surgen en algún momento de la evolución de la especie por mutación a partir del alelo ancestral que fueron transmitidas de una generación a otra y que se estabilizaron en el genoma humano por conferir algún tipo de ventaja adaptativa al medio, generándose de este modo el polimorfismo. El alelo mutante, desde un punto de vista filogenético, es de aparición más reciente y por ello suele ser menos frecuente, aunque no siempre ocurre de este modo.

Durante mucho tiempo se ha sugerido que la relevancia funcional del polimorfismo depende de su localización en el genoma. Es por ello que los primeros estudios de asociación se centraron sobre SNPs ubicados en regiones codificantes, que permitían predecir algún efecto funcional sobre la expresión del gen y/o la proteína (Erichsen & Chanock, 2004). Se calcula que hay entre 50.000 - 250.000 SNPs distribuidos en todo el genoma y se estima que del 90% de los SNPs asociados con diversas patologías se ubican en regiones intergénicas o intrones (Edwards et al., 2013; Erichsen & Chanock, 2004). Estas variantes pueden tener implicancias biológicas mediante la regulación de promotores, *enhancers*, o represores influyendo en la expresión del gen (Rojano et

al.,2016). Además, pueden perturbar la organización cromatínica mediante la regulación de histonas y/o afectar la expresión de distintos ARNs no-codificantes (Edwards et al., 2013). Por otra parte, los SNPs sinónimos en regiones codificantes los cuales no generan un cambio de aminoácido en la proteína, han sido considerados irrelevantes durante mucho tiempo. Sin embargo, se ha demostrado que estos SNPs sinónimos pueden afectar la estabilidad del ARN mensajero, modular cambios durante la traducción y modificar el *splicing* (Sauna et al., 2007).

Al conjunto de SNPs ubicados en un mismo cromosoma y que tienen tendencia a ser heredados en forma conjunta se los denomina haplotipo (Erichsen & Chanock, 2004). Si no existiera ningún evento de recombinación durante la meiosis, todos los alelos de los polimorfismos de un mismo cromosoma se heredarían conjuntamente (Brookes, 1999). Sin embargo, hay muchos fragmentos del genoma que se van a transmitir a la descendencia conjuntamente formando bloques haplotípicos. Se estima que entre el 65-85% del genoma humano puede estar contenido en los bloques de haplotipos. El Desequilibrio de Ligamiento (LD, *linkage disequilibrium*) es un parámetro que cuantifica el grado de segregación independiente entre dos SNPs. Se dice dos alelos están en LD completo cuando uno de ellos puede predecir la presencia del otro (Brookes, 1999). Si bien, el LD no es estable a lo largo del tiempo ya que suele ir decreciendo como consecuencia de la recombinación en loci muy cercanos el LD es completo ya que la probabilidad de recombinación es baja.

De este modo, los SNPs en regiones codificantes, intergénicas e intrónicas heredados de forma independiente o formando bloques haplotípicos, es una de las mayores causas de la variabilidad interindividual teniendo un gran impacto biológico ya que pueden modular la susceptibilidad a distintas enfermedades y/o influir en la respuesta al tratamiento.

4.1.2 Variación en número de copias

Además de la presencia de SNPs, se ha establecido que la variación genética en el genoma humano se produce también por cambios submicroscópicos en la secuencia del ADN los cuales varían en tamaño desde kilobases (kb) hasta megabases (Mb)(Redon et al., 2006). Estos cambios se producen por deleciones, inserciones y duplicaciones que colectivamente se conocen como variaciones en el número de copias (CNV, *copy number variation*). En forma general, estas se definen como un segmento de ADN igual o mayor a 1 kb, con número de copias variable en comparación con el genoma de referencia (Redon et al., 2006). La formación de CNV se asocia a mecanismos de recombinación homóloga y no homóloga así como también a la retrotransposición(Zhang et al., 2009).Los primeros estudios habían identificado cerca de 1.500 regiones variables las cuales representan el 12% del genoma (Redon et al., 2006). Sin embargo, con el advenimiento de tecnologías de mayor poder resolutivo se han detectado 38.000 regiones variables de más de 100 pb en todo el genoma (Zhang et al., 2009). Las CNVs pueden alterar la función de los genes por diversos mecanismos moleculares incluyendo, cambios en la dosis génica, en la estructura del gen o modificaciones en la regulación de los genes (Zhang et al., 2009). Por otro lado, grandes deleciones pueden causar la pérdida completa de la función del gen teniendo gran implicancia sobre el fenotipo(Liu & Bickhart, 2012). Las diferencias en el número de copias de genes son una fuente significativa de variación genética entre los individuos(Liu & Bickhart, 2012; Sebat et al., 2004) teniendo implicancias en la predisposición a enfermedades así como también en la modulación de la eficacia de los tratamientos farmacológicos.

4.2 Genes citocromo P450

La familia de enzimas citocromo P450 (CYP) son un sistema de hemoproteínas, que catalizan las reacciones de metabolización de **Fase I** mediante la oxidación de una serie de sustancias endógenas y exógenas, incluyendo más del 90% de los medicamentos (Nebert & Russell, 2002). Las CYP se expresan abundantemente en el hígado, aunque también se expresan en tejidos extrahepáticos como mucosa del intestino, pulmón,

riñón, cerebro, placenta, mucosa olfatoria y piel (Lin & Lu, 2001; Paine et al., 2006). En humanos se identificaron 57 isoenzimas divididas en 18 familias y 43 subfamilias en base a la homología de la secuencia (Ingelman-Sundberg, 2005). La nomenclatura de estas enzimas es compleja comenzando los nombres de cada familia con el prefijo CYP seguido de un número (CYP1, CYP2, CYP3, etc). Las enzimas que forman una familia y que presentan aun mayor homología de secuencia se las agrupa dentro de una subfamilia (A, B, C, D, etc) y los genes dentro de la misma subfamilia se los denomina con números (1, 2, 3, 4, etc).

El metabolismo hepático de los fármacos es un proceso fundamental que determina la biodisponibilidad de los mismos en el organismo. Específicamente, los ITKs son principalmente metabolizados en el hígado por la enzima CYP3A4 (van Erp & Gelderblom, 2009). Sin embargo, también se ha evidenciado que el metabolismo intratumoral de las drogas puede influir en la eficacia y la resistencia al tratamiento, mediante la reducción significativa del fármaco dentro del tumor (Rochat, 2009). La relevancia de las enzimas CYP en el metabolismo intratumoral es, en gran medida, desconocida (Narjoz et al., 2014), aunque diversos estudios han demostrado que las enzimas CYP1B1 y CYP1A1 se encuentran sobreexpresadas en distintas líneas celulares y en diversos tumores (Leung et al., 2005; Murray et al., 1997; Oyama et al., 2008). De hecho, los estudios metabólicos realizados con dasatinib y erlotinib han revelado que las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 transforman rápidamente estos 2 fármacos (Rochat, 2009). Posteriormente, estos resultados fueron confirmados por Narjoz et al., (2014) quienes encontraron que las enzimas extrahepáticas CYP1A1 y CYP1B1 son capaces de transformar rápidamente al imatinib, dasatinib y nilotinib en las células tumorales, influyendo en la respuesta al tratamiento.

La alta variabilidad interindividual en la actividad de las enzimas CYP se ha atribuido en gran medida a que la mayoría se encuentran codificadas por genes polimórficos. El gen *CYP1A1* se ubica en el cromosoma 15 y presenta variantes alélicas ubicadas a lo largo del gen (Nebert & Dalton, 2006). El SNP *CYP1A1*rs2606345 (C>A) ubicado en uno de los intrones ha sido previamente asociado con mayor riesgo a cáncer de pulmón (Rotunno et al., 2009), cerebro (Salnikova et al., 2013), vesícula (Park et al., 2009) y testículo

(Figueroa et al., 2008). Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado estudios entre el polimorfismo *CYP1A1* rs2606345 y la respuesta al tratamiento en LMC.

El gen *CYP1B1* encuentra en la región cromosómica 2p21-22 y se caracteriza por la presencia de al menos 178 SNPs (ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP) muchos de los cuales producen cambios en la secuencia aminoacídica. Los polimorfismos rs377461582 y rs72549389 ubicados en uno de los intrones del gen, presentan muy baja frecuencia de los alelos menores en las distintas poblaciones (ncbi.nlm.nih.gov/dbSNP). Sin embargo el SNP intrónico *CYP1B1* rs2617266 tiene dos variantes alélicas Citosina o Timina (C>T) sin modificar la secuencia aminoacídica. Este SNP se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,98$) con otro polimorfismo no sinónimo, el SNP *CYP1B1* rs10012, ubicado en la zona codificante del gen (Beuten et al., 2008) que genera un cambio aminoacídico de Arginina por Serina en el codón 48. Los estudios funcionales sugieren que este SNP no sinónimo, puede alterar la actividad enzimática y la especificidad catalítica de la enzima *CYP1B1* (Hanna, 2000; Li, 2000; Shimada, 1999). Diversos estudios para el SNP *CYP1B1* rs10012 ha establecido su asociación con mayor riesgo de cáncer de ovario, endometrio, riñón, próstata, hígado, pulmón y vejiga (Liu et al., 2015; Roos & Bolt, 2005; Sankhwar et al., 2016). Sin embargo, dos metaanálisis sobre este SNP *CYP1B1* rs10012 no encontraron diferencias significativas en el riesgo a cáncer colorectal (He et al., 2014) y glaucoma (Wang et al., 2015). A pesar de las investigaciones efectuadas en diversas patologías, hasta el momento, no se han realizado estudios en pacientes con LMC.

4.3 Genes Transportadores

Se han descrito un elevado número de genes y variantes implicadas en el transporte de drogas cuya distribución no es homogénea en los diferentes tejidos, lo que añade más particularidad y complejidad al transporte de fármacos. Actualmente, los genes transportadores de membrana más conocidos son familia ABC (*ATP Binding Cassette*) y SLC (*Solute Carriers*).

4.3.1 Familia de proteínas ABC (*ATP Binding Cassette*)

Las proteínas ABC son proteínas integrales de membrana capaces de translocar una gran variedad de sustancias a través de las membranas celulares utilizando la energía de la hidrólisis del ATP (**Figura 12**). Se han caracterizado más de 48 genes ABC en humanos, que pueden clasificarse en siete subfamilias (A-G) basándose en sus características filogenéticas y su secuencia aminoacídica (Dean & Annilo, 2005). Estas proteínas participan en numerosos procesos fisiológicos además de realizar el transporte de sustancias endógenas y exógenas como azúcares, aminoácidos, metales, iones, péptidos y proteínas, así como un gran número de compuestos y metabolitos hidrofóbicos. La expresión de los transportadores ABC está desregulada en diversos tumores como pulmón, mama, páncreas, entre otros. La sobreexpresión de los genes ABC se ha correlacionado con menor supervivencia de los pacientes con cáncer (Chen et al., 2016). En varios casos, se ha demostrado que el tratamiento con fármacos quimioterapéuticos aumenta la expresión de los transportadores ABC *in vitro* (Saxena et al., 2011). Consistentemente con esto, se ha demostrado que los pacientes bajo quimioterapia suelen tener niveles elevados de transportadores ABC. Por el contrario, su inhibición, lleva a la quimio-sensibilización, sugiriendo que los inhibidores de los transportadores ABC podrían mejorar los resultados del tratamiento (Chen et al., 2016). El gen *ABCB1* y en menor medida *ABCC3*, han sido asociados con la resistencia a fármacos en diversas patologías. Por lo tanto su estudio es de gran interés a fin de optimizar la respuesta al tratamiento.

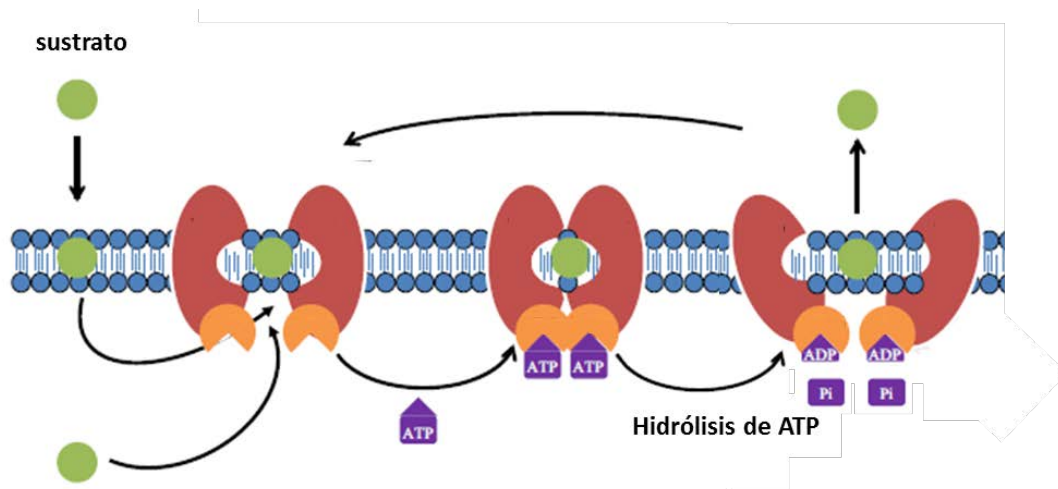


Figura 12. Mecanismo de acción de los transportadores ABC. Un compuesto que ingresa a la célula, se une al dominio transmembrana de unión al sustrato de los transportadores ABC. Gracias a la hidrólisis de

dos moléculas de ATP unidas al dominio de unión a ATP, se produce un cambio conformacional de la proteína, induciendo la salida del sustrato. El transportador ABC vuelve a su conformación original quedando disponible para otro sustrato. (Chen et al., 2016).

4.3.1.1 Gen ABCB1 (MDR1)

El gen *ABCB1* es también conocido como *MDR1* (*Multidrug resistance*) por su asociación con la multi-resistencia a drogas. El gen se ubica en el cromosoma 7, en la región *7q21.12* y codifica a la glicoproteína denominada Pgp que interviene en el flujo de salida activa del imatinib hacia el exterior de las células Ph+. Es por ello, que su sobreexpresión se ha asociado con falta de respuesta a imatinib (Illmer et al., 2004; Kosztyu et al., 2014), con menores concentraciones del mismo (Bouchet et al., 2013) y con una inhibición disminuida de *BCR-ABL1* (Eadie et al., 2013). Los resultados respecto a los inhibidores de segunda generación como dasatinib y nilotinib, han mostrado diferente afinidad por Pgp. Diversos estudios preclínicos sugieren fuertemente que dasatinib también es sustrato de *ABCB1* (Hegedus et al., 2009; Hiwase et al., 2008; Lagas et al., 2009) y que la inhibición farmacológica de Pgp aumenta la exposición al dasatinib (Haouala et al., 2011). Por el contrario, en un solo estudio se encontró que el uso de inhibidores de *ABCB1* parecería no influir en las concentraciones intracelulares de dasatinib en células progenitoras CD34+ (Hiwase et al., 2013). Respecto a nilotinib, también se han reportado resultados contradictorios. Se ha demostrado que el mismo no es sustrato de Pgp (Bouchet et al., 2013; Hegedus et al., 2009) y que también esta droga puede inhibir la actividad de Pgp (Tiwari et al., 2013; Tiwari et al., 2009; Wang et al., 2014). Sin embargo, otro estudio sugiere que nilotinib es sustrato de *ABCB1* y que un aumento en la expresión de este gen reduce la sensibilidad de las células K562 a este inhibidor (Kosztyu & Dolezel, 2013).

El gen *ABCB1* es altamente polimórfico, sin embargo tres SNPs rs1128503 (c.1236 C>T) rs2032582 (c.2677G>T/A) y rs1045642 (c.3435C>T) han sido ampliamente estudiados. Los SNPs *ABCB1* c.1236 C>T y c.3435C>T ubicados en el exón 12 y 26 respectivamente son sinónimos sin producir cambios en la secuencia aminoacídica. Sin embargo, el SNP c.2677G>T/A localizado en el exón 21, la Alanina en la posición 893 puede ser sustituida por Serina o Treonina, respectivamente. Si bien la función exacta de estos

SNPs es aún desconocida, se ha propuesto que los mismos pueden influir en la función de la proteína afectando en el tiempo de plegado y por lo tanto en su conformación (Kimchi-Sarfaty, 2007). Además, se ha sugerido que el SNP rs1045642 puede generar una disminución en los niveles de expresión del gen (Wang et al., 2005). Se ha demostrado que estos tres SNP, así como varios haplotipos, alteran la farmacocinética y la respuesta a varios fármacos en el tratamiento de diferentes patologías (Wolking et al., 2015). De esta forma, los primeros estudios han encontrado que la variación funcional en el gen *ABCB1* podría explicar, al menos en parte, respuestas variables al imatinib (Gurney et al., 2007). La relación entre estos SNPs y la eficacia al tratamiento con imatinib ha sido evaluada en diversos trabajos, sin embargo los resultados no son concluyentes. Estudios *in vitro* en la línea celular K562 demostraron que la expresión de variantes de *ABCB1* no se asoció con mayor resistencia al imatinib (Skoglund et al., 2013). Sin embargo, los primeros reportes en una cohorte de pacientes indicaron una asociación significativa entre los SNPs rs1128503 o rs2032582 con mejor RMM a los 12 meses (Dulucq et al., 2008), mientras que en otro trabajo encontraron que los pacientes con genotipo CC del SNP rs1128503 (c.1236 C>T) presentaron mejores RMM y RCM (Deenik et al., 2010). Por otro lado, el SNP rs1045642 se asoció con falla al tratamiento con imatinib a diferencia del SNP rs2032582 el cual parecía prevenir al fallo al tratamiento (Maffioli et al., 2011). A su vez, el haplotipo TTT (rs1128503 -rs2032582 -rs1045642) se asoció con menor probabilidad de obtener respuesta óptima con imatinib (Ali & Elsalakawy, 2014) y el haplotipo CGC se asoció con mayor riesgo de falla al imatinib (Au et al., 2014). Recientemente dos metaanálisis realizados en LMC con el objetivo de unificar los distintos resultados, arrojaron resultados contradictorios. Los SNPs rs1128503 y rs2032582 pueden servir como marcadores predictivos para la uso terapéutico de imatinib en pacientes con LMC (Zheng et al., 2014). Sin embargo, no se encontró una asociación significativa para los SNPs rs2032582 ors1045642 (Zu et al., 2014).

Teniendo en cuenta que el uso de los inhibidores como dasatinib y nilotinib para el tratamiento de la LMC es más reciente, la asociación entre los polimorfismos en *ABCB1* y estas dos drogas, ha sido menos estudiado. Si bien se demostró que la excreción de nilotinib fue influenciada por el SNP c.2677G> T/A (Galimberti et al., 2014), se

observaron resultados contradictorios para los haplotipos de *ABCB1* los cuales parecían no influir en la eficacia de los ITKs (Skoglund et al., 2013). A su vez, las variantes de *ABCB1* se asociaron significativamente con mayores niveles proteicos en pacientes tratados con nilotinib (Agrawal et al., 2014). Sin embargo, en otro estudio se observó menor impacto de los polimorfismos en *ABCB1* en la actividad de la proteína en presencia de los inhibidores nilotinib y dasatinib (Dessilly et al., 2016).

4.3.1.2 Gen *ABCC3*

La familia de enzimas ABCC está formada por 12 miembros ubicados en distintos cromosomas con baja identidad de secuencia. Uno de los transportadores de esta familia es el gen *ABCC3* que se ubica en el cromosoma 17 en la región q21.33. Este gen suele estar expresado en tejidos involucrados en la absorción, distribución y eliminación de fármacos como hígado, intestino y riñón (Bruhn & Cascorbi, 2014). La sobreexpresión *ABCC3* ha sido asociada con la resistencia en neoplasias hematológicas (Bartholomae et al., 2016) y cáncer de mama (Balaji et al., 2016), entre otros. Sin embargo, los resultados en LMC son escasos y contradictorios. Se ha demostrado una alta expresión del gen en pacientes con LMC en CB (Radich et al., 2006), aunque, se observaron pequeñas variaciones en los niveles de expresión de *ABCC3* en células tratadas con imatinib y dasatinib (Gromicho et al., 2011). Por el contrario, los pacientes con LMC sin respuesta al imatinib presentaron altos niveles de expresión del gen *ABCC3* en comparación con los pacientes con respuesta óptima y subóptima sugiriendo que el mismo es un transportador de eflujo de imatinib (Giannoudis et al., 2014). El gen *ABCC3* es altamente polimórfico observándose más de 100 SNPs sinónimos y no sinónimos (Fukushima-Uesaka et al., 2007; Saito et al., 2002). Recientemente un estudio demostró que la sustitución de Guanina por Timina (G>T) del SNP intrónico *ABCC3* rs4148405 se asoció con menor supervivencia libre de evento (SLE) en pacientes con leucemia (Yee et al., 2013), si bien, hasta la fecha no se han realizado otros estudios sobre este SNP.

4.3.2 Gen *SLC22A1* (hOCT1)

La superfamilia transportadores SLC está formada por más de 300 proteínas funcionalmente agrupadas en 47 familias que son capaces de transportar múltiples sustratos de diferente tamaño y estructura. Dentro de esta superfamilia SLC, se encuentra la familia SLC22 formada por más de 30 proteínas alguna de cuales median el transporte de sustratos endógenos y exógenos que se encuentran como cationes a pH fisiológico (Arimany-Nardi et al., 2015). Uno de los genes que forma parte de esta familia es el gen *SLC22A1* más conocido como *hOCT1* (*Organic Cation Transporter 1*) ubicado en el cromosoma 6, en la región 6q25.3. Este gen codifica una proteína de membrana con 12 dominios transmembrana que es regulada por fosforilación por distintas proteínas (**Figura 13**).

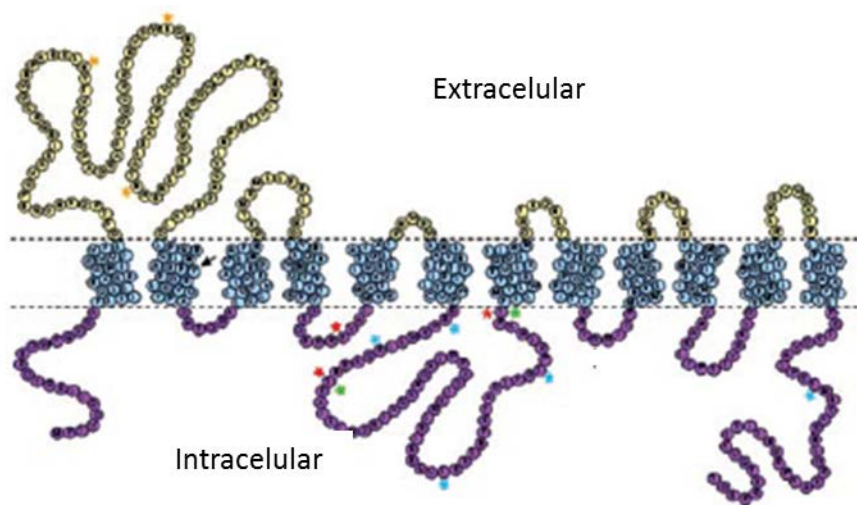


Figura 13. Estructura de hOCT1. La proteína tiene 12 dominios transmembrana (puntos azules), un gran bucle intracelular (púrpura), y un gran lazo extracelular (amarillo). Este transportador puede ser regulado por fosforilación en diversos sitios por la proteína quinasa A (sitios rojos), C (azul) y G (verde). En naranja se indican los sitios de N-glicosilación. (Engler et al., 2011)

El gen *hOCT1* se expresa principalmente en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y participa en la captación celular de una gran variedad de drogas antidiabéticas, anticancerígenas, antivirales y vitaminas, entre otras (Arimany-Nardi, et al., 2015). A diferencia de los transportadores ABC, esta familia realiza el pasaje de las sustancias de manera pasiva, es decir sin gasto de energía, utilizando el potencial de membrana

como fuerza necesaria para el transporte (Arimany-Nardi et al., 2015). Su función puede ser inhibida por un gran número de compuestos los cuales son capaces de interactuar con la proteína sin ser translocados.

La expresión de *hOCT1* se ha visto desregulada en diversos tumores (Gupta et al., 2011; More et al., 2010) aunque en algunos casos los niveles de expresión pueden ser más bajos que en el tejido normal circundante como se ha observado en cáncer de hígado (Schaeffeler et al., 2011). En LMC, se ha demostrado que los pacientes con baja expresión y/o actividad de *hOCT1* tienen menor probabilidad de lograr una remisión citogenética y/o molecular (Thomas et al., 2004).

El gen *hOCT1* tiene varios polimorfismos los cuales parecen modificar la actividad de transporte (Kerb et al., 2002). Dos de los SNPs exónicos más comunes, cuya ubicación es muy cercana dentro del exón 7, son la sustitución de Adenina por Guanina (A>G) (rs628031, c.1222 A>G) y la delección de la Guanina en la posición 1260 (rs35191146, c.1260 G>del). Ambos son SNPs no sinónimos generando cambios en la secuencia aminoacídica de Valina por Metionina en la posición 408 (V408M) para el SNP rs628031 y la delección de Metionina en la posición 420 (M420del) para el polimorfismo rs35191146. Se ha reportado que *hOCT1* juega un papel fundamental en la captación celular del imatinib (Bouchet et al., 2013; Thomas et al., 2004) y que estos SNPs parecen modular la respuesta al tratamiento con este inhibidor. El polimorfismo *hOCT1* rs35191146 (c.1260G>del) se asoció con mayor riesgo de fracaso al tratamiento con imatinib, siendo ese riesgo compensado en presencia del otro SNP rs628031 (c.1222 A>G) (Giannoudis et al., 2013). Estos hallazgos todavía siguen siendo un tema de debate, ya que otros autores encontraron resultados contradictorios sugiriendo que el SNP rs35191146 (c.1260G>del) es el responsable de la pérdida de la especificidad de la proteína por el imatinib y que el SNP rs628031 (c.1222A>G) afecta ligeramente en su actividad (Tzvetkov et al., 2014). A su vez, se ha reportado que el SNP rs628031 (c.1222A>G) se asoció con tiempos más largos para lograr una respuesta óptima (Grinfeld et al., 2013). Para el caso de los inhibidores de segunda generación, los datos preclínicos y clínicos publicados en la literatura son escasos. Se ha demostrado que dasatinib también es sustrato de *hOCT1*, aunque es posible que la captación celular de

este inhibidor ocurra incluso a niveles de expresión de *hOCT1* muy bajos ya que su ingreso dentro de las células Ph⁺ parece ser más por difusión que por transporte activo (Giannoudis et al., 2008; Hiwase et al., 2008; Josephs et al., 2013). Sin embargo, *hOCT1* se encontró sobreexpresado en células resistentes a dasatinib (Gromicho et al., 2011). Si bien se ha sugerido que el ingreso de nilotinib a las células CD34⁺ parecería ser independiente del gen *hOCT1* (Davies et al., 2009), otro estudio observó que el ingreso de nilotinib a las células aumenta en presencia del gen *hOCT1* (Yamakawa et al., 2014). Además, uno de los SNPs presentes en el gen *hOCT1* se asoció con menor SLE en pacientes tratados sugiriendo un posible rol de este transportador en la farmacocinética de nilotinib (Galimberti et al., 2014). La relación definitiva entre el gen *hOCT1* y los ITKs continúa siendo un tema clave a investigar.

4.4 Gen *NQO2*

Las quinonas óxido-reductasas son una familia de proteínas flavinas citosólicas perteneciente a las enzimas de **Fase II** las cuales catalizan la reducción de quinonas y sus derivados a hidroquinonas (Yu et al., 2009). Estas enzimas se encargan de proteger a las células frente a sustancias tóxicas, al evitar la generación de intermediarios que podrían reaccionar con el oxígeno dando lugar a radicales superóxido. En humanos, se conocen dos isoformas de quinonas oxido-reductasas las cuales difieren en el cofactor que utilizan para llevar a cabo las reacciones. Ambas isoformas comparten cierta superposición de sustrato, aunque se han observado diferencias significativas en las afinidades relativas para diversos compuestos (Long & Jaiswal, 2000). La quinona oxido-reductasa 2 (*NQO2*) que utiliza el ribósido dihidronicotinamida (NRH) como cofactor, participa en la reducción metabólica y en detoxificación de xenobióticos (Celli et al., 2006; Gong & Gutala, 2008). Si bien su papel fisiológico preciso sigue siendo incierto (Vella et al., 2005), se han observado altos niveles de *NQO2* en tejidos de pacientes con cáncer de mama (Yu et al., 2009). Además, se ha demostrado que *NQO2* es capaz de estabilizar el gen *TP53* previniendo su degradación del proteasoma (Gong et al., 2007). Específicamente en LMC, el gen *NQO2* se ha visto sobreexpresado en células mieloides y su inhibición por medio de

ARNs de interferencia produjo menores tasas de proliferación en las células K562 (Buryanovsky et al., 2004). Además, se ha demostrado que la proteína NQO2 se encuentra fosforilada en células K562, sugiriendo un potencial mecanismo de regulación de la actividad de la enzima por fosforilación (Bantscheff et al., 2007). A su vez, se observó que el imatinib es capaz de competir eficientemente por unión a la enzima NQO2 aunque para dasatinibla competencia no sería tan eficiente (Bantscheff et al., 2007). La enzima NQO2 no es capaz de metabolizar a ninguno de los ITKs por el contrario, las concentraciones terapéuticas de imatinib y nilotinib son capaces de inhibir a la enzima NQO2 (Rix et al., 2007). Todos estos antecedentes sugieren que NQO2 podría estar involucrado en la susceptibilidad a cáncer y además puede contribuir a los efectos globales farmacológicos de los ITKs.

El gen humano *NQO2* se localiza en el cromosoma 6 en la región 6p25.2 y presenta numerosos SNPs. Algunos de ellos como por ejemplo los SNPs rs142940490, rs144959746, rs140937788, rs55771117, rs191539011 presentan una muy baja frecuencia del alelo menor en las distintas poblaciones (<http://browser.1000genomes.org/>). El SNP *NQO2*rs1143684 ubicado en el codón 47 presenta dos variantes alélicas Citosina o Timina (C>T) generando dos isoformas distintas de la enzima NQO2 con Leucina y Fenilalanina, respectivamente. Si bien esta posición no es parte del sitio activo de la enzima, se ha demostrado que puede tener implicancias en la funcionalidad de la enzima (Foster et al., 1999). Se ha demostrado que la variante Leucina tiene menor actividad en comparación con Fenilalanina (Jamieson et al., 2007). Otros ensayos bioquímicos recientes reportaron que en presencia de Leucina la proteína tiene una especificidad ligeramente menor por el sustrato, es menos estable frente a la digestión proteolítica y la desnaturalización térmica (Megarity et al., 2014). Este SNP se ha involucrado en el pronóstico y tratamiento de pacientes con cáncer de mama (Hubackova et al., 2012; Jamieson et al., 2011), en enfermedades neurodegenerativas (Payton et al., 2010), pero no en cáncer de páncreas (Hubackova et al., 2011). Por último, los SNPs *NQO2* rs2071003 (C>T) y rs2071004 (G>A), ubicados en una zona intrónica, tienen función desconocida y no han sido estudiados hasta el momento. Sin embargo, el SNP *NQO2* rs2071002 (A>C) ubicado en la zona promotora del gen, tiene dos variantes alélicas Adenina o

Citocina. Un solo estudio de asociación se ha realizado para este SNP, el cual determinó que el mismo es un factor de riesgo a cáncer de mama debido a que la presencia de Citocina, aumenta la actividad del promotor (Yu et al., 2009). Hasta el momento no se han realizado estudios de estos polimorfismos en LMC y/o en enfermedades hematológicas.

4.5 Glutation-S-Transferasas

Las Glutation-S-Transferasas (GSTs) constituyen la principal superfamilia de enzimas de detoxificación de fase II involucradas en la protección celular contra xenobióticos, carcinógenos, toxinas y subproductos del estrés oxidativo (Hayes et al., 2005). Las GSTs funcionan como dímeros catalizando la conjugación del glutatión (GSH) a una amplia gama de compuestos permitiendo su transformación en un metabolito que puede ser excretado más fácilmente por la célula (Hollman et al., 2016). Estas enzimas constituyen la primera línea de defensa del organismo al evitar el ingreso de agentes que potencialmente pueden dañar el ADN. Además, como proteínas no enzimáticas, las GSTs pueden modular rutas de señalización que controlan la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis, entre otros procesos (Dusinska et al., 2012; Hollman et al., 2016; Laborde, 2010). Se ha demostrado que las enzimas GSTM1 y GSTP1 son capaces de unirse y formar complejos proteicos con algunas proteínas quinasas cumpliendo un rol importante en la regulación de vías de señalización claves las cuales pueden conducir a apoptosis o proliferación (Tew & Townsend, 2012).

Las GSTs citosólicas se dividen en ocho familias distintas Alfa (A), Mu (M), Theta (T), Pi (P), Zeta (Z), Sigma (S), Kappa (K) y Omega (O) las cuales conservan aproximadamente el 30% de identidad de secuencia (Hollman et al., 2016; Townsend & Tew, 2003). En muchos de estos genes se han descrito distintos tipos de polimorfismos, sin embargo, la mayor atención se ha focalizado en los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*. Los genes *GSTM1* y *GSTT1* presentan polimorfismos de variación en el número de copias causados por la amplificación y/o delección de los mismos. El gen *GSTP1* es altamente polimórfico (Harries et al., 1997; Moyer et al., 2008), sin embargo uno de los SNPs más estudiados es el polimorfismo rs1695 ubicado en el exón 5 del gen. El cambio

de una Adenina por una Guanina (c.313A>G) produce un cambio aminoacídico del isoleucina por una Valina (p.Ile105Val) en el sitio activo de unión del sustrato. Los estudios funcionales han detectado que la presencia de este SNP resulta en una disminución significativa de la actividad de esta enzima que afecta a la actividad catalítica y la estabilidad térmica de la enzima (Moyer et al., 2008).

Teniendo en cuenta que las GSTs cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica varios estudios epidemiológicos han evaluado el papel de los polimorfismos *GSTM1* y *GSTT1* en la susceptibilidad al desarrollo de cáncer. Particularmente, para la LMC, el genotipo *GSTM1*-nulo se asoció con un mayor riesgo de la enfermedad así como también la combinación de la doble delección de *GSTM1* y *GSTT1* (Özten et al., 2011). Estos resultados fueron confirmados posteriormente en un reciente metaanálisis (He et al., 2014). Sin embargo otros estudios han arrojado resultados contradictorios (Banescu et al., 2014; Bhat et al., 2012; Kassogue et al., 2015; Taspinar et al., 2008). Respecto a *GSTP1*, se ha informado la sobreexpresión de la proteína en diferentes tipos de tumores y neoplasias hematológicas, por lo cual se considera como un marcador tumoral (Masood & Malik, 2011; Shi et al., 2008; Stella et al., 2013). Asimismo, la sobreexpresión de *GSTP1* ha sido correlacionada con el desarrollo de resistencia a múltiples drogas (Laborde, 2010). Sin embargo, en LMC solo se han publicado dos estudios hasta la fecha que sugieren que el genotipo *GSTP1*-GG del SNP rs1695 es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Banescu et al., 2014; Sailaja et al., 2010).

La asociación de estos polimorfismos con la respuesta al tratamiento y la toxicidad ha sido frecuentemente estudiada en distintos tipos de cánceres ya que la actividad de las GSTs puede conferir resistencia a ciertos agentes quimioterapéuticos. Un aumento en la toxicidad de la quimioterapia y una disminución de la supervivencia se observó para *GSTT1*-nulo en pacientes pediátricos con LMA (Davies et al., 2001) mientras que lo contrario fue confirmado en niños con LLA (Stanulla et al., 2000). Recientemente se ha reportado que los polimorfismos en los genes GSTs aumentan el riesgo de recaída en pacientes pediátricos con LLA (Leonardi et al., 2016). Sin embargo, en LMC, el efecto de los genes GSTs y su asociación con la respuesta al tratamiento fue menos estudiado.

Se observó un mayor número de copias de *GSTT1* con mayor frecuencia en pacientes que requieren un aumento de la dosis de imatinib debido a la falta inicial de respuesta (Koh et al., 2010). Además, la delección de *GSTM1* sola o en combinación con la delección de *GSTT1*, aumentó significativamente la probabilidad de fallo de imatinib, sin embargo esto mismo no se observó para el SNP en *GSTP1* (Davies et al., 2014).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la presencia de polimorfismos en los genes GSTs puede contribuir a que las células sean más sensibles a la exposición de xenobióticos contribuyendo a la inestabilidad del genoma, por lo cual podrían aumentar el riesgo a desarrollar LMC. Por otro lado, las GSTs parecen modular la respuesta al tratamiento con ITKs aunque no se conocen completamente el mecanismo de acción.

4.6 Gen TP53

El gen *TP53* conocido como el "guardián del genoma", cumple un rol fundamental en el control la proliferación celular, la división, la supervivencia y en la muerte celular programada (Meek, 2015). En condiciones normales la proteína p53 tiene una vida media corta ya que es críticamente regulada por MDM2 que promueve su ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Hu et al., 2012). El mantenimiento de los niveles basales de p53 permite regular distintos eventos biológicos fundamentales para la homeostasis celular. Sin embargo, en respuesta a una gran variedad de estímulos el gen *TP53* es inducido llevando al arresto del ciclo celular, senescencia o apoptosis (Meek, 2015). Uno de los mecanismos por el cual *TP53* es inducido, es en respuesta al daño del ADN, p53 junto con diversas proteínas, tiene la capacidad de coordinar y regular una serie de eventos que permiten la correcta reparación del daño, siendo un proceso fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genética (Jeggo et al., 2016). Mientras que las células normales reparan el daño del ADN o entran en senescencia y/o apoptosis, las células cancerosas genómicamente inestables continúan proliferando, posiblemente porque han adquirido mutaciones que causan la inactivación funcional de p53 (Bouwman &

Jonkers, 2012). *TP53* es uno de los genes más frecuentemente mutado en distintos tipos de cánceres humanos (Meek, 2015; Muller & Vousden, 2014). Alrededor del 20-30% de los pacientes con LMC en CB presentan mutaciones, deleciones o reordenamientos en *TP53*, sin embargo, las alteraciones en dicho gen no son frecuentes en FC (Perrotti et al., 2010; Quintás-Cardama & Cortes, 2009). La pérdida de función de *p53 wild type* aumenta la quimioresistencia debido, principalmente, a la incapacidad de gatillar la apoptosis siendo un mecanismo importante por el cual muchos agentes anticancerígenos que dañan el ADN ejercen sus efectos biológicos (Sullivan et al., 2004). En aquellos cánceres que no tienen mutación en *TP53*, pueden existir otras alteraciones en diferentes vías que influyen sobre la función de *p53* (Meek, 2015).

Se han identificado numerosos SNPs en el gen *TP53*, entre los cuales, el polimorfismo funcional *rs1042522* se localiza en el exón 4 de una región rica en prolina la cual parece cumplir un rol importante para su actividad. Este SNP genera dos variantes, Guanina o Citosina (c.213G> C) que codifican para los aminoácidos Arginina (Arg) o Prolina (Pro) (p.72Arg>Pro), respectivamente (Thomas et al., 1999), las cuales presentan distinta capacidad funcional (Dumont et al., 2003). Se ha demostrado que este SNP *TP53rs1042522* puede afectar la predisposición a cáncer y en la respuesta a la exposición de agentes quimioterapéuticos *in vitro* (Sullivan et al., 2004). La influencia de este polimorfismo en la susceptibilidad a cáncer y en la eficacia del tratamiento farmacológico ha sido investigada en numerosos trabajos, sin embargo, los estudios en LMC son escasos y contradictorios. El alelo *Pro* se asoció con mayor susceptibilidad de LMC y a su vez fue más frecuente en pacientes sin respuesta citogenética con imatinib (Bergamaschi, 2004). Por el contrario, no se han observado diferencias en el riesgo a la LMC y en la sobrevida de pacientes tratados con imatinib (Liu et al., 2014). Se ha sugerido que las diferencias en la susceptibilidad a LMC y en la respuesta terapéutica pueden deberse a la capacidad reducida en inducir apoptosis de las células leucémicas que expresan la proteína *Pro* (Dumont et al., 2003; Pim & Banks, 2004; Thomas et al., 1999). Sin embargo, esta hipótesis no es concluyente, ya que se han encontrado resultados contradictorios demostrando que el alelo *Arg* en homocigosis es un factor de riesgo para la falta de respuesta al imatinib (Camelo-Santos et al., 2013). Por otro

lado, el alelo *Arg* se asoció con mayor riesgo de LMA(Dunna et al., 2012)y leucemia linfocítica crónica (LLC)(Kochethu et al., 2006), aunque un reciente metaanálisis no encontró diferencias significativas entre el SNP y el riesgo a leucemia (Ruan et al., 2015). Teniendo en cuenta esto, los resultados sugieren que el rol del SNP TP53 rs1042522en la susceptibilidad y en la respuesta al tratamiento en LMC sigue siendo controvertido.

Hipótesis de trabajo y objetivos

La etiología de la LMC está determinada por la presencia del cromosoma *Philadelphia* caracterizado por el gen de fusión *BCR-ABL1*. Sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares implicados en el origen de esta alteración que pueden contribuir con la susceptibilidad a desarrollar LMC. Por otro lado, la eficacia de los ITKs se ve afectada por la presencia de polimorfismos genéticos que determinan la biodisponibilidad de las drogas. Los genes involucrados en el transporte, metabolismo, así como también la interacción con *targets* moleculares no específicos, determinan factores que influyen en la eficacia de los ITKs y pueden afectar la respuesta al tratamiento. A su vez, los polimorfismos en genes que codifican proteínas que participan en la proliferación celular y en la apoptosis, también han demostrado influir en la respuesta al tratamiento.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, la **hipótesis principal** del presente trabajo es que los polimorfismos en genes claves representan factores de variabilidad interindividual que influyen tanto en la etiopatogenia de la LMC así como también en la farmacogenética de los ITKs, siendo responsables de la heterogeneidad en la respuesta al tratamiento. A fin de corroborar esta hipótesis, se plantean dos objetivos generales con sus respectivos objetivos específicos.

Objetivo I: Análisis de marcadores de susceptibilidad

1. Identificar las variantes polimórficas en genes metabolizantes (GSTs) y de respuesta al daño del ADN (*TP53*) en controles y pacientes.
2. Establecer el rol individual de estos polimorfismos como factores de riesgo a la LMC.
3. Determinar el efecto combinado de los polimorfismos GSTs en la susceptibilidad a la LMC.

Objetivo II: Estudio de marcadores farmacogenéticos

1. Evaluar la influencia individual de los polimorfismos en genes involucrados en la farmacocinética (*CYPs*, *ABCB1*, *ABCC3* y *hOCT1*) y en la farmacodinamia (*GSTs*, *NQO2* y *TP53*) de los ITKs, en pacientes con LMC a fin de identificar marcadores de pronóstico y/o resistencia a la terapia.
2. Evaluar la influencia conjunta de los polimorfismos analizando la presencia de haplotipos o genotipos de riesgo combinados que puedan influir en la respuesta al tratamiento.
3. Correlacionar los resultados obtenidos con las características clínico-patológicas de los pacientes tendiente a definir el valor pronóstico de los biomarcadores evaluados.

Materiales y Métodos

1. Poblaciones Estudiadas

En el presente trabajo de investigación se estudiaron muestras de ADN de pacientes con LMC y controles sanos. Todos los sujetos incluidos en este estudio eran ciudadanos argentinos, proveniente de la ciudad de Buenos Aires y el conurbano bonaerense. La mayoría de ellos tenían ascendencia predominante caucásica. Todos los individuos dieron su consentimiento informado antes de su inclusión en el estudio. Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina y cumple con la Declaración Internacional de Helsinki.

1.1 Controles

Se estudiaron individuos sanos, no relacionados, sin historial clínico previo de leucemia, cáncer y/o enfermedades crónicas del archivo de ADN genómico del Laboratorio de Genética Hematológica. La biblioteca de ADN de la población control consiste en 300 muestras de individuos formada por 29% de mujeres y 71% de hombres, con una edad media 41 años (rango: 18 a 69 años). Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de sangre periférica de 223 donadores de sangre provenientes del Servicio de Donadores de la Academia Nacional de Medicina. Además, se recolectaron 77 muestras de adultos mayores (rango: 70-84 años) obtenidas durante el análisis hematológico pre-quirúrgico de pacientes con cirugías programadas por fractura de huesos. Los criterios de exclusión de estos controles fueron la presencia de signos clínicos de infección en el momento de extraer la sangre, la presencia de cáncer, enfermedades genéticas o hematológicas, trastornos inmunológicos y los pacientes con transfusiones preoperatorias. A partir de esta biblioteca de ADN se evaluaron 141 individuos apareados por edad y sexo con los pacientes para el estudio de caso-control.

1.2 Pacientes con LMC

En total, se estudiaron 141 individuos diagnosticados con LMC (65 mujeres; 76 varones; edad media: $49,17 \pm 1,39$; rango: 17-85 años) provenientes de diferentes centros: 1. Servicio de Hematología, Hospital Ramos Mejía; 2. Departamento de Hemato-

oncología, 3. Academia Nacional de Medicina; 4. FUNDALEU. Las muestras fueron obtenidas por los médicos hematólogos con la conformidad y consentimiento informado.

Los pacientes se encontraban en FC, FA o CB y bajo tratamiento con diferentes ITKs (imatinib, nilotinib, dasatinib). El seguimiento de los pacientes durante el tratamiento fue llevado a cabo por los médicos hematólogos junto con los controles hematológicos y genéticos. Estos últimos incluyeron principalmente la medición de los transcritos de *BCR-ABL1* por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con el gen de referencia *ABL1* siguiendo los criterios de la reducción a escala internacional. En los pacientes que fallaron al tratamiento se realizó el estudio de mutaciones en el gen *ABL1* por secuenciación directa.

2. Extracción de ácidos nucleicos

2.1 Lisis celular

Las muestras de sangre periférica (SP) o médula ósea, anticoaguladas con EDTA (5%), fueron sometidas al protocolo de lisis de glóbulos rojos haciendo varios lavados con solución tampón de cloruro de amonio/bicarbonato de amonio (NH_4Cl 0,014M / NH_4HCO_3 0,001M), hasta obtener por centrifugación los leucocitos. La lisis se realizó durante 10 min a temperatura ambiente en un homogeneizador circular para 20 tubos (Bioelec®), luego las muestras fueron centrifugadas a 3500 RPM durante 15 min y se descartó el sobrenadante. Al *pellet* obtenido se le agregó 10 ml de la solución de lisis y se centrifugó en iguales condiciones. Este lavado se repitió 2-3 veces hasta obtener un *pellet* celular límpido sin glóbulos rojos. La extracción de ADN genómico se efectuó por medio de los protocolos de *salting out* o DNAzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2 Extracción de ADN genómico por método de Salting out

La digestión de los glóbulos blancos se realizó incubando el pellet con proteinasa K (20 mg/ml) y buffer de digestión (Tris ClH 10 mM; EDTA 5mM y SDS 0,5%) a 37°C toda la noche. Se agregó 0,4 volúmenes de solución saturada de NaCl 6M (por cada 100 µl de buffer pK, se agrega 40 µl de NaCl 6M). Se mezcló suavemente por inversión varias veces, se incubó en hielo por 15 minutos o 30 minutos a 4 °C y se centrifugó 15 min a 500 g a fin de recuperar el sobrenadante. El ADN se precipitó con 1,5 volúmenes de etanol absoluto frío que se agregó despacio por las paredes del tubo, sin mezclar. Se recogió el ovillo de ADN de alto peso molecular con un capilar sellado y se lavó con etanol 70% y 100%. En caso de no haberse formado el ovillo, se mezcló por inversión varias veces y se tomó el ADN de bajo peso molecular con otro capilar o por centrifugación. A continuación, se lavó el ADN con alcohol 70% y 100% y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15-30 min. Se resuspendió en buffer T₁₀E₁ (TrisClH 10mM, EDTA 1mM, pH 8) según la cantidad de ADN obtenido.

2.3 Extracción de ADN genómico por el método de DNAzol

Al precipitado de glóbulos blancos obtenido luego de la lisis celular, se le agregaron 500 µl de DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y se disgregó con pipeta o vortex. La dispersión obtenida se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 14.000 g y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo. El ADN, presente en el sobrenadante, se precipitó con 750 µl de etanol 100% y se separó por centrifugación a temperatura ambiente durante 15 min a 14.000 g. El pellet se lavó con 250 µl de etanol 70% y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 12.000 g. El ADN obtenido se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 200 µl de NaOH 8mM a 73 °C durante toda la noche.

2.4 Control cuali-cuantitativo de los ácidos nucleicos

En primer lugar, se determinó la calidad del ADN extraído mediante electroforesis de minigeles de agarosa (1%) teñidos con 0,25µg/ml de bromuro de Etidio. La velocidad

de migración de la molécula de ADN en la matriz de agarosa está determinada por varios parámetros, entre estos, el tamaño de la molécula de ADN. Se sembró 1 µl de la dilución de ADN por muestra con *buffer* de siembra 1X (0.4% naranja G, 0.03% azul de bromo fenol, 15% fenol, 10mM Tris ClH, 50mM EDTA) en geles de agarosa (1%). La electroforesis se efectuó durante 20 minutos a 80 Voltios. De esta forma, las moléculas de ADN de alto peso molecular, las cuales se encontraban más cerca del punto de siembra, se diferenciaron de aquellas moléculas de ADN degradado que migraron con mayor rapidez.

A continuación, se procedió a analizar la concentración y la pureza del ADN extraído por medio del espectrofotómetro GeneQuant Pro. La cantidad total de ADN purificado se calcula teniendo en cuenta que el coeficiente de absorbancia a 260 nm para el ADN doble cadena es 50 µg/ml por cada 1 unidad de densidad óptica (DO) ($DO_{260} = 50$ µg/ml de ADN). Por otro lado, a fin de valorar la pureza de la muestra, se tuvo en cuenta lo siguiente:

- La relación $DO_{260} / DO_{230} < 1$; indica que la muestra está contaminada con fenol.
- La relación $DO_{260} / DO_{280} < 1,9$; indica contaminación proteica.
- La relación $DO_{260} / DO_{280} \geq 1,9$; indica que la muestra no está contaminada.

Una vez finalizado los procedimientos de cuantificación, se realizaron diluciones finales de modo de disponer entre 20-100 ng/µl de ADN genómico para cada reacción de amplificación.

3. Polimorfismos genéticos estudiados

En este trabajo se estudiaron en total 23 polimorfismos en los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *NQO2*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *ABCB1*, *ABCC3*, *OCT1* y *TP53* (Tabla 5). La mayoría de los polimorfismos estudiados se encontraban en zonas codificantes por lo cual se han relacionado con cambios en la actividad de las enzimas. Sin embargo, en algunos casos los polimorfismos se ubican en zonas regulatorias e intrones.

La secuencia de los *primers* utilizados en cada caso se detalla cuando se describe el método de estudio de cada gen. Los *primers* utilizados para pirosecuenciación fueron diseñados por el programa *Pyromark Assay Design 2.0*. y en el resto de los casos se utilizaron *primers* descritos previamente. En todos los casos se determinó la especificidad mediante la utilización del algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) accedido en línea ([URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

Tabla 5. Resumen de los polimorfismos estudiados en este trabajo.

Genes	Polimorfismo^a	Alelos	Método
<i>GSTM1</i>	Delección		PCR-múltiple
<i>GSTT1</i>	Delección		PCR-múltiple
<i>GSTP1</i>	rs1695 (c.313A>G)	A/G	PCR-PFLP
<i>TP53</i>	rs1042522(c.215G>C)	C/G	PCR-PFLP
<i>NQO2</i>	rs2071002	A/C	PCR-pirosecuenciación
	rs191539011	A/G	
	rs2071003	C/T	
	rs2071004	A/G	
	rs1143684	C/T	
	rs142940490	C/T	
	rs144959746	A/G	
	rs140937788	A/C	
	rs55771117	G/T	
	<i>CYP1A1</i>	rs2606345	
<i>CYP1B1</i>	rs377461582	A/G	
	rs2617266	G/A	
<i>ABCB1</i>	rs72549389	C/T	PCR-múltiple
	rs1045642 (c.3435C>T)	C/T	
	rs1128503 (c.1236C>T)	C/T	
<i>ABCC3</i>	rs2032582 (c.2677G>T/A)	G/T/A	PCR-pirosecuenciación
	rs4148405	G/T	
<i>hOCT1</i>	rs628031(M480V A>G)	A/G	PCR-pirosecuenciación
	rs35191146 (M420del)	G/-	

^a Entre paréntesis se muestra la denominación más conocida de los SNPs más frecuentemente estudiados.

4. Métodos de Genotipificación

4.1 Polimorfismos de delección de *GSTM1* y *GSTT1*

Para la determinación de los genotipos de pacientes y controles se realizó una PCR múltiple mediante la co-amplificación con 3 pares de *primers* correspondientes a los genes *GSTM1* (F:5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3'; R: 5'-CTGGATTGTCAGATCATGC-3'),

GSTT1 (F: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'; R: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3') y *β-globina* (F: 5'-ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3'; R: 5'-GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC-3')(Morari et al., 2002). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: MgCl₂ (1,5 µM), dNTP (0,2 mM), primers de *GSTM1* (0,3 µM), *GSTT1* (0,4 µM), *β-globina* (0,6 µM), 1 U de Taq polimerasa y 100 ng de ADN genómico. La desnaturalización inicial se realizó a 94 °C durante 5 minutos. Las condiciones del ciclado fueron: 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 1 min a 59 °C y 1 min a 72 °C, seguido por una elongación final de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (2%) durante 30 min a 80 Volts (V), revelados con bromuro de etidio. La presencia de los genes *GSTM1* y *GSTT1* genera una señal de PCR positiva mientras que la delección no lo hace. El patrón de electroforesis muestra 3 fragmentos correspondientes a *β-globina* (630 pb), *GSTT1* (480 pb) y *GSTM1* (275 pb). La ausencia de la banda de *GSTT1* o *GSTM1* se interpretó como delección homocigota del gen. (Figura 14).

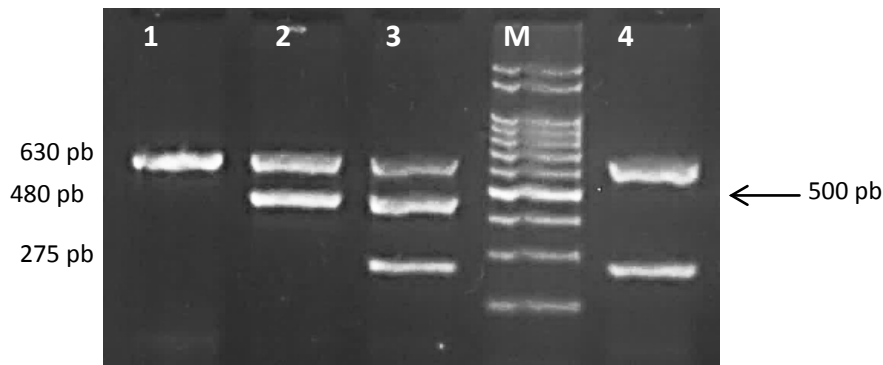


Figura 14. PCR- múltiple para *GSTM1* y *GSTT1*. La presencia de los genes *GSTM1* y *GSTT1* genera una señal de PCR positiva mientras que la ausencia de la banda se interpretó como delección homocigota del gen. Calle 1: delección de *GSTM1* y *GSTT1*; calle 2: delección de *GSTM1*; Calle 3: presencia de *GSTM1* y *GSTT1*; calle 4: delección de *GSTT1*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

4.2 Ensayo de variación del número de Copias de *GSTM1* Y *GSTT1*

Los ensayos de referencia de número de copias se llevaron a cabo utilizando la metodología TaqMan® mediante PCR en tiempo real dúplex. La cuantificación del gen de interés (*GSTM1* o *GSTT1*) fue normalizada respecto de un gen endógeno que se sabe que está presente en dos copias en un genoma diploide. Para este ensayo se usó

como calibrador el gen ARNasaP marcado con TAMRA™ (5') con *primers* específicos de la secuencia de referencia. Para el gen *GSTM1* se utilizó el ensayo Hs02575461_cn utilizando *primers* específicos marcados con sonda VIC® (5') y para *GSTT1* se utilizó el ensayo Hs00010004_cn con la sonda FAM (5'). Las muestras fueron determinadas por triplicado siguiendo las especificaciones del comerciante en un volumen final de 10 µl con 40 ng de ADN total con el siguiente ciclado: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 min y luego 40 ciclos de 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min. En la **Figura 15** se ejemplifican tres gráficos obtenidos durante la amplificación. El número de copias se determinó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con el programa CopyCaller™ v1.0 mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Número de copias de la muestra} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \times \text{número de copias del gen calibrador}$$

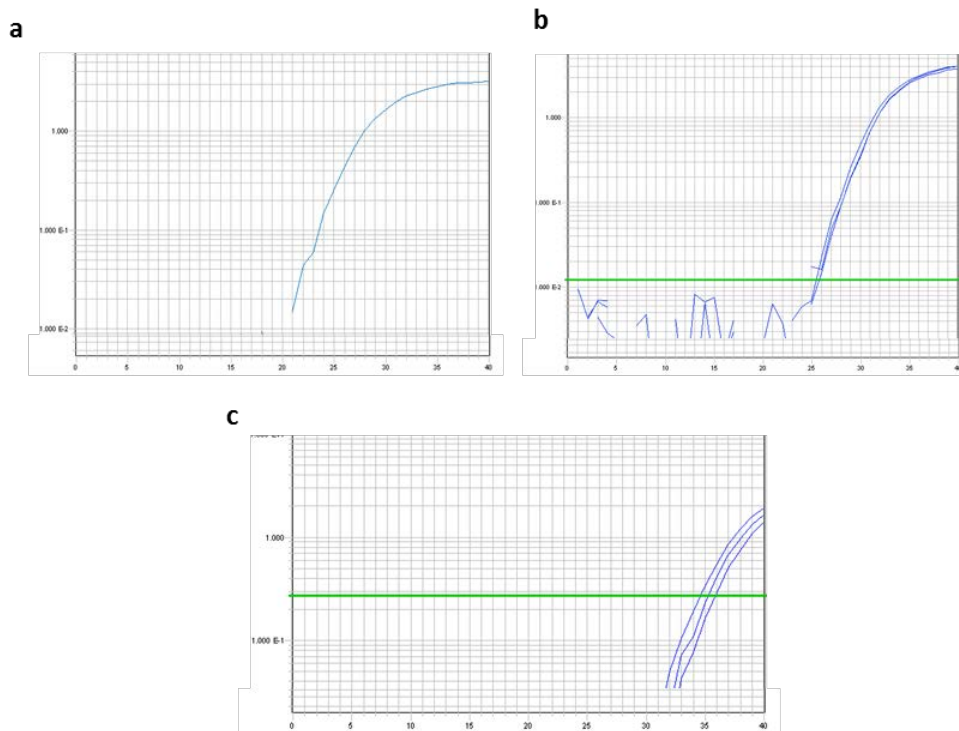


Figura 15. Variación del número de copias de *GSTM1* Y *GSTT1*. Gráficos de Fluorescencia vs. número de ciclos obtenidos durante la reacción de amplificación. a) Amplificación única del gen calibrador RNAaseP mostrando la delección de *GSTM1* y *GSTT1*. b) Amplificación por triplicado de las tres muestras del gen *GSTM1* y c) las de *GSTT1*.

4.3 PCR-RFLP para el polimorfismo *GSTP1* rs1695

La amplificación del gen *GSTP1* se realizó con 0,4 μ M de los siguientes pares de *primers*: F: 5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3'; R: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3' (Harries et al., 1997) con 1,5 μ M MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1 U Taq polimerasa y 50 ng de ADN, con el siguiente ciclado: desnaturalización a 95°C por 5 min y 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 30 seg a 72 °C, seguidos por una elongación final a 72 °C durante 5 min. La presencia de un producto único de 176 pb correspondiente al gen *GSTP1* se confirmó por electroforesis en geles de agarosa (2%) durante 45 min a 30 V revelados con bromuro de etidio (**Figura 16**). La digestión enzimática se realizó incubando 10 μ l de producto de PCR con 10 unidades de la enzima *A/w261* (Fermentas) en un volumen final de 15 μ l con *buffer* Tango (1x), durante toda la noche a 37 °C. El control de la digestión se efectuó por medio de electroforesis en geles de agarosa NuSieve 3:1 (4%) teñidos con bromuro de etidio a 80 V durante 1 hora y media. La presencia del polimorfismo genera un sitio de corte para la enzima por lo que los individuos *wild type* (AA) muestran una banda de 176 pb, los heterocigotas (AG) presentan 3 bandas de 176, 91 y 85 pb y los homocigotas (GG) tienen 2 bandas de 91 pb y 85 pb. En todas las reacciones de amplificación y digestión, se incluyó un control negativo y un control homocigota *GSTP1*-GG (**Figura 16 a y b**). Los patrones electroforéticos se confirmaron por secuenciación directa tal como se muestra en la **Figura 16 c-e**.

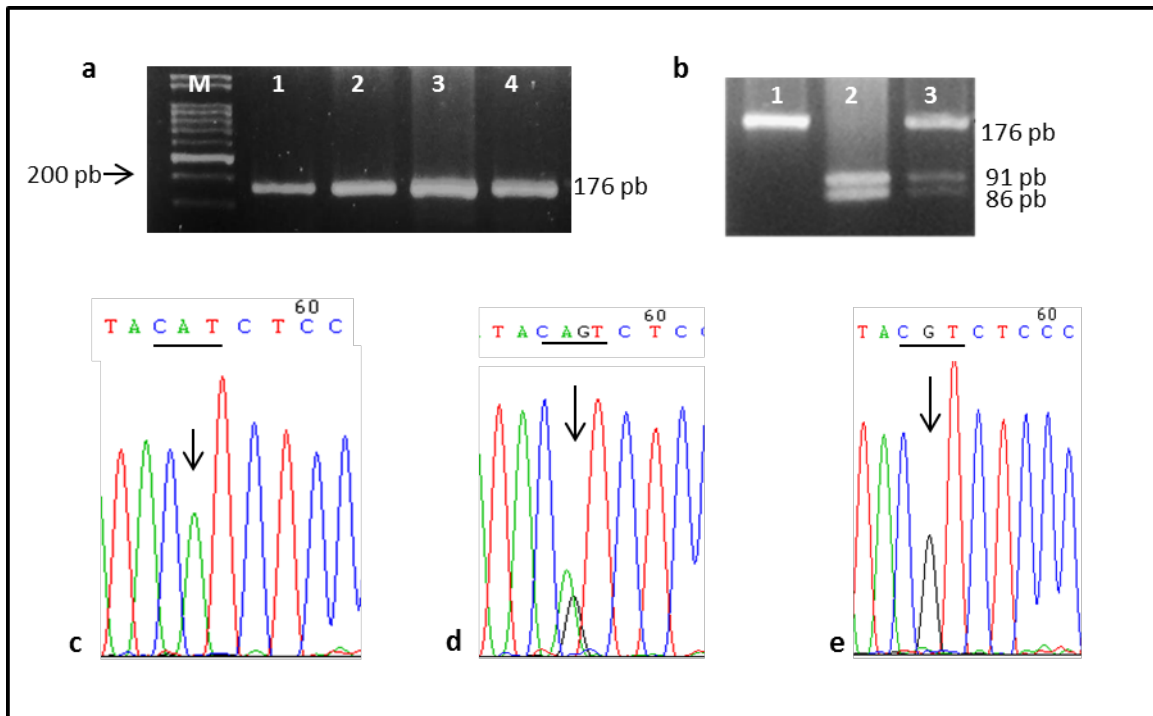


Figura 16. Polimorfismo *GSTP1*rs1695. a) Electroforesis en gel de agarosa (2%) indicando la amplificación del gen *GSTP1* (176 pb). b) Electroforesis en gel de agarosa NuSieve 3:1 (4%) mostrando los individuos homocigotas *wild type* AA (calle 1), los homocigotas GG (calle 2) y los heterocigotas AG (calle 3). M: marcador de peso molecular de 100 pb. En la parte inferior de la Figura se muestran los electroferogramas del análisis de secuenciación directa para cada genotipo, señalando la posición correspondiente al polimorfismo con una flecha negra: c) genotipo homocigota *wild type* *GSTP1*-AA; d) genotipo heterocigota *GSTP1*-AG; e) individuo homocigota *GSTP1*-GG.

4.4 PCR-RFLP para el polimorfismo *TP53* rs1042522

La amplificación del gen *TP53* se realizó empleando 0,6 μ M de los siguientes pares de *primers* F: 5'-GAAGACCCAGGTCCAGATGA-3' y R: 5'-CTGCCCTGGTAGGTTTTCTG-3' (Costa et al., 2008) con 1,5 μ M MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1 U Taq polimerasa y 50 ng de ADN. El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 95 °C por 5 min y 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, 30 seg a 72 °C, seguidos por una elongación final a 72 °C durante 5 minutos. La confirmación de la amplificación de una única banda de 152 pb del gen *TP53* se llevó a cabo por medio de electroforesis en geles de agarosa (2%) durante 30 min a 80 V (**Figura 17a**). Posteriormente, se realizó la digestión enzimática incubando 5 μ l de producto de PCR en un volumen final de 10 μ l con 10 unidades de la enzima *Bsh 1236I* y *buffer* R 1X (Fermentas). Los productos digeridos se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa NuSieve 3:1 (4%) a 80 V durante 60 minutos. La enzima pierde reconocimiento por el sitio de corte

cuando está presente el polimorfismo. Por lo tanto los individuos *wild type* (GG) tienen dos fragmentos de 50 y 102 pb, los heterocigotas (GC): 3 bandas de 152, 102 y 50 pb y los homocigotas CC presentan un único fragmento de 152 pb (**Figura 17b**). Los electroferogramas resultantes de la secuenciación directa confirman los diferentes genotipos observados (**Figura 17c-e**).

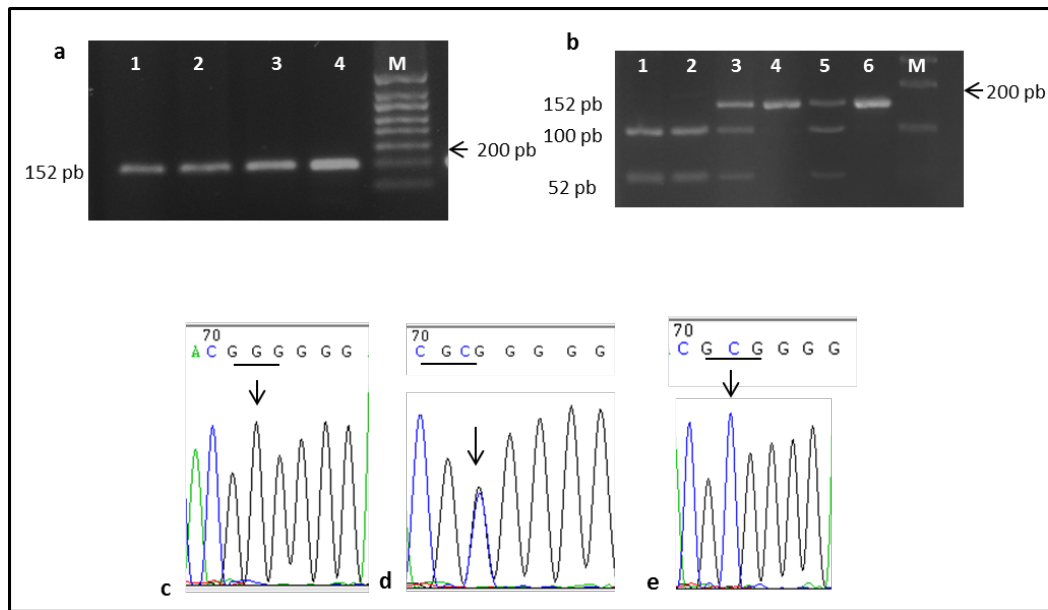


Figura 17. Polimorfismo TP53rs1042522 a) Electroforesis en gel de agarosa (2%) confirmando la amplificación del gen TP53 (152 pb); b) Electroforesis en gel de agarosa NuSieve 3:1 (4%) mostrando los individuos homocigotas *wild type* GG (Calles 1 y 2), los heterocigotas GC (calles 3 y 5) y los homocigotas CC (calle 4 y 6), M: marcador de peso molecular de 100 pb. En la parte inferior se muestran los electroferogramas de la secuenciación directa para cada genotipo, señalando la posición correspondiente al polimorfismo con una flecha negra: c) genotipo homocigota *wild type* TP53-GG; d) genotipo heterocigota TP53-GC; e) genotipo homocigota TP53-CC.

4.5 PCR Múltiple para los polimorfismos en ABCB1

LosSNPs rs1045642, rs1128503 y rs2032582, conocidos como(c.3435 C>T, c.1236 C>T y c.2677 G>T/A, respectivamente) se amplificaron por PCR alelo específica empleando 10 *primers* específicos diseñados previamente por Sunder-Plassmann et al., 2005(**Tabla 6**).

Tabla 6. Secuencia de *primers* y tamaños de cada alelo de los SNPs del gen *ABCB1*.

SNP	Alelo	<i>primers</i> (5' → 3')	Tamaño (pb)
rs2032582	A	F:GACAAGATCTGAAATAAAAGAAAGAACTAGTAGGTA	175
	T	F: CACTGAAAATAAAGAAAGAAC TAGAATGTT	169
	G	F: GATAAG AAAGAACTAGAGGGT G R: GAAAAAGATTGCTTTGAGGAATGG	161
rs1045642	T	F: CAGCCGGGTATAGTCACAGGAAGATATT	126
	C	F: GGTGTACACAGGAAGAGG T C R: GGCCAGAGAGGCTGCCACAT	135
	T	F: CTCACTCGTAAAGGTAGATCTTGAAGAGT	114
rs1128503	C	F: CCTGGTAGATCTTGAACGGC R: GCATCAGCTGGACTGTTGTG	104

Estos *primers* difieren en 8-10 pb los cuales permiten identificar cada uno de los alelos de estos SNPs. En una primera etapa, se amplificó cada SNP por separado a fin de obtener un producto único de cada alelo que servirá de marcador de peso molecular a fin de identificar de forma más precisa cada banda en la PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl con 100 ng de ADN; 1,5 µM MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,6 µM de cada primer y 1 unidad de Taq polimerasa, bajo el siguiente ciclado: desnaturalización por 3 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización por 45 segundos a 95 °C, *annealing* por 45 segundos a 49 °C, elongación por 45 segundos a 72 °C con una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizante (8 %) a 180V durante una hora y media y se revelaron con nitrato de plata (0,1%) (**Figura 18**).

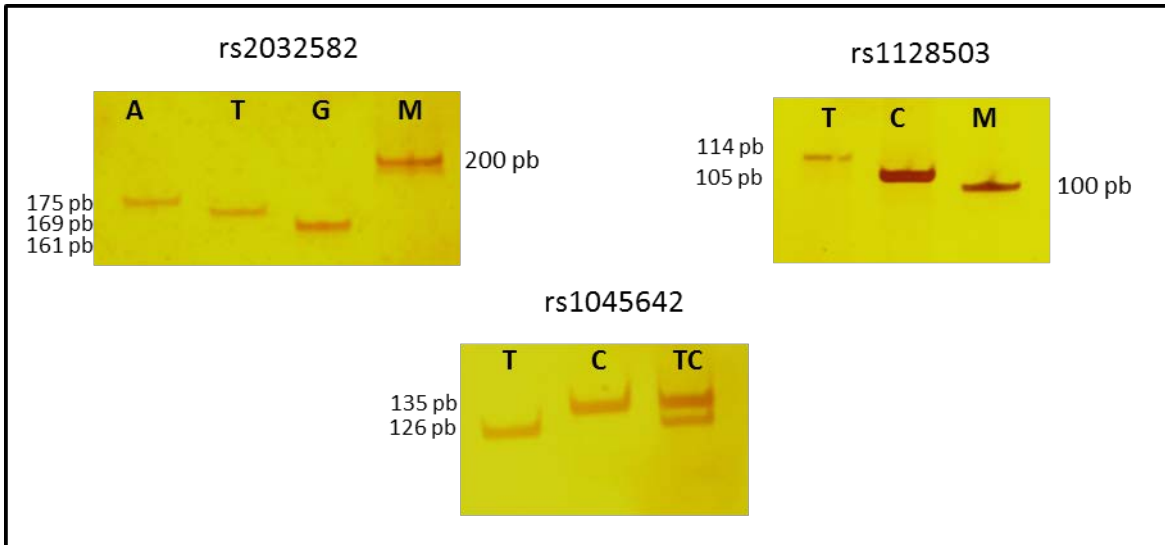


Figura 18. Polimorfismos en el gen *ABCB1*. Electroforesis en geles de poliacrilamida (8%) revelados con nitrato de plata para la PCR individual de los SNPs en el gen *ABCB1*. Se muestra la amplificación separada de los SNPs rs2032582 (Alelos A, T, G); rs1045642 (Alelos T y C) y rs1128503 (Alelos T y C.) M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Una vez amplificado cada producto por separado, se seleccionaron aquellos individuos con genotipo conocido para ajustar la PCR múltiple a fin de amplificar los tres SNPs en forma simultánea. El desarrollo de esta metodología resultó ser una tarea laboriosa que llevó mucho tiempo, sobre todo debido a que pequeñas variaciones en las concentraciones de *primers* producen cambios en el patrón electroforético. Se realizaron numerosos ensayos a diferentes temperaturas de *annealing*, distintas concentraciones de *primers* y diferentes condiciones de electroforesis.

No fue posible ajustar la PCR múltiple con la amplificación simultánea de los tres SNPs ya que por un lado, no se logró una buena señal de cada uno de los productos de PCR y por otro, no fue posible tener una correcta separación de los mismos. Es por ello que el SNP rs1045642 se amplificó de forma separada de los otros dos polimorfismos bajo las mismas condiciones explicadas anteriormente (**Figura19**).

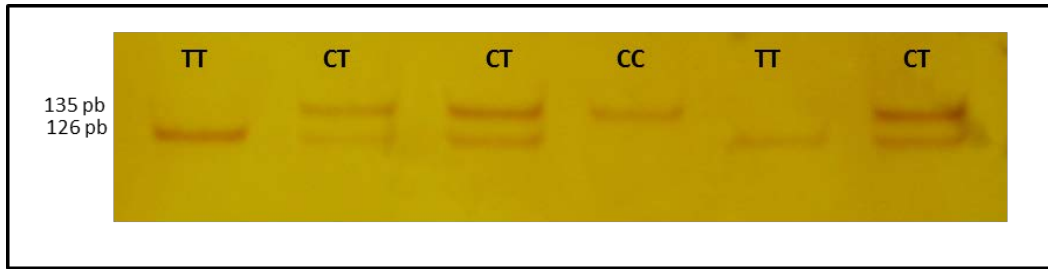


Figura 19. Polimorfismo *ABCB1*rs1045642. Electroforesis en gel de poliacrilamida revelado nitrato de plata. Se muestra la amplificación por PCR-alelo específica del SNP rs1045642. La banda de 126pb corresponde a la amplificación del Alelo T, mientras que el fragmento de 135 pb corresponde al alelo C.

La PCR múltiple pudo establecerse con la amplificación simultánea de los SNPs rs2032582y rs1128503con 400ng ADN, 5 μ M dNTPs, 1,5 μ M MgCl₂, 1 pmol de primer G, 10 pmoles de primer T y A, 20 pmol de primer *reverse* del SNP rs2032582, 2 pmol de primer C, 20 pmoles de primers T y *reverse* del SNP rs1128503 con 1 U de Taq polimerasa en 30 μ l con el mismo ciclado que se utilizó para la PCR por separado. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante (8 %) a 180V durante 2 horas y se revelaron con nitrato de plata (0,1%). En la **Figura 20** se muestran distintos genotipos del gen *ABCB1* en seis pacientes. Para cada SNP se pueden observar una o dos bandas de distintos tamaños dependiendo cada caso. La correcta determinación del peso molecular de cada fragmento permite determinar los genotipos. Un solo fragmento de 175 pb corresponde a un individuo homocigota (AA) para el SNP rs2032582, mientras que un fragmento de 175 pb y otro de 161 pb corresponde a un individuo heterocigota (AG)(**Figura 20**). Además, un solo fragmento de 114 pb indica que el individuo es homocigota (TT) para el SNP rs1128503 mientras que los heterocigotas (TC) tienen una señal de PCR de 114 pb y 105 pb.

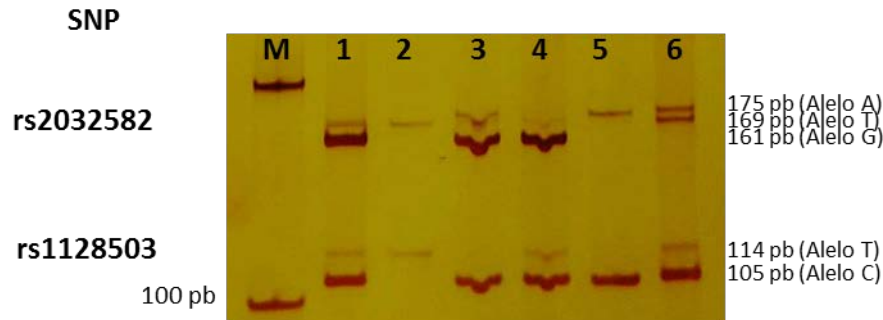


Figura 20. PCR-múltiple de los SNPs rs2032582 y rs1128503 del gen *ABCB1*. Electroforesis en geles de poliacrilamida (8%) revelado con nitrato de plata. Los genotipos para los SNPs rs2032582/ rs1128503 fueron: Calle 1: TG/TC; Calle 2: TT/TT; Calle 3: AG/CC; calle 4: TG/TC; Calle 5: AA/CC; Calle 6: AT/TC. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

4.6 PCR-Pirosecuenciación

Los polimorfismos en los genes *ABCC3*, *hOCT1*, *NQO2*, *CYP1A1* y *CYP1B1* se genotificaron mediante la metodología de PCR-pirosecuenciación. En primer lugar, se amplificaron los distintos genes en placas de 96 wells en un volumen final de 25 μ l utilizando *GoTaq Hot Start Green Master Mix* (Promega) con 40 ng de ADN y 2 pmol de cada *primer*, excepto para el gen *ABCC3* para el cual se usó 1 pmol. Para la reacción de PCR del gen *CYP1B1* a la *Master Mix* se le agregó *High GC enhancer buffer* (10mM Tris-HCl, 25% DMSO, 25% Glycerol). Los tamaños de los productos de PCR, la temperatura de *annealing* y las secuencias de los *primers* utilizados en cada caso se detallan en la **Tabla 7**. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, *annealing* por 30 seg, 72 °C por 20 seg y una extensión final por 10 min. El 10% de las muestras fueron analizadas por duplicado. En todos los casos, se procedió al estudio de los productos de PCR por pirosecuenciación.

Tabla 7. Secuencia de *primers* utilizados en la PCR-pirosecuenciación.

Gen	SNP	Primers (5'-3') ^a	T (°C) ^b	Tamaño	primers (F: 5'-3') ^c
hOCT1	rs628031	F: TCCGCATCTACCCCATGG	56	92	GCATCTACCCCATGGCC
	rs35191146	R: CAGACA A CT TACCA A CT TACC			
NQO2	rs2071002	F: TGGCGCAACTCCTAGAGC	59	129	GAGCGGTCCTTGGGGAG
	rs191539011	R: GGA A CT GTCCTTCCCAAGTC			
	rs2071003				
	rs2071004		58	97	GATTTGTATGCCATGAAC
	rs1143684	F: ACCGTCACAGTGTCTGATTT			
	rs142940490	R: GCATTTATCCCATGACTCAC			
	rs144959746				
	rs140937788				
rs55771117					
CYP1A1	rs2606345	F: GCCTTTCCTATCTCATTGACC R: GTGGTATTTCCAGCTCCC	59	91	CTGCAGTTGGCAATCTGT
CYP1B1	rs377461582	F: CGCCCGCTCCTGTCTCTG	66	79	TGGGCCAGCGGCTGCTG
	rs2617266	R: GCACCAGCCTCAGCCCGA			
	rs72549389				
ABCC3	rs4148405	F: GAATCCCAATCTCTAAGTCTT R: ACGA A CTCTTGGGTAACACC	52	96	TTTGTACATATATGCCCT

^a primers biotinilados en el extremo 5' utilizados para la reacción de PCR, ^b temperatura de *annealing* en la reacción de PCR; ^c utilizados para la pirosecuenciación.

Las placas de 96 wells conteniendo los productos de PCR biotinilados, se incubaron en agitación por 30 minutos con 75 µl *PyroMark Binding Buffer* conteniendo 2 µl de perlas de sefarosa recubiertas con estreptavidina (*Streptavidin Sepharose HP beads*) (**Figura 21**). La interacción biotina-estreptavidina, permite que los productos de PCR queden inmovilizados en la placa. Luego, se aplican sondas de filtro de metal que permiten purificar dichos productos de PCR seguidos de lavados con NaOH, etanol 70% y un buffer de lavado (**Figura 21**). Por último, los filtros de metal que contienen los productos de PCR purificados se transfieren a una nueva placa de 96 wells y se incuban con 45 µl de *PyroMark Annealing Buffer* y 10 pmol de *primer* de secuenciación (**Tabla 7**), permitiendo el correcto *annealing* del *primer* con la secuencia *target* de ADN. Se incuba por 2 minutos a 80 °C y luego se transfiere al equipo PSQ96MA (Qiagen) para su análisis. El procedimiento general del protocolo se detalla a continuación (**Figura 21**).

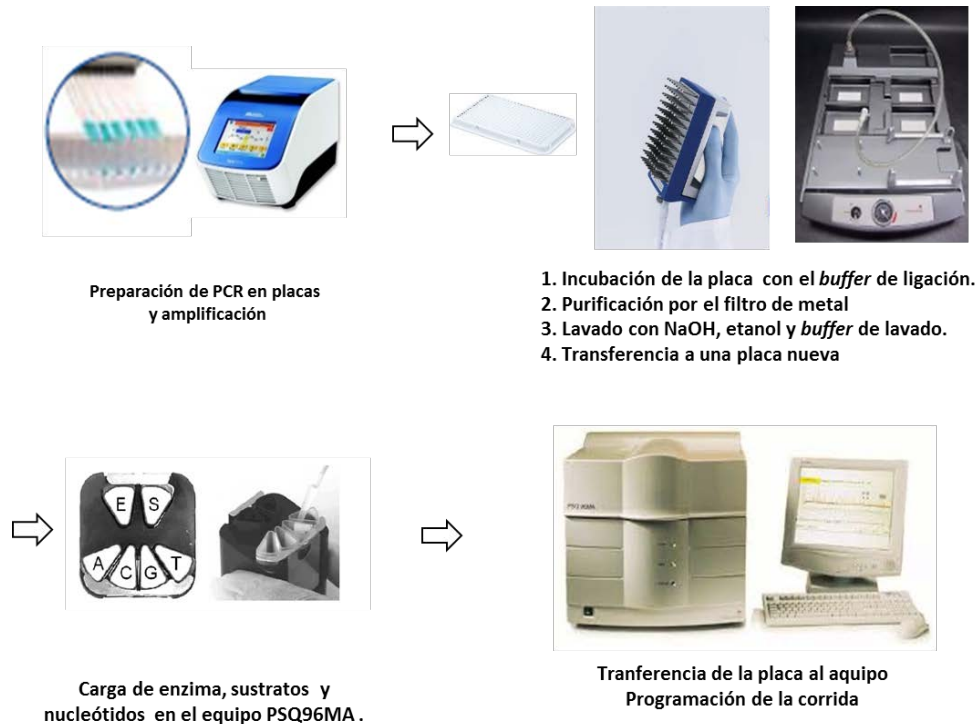


Figura 21. Procedimiento de PCR-Pirosecuenciación. El protocolo se inicia con la amplificación específica de una secuencia en particular, seguido de la purificación de los productos de PCR, lavado y transferencia a una nueva placa. Las enzimas, sustratos y nucleótidos son incorporados al cartucho del equipo y se programa la corrida.

La reacción de pirosecuenciación se lleva a cabo mediante la adición secuencial de nucleótidos. Esta incorporación, se hace de forma pausada a fin de limitar la cantidad disponible para cada reacción. Cuando se añade un nucleótido, el cual es complementario con la cadena molde de ADN (producto de PCR), se activa la enzima ADN polimerasa que libera un pirofosfato al unir el nucleótido. Este pirofosfato se convierte en luz visible gracias a la enzima luciferasa presente en la reacción. La intensidad de la luz emitida depende del número de nucleótidos incorporados la cual es recogida y cuantificada formando una serie de picos llamado pirograma (**Figura 22**). Al final de la reacción se recogen los distintos pirogramas para cada una de las muestras estudiadas. En la parte superior del pirograma se muestra la secuencia analizada y con una línea negra se indica el polimorfismo que se quiere genotipificar (**Figura 22**). En el primer caso solo se analiza un SNP resaltado en azul para el cual se observan dos picos uno de Guanina y de Timina (**Figura 22a**). En los últimos dos casos, se genotipifican dos SNPs en simultáneo. Para el primer SNP (resaltado en color azul) se detecta una señal correspondiente a un solo pico de Guanina indicando que ambos

individuos son homocigotas GG para ese SNP (**Figura 22b y c**). Sin embargo, para el segundo SNP se desea conocer si se ha deletado la Guanina del triplete ATG (línea negra) (**Figura 22b y c**). Para conocer el genotipo en este caso, no es tan directo como para el caso anterior ya que hay que tener en cuenta la variación de tamaño de la señal grande de Timinas ubicadas al final del pirograma (flecha naranja). Cuando se observa una señal baja correspondiente a la Timina del triplete ATG (flecha naranja) y un pico alto de Timinas más retrasado correspondiente a las 5 Timinas de la secuencia el individuo no tiene la deleción en ninguno de sus dos alelos(**Figura 22b**). Sin embargo, cuando se detecta un pico alto de Timinas más adelantado respecto del caso anterior, el individuo es homocigota para la deleción ya que, al no estar Guanina, la Timina del triplete ATG genera una señal alta junto con las 5 Timinas consecutivas ubicadas a una base de diferencia (**Figura 22c**).

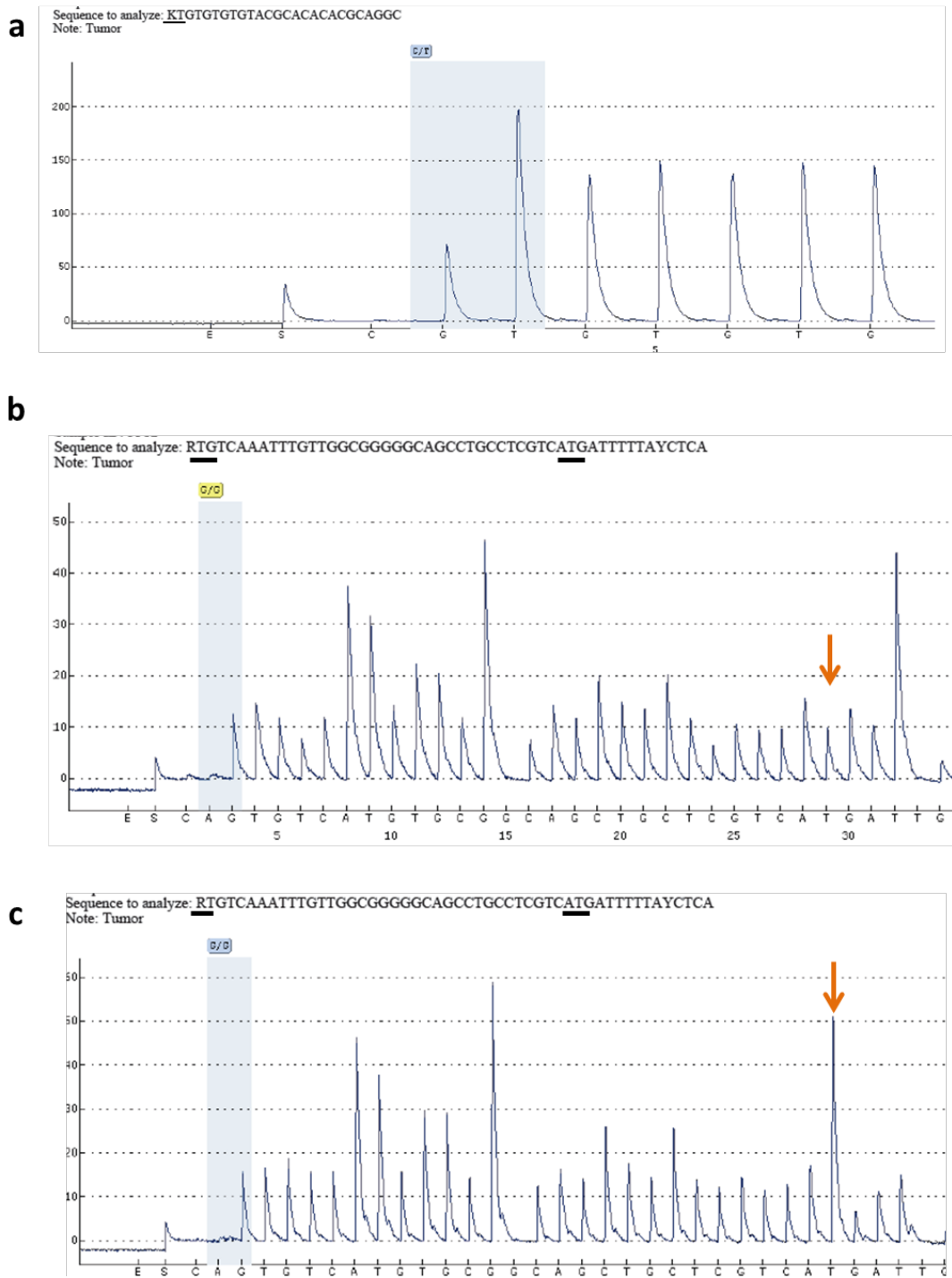


Figura 22. Gráficos de Pirogramas. En la parte superior se muestra la secuencia y los SNPs marcados con línea negra. La presencia de una señal (por encima del pico) de color azul y/o amarilla indica que los resultados son confiables y que la genotipificación se llevó a cabo correctamente. Por el contrario, si la señal es roja, el ensayo debe repetirse. a) Pirograma de un SNP heterocigota GT. b) Se genotifican dos polimorfismos en simultáneo. El individuo es homocigota GG para el primer SNP y además no tiene deletorado la Guanina del triplete ATG ya que se observa una señal pequeña de Timina (flecha naranja). c) el individuo tiene el mismo genotipo homocigota GG para el primer SNP pero se observa que la señal alta de Timinas se adelanta como consecuencia de la deleción homocigota de la Guanina (flecha naranja).

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando los programas GraphPad Prism (5.04), PLINK (1.9) y SPSS versión 15.0 (IBM, SPSS Inc., Chicago, USA). Se analizó el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para los SNPs comparando las frecuencias observadas y esperadas mediante el test de χ^2 . La comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas se realizó empleando tablas de contingencia de 2x2 con la prueba exacta de Fisher o el test de χ^2 . El método de regresión logística, ajustado por edad y sexo, se utilizó para establecer la asociación entre los polimorfismos y el riesgo a desarrollar LMC. De esta forma se evaluaron tres modelos de penetrancia genética (aditivo, dominante, recesivo). Para analizar los modelos de penetrancia se asignó una puntuación de riesgo a cada genotipo de la siguiente forma: modelo logaritmo aditivo: (0 para el homocigota del alelo mayor, 1 para el heterocigota y 2 para el homocigota del alelo menor); modelo dominante: (0 para el homocigota dominante; 1 para el heterocigota, y 1 para el homocigota del alelo menor), recesivo: (0 para el homocigota del alelo mayor; 0 para el heterocigota; 1 para el homocigota del alelo menor). En todos los casos se estimó el riesgo relativo de cada genotipo para desarrollar LMC mediante el cálculo del *Odds Ratio* (OR) y sus intervalos de confianza (IC) del 95%. Si el valor del OR es menor a 1, se considera que el genotipo y/o el alelo son factores protectores, mientras que, si el valor de OR es mayor a 1, se consideran de riesgo. La comparación entre los distintos genotipos con los parámetros clínicos se realizó mediante regresión logística para las variables dicotómicas y regresión lineal para las continuas. Además, se analizaron los siguientes parámetros que permiten evaluar la eficacia al tratamiento:

1. Sobrevida libre de evento (SLE): tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la pérdida de la respuesta hematológica, citogenética, molecular, progresión a FA/CB o muerte.
2. Sobrevida libre de fallo (SLF): tiempo desde el inicio del tratamiento hasta el cambio de tratamiento por respuesta insatisfactoria o intolerancia.
3. Tiempo hasta la RMM (tRMM): tiempo desde el inicio del tratamiento hasta obtener la primer RMM.

Las curvas de tiempo hasta el evento fueron estimadas por mediante el método de Kaplan-Meier. La comparación entre las distintas curvas de acuerdo a la estratificación de cada genotipo se realizó aplicando el test de Log-Rank. A continuación se analizaron los modelos de regresión de Cox para cada una de las variables, calculando la razón del riesgo como el Hazard Ratio (HR) con un IC del 95% ajustado por distintas variables de confusión.

Por último, se evaluó el desequilibrio de ligamiento (LD) mediante el coeficiente estandarizado de Lewontin D' y el r^2 a fin de determinar los bloques haplotípicos mediante el programa Haploview (4.1). Los valores de D' y r^2 varían entre 0 y 1, un valor de 0 indica que los SNP analizados son independientes el uno del otro, mientras que un valor de 1 indica que ambos están en un completo LD. La asociación de los haplotipos con los parámetros clínicos y la respuesta al tratamiento se realizó con el programa *online* SNPstats considerando modelos aditivos mediante regresión logística y estimando el OR y su IC del 95% ajustado por edad y sexo. En todos los casos, se consideraron como resultados estadísticamente significativos aquellos con un nivel de significación de $p \leq 0,05$.

Resultados

1. Características clínicas de los pacientes

Se estudiaron 141 muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con LMC y bajo tratamiento con distintos ITKs (imatinib, dasatinib y nilotinib) con una media de seguimiento de 67,6 meses. Las principales características clínicas de los pacientes se muestran en la **Tabla 8**. La mayoría de los pacientes estaba en fase crónica de los cuales 54 se encontraban en tratamiento con imatinib, 12 con nilotinib y 5 con dasatinib de primera línea y continúan con el mismo hasta la última actualización de los datos clínicos. Los 70 pacientes restantes ingresaron a un protocolo de mutaciones realizado en el laboratorio, debido a falta de respuesta a los ITKs de los cuales 35 estaban tratados con imatinib, 17 con dasatinib, 18 con nilotinib. La secuenciación directa del gen *BCR-ABL1* en los pacientes no respondedores al tratamiento permitió identificar 25 pacientes con mutaciones en el dominio tirosina quinasa de este gen. Las mutaciones más frecuentes fueron G295E y T315I, detectadas en 3 y 4 pacientes, respectivamente. El seguimiento de la enfermedad se llevó a cabo mediante las mediciones de los transcriptos *BCR-ABL1* por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con *ABL1* como gen de referencia en escala internacional. De esta forma se determinó que 63 pacientes se encontraban con RMM, RM4.5 y RM5.0 (**Tabla 8**). La respuesta al tratamiento con ITKs se consideró analizando cada paciente en particular siguiendo los criterios de la *European LeukemiaNet* (Baccarani et al., 2015).

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes tratados con ITKs.

Parámetros clínicos		Nº pacientes (%) ^a
Fase	Crónica	76 (82,6)
	Acelerada	8 (8,7)
	Crisis blástica	8 (8,7)
Sokal	Alto	32 (32)
	Intermedio	32 (32)
	Bajo	36 (36)
Mutación <i>BCR-ABL1</i>^b	Si	25 (35,7)
	No	45 (64,3)
Respuesta molecular	Mayor/4.5/5.0	63 (45,3)
	Menor	27 (19,4)
	Mínima	26 (18,7)
	Nula	23 (16,6)
Respuesta citogenética	Mayor	78 (66,1)
	Mínima	6 (5,1)
	Menor	20 (16,9)
	Nula	14 (11,9)
Progresión	Si	16 (13,8)
	No	110 (86,2)

^a las diferencias en el número total se debe a la falta de información disponible en algunos casos. ^b estudio realizado en los pacientes no respondedores al tratamiento.

2. Descripción de los polimorfismos estudiados en los pacientes con LMC

En este trabajo se estudiaron 21 SNPs en los genes *ABCB1*, *ABCC3*, *hOCT1*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *NQO2*, *GSTP1* y *TP53*. Además, se evaluaron los polimorfismos de delección de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, así como también la variación del número de copias de estos últimos. En primer lugar, se analizó el rol de la variabilidad genética en los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *TP53* en la susceptibilidad a LMC mediante un estudio caso-control. En segundo lugar, se estableció la asociación entre todos los polimorfismos evaluados con las características clínicas de los pacientes y con la eficacia al tratamiento. A continuación, se describe el análisis estadístico efectuado para determinar si los SNPs evaluados estaban en equilibrio de Hardy -Weinberg (EHW) y la distribución de las frecuencias genotípicas.

2.1 Equilibrio de Hardy Weinberg

A fin de establecer si los 21 SNPs evaluados estaban en EHW se realizó el análisis estadístico mediante el *test* de chi-cuadrado comparando las frecuencias observadas de los genotipos heterocigotas (ObsHet) respecto de las frecuencias esperadas (EspHet) (**Tabla 9**). Este análisis demostró que la mayoría de los polimorfismos evaluados estaba en EHW. Sin embargo, un alejamiento del EHW se observó para los polimorfismos *ABCB1* rs1045642 y *hOCT1* rs628031, rs35191146. En los SNPs monoalélicos del gen *CYP1B1* y *NQO2* no se determinó el EHW.

Tabla 9. Evaluación del EHW de los SNPs estudiados.

Gen	Localización	SNP	Alelo Mayor	Alelo Menor	ObsHet	EspHet	EHWp
<i>ABCB1</i>	7q21.12	rs1128503	C	T	0,412	0,482	0,11
		rs2032582	G	T/A	0,325	0,464	0,001
		rs1045642	C	T	0,423	0,499	0,09
<i>ABCC3</i>	17q21.33	rs4148405	T	G	0,373	0,392	0,3213
<i>hOCT1</i>	6q25.3	rs628031	G	A	0,286	0,497	0,0001
		rs35191146	G	del	0,279	0,375	0,02
<i>NQO2</i>	6p25.2	rs191539011	G	-	0	0	-
		rs2071002	A	C	0,403	0,391	0,8297
		rs2071003	C	T	0,36	0,397	0,567
		rs2071004	G	A	0,388	0,41	0,5374
		rs1143684	T	C	0,357	0,396	0,3266
		rs142940490	C	-	0	0	-
		rs144959746	A	-	0	0	-
		rs140937788	A	-	0	0	-
<i>CYP1A1</i>	15q24.1	rs2606345	C	A	0,379	0,33	0,2334
		<i>CYP1B1</i>	2p22.2	rs377461582	C	-	0
rs2617266	C	T		0,421	0,448	0,45	
rs72549389	T	-		0	0	-	
<i>GSTP1</i>	11q13.2	rs1695	A	G	0,435	0,462	0,5776
<i>TP53</i>	17p13.1	rs1042522	G	C	0,379	0,33	0,168

ObsHet: frecuencias observadas y EspHet: frecuencias esperadas de genotipos heterocigotas

2.2 Distribución de las frecuencias genotípicas de los SNPs en los pacientes con LMC

Las frecuencias de los genotipos de los SNPs evaluados se muestran en la **Figura 23**. En el gen *ABCB1* se estudiaron tres SNPs: rs1128503, rs2032582 y rs1045642 de los cuales para el polimorfismo rs2032582 trialélico se identificaron 6 genotipos diferentes (GG, TT, AA, GT, GA y TA). Las frecuencias genotípicas observadas para este SNP fueron: GG (40%), GT (30%) y TT (19%), encontrando muy baja frecuencia de los restantes genotipos (**Figura 23 A**). En el SNP *ABCC3* rs4148405 se observó una alta proporción de pacientes con genotipo homocigota *wild type* TT (73%), mientras que para los SNPs *hOCT1* rs628031 y rs35191146 la mayoría de los pacientes tenían genotipo GG (45% y 66%, respectivamente) (**Figura 23 A**). El SNP *CYP1A* rs2606345 presentó mayor

frecuencia de individuos heterocigotas AC (44%), en tanto que para *CYP1B1* se observó que los SNPs rs377461582 y rs72549389 eran monoalélicos en nuestra población, encontrándose que todos los pacientes exhibían los genotipos homocigotas CC y TT, respectivamente (**Figura 23 B**). En el gen *NQO2* se estudiaron 9 polimorfismos de los cuales los SNPs rs2071002, rs2071003, rs2071004 y rs1143684 presentaron frecuencias relativamente similares (**Figura 23 C**). Los 5 SNPs restantes fueron monoalélicos mostrando los genotipos homocigotas *wild type*. Por último, el análisis del SNP *GSTP1* rs1695 permitió establecer que la frecuencia del genotipo heterocigota AG fue del 51%, mientras que para el gen *TP53* rs1042522 se observó mayor frecuencia de portadores de genotipo GG (58,8%) (**Figura 23 D**).

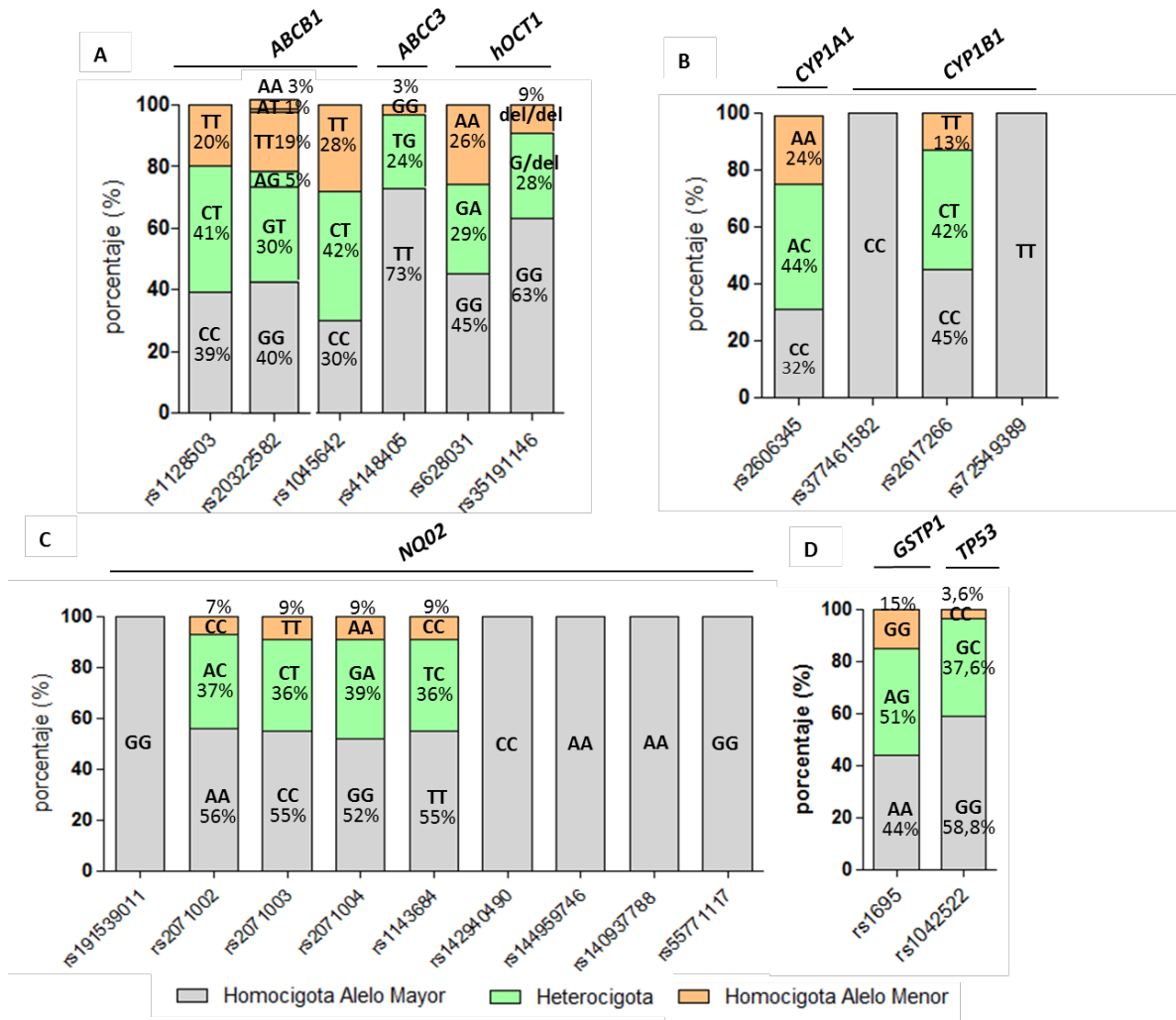


Figura 23. Distribución de las frecuencias genotípicas de los SNPs en los pacientes con LMC. Se muestran los genotipos y su frecuencia para todos los SNPs evaluados. Genotipos homocigotas para el alelo mayor (gris), genotipo heterocigota (verde), genotipos homocigotas para el alelo menor (naranja).

2.3 Distribución de los polimorfismos en los genes *GSTM1* y *GSTT1*

En primer lugar, el estudio de los polimorfismos de delección de los genes *GSTM1* y *GSTT1* permitió detectar la presencia o la ausencia de dichos genes. La delección homocigota del gen *GSTM1* se observó en 56 pacientes (39,7%), mientras que 20 de ellos (14,2%) tenían genotipo *GSTT1*-nulo (Figura 24).

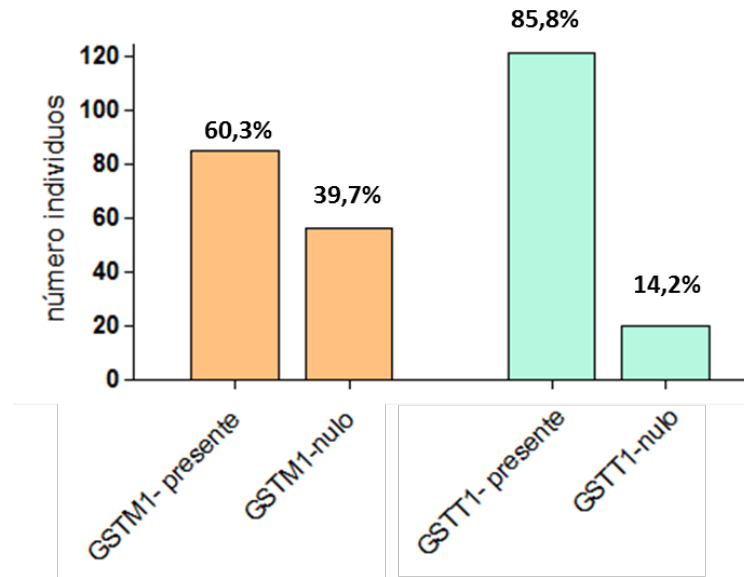
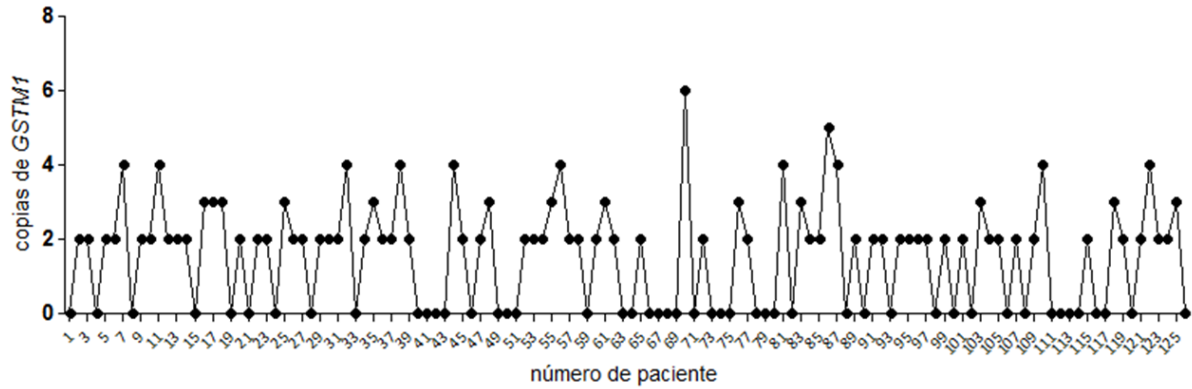


Figura 24. Distribución del número de individuos y los porcentajes de los polimorfismos en los genes *GSTM1* y *GSTT1* en los 141 pacientes con LMC.

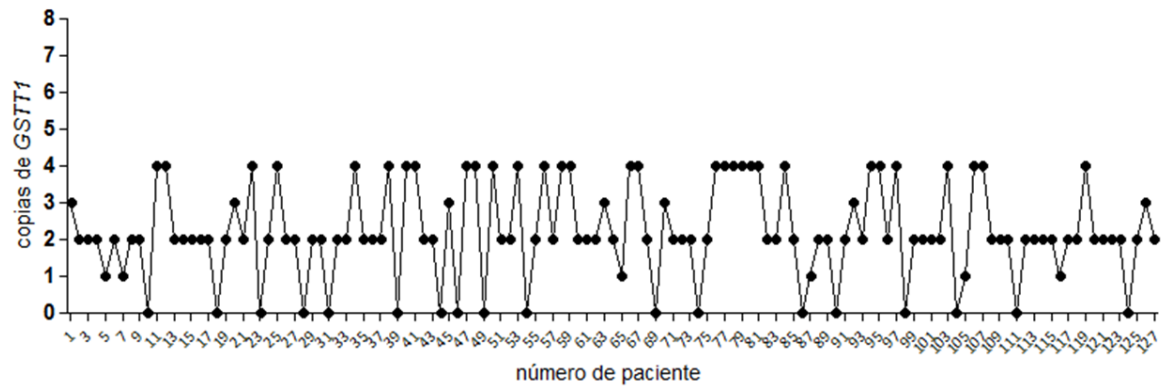
Además, en este grupo de pacientes se evaluó la variación del número de copias de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en aquellos individuos con genotipo *GSTM1*-presente y *GSTT1*-presente. El número de copias del gen *GSTM1* por paciente y el porcentaje de pacientes según el número de copias se detalla en la **Figura 25**. En total se pudieron analizar 126 pacientes, mientras que en 15 casos (10,6%) no se pudo realizar la determinación de la cantidad de copias de *GSTM1* por mala calidad de la muestra. Se estableció que el 42,1% de las 126 muestras evaluables tenían dos copias de *GSTM1*, en tanto que el 38,1% no tenía el gen (0 copias). No se detectaron pacientes con una sola copia del gen. Por último, se observó que el 10,3% y el 7,9% de los pacientes tenían 3 y 4 copias, respectivamente y, en menor proporción se identificaron pacientes que presentaban 5 y 6 copias del gen *GSTM1* (0,8% cada grupo).



Copias de <i>GSTM1</i>	ND	0	2	3	4	5	6
Número	15	48	53	13	10	1	1
Porcentaje (%)	10,6	38,1	42,1	10,3	7,9	0,8	0,8

Figura 25. Distribución del número de copias de *GSTM1* en los pacientes. Se grafica la cantidad de copias de *GSTM1* (punto negro) por paciente enumerando las muestras impares. En la tabla se resume la distribución del número y porcentaje de pacientes con diferente número de copias. ND= no determinado

Respecto de la distribución del número de copias de *GSTT1*, se pudieron analizar en total 127 pacientes, en tanto que en 14 individuos (9,9 %) no fue posible determinar la cantidad de copias del gen (**Figura 26**). La mayoría de los individuos presentaron dos copias de *GSTT1* (51,18%), seguido de un 24,4% de portadores de 4 copias, mientras que el 14,7% de los pacientes no presentó copias del gen *GSTT1* (0 copias). A diferencia de *GSTM1*, el 7% de la población presentó 1 copia de *GSTT1* y el 5,5% de los pacientes presentó 3 copias de *GSTT1*, no detectándose individuos portadores de más de 4 copias (**Figura 26**).



Copias de GSTT1	ND	0	1	2	3	4
Número	14	18	6	65	7	31
Porcentaje (%)	9,9	14,7	4,7	51,18	5,5	24,4

Figura 26. Distribución del número de copias de GSTT1 en los pacientes. Se grafica la cantidad de copias de GSTT1 por cada paciente (punto negro) enumerándose las muestras impares. En la tabla se resume la distribución del número y el porcentaje de pacientes con diferente número de copias. ND= no determinado

3. Susceptibilidad a LMC

A fin de identificar co-factores genéticos independientes al *BCR-ABL1* los cuales pueden predisponer a la enfermedad, se llevó a cabo un estudio caso-control para los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *TP53* a fin de determinar si los polimorfismos genéticos pueden contribuir con la susceptibilidad a LMC. Teniendo en cuenta que en los individuos controles solamente se evaluó la presencia y/o delección de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, en este estudio de caso-control no se analizó la variación del número de copias de ambos genes.

3.1 Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas de los genes GSTs y TP53

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos estudiados en pacientes y controles se muestra en la **Tabla 10**. El análisis de las frecuencias genotípicas de *GSTM1* y *GSTT1* no arrojó diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,9$ y $p=0,62$, respectivamente). Si bien el análisis estadístico en la distribución de los genotipos *GSTP1* entre controles y pacientes no reveló diferencias significativas, se observó que los pacientes exhibieron una mayor frecuencia del genotipo *GSTP1*-GG (15%) respecto de los controles (8,5%) ($p=0,12$). A su vez, la distribución alélica de *GSTP1*, tampoco reveló diferencias significativas entre pacientes y controles ($p=0,2$) (**Tabla 10**). Por otro lado, se demostró que las frecuencias genotípicas de *TP53*-GG y *TP53*-CG fueron muy similares entre ambos grupos. Sin embargo, el genotipo *TP53*-CC se encontró significativamente disminuido en los pacientes (3,6%) respecto de los controles (12,1%) ($p=0,012$) (**Tabla 10**). Asimismo, se demostró que la frecuencia del alelo *TP53*-C estaba significativamente disminuida en los pacientes (22,8%) respecto de los controles (29,8%) ($p=0,05$).

Tabla 10. Análisis de frecuencias genotípicas y alélicas para GSTs y *TP53* en pacientes y controles

Genes	Genotipos/ Alelos	Pacientes N=141 (%)	Controles N=141 (%)	<i>p</i> ^a
<i>GSTM1</i>	Presente	85 (60,3)	84 (59,6)	0,9
	Nulo	56 (39,7)	57 (40,4)	
<i>GSTT1</i>	Presente	121 (85,8)	117 (83)	0,62
	Nulo	20 (14,2)	24 (17)	
<i>GSTP1</i>	AA	62 (44)	67 (47,5)	0,9
	AG	58 (41)	62 (44)	
	GG	21 (15)	12 (8,5)	
	A	182 (65)	196 (70)	
	G	100 (35)	86 (30)	
<i>TP53</i>	GG	83 (58,8)	74 (52,5)	0,89
	GC	53 (37,6)	50 (35,4)	
	CC	5 (3,6)	17 (12,1)	
	G	219 (77,7)	198 (70,2)	
	C	63 (22,3)	84 (29,8)	

^aAnálisis de chi cuadrado por tablas de contingencia de 2x2 considerando al genotipo o alelo *wild type* como referencia.

3.1.1 Distribución de los genotipos GSTs y TP53 de acuerdo a la edad y sexo

A fin de comparar la distribución de los genotipos GSTs y TP53 entre mujeres y varones, se analizaron las frecuencias genotípicas estratificadas según el género (**Figura 27**). Si bien en la mayoría de los casos no se observaron diferencias significativas, el análisis estadístico reveló una distribución no homogénea para el SNP del gen *TP53*. En el grupo de varones, el 1% de los pacientes tenían el genotipo *TP53*-CC el cual estaba significativamente disminuido respecto del 15% observado en los controles ($p=0,02$) (**Figura 27**).

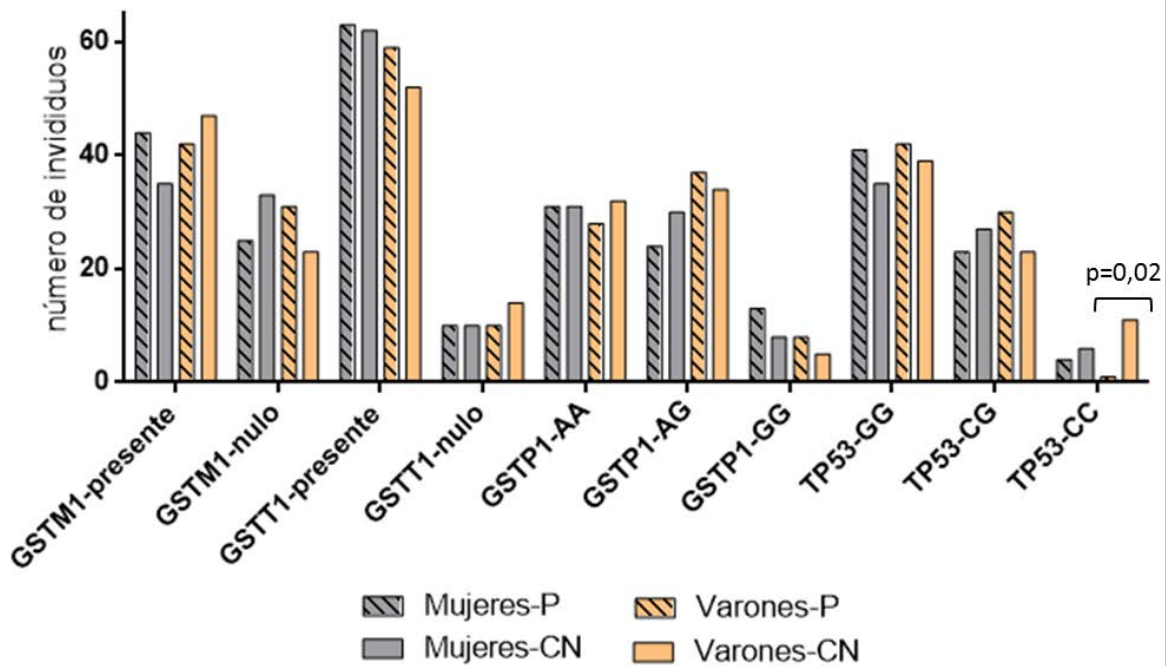


Figura 27. Distribución de los genotipos en pacientes (P) y controles (CN) estratificados de acuerdo al género. Se comparó la distribución de los genotipos en las mujeres pacientes (Mujeres –P) (naranja rayas) vs. mujeres controles (Mujeres –CN) (naranja liso); y en los varones (Varones–P) (gris rayas) vs. Varones controles (varones –CN) (gris liso). En todos los casos se utilizó el test de chi-cuadrado.

Por otra parte, considerando que la edad media de ambas poblaciones fue de 50 años, se definieron dos estratos de edad a fin de analizar la distribución de los genotipos en los mayores y menores 50 años (**Figura 28**). No se encontraron diferencias significativas de la distribución de los genotipos de *GSTM1* y *GSTP1* entre pacientes y controles según la edad. Sin embargo, el genotipo *GSTT1*-nulo se encontró significativamente disminuido en los pacientes mayores de 50 años respecto de los controles ($p=0,04$). Por otro lado, la frecuencia del genotipo *TP53*-CC se observó en un 2% de los pacientes menores de 50 años respecto de un 16% observado en los controles ($p=0,01$) (**Figura 28**).

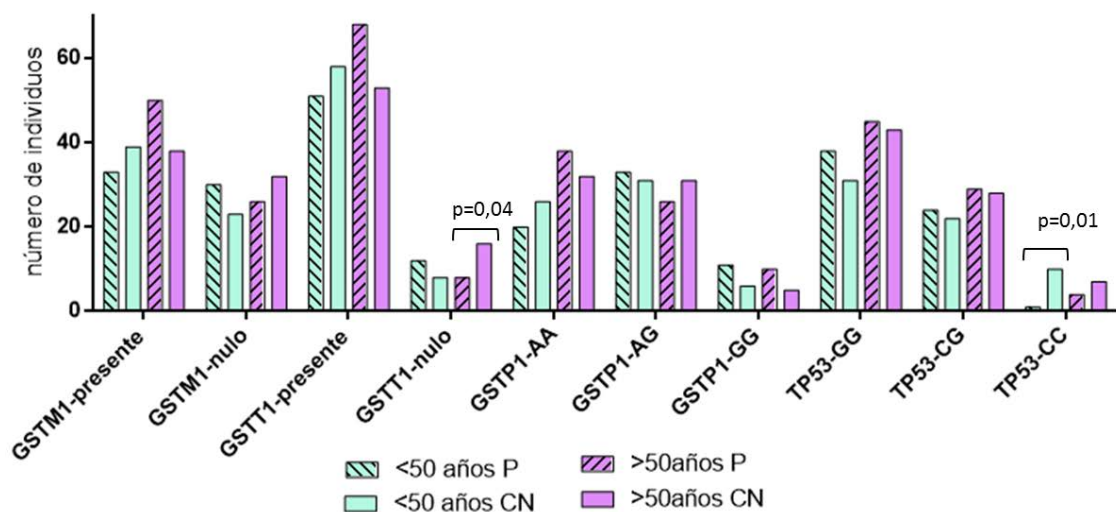


Figura 28. Distribución de los genotipos en pacientes (rayas) y controles (liso) estratificados de acuerdo a menores de 50 años y mayores de 50 años. Se comparó la distribución de los genotipos en los pacientes menores de 50 años (<50 años -P) vs. controles menores de 50 años (<50 años -CN); y en pacientes mayores de 50 años (>50 años-P) vs. controles mayores de 50 años (>50 años-CN). En todos los casos se utilizó el test de chi-cuadrado. Solamente se muestran las comparaciones estadísticamente significativas.

3.2 Modelos genéticos de penetrancia

A fin de determinar el impacto de estos polimorfismos en la susceptibilidad a LMC, se analizaron diferentes modelos genéticos de penetrancia, los cuales evalúan la relación específica entre el genotipo y el riesgo a la enfermedad. Tal como se explicó anteriormente, se evaluaron los modelos genéticos aditivo, recesivo y dominante (ver sección análisis estadístico en materiales y métodos). Teniendo en cuenta que en los controles no se determinó el número de copias de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, solamente se contaba con la información de la presencia o ausencia de los genes. Por lo tanto, se evaluó el modelo de herencia recesivo mediante la comparación de la presencia del gen en homocigosis (+/+) o en hemicigosis (+/-) respecto de la delección homocigota del gen (-/-). El análisis de regresión logística entre pacientes y controles no mostró diferencias significativas de acuerdo al modelo recesivo para los genes *GSTM1* ($p=0,83$; OR: 0,95; IC95%: 0,56-1,53) y *GSTT1* ($p=0,37$ OR: 0,74; IC95%: 0,39-1,43). (Tabla 11). Por otro lado, para los genes *GSTP1* y *TP53* se evaluaron los modelos aditivo, recesivo y dominante (Tabla 11). Se observó una tendencia hacia la significación para el polimorfismo en *GSTP1* teniendo en cuenta el modelo recesivo (AA-AG vs.GG) ($p=0,07$). Esto sugiere que la presencia de dos alelos *GSTP1*-G sería un

factor de riesgo para LMC (OR: 2,04; IC95%: 0,94-4,4). El análisis de *TP53* arrojó diferencias significativas considerando un modelo recesivo (GG-GC vs. CC) ($p=0,01$). Teniendo en cuenta que el valor del OR es menor a uno, estos resultados indican que la presencia de ambos alelos *TP53*-C serían un factor protector para el desarrollo de LMC (OR: 0,19 IC95%: 0,06-0,68) (**Tabla 11**).

Tabla 11. Análisis de los modelos genéticos de penetrancia por regresión logística.

Genes	Modelos Genéticos	P	OR (IC 95%) ^a
<i>GSTM1</i>	<i>Recesivo</i> (+/+ o +/-) vs. -/- ^b	0,83	0,95 (0,56-1,53)
<i>GSTT1</i>	<i>Recesivo</i> (+/+ o +/-) vs. -/- ^b	0,37	0,74 (0,39-1,43)
<i>GSTP1</i>	<i>Recesivo</i> AA-AG vs. GG	0,07	2,04 (0,94-4,4)
A>G	<i>Dominante</i> AA vs. AG-GG	0,57	1,15 (0,71-1,8)
	<i>Log – Aditivo</i> -	0,19	1,26 (0,88-1,82)
<i>TP53</i>	<i>Recesivo</i> GG-GC vs. CC	0,01	0,19 (0,06-0,68)
G>C	<i>Dominante</i> GG vs. CG-CC	0,79	1,08 (0,69-1,97)
	<i>Log-Aditivo</i> -	0,17	0,72 (0,15-1,15)

^a Análisis de regresión logística ajustado por edad y sexo; ^b +/-: presencia del gen en homocigosis; +/-: delección en hemocigosis; -/-: delección homocigota del gen.

3.3 Combinación de polimorfismos GSTs y susceptibilidad a LMC

Teniendo en cuenta que las GSTs comparten especificidad de sustrato, se investigó si el efecto combinado de los polimorfismos evaluados puede modular el riesgo a LMC mediante regresión logística. Las combinaciones que involucran a *GSTM1* y *GSTT1* se analizaron considerando cada combinación como factor de riesgo respecto de las otras tres combinaciones como referencia. No se observó riesgo acumulado para la LMC considerando la combinación de los genotipos *GSTM1* y *GSTT1*. Por otro lado, para las combinaciones que involucran al gen *GSTP1*, se consideró en todos los casos el modelo recesivo (**Tabla 12**).

Tabla 12. Análisis combinado de los genotipos GSTs con el riesgo a LMC.

Genotipos	LMC N= 141 (%)	Controles N = 141 (%)	P	OR (IC 95%) ^a
<i>GSTM1/GSTT1</i>				
M1+/T1+	72 (51,1)	70 (49,6)	0,92	0,97 (0,57-1,65)
M1+/T1-	14 (9,9)	15 (10,6)	0,47	0,74 (0,83-1,6)
M1-/T1+	50 (35,5)	48 (34)	0,9	0,9 (0,58-1,65)
M1-/T1-	5 (3,5)	8 (5,7)	0,28	0,6 (0,28-1,5)
<i>GSTM1/GSTP1^b</i>				
M1+ / AA-AG	71 (50,4)	76 (53,9)		1 (ref)
M1+ / GG	14 (9,9)	9 (6,4)	0,24	1,71 (0,6-4,63)
M1- / AA-AG	48 (34)	53 (37,6)		1 (ref)
M1- / GG	8 (5,8)	3 (2,1)	0,047	3,54 (1,2-14,57)
<i>GSTT1/GSTP1^b</i>				
T1+ / AA-AG	106 (75,2)	107 (75,9)		1(ref)
T1+ / GG	14 (9,9)	11 (7,8)	0,47	1,39 (0,57-3,24)
T1- / AA-AG	14 (9,9)	22 (15,6)		1 (ref)
T1- / GG	7 (5,0)	1 (0,7)	0,03	12,65 (1,17-21,5)
<i>GSTM1/GSTT1/GSTP1^b</i>				
M1+/T1+/AA-AG	62 (44)	62 (44)		1 (ref)
M1+/T1+/GG	7 (5,7)	8 (5,7)	0,94	0,96 (0,3-2,99)
M1-/T1+/AA-AG	43 (30,5)	45 (31,2)		1 (ref)
M1-/T1+/GG	7 (5)	3 (2,1)	0,162	2,7 (0,66-11,85)
M1+ / T1- /AA-AG	8 (5,7)	7 (5)		1 (ref)
M1+ / T1-/GG	6 (5,0)	8 (5,7)	0,23	9,3 (0,88- 10,2)
M1-/T1-/AA-AG	5 (3,5)	9 (6,4)		1 (ref)
M1-/T1-/GG	1 (0,7)	0	0,99	ND

^a Análisis de regresión logística ajustado por edad y sexo. ^b Se consideró un modelo recesivo para las combinaciones que involucran a *GSTP1*. M1+= *GSTM1*-presente; M1-=*GSTM1*-nulo, T1+= *GSTT1*-presente; T1-=*GSTT1*-nulo; ND=no determinado.

El análisis de genotipos combinados de *GSTM1*-nulo con *GSTP1*-GG, reveló que la frecuencia de los pacientes estaba significativamente incrementada (5,8%) respecto de los controles (2,1%) ($p=0,047$). La cuantificación del riesgo, determinada por el OR, indicó que los individuos portadores de ambos genotipos *GSTM1*-nulo y *GSTP1*-GG tienen 3,54 veces más riesgo de desarrollar LMC (OR: 3,54 IC95%: 1,2-14,57). A su vez, la frecuencia de pacientes portadores de los genotipos *GSTT1*-nulo y *GSTP1*-GG (5%) también fue significativamente mayor respecto de la observada en los controles (0,7%) ($p=0,03$) sugiriendo que la combinación de estos genotipos influyen en la susceptibilidad para la LMC (OR: 12,65; IC95%: 1,17-21.5). Por último, se estudió el

efecto de la combinación triple de los genotipos de las GSTs, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles (**Tabla 12**).

4. Asociación de los polimorfismos con el índice de Sokal, Fase de enfermedad y presencia de mutaciones en *BCR-ABL1*

A fin de determinar si la presencia de los polimorfismos puede estar asociado con alguno de los parámetros clínicos principales, se realizó un análisis de asociación entre los polimorfismos genéticos con la fase de la enfermedad, el índice de Sokal y la presencia de mutaciones en el *BCR-ABL1*. Este análisis se realizó mediante regresión logística considerando, en todos los casos, el modelo aditivo, ajustado por edad y sexo. Se estableció como alelo de riesgo al alelo menor de cada SNP. Teniendo en cuenta que el SNP trialélico de *ABCB1* rs2032582 cuenta con dos alelos menores (T y A) y considerando que la frecuencia del alelo A en toda la población fue de 4,6% respecto de un 37% de alelo T, es por ello que a fin de unificar el análisis los pacientes con el alelo A no fueron considerados. Para estos análisis no se incluyeron los SNPs monoalélicos de los genes *NQO2*, *CYP1A1* y *CYP1B1*.

4.1 Sokal y fase de la enfermedad

En primer lugar, se realizó el análisis de los SNPs estudiados en los genes *ABCB1*, *ABCC3*, *hOCT1*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *NQO2*, *GSTP1* y *TP53* con los parámetros Sokal (**Tabla 13**) y fase de la enfermedad (**Tabla 14**). El análisis del índice de Sokal se efectuó agrupando los pacientes con Sokal intermedio o alto y se compararon respecto de los pacientes con índice de Sokal bajo. La única asociación significativa fue la observada para el SNP del gen *NQO2* rs2071002. El análisis determinó que el alelo C se asoció significativamente con valores de índice de Sokal intermedio y altos (OR= 3,138; IC: 1,19-8,22; p=0,02).

Tabla 13. Análisis de regresión logística de los SNPs con el índice de Sokal.

Gen/SNP	Alelos ^a	Sokal Bajo % ^b (n=36)	Sokal Int o Alto % ^b (n=64)	OR ^c	IC 95%	p
ABCB1						
rs1128503	C/T	63/37	39/61	0,68	0,33-1,38	0,287
rs2032582	G/T	62/38	43/57	0,79	0,39-1,56	0,492
rs1045642	C/T	63/37	61/39	1,09	0,56-2,14	0,793
ABCC3						
rs4148405	T/G	84/16	92/8	0,96	0,39-2,28	0,901
hOCT1						
rs628031	G/A	62/38	50/50	1,02	0,45-2,29	0,961
rs35191146	G/del	73/27	82/18	1,03	0,46-2,25	0,945
CYP1A1						
rs2606345	C/A	54/46	20/60	0,98	0,51-1,92	0,960
CYP1B1						
rs2617266	C/T	70/30	77/23	1,02	0,48-1,18	0,954
NQO2						
rs2071002	A/C	80/21	65/35	3,13	1,19 -8,2	0,020
rs2071003	C/T	70/30	85/15	0,82	0,38-1,73	0,595
rs2071004	G/A	73/27	85/15	0,77	0,36-1,65	0,506
rs1143684	T/C	73/27	85/15	0,69	0,32-1,53	0,366
GSTP1						
rs1695	A/G	64/36	61/39	0,93	0,44-1,92	0,837
TP53						
rs1042522	G/C	85/15	86/14	0,83	0,33-1,91	0,791

^a Alelo mayor/menor; ^b se muestra la frecuencia de alelo mayor/alelo menor; ^c ajustado por edad y sexo considerando al alelo mayor como referencia.

A su vez, para el análisis de la fase de enfermedad se agruparon los pacientes con fase acelerada y crisis blástica y se comparó respecto de los pacientes en fase crónica (Tabla 14). Solamente dos SNPs del gen *ABCB1* mostraron una relación con la fase de la enfermedad. Se observó una tendencia hacia la significación ($p=0,06$) para los portadores del alelo T del SNP rs1128503 con mayor riesgo de progresión a FA o CB (OR: 2,263; IC: 1,09-5,42, $p=0,06$). A su vez, se demostró que los pacientes portadores del alelo T del SNP rs2032582 se asoció con mayor riesgo de progresión a FA o CB (OR: 2,31; IC: 0,95-5,42, $p=0,05$).

Tabla 14. Análisis de regresión logística entre los SNPs con la Fase de la enfermedad.

Gen/SNP	Alelos ^a	FC % ^b (n=76)	FA-CB % ^b (n=16)	OR ^c	(IC 95%)	p
ABCB1						
rs1128503	C/T	63/37	39/61	2,26	1,09-5,42	0,06
rs2032582	G/T	62/38	43/57	2,31	0,95-5,42	0,05
rs1045642	C/T	55/45	47/53	1,21	0,54-2,71	0,63
ABCC3						
rs4148405	T/G	72/28	82/18	0,23	0,03-1,75	0,156
hOCT1						
rs628031	G/A	62/38	50/50	1,44	0,64-3,22	0,374
rs35191146	G/del	73/27	82/18	0,68	0,23-2,02	0,498
CYP1A1						
rs2606345	C/A	54/46	40/60	1,95	0,85-4,49	0,115
CYP1B1						
rs2617266	C/T	71/29	73/23	0,81	0,30-2,17	0,675
NQO2						
rs2071002	A/C	79/21	66/34	1,82	0,67-4,92	0,235
rs2071003	C/T	71/29	88/12	0,38	0,12-1,34	0,134
rs2071004	G/A	70/30	85/15	0,51	0,16-1,57	0,239
rs1143684	T/C	74/26	86/14	0,55	0,17-1,75	0,309
GSTP1						
rs1695	A/G	64/36	61/39	0,99	0,44-2,23	0,973
TP53						
rs1042522	G/C	80/20	79/21	1,16	0,39-3,41	0,790

^a Alelo mayor/menor; ^b se muestra la frecuencia de alelo mayor/alelo menor; ^c ajustado por edad y sexo considerando al alelo mayor como referencia; FC: Fase crónica; FA: Fase acelerada; CB: Crisis blástica.

A continuación se realizó este mismo análisis según las copias de *GSTM1* y *GSTT1* agrupando los pacientes con distinto número de copias con fines comparativos. Para *GSTM1* se definieron 3 grupos: 0, 2 y >2 copias. El grupo de >2 copias incluyó: 13 pacientes con 3 copias, 10 pacientes con 4 copias y dos pacientes con 5 y 6 copias de *GSTM1*. Por otro lado, para evaluar *GSTT1* se definieron también 3 grupos: < 2, 2 y >2 copias. El grupo < 2 copias incluye: 18 pacientes con 0 copias y 6 pacientes con 1 copia de *GSTT1*. Por otro lado, el grupo > 2 copias está formado por 7 pacientes portadores de 3 copias y 31 casos con 4 copias de *GSTT1*. El análisis de asociación con la variable Sokal se realizó agrupando según lo explicado anteriormente. La distribución de los

pacientes con distinto número de copias no mostró una asociación significativa con el índice de Sokal (**Tabla 15**).

Tabla 15. Asociación logística entre los polimorfismos en *GSTM1* y *GSTT1* con el Sokal.

<i>Gen</i>	Nº de copias	Sokal Bajo % (n=36)	Sokal Int o alto % (n=64)	OR ^a	IC 95%	P
<i>GSTM1</i>	0	42	39	1,22	0,59-2,51	0,58
	2	46	37			
	>2	12	24			
<i>GSTT1</i>	<2	20	21	0,89	0,31-2,40	0,74
	2	46	52			
	>2	35	27			

^a Ajustado por edad y sexo considerando el aumento de copias de *GSTM1* o *GSTT1* como riesgo.

Asimismo, la distribución de la fase de la enfermedad de los pacientes según el número de copias de *GSTM1* y *GSTT1*, tampoco mostró diferencias significativas comparando a los pacientes en FA/CB respecto de los FC (**Tabla 16**).

Tabla 16. Análisis de asociación logística entre los polimorfismos en *GSTM1* y *GSTT1* con la fase de la enfermedad.

<i>Gen</i>	Nº de copias	FC % (n=76)	FA-CB % (n=16)	OR ^a	IC 95%	P
<i>GSTM1</i>	0	40	33,3	1,46	0,63-3,38	0,37
	2	40	33,3			
	>2	20	33,3			
<i>GSTT1</i>	<2	19	23	0,96	0,26-3,61	0,96
	2	50	54			
	>2	31	23			

^a Ajustado por edad y sexo considerando el aumento de copias de *GSTM1* o *GSTT1* como riesgo. FC: Fase crónica; FA: Fase acelerada; CB: Crisis blástica.

4.2 Mutaciones en *BCR-ABL1*

Por último, se realizó el análisis de asociación entre la presencia o no de mutaciones en *BCR-ABL1* en función de los distintos polimorfismos evaluados en los 70 pacientes que fallaron al tratamiento (**Tabla 17**). El porcentaje de pacientes con o sin mutación en

BCR-ABL1 en función de los distintos alelos fue muy similar en todos los casos, por tal motivo el análisis de regresión no arrojó diferencias significativas.

Tabla 17. Análisis de regresión logística entre los SNPs con las mutaciones en *BCR-ABL1*.

Gen/SNP	Alelos ^a	No mutado % ^b (n=45)	Mutado% ^b (n=25)	OR ^c	IC 95%	P
ABCB1						
rs1128503	C/T	52/40	67/33	1,63	0,80 -3,32	0,176
rs2032582	G/T	60/40	46/54	1,58	0,80-3,11	0,183
rs1045642	C/T	65/35	50/50	0,59	0,23-0,98	0,126
ABCC3						
rs4148405	T/G	83/17	86/14	0,67	0,26-1,75	0,414
hOCT1						
rs628031	G/A	55/45	62/38	0,83	0,40-1,71	0,608
rs35191146	G/del	81/19	77/23	1,08	0,52-2,26	0,827
CYP1A1						
rs2606345	C/A	54/46	54/46	0,99	0,52-1,91	0,996
CYP1B1						
rs2617266	C/T	72/28	66/34	1,40	0,67-2,93	0,374
NQO2						
rs2071002	A/C	74/26	70/30	1,07	0,51-2,29	0,849
rs2071003	C/T	72/28	72/28	1,14	0,53-2,26	0,812
rs2071004	G/A	70/30	72/28	1,12	0,48-2,06	0,99
rs1143684	T/C	56/44	72/28	0,92	0,43-1,98	0,831
GSTP1						
rs1695	A/G	64/36	56/44	1,26	0,64-2,48	0,504
TP53						
rs1042522	G/C	75/25	80/20	0,70	0,29-1,71	0,435

^aAlelo mayor/menor; ^b se muestra la frecuencia de alelo mayor/alelo menor; ^c ajustado por edad y sexo considerando al alelo mayor como referencia.

Asimismo, la asociación entre la presencia o no de mutaciones en *BCR-ABL1* se analizó en función del número de copias de *GSTM1* y *GSTT1* según los tres grupos definidos previamente. Las comparaciones entre los diferentes grupos de pacientes no revelaron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 18**).

Tabla 18. Análisis de regresión logística entre el número de copias de *GSTM1* y *GSTT1* con la presencia o no de mutaciones en *BCR-ABL1*.

Gen	Nº de copias	No mutado % (n=45)	Mutado % (n=25)	OR ^a	IC 95%	P
<i>GSTM1</i>	0	17	23	1,29	0,63-2,63	0,47
	2	58	54			
	>2	25	23			
<i>GSTT1</i>	<2	18	23	0,49	0,31-2,24	0,81
	2	48	57			
	>2	34	20			

^aAnálisis ajustado por edad y sexo considerando el aumento de copias de *GSTM1* o *GSTT1* como riesgo.

5. Asociación de los polimorfismos genéticos con la respuesta al tratamiento

Se estudió la asociación entre los polimorfismos con la respuesta al tratamiento ya que los genes que participan en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los ITKs podrían influir en la respuesta al tratamiento. En primer lugar se estableció la relación de los polimorfismos evaluados con la obtención de la RCM y la RMM mediante el análisis de regresión logística ajustado por edad y sexo. En segundo lugar, se evaluó el tiempo hasta alcanzar la RMM (tRMM), dado que recientemente se ha hecho hincapié que no sólo es importante que los pacientes logren respuestas moleculares completas sino que el tiempo en el que se obtiene es una variable a considerar. Por último, se evaluó la sobrevida libre de fallo (SLF) y la sobrevida libre de eventos (SLE) a fin de determinar si la presencia de los polimorfismos puede alterar la eficacia del tratamiento. La comparación de las medias de sobrevidas se realizó mediante las curvas de Kaplan-Meier evaluando en todos los casos modelos recesivos y dominantes. El análisis con el test log-rank permitió definir el mejor modelo dado por la mayor significancia estadística. Los análisis que incluyen el tiempo hasta el evento también se analizaron por regresión de Cox ajustado por edad y sexo.

5.1 Respuesta Citogenética

El análisis de asociación entre los SNPs evaluados con la obtención de la RCM demostró que la distribución de frecuencias alélicas entre pacientes con y sin RCM fue muy similar. Sin embargo, se encontró que los SNPs de *NQ02* rs2071003 y rs2071004 se asocian con la RCM (**Tabla 19**). El análisis de regresión logística demostró que la presencia de los alelos T y A de los SNPs rs2071003 y rs2071004, respectivamente, son factores de riesgo para la falta de RCM (OR: 1,99; IC: 1,12-3,58; $p=0,019$ y OR: 1,93; IC 1,09-3,44 $p= 0,02$; respectivamente).

Tabla 19. Análisis de regresión logística entre los SNPs y la RCM.

Gen/SNP	Alelos ^a	Con RCM % ^b (n=78)	Sin RCM % ^b (n=40)	OR ^c	IC 95%	P
ABCB1						
rs1128503	C/T	50/50	57/43	1,28	0,77-2,14	0,334
rs2032582	G/T	62/38	54/46	1,09	0,58-1,65	0,943
rs1045642	C/T	64/36	62/38	0,76	0,40-1,16	0,155
ABCC3						
rs4148405	T/G	85/15	80/20	1,29	0,64-2,63	0,480
hOCT1						
rs628031	G/A	62/38	58/42	1,12	0,65-1,96	0,675
rs35191146	G/del	75/25	70/21	0,81	0,45-1,45	0,472
CYP1A1						
rs2606345	C/A	52/48	55/45	0,86	0,52-1,43	0,560
CYP1B1						
rs2617266	C/T	66/34	70/30	0,85	0,49-1,49	0,571
NQO2						
rs2071002	A/C	75/25	72/28	1,16	0,63-2,13	0,647
rs2071003	C/T	77/23	64/36	1,99	1,12-3,58	0,019
rs2071004	G/A	75/25	63/37	1,93	1,09-3,44	0,02
rs1143684	T/C	77/23	67/33	1,58	1,09-3,14	0,11
GSTP1						
rs1695	A/G	62/38	47/53	0,89	0,52-1,55	0,470
TP53						
rs1042522	G/C	77/23	80/20	0,74	0,39-1,56	0,488

^a alelo mayor/menor; ^b se muestra la frecuencia de alelo mayor/alelo menor; ^c ajustado por edad y sexo considerando al alelo mayor como referencia. RCM: Respuesta Citogenética Mayor.

A su vez, el análisis de asociación con la obtención de la RCM también se realizó para los polimorfismos en *GSTM1* y *GSTT1* (Tabla 20). Los resultados no mostraron diferencias significativas para los pacientes con diferente número de copias de *GSTM1*, así como tampoco para las copias de *GSTT1*.

Tabla 20. Regresión logística entre las copias de *GSTM1* y *GSTT1* con la RCM.

Gen	Número de copias	Con RCM % (n=78)	Sin RCM % (n=40)	OR ^a	IC 95%	p
<i>GSTM1</i>	0	39	48	1,28	0,71-2,17	0,36
	2	39	32			
	>2	22	20			
<i>GSTT1</i>	<2	16	17	1,21	0,69-2,25	0,182
	2	53	58			
	>2	30	25			

^a Análisis ajustado por edad y sexo considerando el aumento de copias de *GSTM1* o *GSTT1* como riesgo.
RCM: Respuesta Citogenética Mayor.

5.2 Respuesta Molecular

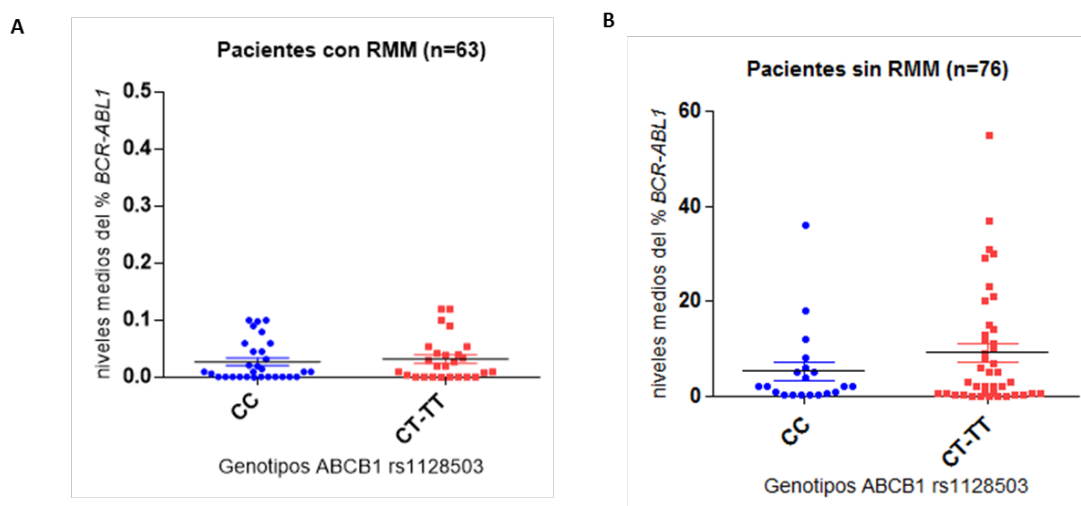
El análisis de regresión logística de los SNPs evaluados según la RMM se muestra en la **Tabla 21**. La distribución de las frecuencias alélicas de los distintos SNPs fue muy similar entre los pacientes con RMM y en aquellos sin RMM. Sin embargo, los resultados indican que el SNP de *ABCB1*rs1128503 presentó una asociación estadísticamente significativa con la RMM ($p=0,012$). La presencia del alelo T del SNP rs1128503 confiere casi 2 veces más riesgo para no lograr la RMM (OR: 1,92; IC: 1,18 - 3,14) (**Tabla 21**). Respecto de los otros polimorfismos evaluados, los análisis realizados no mostraron diferencias significativas, indicando que no influyen en la RMM.

Tabla 21. Análisis de regresión logística entre los SNPs con la falta o no de RMM.

Gen/SNP	Alelos ^a	Con RMM % ^b (n=63)	Sin RMM % ^b (n=76)	OR ^c	IC 95%	P
ABCB1						
rs1128503	C/T	48/52	30/70	1,92	1,18-3,14	0,012
rs2032582	G/T	41/59	40/60	1,36	0,84-2,07	0,206
rs1045642	C/T	47/53	49/51	0,95	0,60-1,49	0,816
ABCC3						
rs4148405	T/G	18/82	13/87	1,51	0,78-2,88	0,216
hOCT1						
rs628031	G/A	46/54	35/65	1,29	0,77-2,16	0,321
rs35191146	G/del	25/75	27/73	0,72	0,42-1,20	0,207
CYP1A1						
rs2606345	C/A	45/55	36/64	1,15	0,73-1,82	0,555
CYP1B1						
rs2617266	C/T	20/80	27/73	0,68	0,41-1,12	0,129
NQO2						
rs2071002	A/C	27/73	26/74	1,23	0,65-1,95	0,679
rs2071003	C/T	29/71	25/75	1,22	0,73-2,07	0,445
rs2071004	G/A	31/69	26/74	1,24	0,73-2,10	0,419
rs1143684	T/C	30/70	23/77	1,46	0,86-2,48	0,167
GSTP1						
rs1695	A/G	38/62	35/65	1,10	0,91-3,21	0,694
TP53						
rs1042522	C/G	22/72	21/79	1,19	0,65-2,19	0,576

^a Alelo mayor/menor; ^b se muestra la frecuencia de alelo mayor/alelo menor; ^c ajustado por edad y sexo considerando al alelo mayor como referencia. RMM: Respuesta Molecular Mayor.

Considerando que el SNP *ABCB1*rs1128503 se asoció con la RMM, se evaluó si esta diferencia se debe a los niveles medios de *BCR-ABL1*. Teniendo en cuenta que el alelo T se asoció con mayor riesgo para obtener la RMM, se analizó la media del porcentaje de *BCR-ABL1* entre los pacientes con genotipo CC respecto de los pacientes con genotipos CT-TT (**Figura 29**).



En el grupo de pacientes con RMM, los portadores de los genotipos CT-TT presentaron una media de *BCR-ABL1* de ($0,05 \pm 0,01$ %) respecto de los pacientes con genotipo CC ($0,03 \pm 0,006$ %) (**Figura 29 A**). Por otro lado, en los pacientes sin RMM, la media de *BCR-ABL1* fue mayor respecto del grupo anterior (**Figura 29 B**). Los pacientes con genotipo CT-TT mostraron una media de $9,3 \pm 1,9$ respecto de $5,3 \pm 1,8$ del grupo CC (**Figura 29 B**). Si bien tanto para el grupo con y sin RMM los pacientes con genotipo CT-TT (portadores del alelo de riesgo T del SNP *ABCB1*rs1128503) mostraron una media de *BCR-ABL1* mayor respecto del grupo CC, no se observaron diferencias significativas ($p=0,15$ y $p=0,21$).

Por otro lado, se evaluó la obtención de la RMM según el número de copias de los genes *GSTM1* y *GSTT1* (**Tabla 22**). El porcentaje de pacientes con y sin RMM estratificados en función de las copias de *GSTM1* y *GSTT1* fue muy similar entre ambos grupos, por lo tanto, el análisis de regresión logística no mostró diferencias significativas.

Tabla 22. Regresión logística entre las copias en *GSTM1* y *GSTT1* con la RMM.

Gen	Número de copias	Con RMM % (n=63)	Sin RMM% (n=76)	OR ^a	IC 95%	P
<i>GSTM1</i>	0	31	38	1,27	0,78-2,06	0,33
	2	45	36			
	>2	24	26			
<i>GSTT1</i>	<2	18	20	1,31	0,62-2,19	0,32
	2	51	50			
	>2	30	30			

^a Análisis ajustado por edad y sexo considerando el aumento de copias de *GSTM1* o *GSTT1* como riesgo.
RMM: Respuesta Molecular Mayor

5.3 Tiempo hasta la RMM (tRMM)

La media de tRMM observada en los pacientes para los SNPs estudiados se muestra en la **Tabla 23**. Al evaluar los distintos modelos genéticos mediante el test log-rank, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los polimorfismos estudiados, sugiriendo que la presencia de estos SNPs no influye en el tRMM.

Tabla 23. Análisis de la media de tRMM según el mejor modelo para los polimorfismos.

Gen/SNP	Genotipos	Mejor Modelo ^a	Media tRMM (meses)	p
ABCB1				
rs1128503	CC/CT/TT	CC vs. CT-TT	51,7 vs.49,5	0,78
rs2032582	GG/GT/TT	GG-GT vs.TT	49,4 vs.45,5	0,77
rs1045642	CC/CT/TT	CC-CT vs. TT	36,8 vs. 57,4	0,22
ABCC3				
rs4148405	TT/TG/GG	TT vs. TG-GG	44,4 vs.60,3	0,12
hOCT1 rs6280				
31	GG/GA/AA	GG-GA vs. AA	57,6 vs. 39,8	0,22
rs35191146	GG/Gdel/del/del	GG- Gdel vs. del/del	54,5 vs. 40,1	0,81
CYP1A1				
rs2606345	AA/AC/CC	AA vs.AC-CC	40,2 vs.30,4	0,59
CYP1B1				
rs2617266	CC/CT/TT	CC-CT vs.TT	38,9 vs.25,5	0,19
NQ02				
rs2071002	AA/AC/CC	AA vs.AC-CC	40,5 vs,37,7	0,71
rs2071003	CC/CT/TT	CC vs. CT-TT	45,3 vs.36,6	0,56
rs2071004	GG/GA/AA	GG vs.GA-AA	43,2 vs. 35,8	0,12
rs1143684	TT/CT/CC	TT vs. TC-CC	43,6 vs. 30,8	0,84
GSTP1				
rs1695	AA/AG/GG	AA-AG vs. GG	53,4 vs. 43,6	0,51
TP53				
rs1042522	GG/CG/CC	GG vs. GC-CC	47,2 vs. 34,5	0,91

^a determinado por el test Log-Rank luego de analizar todos los modelos genéticos posibles.

Además, se evaluó el tRMM en función de los polimorfismos de *GSTM1* y *GSTT1*. La comparación entre la media de tRMM de los pacientes con 0, 2 y >2 copias de *GSTM1* no reveló diferencias significativas (**Tabla 24**). Considerando que las medias de tRMM de los individuos con 2 y >2 copias de *GSTM1* fueron similares, estos se analizaron juntos formando el grupo ≥ 2 copias. El análisis mediante el test log-rank reveló que la media de tRMM de los pacientes con ≥ 2 copias de *GSTM1* (53,7 meses) estaba significativamente incrementada respecto de los de 0 copias (34,3 meses) ($p=0,049$). Este mismo análisis mediante el modelo de regresión de Cox, ajustado por edad y sexo estableció una tendencia hacia la significación ($p=0,078$) demostrando que los pacientes con ≥ 2 copias de *GSTM1* obtienen la respuesta molecular en tiempos más largos que los de 0 copias (HR: 1,8; IC: 0,93 – 3,67) (**Figura 30**). Por otro lado el análisis de los grupos con diferente número de copias de *GSTT1* no mostró diferencias significativas (**Tabla 24**).

Tabla 24. Media del tRMM en función de los polimorfismos de *GSTM1* y *GSTT1*.

Polimorfismo	Media de tRMM (meses)	p ^a
<i>GSTM1</i>		
0 copias	34,3	
2 copias	48,7	0,12
>2 copias	52	
≥ 2 copias ^b	53,7	0,049
<i>GSTT1</i>		
<2 copias	55,5	
>2 copias	33,5	
2 copias	50,6	0,31

^a test Log-Rank. ^b comparado respecto a los de 0 copias de *GSTM1*.

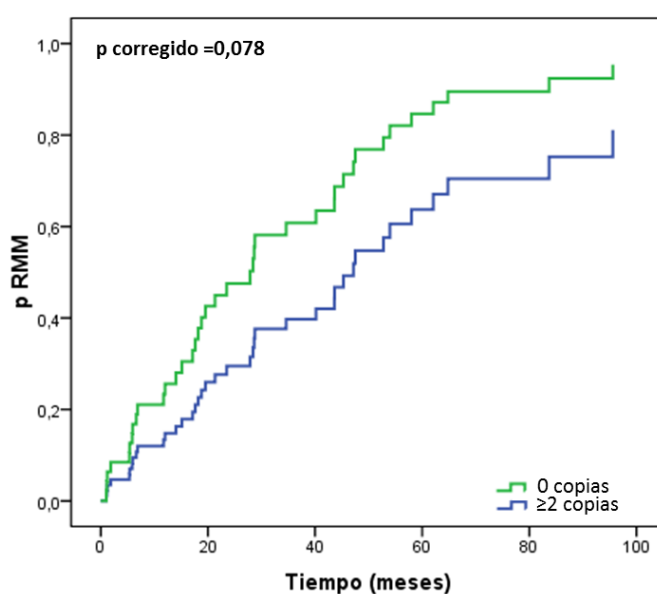


Figura 30. Análisis del tRMM por regresión de Cox para *GSTM1*. Se grafica la probabilidad de obtener la RMM en función del tiempo en meses. Análisis ajustado por edad y sexo.

5.4 Sobrevida libre de Fallo al tratamiento (SLF)

La asociación entre los SNPs evaluados con la SLF estratificado de acuerdo a los distintos genotipos se muestra en la **Tabla 25**. Se realizó un análisis estadístico con el test log-rank y se determinó el mejor modelo. Se observó que los SNPs *ABCB1*rs1045642 y el *GSTP1* rs1695 mostraron asociación significativa con la SLF.

Tabla 25. Análisis de la media de SLF según el mejor modelo para los polimorfismos.

SNP	Genotipos	Mejor Modelo ^a	Media SLF (meses)	P
ABCB1				
rs1128503	CC/CT/TT	CC vs. CT-TT	72,3 vs. 61,2	0,41
rs2032582	GG/GT/TT	GG-GT vs. TT	70,9 vs. 55,5	0,46
rs1045642	CC/CT/TT	CC vs. CT-TT	35,6 vs. 74,5	0,02
ABCC3				
rs4148405	TT/TG/GG	TT vs. TG-GG	65,4 vs. 35,7	0,32
hOCT1				
rs628031	GG/GA/AA	GG-GA vs. AA	59,2 vs. 80,4	0,64
rs35191146	GG/Gdel/deldel	GG vs. Gdel-deldel	55,3 vs. 64,5	0,57
CYP1A1				
rs2606345	AA/AC/CC	AA-AC vs. CC	59,2 vs. 55,2	0,64
CYP1B1				
rs2617266	CC/CT/TT	CC-CT vs. TT	55,8 vs. 90,4	0,15
NQ02				
rs2071002	AA/AC/CC	AA vs. AC-CC	68,5 vs. 42,2	0,20
rs2071003	CC/CT/TT	CC vs. CT-TT	67,7 vs. 35,3	0,33
rs2071004	GG/GA/AA	GG vs. GA-AA	63,4 vs. 36,1	0,47
rs1143684	TT/CT/CC	TT vs. TC-CC	64,3 vs. 36,7	0,24
GSTP1				
rs1695	AA/AG/GG	AA-AG vs. GG	35,5 vs. 19,2	0,03
TP53				
rs1042522	GG/GC/CC	GG vs. CG-CC	34,9 vs. 58,3	0,08

^a determinado por el test Log-Rank luego de analizar todos los modelos genéticos posibles.

La media de SLF en los pacientes portadores del genotipo CC del SNP *ABCB1*rs1045642 fue significativamente menor (35,6 meses) respecto de los portadores de los genotipos CT-TT (74,5 meses) siguiendo el modelo dominante (CC vs. CT-TT) ($p=0,02$) (**Tabla 25**). Este mismo resultado se demostró con el modelo de regresión de Cox ajustado por edad y sexo (HR: 1,85 IC 95%: 1,2-3,2; $p=0,017$) (**Figura 31 A**). A su vez, el análisis del SNP *GSTP1* rs1695 mostró que los portadores de los genotipos GG tuvieron una media de SLF de 19,2 meses, significativamente menor a la observada en los pacientes del grupo AA-AG (35,5 meses) (**Tabla 25**). El análisis corregido del modelo recesivo (AA-AG vs. GG) por regresión de Cox mantuvo esta significación (HR: 1,30; IC: 1,69-2,20; $p=0,02$) (**Figura 31 B**). Una tendencia hacia la significación ($p=0,08$), se observó para los pacientes con genotipo *TP53*-GG y menor media de SLF (34,9 meses) respecto de los portadores de genotipo *TP53* CG-CC (58,3 meses) mediante el test log-rank (**Tabla 25**).

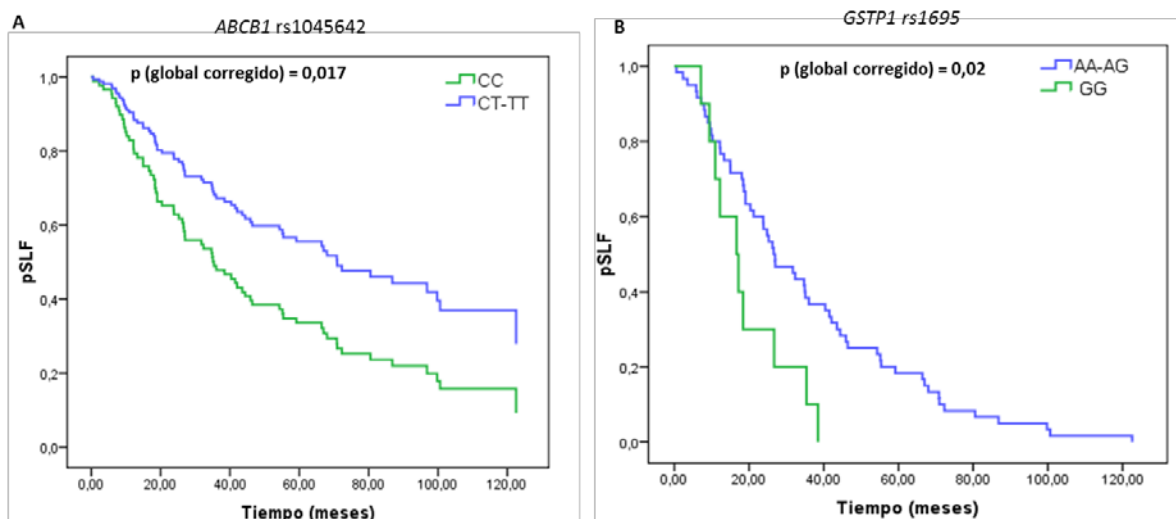


Figura 31. Análisis de la SLF por regresión de Cox. Se grafica la probabilidad de SLF en función del tiempo en meses. **A)** *ABCB1* rs1045642 según el modelo dominante **B)** *GSTP1* rs1695 según el modelo recesivo.

Asimismo, se evaluó la SLF teniendo en cuenta las variaciones en el número de copias de los genes *GSTM1* y *GSTT1* (Tabla 26). Una tendencia hacia la significación ($p=0,063$) se observó para la SLF según el número de copias de *GSTM1* (Tabla 26). Al agrupar a los pacientes con 2 copias junto con los de >2 copias de *GSTM1*, la media de SLF para este grupo, denominado ≥ 2 copias, fue significativamente menor (63,5 meses) respecto de los de 0 copias (91,5 meses) ($p=0,04$). El análisis de regresión de Cox para este análisis reveló una tendencia hacia la significación (HR: 1,69 IC: 0,99-2,89; $p=0,054$) (Figura 32). Para el caso de *GSTT1*, no se encontraron diferencias significativas al realizar el análisis estratificado según el número de copias (Tabla 26).

Tabla 26. Análisis de SLF y las copias de *GSTM1* y *GSTT1*.

Polimorfismo	Media de SLF (meses)	p^a
<i>GSTM1</i>		
0 copias	91,5	
2 copias	67,9	0,063
>2 copias	47,6	
≥ 2 copias ^b	63,5	0,04
<i>GSTT1</i>		
<2 copias	63,1	
2 copias	85,3	0,87
>2 copias	66,7	

^a test Log-Rank. ^b comparado respecto a los de 0 copias de *GSTM1*.

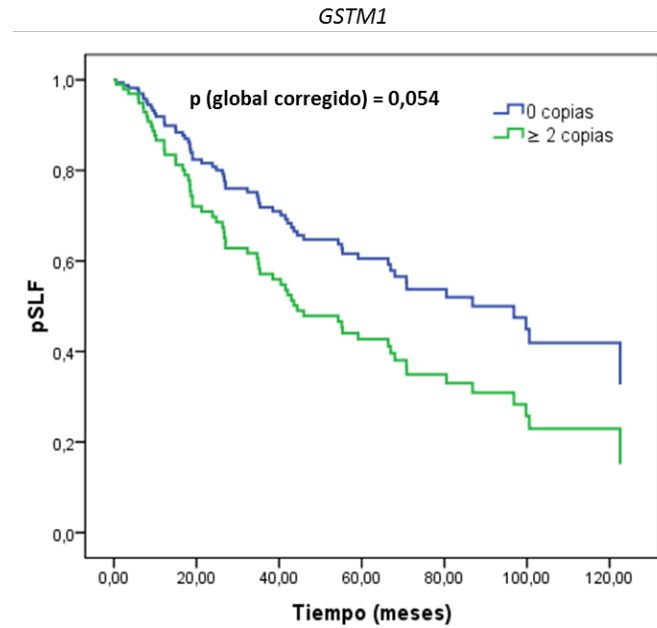


Figura 32. Análisis de la SLF por regresión de Cox para *GSTM1*. Se grafica la probabilidad de obtener la RMM en función del tiempo en meses. Análisis ajustado por edad, sexo.

5.5 Sobrevida libre de Eventos (SLE)

La asociación de los polimorfismos con la SLE establecida mediante el test log-rank se resume en la **Tabla 27**. Se encontró una asociación significativa entre la SLE y los polimorfismos *CYP1B1* rs2617266, *NQO2* rs2071003 y rs2071004. Los portadores de los genotipos CC-CT del SNP *CYP1B1* rs2617266 mostraron menor SLE respecto de los pacientes con genotipo TT ($p=0,012$). Esta significancia estadística se mantuvo con el análisis de regresión de Cox ajustado por edad y sexo (HR: 2,23; IC 95%: 1,1-4,7; $p=0,026$) (**Figura 33 A**).

Tabla 27. Análisis de la SLE y los polimorfismos por el test log- Rank.

<i>SNP</i>	Genotipos	Mejor Modelo	Media SLE (meses)	p^a
ABCB1				
rs1128503	CC/CT/TT	CC-CT vs. TT	50.4 vs. 35.8	0.56
rs2032582	GG/GT/TT	GG-GT vs. TT	55.2 vs. 38.9	0,73
rs1045642	CC/CT/TT	CC vs. CT-TT	26,3 vs. 58,3	0,06
ABCC3				
rs4148405	TT/TG/GG	TT vs. TG-GG	50,4 vs. 67,5	0,21
hOCT1				
rs628031	GG/GA/AA	GG-GA vs. AA	44,9 vs. 64,5	0,61
rs35191146	GG/Gdel/deldel	GG vs. Gdel-deldel	55,1 vs. 34,5	0,24
CYP1A1				
rs2606345	AA/AC/CC	AA vs. AC-CC	36,3 vs. 58,6	0,16
CYP1B1				
rs2617266	CC/CT/TT	CC-CT vs. TT	61,5 vs. 106,8	0,012
NQO2				
rs2071002	AA/AC/CC	AA vs. AC-CC	54,2 vs. 50,6	0,98
rs2071003	CC/CT/TT	CC vs. CT-TT	73,2 vs. 34,5	0,04
rs2071004	GG/GA/AA	GG vs. GA-AA	72,2 vs. 29,3	0,04
rs1143684	TT/CT/CC	TT vs. TC-CC	54,2 vs. 50,1	0,81
GSTP1				
rs1695	AA/AG/GG	AA-AG vs. GG	115 vs. 70,4	0,049
TP53				
rs1042522	GG/GC/CC	GG vs. GC-CC	52,2 vs. 80,5	0,04

^a determinado por el test Log-Rank luego de analizar todos los modelos genéticos posibles.

Asimismo, el análisis del polimorfismo *NQO2* rs2071003 mostró que el grupo CT-TT presentó una media de SLE significativamente menor (34,5 meses) respecto de los pacientes con genotipo CC (73,21 meses) ($p=0,034$) (Tabla 27). Además, para el SNP *NQO2* rs2071004 se estableció que la media de SLE del grupo GA-AA (29,25 meses) difirió significativamente respecto de los portadores del genotipo GG (72,20 meses) ($p= 0,04$). El análisis de regresión de Cox según el modelo dominante para el SNP *NQO2*rs2071003 mantuvo la significación (HR: 1,45; IC: 1,03-2,23; $p=0,031$), al igual que para el SNP rs2071004 (HR: 1,51; IC95%: 1,1-2,21; $p=0,04$) (Figura 33 B y C).

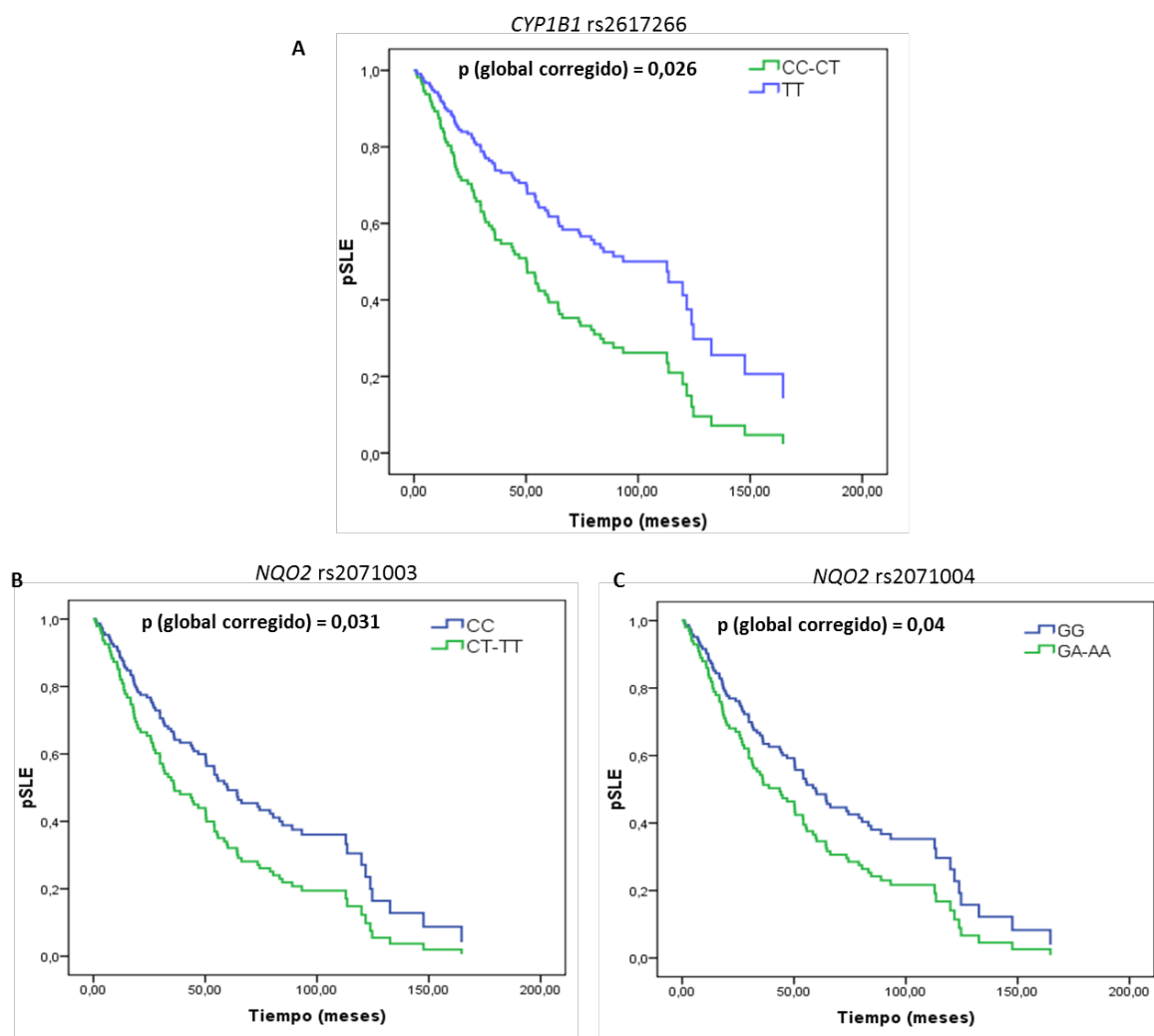


Figura 33. Análisis de la SLE por regresión de Cox ajustado por edad y sexo. Se grafica la probabilidad de SLE en función del tiempo en meses. **A)** SNP *CYP1B1* rs2617266 considerando un modelo recesivo **B)** SNP *NQO2* rs2071003 considerando el modelo dominante. **C)** SNP *NQO2* rs2071004 considerando el modelo dominante.

El análisis del gen *GSTP1* demostró que los pacientes con genotipo GG presentaron una media de SLE (70,4 meses) significativamente menor respecto de los portadores de los genotipos AA-AG (115 meses) ($p=0,049$) (**Tabla 27**). El análisis de la SLE por regresión de Cox corregido mantuvo esta significación (HR: 3,45 IC: 1,09-10,8; $p=0,034$) (**Figura 34 A**). Por otro lado, se observó que si bien el SNP *TP53* rs1042522 presentó una asociación significativa con la SLE mediante el test log-rank ($p=0,04$) (**Tabla 27**), el análisis de regresión de Cox ajustado mostró una tendencia hacia la significación (HR: 1,15 IC: 0,97-2,5, $p=0,07$) (**Figura 34 B**).

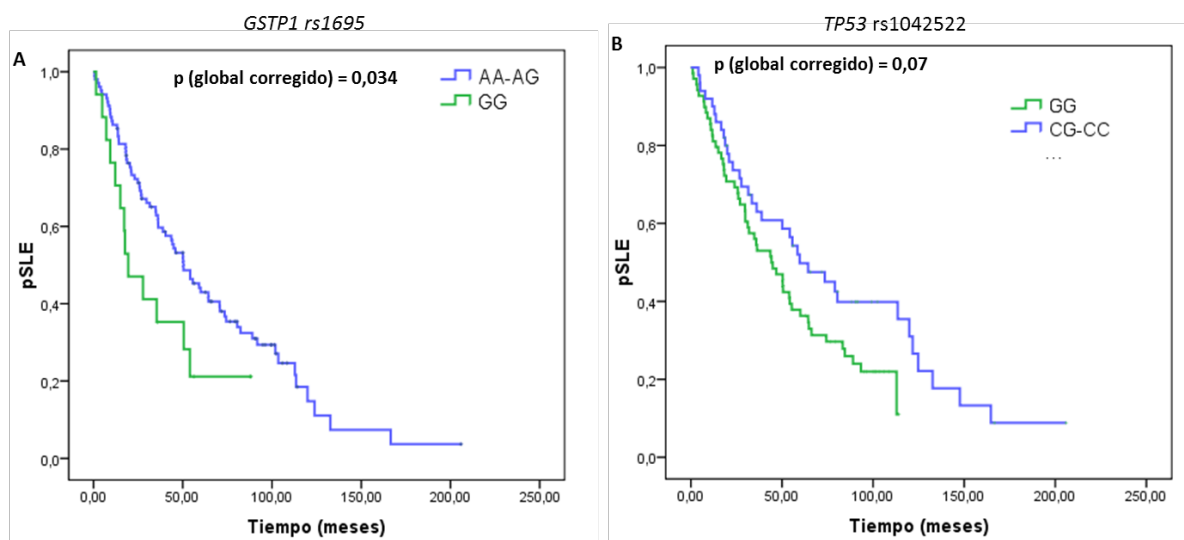


Figura 34. Análisis de la SLE por regresión de Cox ajustado por edad y sexo. Se grafica la probabilidad de SLE en función del tiempo en meses. A) SNP *GSTP1* rs1695, B) SNP *TP53* rs1042522.

La media de SLE según el número de copias de *GSTM1* y *GSTT1* se muestra en la **Tabla 28**. Teniendo en cuenta que las medias de SLE de los pacientes con 2 copias y más de 2 copias de *GSTM1* fueron similares, se analizaron conjuntamente formando un grupo ≥ 2 copias de *GSTM1*. La media de SLE de 58,7 meses de este grupo fue significativamente menor a la observada para los individuos con 0 copias del gen (84,7 meses) ($p=0,044$). Este resultado se confirmó mediante el análisis de regresión de Cox (HR: 1,61 IC: 1,07-2,6 $p=0,04$) (**Figura 35**). Por otro lado, la media de SLE de los pacientes con diferente número de copias de *GSTT1* no mostró diferencias significativas (**Tabla 28**).

Tabla 28. Análisis de la SLE y las copias de *GSTM1* y *GSTT1*.

Polimorfismo	Media de SLE (meses)	p^a
<i>GSTM1</i>		
0 copias	84,2	
2 copias	59,4	0,12
>2 copias	56,6	
≥ 2 copias ^b	58,7	0,044
<i>GSTT1</i>		
<2 copias	73,7	
2 copias	72,9	0,58
>2 copias	58,6	

^a test Log-Rank. ^b comparado respecto a los de 0 copias de *GSTM1*.

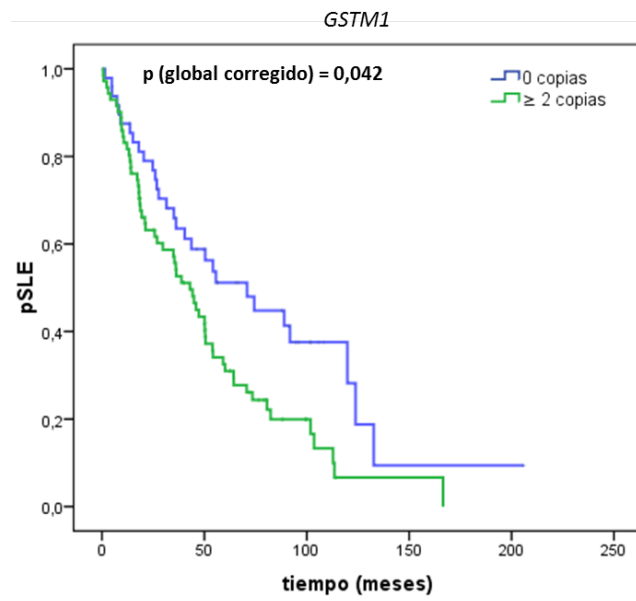


Figura 35. Análisis de la SLE por regresión de Cox ajustado por edad y sexo para el polimorfismo en *GSTM1*. Se grafica la probabilidad de SLE en función del tiempo en meses.

6. Análisis de haplotipos

6.1 Cálculo del Desequilibrio de Ligamiento

Se realizó el cálculo del desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*, LD) entre los polimorfismos estudiados sin tener en cuenta los SNPs monoalélicos. Considerando los criterios de inclusión para el análisis establecido por el programa Haploview (*cutoff* de $EHW=0,0001$ y porcentaje mínimo de genotipificación del 75%), se determinaron los LD *plot* teniendo en cuenta los valores de D' y el r^2 , tal como se muestra en la **Figura 36**.

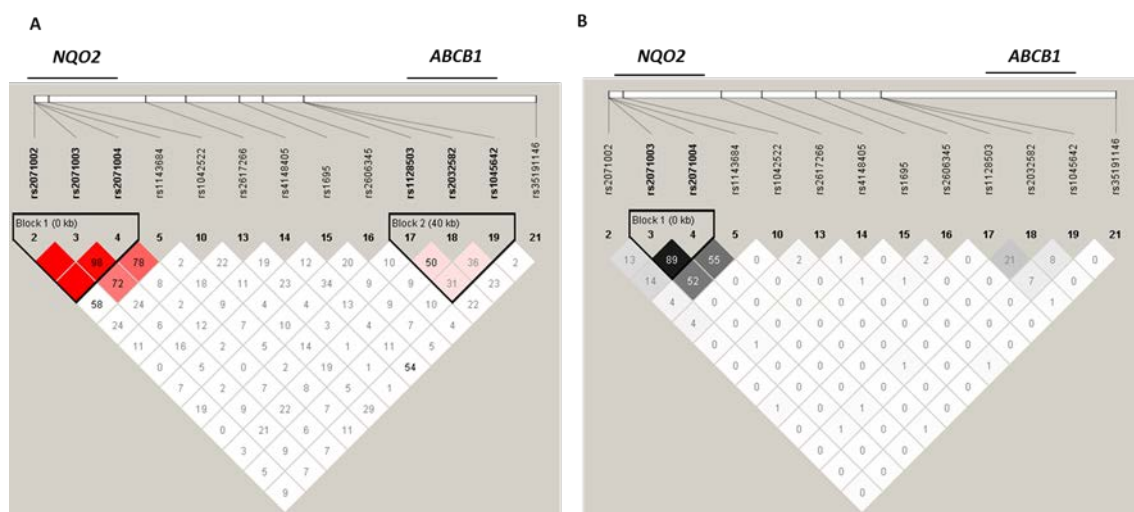


Figura 36. Desequilibrio de ligamiento (LD) en los polimorfismos de *NQO2* y *ABCB1*. Cada rombo representa una relación de LD por parejas formadas entre los SNPs. **A)** Se representa los valores de D' estableciendo un bloque 1 formado por los SNPs de *NQO2* (rs2071002, rs2071003, rs2071004) en fuerte desequilibrio de ligamiento ($D'=1$). El bloque 2 formado por los SNPs de *ABCB1* (rs1128503, rs2031582, rs1045642) en desequilibrio de ligamiento intermedio ($D'=0,31$). Color rojo (fuerte ligamiento), color rosa (Ligamiento intermedio), color blanco (sin ligamiento). **B)** Se representan los valores de r^2 estableciendo un bloque en fuerte desequilibrio de ligamiento ($r^2=0,89$) entre los SNPs *NQO2* (rs2071003 y rs2071004). Color negro (fuerte ligamiento), color gris (ligamiento intermedio), color blanco (sin ligamiento).

Se estableció un bloque en fuerte desequilibrio de ligamiento con un $D'=1$, conformado por 3 polimorfismos (rs2071002, rs2071003, rs2071004) del gen *NQO2* (**Figura 36**). Además, se observó un bajo desequilibrio de ligamiento ($D'=0,31$), para los tres polimorfismos del gen *ABCB1* (rs1128503, rs2031582, rs1045642). Según los valores del r^2 se estableció un bloque en fuerte desequilibrio de ligamiento entre dos SNPs del gen *NQO2* (rs2071003 y rs2071004) ($r^2=0,89$), mientras que para los tres

polimorfismos del gen *ABCB1* se observaron valores de r^2 más bajos. El análisis de ligamiento utilizando el valor del r^2 es más estricto ya que el valor de D' se ve afectado por frecuencias alélicas bajas. De este modo se considera que el valor de r^2 es el más adecuado para determinar el ligamiento por lo tanto se estableció un único bloque haplotípico formado por los SNPs rs2071003 y rs2071004 del gen *NQO2*.

6.2 Haplotipos de *NQO2* y su asociación con los parámetros clínicos y la respuesta al tratamiento

En primer lugar, se calcularon las frecuencias observadas para los haplotipos de *NQO2* (Tabla 29). Se determinaron 3 haplotipos, siendo el más frecuente CG, presente en el 70,9% de los pacientes, seguido de los haplotipos TA y CA que presentaron frecuencias menores.

Tabla 29. Distribución de las frecuencias haplotípicas de los genes *NQO2*.

Haplotipos		Frecuencia
rs2071003	rs2071004	
C	G	0,709
T	A	0,270
C	A	0,018

A continuación, teniendo en cuenta que la presencia de polimorfismos en desequilibrio de ligamiento, pueden causar efectos sinérgicos, se estudió la relación de los distintos haplotipos de *NQO2* con los parámetros RCM, RMM y fallo al tratamiento, Sokal, fase de enfermedad y presencia de mutaciones en *BCR-ABL1* (Figura 37 A y B).

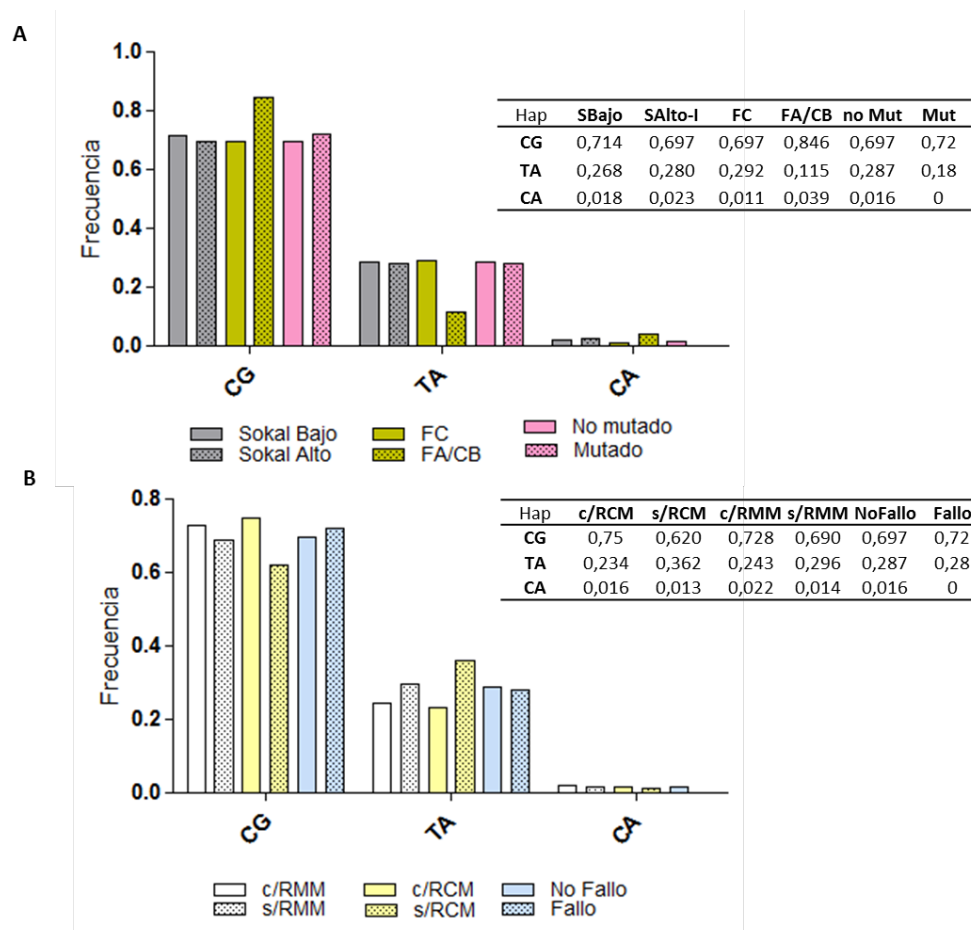


Figura 37. Distribución de frecuencias haplotípicas de *NQO2*. A) Análisis del índice de Sokal, fase de enfermedad y mutación. Pacientes con Sokal bajo (gris) y sokal Alto/intermedio (gris punteado); en fase crónica (mostaza) y fase acelerada/crisis blástica (mostaza punteado), no mutados (rosa) y mutado en *BCR-ABL1* (rosa punteado). **B) Análisis de la respuesta citogenética, molecular y respuesta tratamiento.** Pacientes con RCM (blanco) y sin RCM (blanco punteado); con RMM (amarillo) y sin RCM (amarillo punteado); los cuales no fallaron al tratamiento (azul) y los que fallaron (azul punteado). En las tablas se muestran las frecuencias correspondientes cada barra.

Se observaron frecuencias muy similares en la distribución de los pacientes según los distintos parámetros clínicos evaluados respecto de los haplotipos en *NQO2*. Sin embargo, se encontró que los pacientes en FA o CB presentaron una frecuencia relativamente mayor del haplotipo CG y menor del TA (**Figura 37 A**). A su vez, se encontró que los pacientes sin RCM presentaron mayor frecuencia del haplotipo TA (**Figura 37 B**).

La asociación entre los haplotipos de *NQO2* con los parámetros clínicos y la respuesta al tratamiento se evaluó por medio de un análisis de regresión logística comparando los haplotipos TA y CA respecto al haplotipo más frecuente CG, como referencia. Se

encontró que el haplotipo **TA** de *NQO2* es un factor de riesgo para que los pacientes no obtengan la RCM (OR: 1,59 IC95%: 1,08-2,76; p=0,04). Sin embargo, para los otros parámetros evaluados no se observaron diferencias significativas (**Tabla 30**).

Tabla 30. Análisis de regresión logística para haplotipos del gen *NQO2* con las características clínicas.

Haplotipo	Fase	Sokal	Mutaciones	RCM	RMM	Fallo tto
OR (IC95%) ^a						
CG	Referencia					
TA	0,34 (0,10-1,21)	0,83 (0,39-1,75)	1,21 (0,72-4,23)	1,59 (1,08-2,76)	1,41 (0,83-2,46)	1,27 (0,74-2,16)
p	0,099	0,63	0,67	0,04	0,21	0,39
CA	3,68 (0,26-5,23)	0,48 (0,04 -5,51)	1,59 (0,92-2,76)	0,60 (0,06-5,67)	ND	ND
p	0,34	0,56	0,76	0,64	0,98	0,78

^aajustado por edad y sexo. RMM: Respuesta Molecular Mayor; RCM: Respuesta Citogenética Mayor; Tto: tratamiento; ND: No determinado.

7.SNPScore

Teniendo en cuenta que varios SNPs mostraron una asociación significativa con la SLF y SLE, a continuación se diseñó un score para definir distintos grupos de riesgo. En base a los resultados de los análisis individuales de los SNPs y la SLE, se determinó un SNP score considerando *ABCB1*rs1045642 y *GSTP1* rs1695, los cuales fueron previamente asociados con la SLF. Se asignó un valor de 1 punto a cada uno de los genotipos de riesgo de ambos SNPs considerando: riesgo 0 a los genotipos: *ABCB1* CT-TT y *GSTP1* AA-AG; riesgo 1 a los genotipos *ABCB1*-CC o bien *GSTP1*-GG y riesgo 2 a los genotipos *ABCB1*-CC más *GSTP1*-GG. De esta forma se establecieron dos grupos de bajo y alto riesgo con diferencias significativas en la SLF (**Figura 38**). El primer grupo contiene a los individuos que no poseen ningún genotipo de riesgo y el otro incluye a aquellos pacientes con 1 y 2 genotipos de riesgo. De este modo, se determinó que los pacientes de este último grupo tienen significativamente menor SLF, sugiriendo que el mayor número de variantes de estos SNPs es un factor de riesgo para la falta de respuesta al tratamiento ($p=0,02$; HR: 1,71 IC: 95%: 1,07- 2,73).

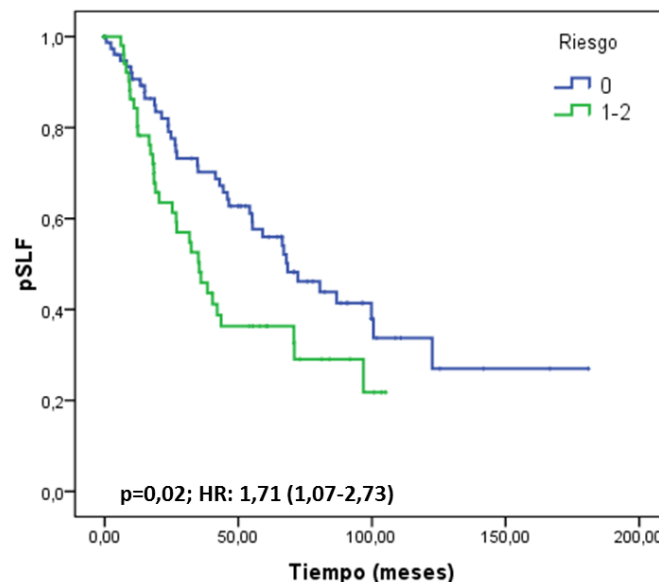


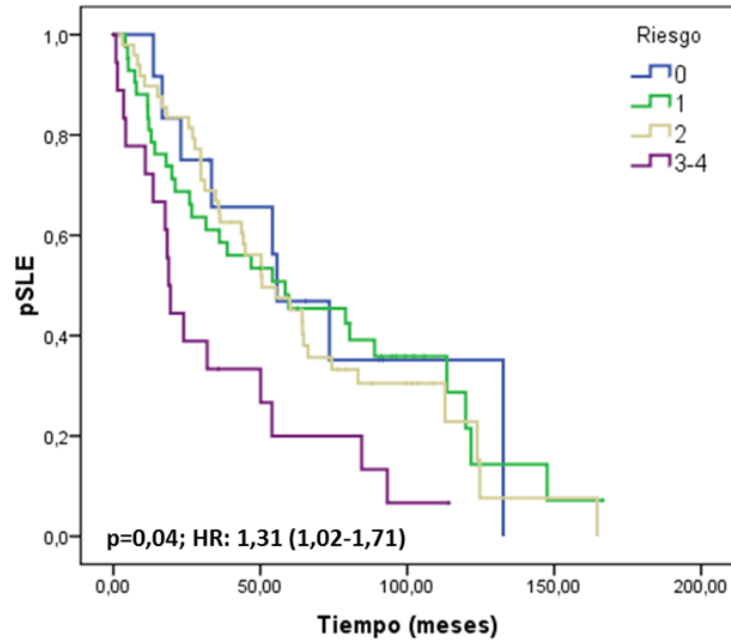
Figura 38. Score Genético para SLF. Se determinó un grupo de bajo riesgo con individuos que no poseen ningún genotipo de riesgo y otro de alto riesgo con aquellos pacientes con 1 y 2 genotipos de riesgo. Este último grupo tiene significativamente menor SLF y por lo tanto mayor riesgo de fallar al tratamiento respecto de los pacientes con puntuación 0. HR: Hazard ratio.

Por otro lado, se estableció un score genético para la SLE según los diferentes genotipos de riesgo de los SNPs: *CYP1B1* rs2617266, *NQ02* rs2071003, *NQ02* rs2071004, *GSTP1* rs1695 y *TP53* rs1042522. Para ello se definió un sistema de puntuación en el cual se asignó un valor de uno a cada genotipo de riesgo, tal como se detalla en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Sistema de puntuación para los genotipos de riesgo asociados a SLE.

Genes	SNPs	Genotipos de riesgo	Puntuación
<i>CYP1B1</i>	rs2617266	CC-CT	1
<i>NQ02</i>	rs2071003	CT-TT	1
	rs2071004	GA-AA	1
<i>GSTP1</i>	rs1695	GG	1
<i>TP53</i>	rs1042522	GG	1

Con este sistema de puntuación se definieron dos grupos con diferencias significativas en la SLE. El primer grupo de bajo riesgo con puntuación 0,1 y 2 y el otro de algo riesgo con puntuación 3-4 (**Figura 39**). El análisis estadístico demostró que el grupo de alto riesgo tiene menor SLE y por lo tanto mayor riesgo de sufrir eventos durante la enfermedad respecto a los otros grupos ($p=0,04$; HR: 1,31; IC95%: 1,02-1,71).



Grupos de riesgo	riesgo
Bajo	0
	1
	2
Alto	3-4

Figura39. SNP Score para SLE. Se establecieron dos grupos con diferencias significativas en la SLE. El grupo de bajo riesgo incluyó pacientes con puntuación 0, 1 y 2 y el de alto riesgo con puntuación 3-4. Los pacientes con un score de 3 y 4 tienen significativamente menor SLE y por lo tanto mayor riesgo de tener eventos durante la enfermedad. HR: *Hazard ratio*.

Resumen de Resultados

Susceptibilidad a LMC

- El estudio de caso-control reveló una tendencia hacia la significación para el SNP *GSTP1*rs1695 de acuerdo a un modelo recesivo, mientras que la combinación de los genotipos *GSTP1*-GG/*GSTM1*-nulo o *GSTP1*-GG/*GSTT1*-nulo se asoció con la susceptibilidad para LMC.
- El análisis del SNP *TP53* rs1042522 reveló que el genotipo CC es un factor protector para la LMC.

Asociación de los polimorfismos con índice de Sokal, fase de enfermedad y mutaciones en *BCR-ABL1*

- El SNP del gen *NQO2* rs2071002 se asoció con mayor riesgo a índice de Sokal intermedio o alto.
- Los SNPs del gen *ABCB1* rs1128503 y rs2032582 se asociaron con mayor riesgo de progresión a FA o CB.
- No se observó asociación entre los polimorfismos con la presencia de mutaciones en *BCR-ABL1*.

Asociación de los polimorfismos con la respuesta al tratamiento.

- Los SNPs *NQO2* rs2071003 y rs2071004 son factores de riesgo para la falta de RCM.
- El SNP *ABCB1* rs1128503 se asoció con la falta de RMM.
- Los genotipos de *GSTM1*≥2 copias mostraron una tendencia hacia la significación con mayor tRMM.

- Los genotipos de riesgo de *GSTM1* ≥ 2 copias y los SNPs *ABCB1* rs1045642 y *GSTP1* rs1695 se asociaron significativamente con menor SLF.
- Los genotipos de riesgo de los polimorfismos *CYP1B1* rs2617266, *NQ02* rs2071003, *NQ02* rs2071004, *GSTP1* rs1695 y *GSTM1* ≥ 2 copias se asociaron significativamente con menor SLE. Una tendencia hacia la significación se observó para el SNP *TP53* rs1042522.

Análisis de Haplotipos

- Se estableció que los SNPs *NQ02* rs2071003 y *NQ02* rs2071004 estaban en fuerte desequilibrio de ligamiento y el haplotipo TA se asoció con mayor riesgo de falta de RCM.

SNP Score

- El score genético para la SLF definió un grupo de alto riesgo que incluye a los pacientes con 1-2 genotipos de riesgo de los SNPs *ABCB1* rs1045642 y *GSTP1* rs1695.
- El score genético para la SLE considerando los SNPs *CYP1B1* rs2617266, *TP53* rs1042522, *NQ02* rs2071003, *NQ02* rs207100 y *GSTP1* rs1695 definió un grupo de alto riesgo para los portadores de 3-4 genotipos de riesgo de estos SNPs.

Discusión

La LMC se caracteriza por la presencia del gen *BCR-ABL1* resultado de la translocación recíproca t(9;22) (q34;q11) conocido como cromosoma *Philadelphia (Ph)*. Este gen de fusión produce un aumento de la capacidad proliferativa, disminución de la muerte celular programada, activación mitogénica y la independencia de los factores de crecimiento (Hwan et al., 2009). El hecho que la expresión del *BCR-ABL1* sea un contribuyente fundamental para la patogénesis y progresión de la enfermedad, condujo a la síntesis de los ITKs los cuales revolucionaron el tratamiento de la LMC. Sin embargo, aún no se conocen otros factores genéticos los cuales pueden influir en la predisposición individual al desarrollo de LMC o en la diversidad de respuestas a los ITKs. De esta forma, en el presente trabajo se estudió la influencia de la variabilidad interindividual mediada por polimorfismos genéticos a fin de identificar nuevos marcadores de susceptibilidad y respuesta farmacogenética en LMC.

El gen *BCR-ABL1* desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la LMC sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo exacto por el cual desencadena la enfermedad. Luego del descubrimiento del cromosoma Ph, diversos estudios *in vitro* han intentado generar el modelo de LMC en ratones mediante la introducción de la proteína de fusión *BCR-ABL1* en las células hematopoyéticas. Como resultado, los ratones obtuvieron una enfermedad similar a la LMC aunque muchos casos tuvieron falta de la enfermedad en FC y desarrollaron predominantemente linfomas de tipo B y T (Elefanty et al., 1990; Gishizky et al., 1993; Kelliher et al., 1990). En otros modelos experimentales, la introducción del *BCR-ABL1* en ratones ha demostrado ser suficiente para inducir la enfermedad y para su mantenimiento (Era & Witte, 2000; Huettner et al., 2000). Sin embargo, la detección del gen de fusión *BCR-ABL1* en un nivel muy bajo en la sangre de individuos sanos sugiere que sólo una pequeña fracción de estos individuos con la translocación cromosómica Ph espontánea terminan en un desorden mieloproliferativo (Hwan et al., 2009). Por consiguiente, es posible especular que la iniciación de la LMC requiere otros eventos celulares o moleculares que predispongan a la enfermedad. De este modo, se considera que el gen quimérico *BCR-ABL1* por sí solo no es insuficiente para el desarrollo de LMC. Teniendo en cuenta que factores genéticos inherentes podrían contribuir a desencadenar la LMC, dos grandes estudios

han evaluado diversos SNPs a fin de determinar su relación con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. El trabajo de Hwan et al. (2009) evaluó numerosos SNPs en vías relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos, apoptosis, crecimiento celular, angiogénesis, y la vía de interferón. A su vez, otro estudio analizó un gran número de pacientes con LMC abarcando 1916 genes candidatos determinando un *score* de riesgo para el desarrollo de la LMC (Bruzzoni-Giovanelli et al., 2015). Sin embargo, ninguno de estos estudios, incluyó el análisis de los polimorfismos en los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *TP53*. Uno de los objetivos planteados en este trabajo de Tesis fue el estudio de la influencia de los polimorfismos en dichos genes a fin de determinar el rol de la variabilidad genética interindividual en la susceptibilidad a desarrollar LMC.

En el presente trabajo, el análisis individual de los polimorfismos en los genes GSTs, permitió establecer que los genotipos *GSTM1*-nulo y *GSTT1*-nulo, no se asociaron significativamente con la susceptibilidad a LMC. Se estableció una tendencia a la significación para el SNP *GSTP1* rs1695 siguiendo un modelo recesivo. Asimismo, se encontró que el polimorfismo *TP53* rs1042522 es un co-factor de susceptibilidad para LMC de acuerdo a un modelo recesivo, sugiriendo que el alelo *TP53*-C del SNP rs1042522 en homocigosis es un factor protector para la enfermedad. En cuanto a la influencia de la edad y el género en la distribución de los polimorfismos en los genes GSTs, no se observaron diferencias significativas para los polimorfismos de *GSTM1* y *GSTP1*. Sin embargo, dentro del grupo mayores de 50 años, la frecuencia de *GSTT1*-nulo fue significativamente menor en los pacientes respecto de los controles. Este resultado coincide en parte con lo previamente reportado por Santovito et al. (2008) quienes observaron una disminución significativa de los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* nulos en pacientes añosos. Por el contrario, otros autores han sugerido que no hay diferencias en la distribución de los genotipos GSTs según la edad y el género (Garte et al., 2001). A su vez, la comparación de los genotipos del SNP *TP53* rs1042522 entre pacientes y controles según la edad y el género demostró que el genotipo *TP53*-CC se encontró significativamente disminuido en los pacientes varones respecto de los controles así como también en el grupo de pacientes menores de 50 años. Estas diferencias en la distribución entre grupos etarios y el género ha sido previamente

reportada sugiriendo que la frecuencia de genotipos *TP53*-CG/CC fue más frecuente en pacientes hombres y en mayores de 45 años (Pandith et al., 2012). Resultados contradictorios sugieren que el genotipo *TP53*-CC se encontró sobre-representado en pacientes menores de 50 años y en mujeres (Chowdhury et al., 2015).

Numerosos estudios han evaluado el rol del polimorfismo *TP53* rs1042522 en la susceptibilidad a cáncer, sin embargo, su papel en la susceptibilidad a LMC, ha sido menos estudiado. Previamente se ha demostrado que el alelo *TP53*-C es un factor de riesgo para el desarrollo de LMC (Bergamaschi, 2004). Se ha propuesto que el mayor riesgo de enfermedad puede deberse a la menor capacidad de inducir apoptosis en presencia de la variante *TP53*-C Prolina (Pro) respecto de la variante *TP53*-G Arginina (Arg) (Dumont et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados indican que el genotipo *TP53*-CC cumple un efecto protector en LMC al igual que lo reportado en otras publicaciones en leucemia aguda (Francisco et al., 2011) y en otros tipos de tumores (Buyru et al., 2003; Damin et al., 2006; Gochhait et al., 2007; Kalemi et al., 2005; Nadji et al., 2007). Se ha demostrado que la variante *TP53*-CC (Pro/Pro) es más eficiente en la reparación del ADN dañado (Siddique & Sabapathy, 2006). Por otro lado, también se determinó que las células que expresan la variante *TP53*-CC (Pro/Pro) reducen la formación de micronúcleos, indicando que esta variante conlleva a menor daño cromosómico (Siddique & Sabapathy, 2006). A su vez, se ha observado que la variante *TP53*-CC (Pro/Pro) tiene mayor capacidad de arresto del ciclo celular en G1 (Pim & Banks, 2004). De este modo, estas evidencias sugieren que la variante *TP53*-C (Pro) podría ser más potente en la reducción de la inestabilidad genómica, y quizás en la predisposición a cáncer (Siddique & Sabapathy, 2006). En línea con esta hipótesis, el hallazgo que el genotipo *TP53*-CC (Pro/Pro) tiene un papel protector para la LMC, podría explicarse por el hecho que contribuye con el mantenimiento de la integridad del genoma, con lo cual podría disminuir la tasa de reordenamientos cromosómicos, entre ellos, la translocación *BCR-ABL1*, así como otro tipo de mutaciones.

La ausencia y/o la disminución de la actividad enzimática producto de los polimorfismos en los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* aumentarían el riesgo de daño al ADN y por ende una mayor predisposición al desarrollo de inestabilidad genómica y

cáncer. Es por ello que el estudio de los polimorfismos en los genes GSTs y su rol en la susceptibilidad a diversos tumores ha sido ampliamente investigado, aunque los resultados en LMC son escasos y contradictorios. Al igual que nuestro trabajo, la mayoría de los estudios epidemiológicos, sugieren que *GSTM1* no es un factor de riesgo para la LMC (Banescu et al., 2014; He et al., 2014; Kassogue et al., 2015; Özten, 2011; Taspinar et al., 2008). No obstante, un escenario diferente se describió para el genotipo *GSTT1*-nulo el cual fue asociado con mayor riesgo a LMC en diferentes poblaciones, ya sea solo o combinado con la delección de *GSTM1* (Bhat et al., 2012; He et al., 2014; Özten et al., 2011; Taspinar et al., 2008). Por otra parte, pocos estudios han evaluado el SNP *GSTP1* rs1695 en relación a la susceptibilidad a LMC. A pesar de ello, los resultados observados hasta la fecha sugieren que el genotipo *GSTP1*-GG es un factor predisponente para la susceptibilidad a LMC (Banescu et al., 2014; Sailaja et al., 2010).

Teniendo en cuenta que los genes GSTs están involucrados en la misma vía metabólica, comparten especificidad de sustratos y hay evidencias de interacción génica entre ellos (de Lima Marson et al., 2013), se analizó el efecto combinado de los distintos polimorfismos en los genes *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*. La mayoría de los trabajos realizados hasta ahora reportaron el efecto combinado de los polimorfismos de *GSTM1* y *GSTT1*, sin considerar el efecto de *GSTP1* conjuntamente. Estudios previos demostraron que la combinación de los genotipos *GSTM1*-nulo y *GSTT1*-nulo se asoció con mayor riesgo de LMC (Bhat et al., 2012; He et al., 2014; Özten et al., 2011), mientras que la combinación de *GSTM1*-presente con *GSTT1*-nulo mostró tener un efecto protector (Kassogue et al., 2015). Sin embargo, en otro estudio, la combinación de los genotipos *GSTM1* y *GSTT1* no reveló ninguna asociación (Bajpai et al., 2007). Estos resultados indican que el efecto combinado de estos polimorfismos en el desarrollo de la LMC sigue siendo controvertido. A diferencia de los estudios previos, en el presente trabajo se incluyó el análisis combinado con el gen *GSTP1*. De esta forma, se demostró que la combinación del genotipo *GSTP1*-GG junto con *GSTM1*-nulo, se asoció con mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Incluso, se observó mayor riesgo para el genotipo *GSTP1*-GG junto con *GSTT1*-nulo dado por un marcado aumento del OR y de la significación. Teniendo en cuenta que en el análisis individual

se observó una tendencia hacia la significación de *GSTP1*-GG solo, esto sugiere que este genotipo por sí solo no es suficiente para generar mayor riesgo de LMC. Sin embargo, *GSTP1*-GG en conjunto con los polimorfismos *GSTM1*-nulo o *GSTT1*-nulo, son factores predisponentes para el desarrollo de LMC. Por otro lado, si bien era de esperarse que la combinación de triples variantes de las GSTs diera aún mayor riesgo de susceptibilidad a LMC, debido a que pocos pacientes y controles fueron portadores del genotipo triple *GSTM1*-nulo/*GSTT1*-nulo/*GSTP1*-GG, no fue posible verificar esta hipótesis en nuestra población. De este modo, nuestros resultados y los reportados en la literatura indican que el efecto conjunto de los genotipos GSTs puede modificar el riesgo de la enfermedad, sugiriendo que el análisis combinado de los genotipos en estos genes podría ser una herramienta más apropiada para determinar el riesgo a LMC en lugar de considerar sólo los genes individuales.

Teniendo en cuenta las discrepancias entre los diferentes estudios, el rol de estos polimorfismos en la susceptibilidad a LMC sigue siendo controvertido. Las diferencias entre los distintos estudios epidemiológicos probablemente están relacionadas con el origen geográfico o étnico de los individuos, la elección de los individuos controles, tamaños muestrales desiguales, exposición a diversos factores ambientales, entre otros.

El descubrimiento del rearrreglo *BCR-ABL1* fue uno de los avances más importantes permitiendo mejorar el diagnóstico y el desarrollo específico de drogas para esta enfermedad. El tratamiento de la LMC cambió notoriamente gracias a los ITKs, pequeñas moléculas que permiten inhibir la actividad constitutiva de TK del *BCR-ABL1* convirtiendo a la LMC en el paradigma de la terapia molecularmente dirigida. El imatinib, nilotinib y dasatinib son las tres drogas actualmente aprobadas para el tratamiento de primera línea de pacientes con LMC en FC. Aunque en primera instancia, estos dos últimos, se aprobaron para rescatar a los pacientes que no respondieron al tratamiento con imatinib. Si bien los ITKs han modificado drásticamente el tratamiento de la enfermedad, la capacidad de respuesta a los fármacos no es igual en todos los pacientes. Se ha estimado que alrededor de un 35% de los pacientes tratados con imatinib exhiben resistencia primaria o secundaria (Giles

et al., 2013; Khorashad et al., 2013). La resistencia a los inhibidores de segunda generación nilotinib y dasatinib también se ha reportado, aunque con menor incidencia (Hochhaus & Saglio, 2013; Kantarjian et al., 2012). Paradójicamente, la disponibilidad de opciones terapéuticas en la LMC no está en paralelo con la disponibilidad de predictores biológicos los cuales permitan identificar a aquellos pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse con nilotinib, dasatinib o imatinib (Angelini et al., 2013). Además, se ha reportado que las *stem cells* leucémicas son insensibles a los ITKS pudiendo reiniciar la enfermedad aún mucho tiempo después de alcanzada la respuesta (O'Hare et al., 2012). Es por ello, que la terapia de la LMC todavía se enfrenta con grandes retos (Tabarestani & Movafagh, 2016), considerándose que la prevención de la progresión de la enfermedad sigue siendo un objetivo primario, y la predicción del riesgo de progresión es de alta relevancia clínica (Brehme et al., 2016). De este modo, con el fin de optimizar la estrategia terapéutica, la farmacogenética estudia las variaciones genéticas que pueden influir en la respuesta a los medicamentos con el objetivo de encontrar biomarcadores que permitan maximizar la eficacia terapéutica y minimizar la toxicidad. En el presente trabajo se estudiaron diversos polimorfismos en los genes *CYP1A1*, *CYP1B1*, *ABCB1*, *ABCC3*, *hOCT1*, *NQO2*, *GSTP1*, *GSTM1*, *GSTT1* y *TP53* a fin de determinar si los mismos pueden influir en la respuesta a los ITKS para identificar biomarcadores que permitan adaptar el tratamiento farmacológico.

A pesar de la intensa búsqueda de nuevos marcadores de pronóstico, durante años el índice de Sokal fue el único factor de riesgo confiable y ampliamente utilizado en la LMC. Sin embargo, recientemente, se ha sugerido que la actividad de los genes transportadores de salida y de entrada de drogas permiten predecir la resistencia a imatinib a largo plazo (Baccarani et al., 2015). Además, los niveles de expresión de *hOCT1* y *ABCB1* en células mononucleares de médula ósea se correlacionaron con los niveles de imatinib sugiriendo la importancia de ambos genes en la regulación de la biodisponibilidad de este inhibidor (Yin et al., 2016). Asimismo, se ha demostrado que existe una relación en la expresión de los genes *ABCC3*, *ABCB1* y *hOCT1* en células leucémicas (Hu et al., 2008) indicando que la compleja interacción entre la expresión y la actividad de estos transportadores podría determinar las concentraciones

intracelulares de los ITKs y por lo tanto capacidad de inhibición del *BCR-ABL1*. La actividad de los genes transportadores es esencial para regular los niveles de ITKs disponibles ya sea a nivel celular e intestinal por lo que su estudio puede ser de gran importancia para determinar la respuesta al tratamiento.

En este trabajo se estudió por primera vez el polimorfismo *ABCC3* rs4148405 en pacientes con LMC. Solamente en un trabajo previo se asoció este SNP con menor SLE en pacientes adultos con LMA (Yee et al., 2013), mientras que otro polimorfismo en el gen *ABCC3* se asoció con peor pronóstico en pacientes con LMA (Müller et al., 2008). Sin embargo nuestros resultados sugieren que este SNP no está involucrado en la respuesta al tratamiento con ITKs. Este resultado podría explicarse por el hecho que el gen *ABCC3* no parece estar involucrado en la resistencia a imatinib y dasatinib debido a que los niveles de expresión del gen no variaron significativamente en función de diferentes concentraciones de ambas drogas (Gromicho et al., 2011). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la expresión de *ABCC3* tendría un papel importante en la falta de respuesta al tratamiento con imatinib pero no en la progresión de la enfermedad (Giannoudis et al., 2014).

El estudio de los polimorfismos *hOCT1* rs35191146 y rs628031 en los 141 pacientes con LMC no mostró asociación con la respuesta al tratamiento con ITKs. La relación entre los polimorfismos en *hOCT1* con la actividad de la proteína transportadora todavía es motivo de discusión. Un análisis del modelado estructural de *hOCT1* predice que los SNPs rs35191146 y rs628031 alteran la estructura de la proteína, afectando de esta forma la respuesta al tratamiento con imatinib (Giannoudis et al., 2013). Sin embargo, se ha sugerido que la actividad de *hOCT1* no estaría influenciada por la presencia de los SNPs rs35191146 y rs628031 (White et al., 2010). A su vez, se ha especulado que ambos polimorfismos no afectan la actividad de la proteína de forma directa pero pueden estar ligados a otros SNPs en otros genes que influyen en la respuesta al tratamiento con ITKs (Arimany-Nardi et al., 2015). Si bien las consecuencias funcionales no son del todo claras, se ha reportado que estos polimorfismos parecen predecir la RMM a los 12 meses (Vaidya et al., 2015) y además muestran diferencias en la supervivencia global y en la SLE (Koren-Michowitz et al., 2014).

Por otro lado, resultados contradictorios han sugerido que el SNP *hOCT1*rs628031 no predice la falta de respuesta al tratamiento con imatinib (Vine et al., 2014) y que los polimorfismos *hOCT1*rs35191146 y rs628031 tampoco se asocian con la obtención de la RMM a los 24 meses de tratamiento (White et al., 2010). Por el momento, un único estudio también sugiere que otro SNP en *hOCT1* afectaría la respuesta al tratamiento con nilotinib (Galimbertiet al., 2014).

Teniendo en cuenta que el gen *ABCB1* se encuentra altamente expresado en células cancerígenas resistentes a fármacos y que la pérdida de función del gen afecta la absorción, distribución y eliminación de las drogas (Schinkel et al., 1997; Schinkel et al., 1995), esto determinó la necesidad de comprender los mecanismos que determinan la actividad y función de *ABCB1*. Si bien, el gen es altamente polimórfico, se ha puesto una especial atención en los SNPs *ABCB1* rs1128503, rs2032582 y rs1045642 más comúnmente conocidos como 1236C>T, 2677G>T/A y 3435C>T, respectivamente. Diferentes estudios funcionales se han llevado a cabo a fin de determinar la relación entre los SNPs con la actividad de la glicoproteína transportadora (PgP) codificada por *ABCB1*, habiéndose propuesto distintas hipótesis. Se ha sugerido que el SNP sinónimo *ABCB1*rs1045642 altera la conformación de la proteína afectando la especificidad por el sustrato, aunque no se ven afectados los niveles de expresión del gen (Kimchi-Sarfaty, 2007). Del mismo modo, Fung & Gottesman, (2010), sugieren que posiblemente el polimorfismo *ABCB1*rs1045642 produce un enlentecimiento del ribosoma que influye tanto en el plegamiento como en la función de Pgp. Asimismo, se ha sugerido que este SNP puede generar una disminución en los niveles de expresión del gen (Wang & Sadée, 2006). De este modo, se han propuesto diferentes mecanismos que permiten explicar, en parte, la asociación entre los SNPs y la actividad de esta proteína transportadora. Sin embargo, las consecuencias funcionales de estos tres SNPs no están del todo claras, de modo que todavía no es posible comprender la variabilidad de respuestas observadas en la clínica.

En el presente trabajo, los SNPs *ABCB1* rs1128503 y rs2032582 se asociaron con mayor riesgo de progresión a fases más aceleradas de la enfermedad y, además, el alelo T del SNP *ABCB1* rs1128503 se asoció con falta de RMM. Sin embargo, en una población de

pacientes en tratamiento con imatinib, se reportó que los genotipos TT de ambos SNPs se asociaron con mejor RMM a los 12 meses (Dulucq et al., 2008). Resultados contradictorios señalaron que el genotipo CC de los SNPs *ABCB1* rs1128503 y rs1045642 son predictores de mejor RMM (Angelini et al., 2013; Deenik et al., 2010). Por el contrario, el grupo de Kim et al., (2009) no encontró diferencias significativas para ninguno de los SNPs con la respuesta al tratamiento.

La asociación entre estos polimorfismos con la resistencia al tratamiento ha sido estudiada previamente mostrando resultados contradictorios. Mayor incidencia de falta de respuesta al tratamiento se correlacionó con el número de alelos T de los SNPs *ABCB1* rs1128503 y rs1045642 (Ni et al., 2011). En cambio, otro grupo demostró que el genotipo CC del SNP rs1045642 se asoció con falla primaria al tratamiento con imatinib, mientras que el alelo T del SNP rs2032582 parece prevenir el fallo al tratamiento (Maffioli et al., 2011). A diferencia de nuestro trabajo, en ninguno de estos estudios se evaluó la SLF. Nuestros resultados sugieren que los pacientes portadores de los genotipos CT-TT del SNP *ABCB1* rs1045642 tienen una mayor probabilidad de fallar al tratamiento con ITKs. Sin embargo, este SNP no se asoció con falta de RMM y/o falta de RCM. Aparentemente, este SNP parece estar involucrado en el fracaso al tratamiento con ITKs y no en la obtención de la RMM. Probablemente se puede especular que este polimorfismo pueda estar relacionado con la intolerancia al tratamiento y/o podría modular los niveles de *BCR-ABL1* sugiriendo de esta forma el cambio de tratamiento siendo independiente de la obtención de la RMM.

Los resultados del presente trabajo indican que los SNPs *ABCB1* rs1128503, rs2032582 y rs1045642 afectarían diferencialmente la respuesta a los ITKs, probablemente involucrando diversos mecanismos que podrían estar relacionados con el tipo de tratamiento. Es decir, se ha sugerido que la expresión de *ABCB1* modula la respuesta al imatinib (Eadie et al., 2013), sin embargo, nilotinib y dasatinib también han sido reportados ser sustratos de *ABCB1* pero han sido menos estudiados en este contexto. Estudios *in vitro* confirmaron que el nilotinib sigue siendo eficaz en células que sobreexpresan *ABCB1* (Deguchi et al., 2008) y que incluso puede actuar como un inhibidor de Pgp (Hegedus et al., 2009). Por el contrario, otro grupo encontró que la

sobreexpresión de *ABCB1* reduce hasta 3 veces los niveles intracelulares de nilotinib (Kosztyu & Dolezel, 2013). Por otro lado, estudios previos de pacientes tratados con nilotinib no pudieron confirmar la asociación entre estos SNPs con mayores tasas de respuesta. Sin embargo, se reportó un aumento en los niveles de expresión génica para distintos genotipos de los SNPs de *ABCB1* rs1128503 y rs2032582, mientras que no se observaron diferencias para el SNP *ABCB1* rs1045642 (Agrawal et al., 2014). Recientemente se ha reportado que la acumulación intracelular de nilotinib se ve reducida luego de la expresión de *ABCB1* y que la toxicidad inducida por nilotinib y dasatinib también es menor cuando se expresa *ABCB1*. Sin embargo, los polimorfismos *ABCB1* rs1128503, rs1045642 y rs2032582 no afectaron las concentraciones intracelulares de nilotinib y dasatinib a diferencia de lo ocurrido con imatinib (Dessilly et al., 2016). De esta forma, este último estudio sugiere que los polimorfismos en *ABCB1* afectan significativamente la respuesta celular a imatinib pero en menor grado a las respuestas observadas para dasatinib o nilotinib. Teniendo en cuenta la notable variabilidad de los diferentes estudios sobre *ABCB1* en relación a los distintos ITKs disponibles, probablemente hubiera sido conveniente hacer un análisis estratificado por tratamiento en el trabajo. Sin embargo cabe señalar que no se cuenta con un número parejo de pacientes bajo tratamiento con imatinib, nilotinib y dasatinib dificultando de esta forma el análisis estadístico.

Se ha reportado que el número de haplotipos para *ABCB1* varían de 3 a 55, siendo más frecuente en caucásicos los haplotipos CGC y TTT (rs1128503, rs2032582, rs1045642) (Fung & Gottesman, 2010). Cabe destacar que en el presente trabajo, los SNPs de *ABCB1* rs1128503, rs2032582 y rs1045642 no se encontraron en desequilibrio de ligamiento en contraposición a lo reportado previamente en otras poblaciones (Fung & Gottesman, 2010). Probablemente una de las causas de los resultados observados en este trabajo se debe a que el porcentaje de genotipificado para estos SNPs en *ABCB1* se encontraba cerca del límite inferior requerido para la estimación haplotípica por el programa Haploview, de este modo, sería conveniente analizar un mayor número de individuos para definir si estos SNPs están en desequilibrio de ligamiento en nuestra población.

A fin de establecer si los diferentes genotipos de *ABCB1* influyen en el patrón transcripcional, en nuestro laboratorio se comenzó con un análisis preliminar de los niveles de expresión de *ABCB1* en 44 pacientes estudiados. La asociación entre el nivel de expresión génica con la presencia de los polimorfismos *ABCB1* rs1128503,rs1045642 y rs2032582 no mostró diferencias significativas. A pesar de ello, es interesante señalar que la expresión de *ABCB1* parece estar involucrada en la falta de respuesta terapéutica. Diferentes niveles de expresión del gen se han observado en pacientes con diferentes grados de respuesta a imatinib aunque algunos pacientes con altos niveles de expresión de *ABCB1* consiguen RCC o incluso RMM (Yin et al., 2016). La sobreexpresión de *ABCB1* se ha asociado con falta de respuesta a imatinib (Illmer et al., 2004; Kosztyu et al., 2014), y a su vez, pruebas *in vivo* a partir de dos estudios independientes sugieren que la sobreexpresión *ABCB1* puede preceder a la aparición de mutaciones en *BCR-ABL1* y al fracaso al tratamiento con imatinib (Eadie et al., 2016 a). Al mismo tiempo, se ha sugerido que grandes cambios en los niveles de expresión de *ABCB1* desde el inicio del tratamiento hasta el control del seguimiento a las tres semanas puede ser un buen marcador de falta de RMM y RM4.5 a los 12 y 14 meses y un buen predictor de riesgo de mutación o progresión a FA (Eadie et al., 2016 b). También, se demostró que el aumento en los niveles de expresión de *ABCB1* en el momento de la resistencia a imatinib es un buen predictor pronóstico para el tratamiento con nilotinib en segunda línea (Agrawal et al., 2014). Estos datos sugieren la importancia del potencial valor predictivo de controlar la dinámica de la expresión del gen *ABCB1* con el fin de predecir el resultado terapéutico de los pacientes con LMC. Si bien todavía se desconocen los mecanismos exactos por medio de los cuales la variabilidad genética en *ABCB1* influye en la eficacia de los ITKs, pueden estar relacionados con el tipo de tratamiento y probablemente con el nivel de expresión génica y la interacción de *ABCB1* con otras vías implicadas en el transporte y/o metabolización de estas drogas.

El gen *NQO2* forma parte de la familia de enzimas de Fase II cuya función tradicional es la de proteger a las células de los radicales libres y metabolitos tóxicos del oxígeno (Vasiliou et al., 2006). A su vez, cumple una función como supresor tumoral participando en la regulación de la degradación de las proteínas p53 y p63 (Gong et

al., 2007; Patrick et al., 2011; Sollner & Macheroux, 2009) y en la estabilidad de la ciclina D1 (Hsieh et al., 2012). Asimismo, se observó la expresión disminuida del gen *NQO2* en cáncer de mama, hepatocarcinomas (Strassburg et al., 2002; Yu et al., 2009) y en cáncer colorectal (Chen et al., 2016). Hasta la fecha, su asociación con la LMC y/o con otras neoplasias hematológicas no ha sido muy estudiada. Un primer reporte demostró que ratones *knockouts* deficientes en la actividad de las proteínas *NQO1* y *NQO2*, no mostraron anomalías detectables durante el crecimiento. Curiosamente, todos los ratones mostraron hiperplasia mieloide en médula ósea y aumento de los granulocitos en sangre periférica (Iskander & Jaiswal, 2005). A su vez, los ratones deficientes de *NQO2* desarrollaron linfomas de tipo B en distintos tejidos luego de la exposición a radiación (Iskander et al., 2009). Por otro lado, en relación al tratamiento de la LMC, se ha demostrado que la enzima *NQO2* fue el primer target inespecífico reportado para las drogas imatinib y nilotinib (Bantscheff et al., 2007; Rix et al., 2007). A pesar de la importancia de este gen, como supresor tumoral y modulador de la respuesta a los ITKs, hasta el momento no se ha evaluado el estudio de los polimorfismos en *NQO2* en pacientes con LMC.

En el presente trabajo se estudió por primera vez la presencia de varios polimorfismos en el gen *NQO2* en pacientes con LMC tratados con ITKs. Los resultados obtenidos sugieren que los polimorfismos *NQO2* rs2071002 rs2071003 y rs2071004 parecen afectar el pronóstico y la respuesta al tratamiento con ITKs. En primer lugar, SNP *NQO2* rs2071002 se asoció significativamente con altos valores de índice de Sokal, mientras que los SNPs *NQO2* rs2071003 y rs2071004 se asociaron significativamente con la falta de RCM y con mayor riesgo de eventos durante la enfermedad. Otro de los polimorfismos estudiados en este trabajo, el *NQO2* rs1143684, no se asoció significativamente con ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, previamente se ha indicado que el mismo parece producir cambios en la actividad de la enzima (Megarity et al., 2014) y se ha asociado con mayor riesgo de cáncer de mama (Hubackova et al., 2012). De este modo, la presencia de los SNPs en *NQO2* parece influir de forma diferencial en la respuesta al tratamiento de la LMC.

Un estudio funcional del SNP *NQO2* rs2071002 demostró que el alelo A de este polimorfismo produce la pérdida del sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1, reduciendo la actividad promotora e influyendo en la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama (Yu et al., 2009). El análisis de este polimorfismo en nuestra población no se asoció con falta de respuesta al tratamiento aunque se detectó mayor frecuencia de pacientes con Sokal alto e intermedio portadores del alelo C del SNP *NQO2* rs2071002, sugiriendo que el mismo puede ser un factor asociado con peor pronóstico.

En este trabajo se demostró que los SNPs intrónicos *NQO2*rs2071003 y rs2071004 se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento ($r^2=0,98$). El análisis individual reveló que los alelos T y A de los SNPs *NQO2*rs2071003 y rs2071004 respectivamente, se asociaron significativamente con la falta de RCM. De acuerdo con este hallazgo, el análisis en conjunto reveló que el haplotipo TA de los SNPs *NQO2*rs2071003 y rs2071004 se asoció con falta de RCM. El análisis de ambos SNPs mediante las curvas de supervivencia reveló que los pacientes con genotipos *NQO2* rs2071003 CT-TT y *NQO2* rs2071004 GA-AA presentaron mayor probabilidad de eventos durante la enfermedad. La asociación entre estos SNPs intrónicos con la respuesta al tratamiento es difícil de explicar debido a que su localización pareciera no presentar consecuencias en la actividad de *NQO2*. Sin embargo, con los avances en la secuenciación del ADN, los cuales permitieron desarrollar estudios de gran escala, se han identificado variaciones genéticas asociadas con enfermedades humanas muchas de las cuales corresponden a SNPs localizados en regiones intrónicas. Teniendo en cuenta esto, resulta difícil conocer el mecanismo íntimo mediante el cual los SNPs intrónicos pueden estar involucrados en la respuesta al tratamiento con ITKs. Sin embargo, el hecho que los polimorfismos *NQO2*rs2071003 y rs2071004 se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento con el SNP rs2071001 ($r^2=0,98$) ubicado en la secuencia 5'-UTR del gen (HaploReg v4.1: <http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), es posible especular que pueden afectar la actividad transcripcional, la estructura o funcionalidad de la proteína resultante o bien interferir con la regulación local de otros genes. Por consiguiente, este es el primer estudio en reportar que los SNPs en el gen *NQO2* afectan el pronóstico y la respuesta al tratamiento con ITKs. Considerando la

escasa información con la que se cuenta hasta el momento, su asociación con la LMC todavía es difícil de comprender siendo necesario estudios consecutivos a fin de definir el rol del gen *NQO2* en la respuesta al tratamiento con ITKs en esta patología.

La superfamilia de enzimas CYP450 es el sistema más importante involucrado en la biotransformación de muchas sustancias endógenas y exógenas incluyendo fármacos, toxinas y carcinógenos (Bozina 2009). La sobreexpresión de los genes *CYP1B1* y *CYP1A1* se ha descrito en diferentes tumores (Leung et al., 2005; Murray et al., 1997; Oyama et al., 2008). A su vez, se ha reportado que la co-expresión del gen *CYP1A1* con la subunidad activa de la telomerasa (hTERT), la cual juega un papel crítico en el desarrollo de la inmortalidad celular, sugiere un mecanismo de selección para que la enzima *CYP1A1* disminuya la concentración de agentes anticancerígenos en las células tumorales (Rochat, 2009). Asimismo, otras evidencias sugieren un posible rol de ambos genes en la carcinogénesis, habiéndose sugerido que la sobre-expresión de *CYP1A1* y *CYP1B1* contribuyen con el desarrollo tumoral (Badal & Delgoda, 2014). Los genes *CYP1B1* y *CYP1A1* presentan varios polimorfismos que se han asociado con la susceptibilidad a cáncer, reacciones adversas severas y falla en la respuesta a diversos tratamientos farmacológicos (Bozina, et al., 2009; He & Feng, 2015). Si bien estos polimorfismos han sido previamente estudiados en diversas patologías, hasta la fecha no se han reportado trabajos en pacientes con LMC.

El presente trabajo de Tesis es el primer estudio en evidenciar una asociación entre el SNP *CYP1B1* rs2617266 en pacientes con LMC bajo tratamiento con ITKs. Los resultados obtenidos sugieren que los portadores del genotipo TT del SNP *CYP1B1* rs2617266 poseen mayor probabilidad de sufrir eventos durante el transcurso de la enfermedad dado por una menor SLE. Sin embargo, no se ha observado una asociación significativa para el polimorfismo *CYP1A1* rs2606345 con ninguno de los parámetros analizados. Los estudios funcionales indican que ciertas combinaciones alélicas pueden alterar drásticamente las propiedades cinéticas de la enzima *CYP1B1* (Beuten et al., 2008), aunque todavía se desconoce el efecto del SNP intrónico *CYP1B1* rs2617266. Un estudio realizado en 23 pacientes con glaucoma reveló que la mayoría de ellos fueron portadores del alelo T del SNP *CYP1B1* rs2617266 mientras que el mismo no se

observó en ninguno de los 50 controles evaluados (Tanwar et al., 2009). A su vez, se ha reportado que el SNP *CYP1B1*rs2617266 se encuentra en desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,8$) con otros polimorfismos ubicados dentro del mismo gen. En el estudio de los haplotipos de un grupo de pacientes con cáncer de próstata se encontró que el haplotipo C-G-C-C-G-A formado por los SNPs *CYP1B1*rs2567206-rs2551188-rs2617266-rs10012-rs1056836-rs1800440 mostró una asociación significativa con riesgo de cáncer (Beuten et al., 2008). Por otro lado, el estudio por separado de cada uno de estos SNPs en otra población de pacientes, reveló una tendencia hacia la significación con mayor riesgo a cáncer de próstata. Sin embargo, el análisis del haplotipo C-C-G-C-C-G se asoció significativamente con riesgo a cáncer de próstata (Chang et al., 2003). Por último, un metaanálisis en pacientes con esta misma enfermedad reveló que el SNP *CYP1B1* rs2617266 no estaría asociado con cáncer de próstata (Zhang et al., 2013).

Hasta ahora, los estudios realizados respecto al SNP *CYP1B1* rs2617266 son escasos y contradictorios. Nuestros resultados sugieren que el mismo estaría involucrado en la respuesta al tratamiento con ITKs. Probablemente el ligamiento del *CYP1B1* rs2617266 con los otros polimorfismos ubicados en la zona regulatoria de *CYP1B1* puedan generar consecuencias en la actividad de la enzima y por lo tanto diferencias en la respuesta al tratamiento. Sin duda, nuevos estudios son necesarios así como también el análisis de otros SNPs en el gen *CYP1B1* a fin de comprender efectivamente su implicancia en la farmacogenética de los ITKs.

En esta cohorte de pacientes con LMC también se evaluó el SNP *TP53* rs1042522 a fin de determinar su rol en la respuesta al tratamiento con ITKs. Estudios previos en LMC han investigado el papel de este polimorfismo en pacientes tratados con imatinib no observando diferencias significativas en la supervivencia (Liu et al., 2014). Sin embargo, en otro estudio se demostró que el alelo *TP53*-C (Pro) se asoció significativamente con la falta de respuesta citogenética en pacientes con LMC (Bergamaschi, 2004). En el presente trabajo, el SNP *TP53*rs1042522 no mostró una asociación significativa con los diferentes parámetros clínicos evaluados, aunque el genotipo *TP53*-GG (Arg/Arg) se asoció con menor SLE respecto de los genotipos CG-CC. En un estudio previo se estableció que el genotipo *TP53*-GG (Arg/Arg) se asoció con valores de Sokal alto y

mayor riesgo de falla al tratamiento con imatinib, sin embargo la SLE no fue evaluada (Camelo-Santos et al., 2013).

El SNP *TP53*rs1042522 se ubica en una región rica en prolina situada entre los dominios de transactivación y de unión al ADN. Se ha demostrado que esta región es importante para la función de p53, especialmente por su capacidad de inducir apoptosis. El trabajo inicial de Thomas et al., (1999) reportó que la isoforma *TP53*-Arg era más eficiente en suprimir la transformación e iniciar apoptosis. Posteriormente, otros grupos confirmaron este hallazgo sugiriendo que la mayor capacidad apoptótica de la variante *TP53*-Arg se debe a que la misma es más eficiente en translocarse a la mitocondria e interactuar con proteínas pro-apoptóticas en presencia y ausencia de agentes quimioterapéuticos (Dumont et al., 2003; Pim & Banks, 2004; Sullivan et al., 2004). Por el contrario, se ha sugerido un mecanismo de regulación transcripcional para explicar las diferencias apoptóticas entre ambas isoformas de p53 (Vikhanskaya et al., 2005). Por otro lado, se ha reportado que el SNP *TP53*rs1042522 puede afectar la actividad de la proteína no sólo en el contexto de *TP53*-wild type, sino también en el contexto de *TP53* con mutaciones somáticas. De este modo, los resultados sugieren que este polimorfismo puede tener efectos opuestos con respecto a la sensibilidad a la quimioterapia (Vikhanskaya et al., 2005). Es decir, en el contexto de algunas mutaciones de *TP53*, las células que expresan la variante *TP53*-C (Pro) tienen mayor apoptosis que las células que expresan *TP53*-G (Arg) causado por la mayor afinidad de esta variante por la proteína supresora de tumores p73, inhibiendo de esta forma la apoptosis (Marin et al., 2000; Bergamaschi et al., 2003; Vikhanskaya et al., 2005). Un estudio en pacientes con cáncer de cabeza y cuello estableció que el polimorfismo *TP53*-G (Arg) junto con *TP53* mutado presenta tasas de respuesta a la terapia más bajas en comparación con la variante *TP53*-C (Pro) (Bergamaschi et al., 2003). Nuestros resultados sugieren que el SNP *TP53*rs1042522 influye en la respuesta al tratamiento de los pacientes con LMC. Sin embargo, falta comprender el mecanismo molecular preciso por el cual este SNP interviene en las diferencias observadas en la apoptosis (Vikhanskaya et al. 2005).

En el presente estudio no solo se investigó el papel de las GSTs en la susceptibilidad a LMC sino también se evaluó su asociación con la respuesta al tratamiento con ITKs. Solamente dos estudios previos determinaron el papel farmacogenético de los genes GSTs en pacientes con LMC. El genotipo GG del SNP *GSTP1* rs1695 se observó en mayor frecuencia en pacientes en FA y en CB, indicando que este polimorfismo puede influir en la progresión de la LMC y en la respuesta a la terapia (Sailaja et al., 2010). Sin embargo, en el trabajo de Davies et al., (2014) no encontraron asociación entre el SNP *GSTP1* rs1695 con la falta de respuesta al imatinib. El presente trabajo, los resultados obtenidos sugieren que los pacientes portadores del genotipo GG de este SNP tienen significativamente mayor probabilidad de tener eventos durante la enfermedad y fallar al tratamiento con ITKs, sugiriendo que el polimorfismo *GSTP1* rs1695 puede modular la respuesta al tratamiento.

Respecto de los polimorfismos en *GSTM1* y *GSTT1*, pocos estudios evaluaron el efecto de los mismos con la respuesta al tratamiento. Uno de los primeros trabajos realizados informó que un mayor número de copias de *GSTT1* fue más frecuente en aquellos pacientes que requieren un aumento de la dosis de imatinib por falta de respuesta (Koh et al., 2010). Igualmente, la pérdida de copias de *GSTM1* se asoció con un aumento del riesgo de falta de respuesta al tratamiento con imatinib (Davies et al., 2014). En el presente trabajo se estableció que los pacientes portadores de 2 o más copias de *GSTM1* se asociaron con peor pronóstico, aunque no se observó asociación entre las copias de *GSTT1* con la respuesta a los ITKs. En primer lugar, se demostró que estos pacientes obtienen la respuesta molecular en tiempos más largos respecto de los portadores de la delección del gen (0 copias) ya que presentaron un incremento de la media de tRMM. Asimismo, los pacientes con 2 o más copias de *GSTM1* presentaron menor SLE y SLF, indicando que tienen mayor probabilidad de tener eventos durante el transcurso de la enfermedad y de no responder al tratamiento.

Los mecanismos subyacentes que permiten explicar el papel de las GST y su asociación con el tratamiento de la LMC aún no están del todo claros. Estas enzimas participan en la metabolización de una gran variedad de drogas, aunque no intervienen directamente en el metabolismo de los ITKs (Christopher et al., 2008; Gschwind et al.,

2005). Una explicación alternativa puede estar relacionada con la participación de las enzimas GSTM1 y GSTP1 en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Dusinska et al., 2012). La regulación de apoptosis mediada por ambas enzimas añade una nueva dimensión a su papel conocido involucrado en el metabolismo y la homeostasis celular.

La proteína ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase*) es una MAP kinasa que activa las vías de JNK (*c-Jun N-terminal kinase 1*) y p38 que conducen a la apoptosis inducida por citoquinas. La activación de ASK1 se produce como consecuencia de un aumento del estrés oxidativo y por lo tanto su actividad en condiciones normales es baja gracias a la formación de un complejo proteico con la enzima GSTM1. La disociación del complejo GSTM1/ASK1, permite la activación de ASK1 y la consiguiente fosforilación de JNK y p38 conduciendo a la apoptosis (Townsend & Tew, 2003). La alteración de la expresión de GSTM1 se ha relacionado con un deterioro de la respuesta clínica en algunos tipos de tumores y en algunos casos el aumento de la expresión de *GSTM1* se asoció con la resistencia a fármacos (Tew & Townsend, 2012). Se podría especular que un mayor número de copias del gen *GSTM1* conducirían a una mayor inhibición de ASK1, lo cual llevaría a la disminución en la tasa de apoptosis, influyendo de esta forma en la falta de respuesta al tratamiento.

A su vez, la enzima GSTP1 es un inhibidor endógeno de JNK a través de la interacción directa proteína-proteína (Laborde, 2010; Tew & Townsend, 2012). La kinasa JNK se activa por múltiples estímulos, permitiendo la activación de señales celulares contradictorias. Al igual que ocurre con ASK1 en condiciones normales, la actividad de JNK es baja gracias a la interacción con GSTP1. Sin embargo, el aumento de especies reactivas del oxígeno y/o la exposición a fármacos conllevan a la disociación del complejo GSTP1-JNK induciendo un aumento de la supervivencia celular, proliferación y/o apoptosis, dependiendo del contexto celular (Laborde, 2010). La apoptosis inducida por estrés dependiente de JNK puede suprimirse durante el desarrollo del tumor, es por ello que altos niveles de GSTP1 podrían potenciar la inactivación de JNK (Tew & Townsend, 2012). Posiblemente esto pueda explicar la presencia de elevados niveles de GSTP1 en células tumorales resistentes a fármacos incluso cuando el fármaco no es

un sustrato de esta enzima (Tew, 2007). El aumento de GSTP1 puede ser necesario para mantener la actividad de JNK en niveles basales inhibiendo de esta forma la apoptosis. La asociación entre el polimorfismo *GSTP1* rs1695 y la LMC no está del todo clara, sin embargo se podría especular que el mismo puede producir cambios en la expresión de *GSTP1*. Un estudio previo analizó la presencia de varios polimorfismos en el gen identificando 5 de ellos, que se asociaron significativamente con el nivel de ARN mensajero de *GSTP1*. Entre estos, el SNP *GSTP1*G>A ubicado en la región 5'-UTR (-18) mostró estar estrechamente vinculado con el SNP *GSTP1* rs1695. En consecuencia, los autores sugieren que probablemente una parte de la asociación del polimorfismo *GSTP1* rs1695 con varios fenotipos clínicos resulta del efecto sobre la transcripción del SNP región 5'-UTR (Moyer et al., 2008).

En definitiva, se podría afirmar que las GSTs desempeñan distintas funciones en el desarrollo de resistencia. Por un lado a través de la detoxificación directa de los fármacos y por el otro como inhibidores de apoptosis. Por ende, la asociación de los polimorfismos en *GSTM1* y *GSTP1* rs1695 con el fracaso de la terapia con ITKs puede estar relacionada por la alteración de vías necesarias para la activación de kinasas responsables de inducir apoptosis.

Finalmente, con el objeto de disponer de alguna herramienta para trasladar la información observada del análisis de los SNPs hacia a la práctica clínica, en este trabajo se diseñó un *SNP score* para construir un modelo pronóstico para la SLE y la SLF. Este score se basó en los resultados del análisis individual de los SNPs el cual permitió evaluar los distintos modelos genéticos para identificar los genotipos de riesgo. Se construyó un índice de riesgo asignando un valor de 1 a cada uno de los genotipos de riesgo. De esta forma el sistema de puntuación para la SLF permitió diferenciar dos poblaciones, una de bajo y otra de alto riesgo según los genotipos de los SNPs *ABCB1* rs1045642 y *GSTP1* rs1695. Se determinó que los pacientes con puntuación 1 y 2 mostraron una SLF significativamente menor respecto del grupo de pacientes con puntuación 0, sugiriendo que tienen mayor probabilidad de no responder al tratamiento. Del mismo modo, el *SNP score* para la SLE reveló que los pacientes con puntuación 3 y 4 según los genotipos de riesgo de los SNPs *CYP1B1* rs2617266, *TP53*

rs1042522, *NQ02* rs2071003, *NQ02* rs2071004 y *GSTP1* rs1695 tienen menor SLE sugiriendo que tienen mayor probabilidad de tener eventos durante el transcurso de la enfermedad. Desde el punto de vista terapéutico, el desarrollo de este *score* genético permitirá la identificación de poblaciones de riesgo, siendo un factor importante a considerar durante el seguimiento del paciente. Cabe destacar que estos resultados deben ser validados en una cohorte de pacientes independiente antes que esta herramienta pronóstica pueda ser aplicada a la práctica clínica.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron definir que los polimorfismos en los genes *TP53* y GSTs, solos o combinados, constituyen marcadores que pueden contribuir en la susceptibilidad a LMC. Si bien se acepta que la variabilidad genética interindividual se correlaciona con la susceptibilidad a cáncer, hay que tener en cuenta también el efecto combinado de múltiples genes, los cuales a su vez interactúan con factores ambientales. Los hallazgos presentados contribuyen a profundizar la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la predisposición de la enfermedad.

Por otro lado, la asociación establecida entre los polimorfismos con los parámetros clínicos y de respuesta terapéutica permitió identificar biomarcadores de riesgo y establecer un SNP *score* como modelo pronóstico de SLE y SLF para este grupo de pacientes. Los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a fármacos son complejos y variables entre los distintos pacientes. Por esta razón es difícil excluir la influencia de otros factores que pueden afectar la respuesta a los ITKs. El adecuado seguimiento de los pacientes mediante las mediciones de los niveles de *BCR-ABL1*, el control de la adherencia al tratamiento y el análisis de mutaciones en *BCR-ABL1* son los factores fundamentales para optimizar la eficacia del tratamiento. Si bien falta confirmar la relevancia clínica del estudio de los polimorfismos genéticos involucrados en la farmacocinética y farmacodinamia de los ITKs, se puede considerar como una herramienta complementaria y útil para racionalizar la complejidad de la respuesta terapéutica. La aplicación de este abordaje en la práctica clínica probablemente será factible en el futuro justificando la necesidad de nuevas investigaciones

multidisciplinarias a fin de adaptar el esquema terapéutico de acuerdo al perfil genético individual.

Conclusiones

- ✓ La susceptibilidad a desarrollar LMC se asoció con la variabilidad genética en *TP53* y en los genes GSTs. En particular, el genotipo *TP53*-CC mostró ser un factor protector mientras que *GSTP1*-GG junto con *GSTM1*-nulo o con *GSTT1*-nulo se asociaron con mayor riesgo de enfermedad.

- ✓ Los SNPs del gen *NQO2* rs2071002, rs2071003 y rs2071004 y del gen *ABCB1* rs1128503 y rs2032582, así como el haplotipo TA de *NQO2* resultaron ser marcadores de peor pronóstico.

- ✓ El genotipo *GSTM1* ≥ 2 copias se asoció con peor respuesta a los ITKs indicando que puede ser un marcador pronóstico que influye en la respuesta al tratamiento.

- ✓ Se definió un SNP score basado en los genotipos de riesgo de *ABCB1* rs1045642, *GSTP1* rs169, *CYP1B1* rs2617266, *NQO2* rs2071003 y rs2071004 que permitió diferenciar dos poblaciones de riesgo, indicando la necesidad de mayor seguimiento de estos pacientes.

- ✓ Este estudio contribuye a una mejor comprensión de la LMC sugiriendo que los polimorfismos en los genes estudiados son factores genéticos heredados implicados en la susceptibilidad a LMC y constituyen marcadores farmacogenéticos que modulan la respuesta a los ITKs.

Referencias

- Agrawal M., Hanfstein B., Erben P., Wolf D., Ernst T., Fabarius A., et al. (2014). MDR1 expression predicts outcome of Ph+ chronic phase CML patients on second-line nilotinib therapy after imatinib failure. *Leukemia*, 28(7), 1478–85.
- Ahmed S., Zhou Z., Zhou J. & Chen S.Q. (2016). Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. *Genomics Proteomics Bioinforma.*, 14(5), 298–313.
- Ali M.A. & Elsalakawy W.A. (2014). ABCB1 haplotypes but not individual SNPs predict for optimal response/failure in Egyptian patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia receiving imatinib mesylate. *Med. Oncol.*, 31(11), 279.
- Angelini S., Soverini S., Ravegnini G., Barnett M., Turrini E., Thornquist M., et al. (2013). Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica*, 98(2), 193–200.
- Aplan P.D. (2006). Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet.*, 22(1), 46–55.
- Arimany-Nardi C., Koepsell H. & Pastor-Anglada M. (2015). Role of SLC22A1 polymorphic variants in drug disposition, therapeutic responses, and drug–drug interactions. *Pharmacogenomics J.*, 15(6), 473–487.
- Au A., Aziz Baba A., Goh A.S., Wahid Fadilah S.A., Teh A., Rosline H. et al. (2014). Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients. *Biomed Pharmacother*, 68(3), 343–934.
- Banescu C., Trifa A.P., Demian S., Benedek Lazar E., Dima D., Duicu C., et al. (2014). Polymorphism of XRCC1, XRCC3, and XPD genes and risk of chronic myeloid leukemia. *Biomed Res. Int.*, 213790.
- Baccarani M., Castagnetti F., Gugliotta G., Rosti G. (2015). A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol. Suppl 2*:S141-147.
- Baccarani M., Deininger M.W., Rosti G., Hochhaus A., Soverini S., Apperley J.F., et al. (2013). Review Article European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia : 2013. *Blood*, 122(6), 872–884.
- Badal S. & Delgoda R. (2014). Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *J Appl Toxicol. J Appl Toxicol.*, 34, 743–753.
- Bajpai P., Tripathi A.K. & Agrawal D. (2007). Increased frequencies of glutathione-S-transferase (GSTM1 and GSTT1) null genotypes in Indian patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, 31(10), 1359–1363.
- Balabanov S., Braig M. & Brümmendorf T. H. (2014). Current aspects in resistance against tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. *Drug Discov. Today Technol.*, 11(1), 89–99.
- Balaji S.A., Udupa N., Chamallamudi M.R., Gupta V. & Rangarajan A. (2016). Role of the drug transporter ABCC3 in breast cancer chemoresistance. *PLoS One*, 11(5), 1–22.
- Bantscheff M., Eberhard D., Abraham Y., Bastuck S., Boesche M., Hobson S., et al. (2007). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.*, 25(9), 1035–1044.
- Bartholomae S., Gruhn B., Debatin K.M., Zimmermann M., Creutzig U., Reinhardt D., et al., (2016). Coexpression of Multiple ABC-Transporters is strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Blood Cancer.*, 63(2), 242–247.
- Bennour A., Saad A. & Sennana H. (2016). Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and

- molecular assays. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 97, 263–274.
- Bergamaschi D. (2004). TP53 codon 72 polymorphism in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematology*, 10, 1–2.
- Bergamaschi D., Gasco M., Hiller L., Sullivan A., Syed N., Trigiante G., et al. (2003). P53 Polymorphism Influences Response in Cancer Chemotherapy Via Modulation of P73-Dependent Apoptosis. *Cancer Cell*, 3(4), 387–402.
- Beuten J., Gelfond J.A., Byrne J.J., Balic I., Crandall A.C., Johnson-Pais T. L., et al. (2008). CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians. *Carcinogenesis*, 29(9), 1751–1757.
- Bhat G., Bhat A., Wani A., Sadiq N., Jeelani S., Kaur R., et al. (2012). Polymorphic variation in glutathione-S-transferase genes and risk of chronic myeloid leukaemia in the Kashmiri population. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 13(1), 69–73.
- Bizzozero O.J., Johnson K.G. & Ciocco A. (1966). Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time. Distribution, incidence and appearance time, 274, 1095–1101.
- Bouchet S., Dulucq S., Pasquet J.M., Lagarde V., Molimard M. & Mahon F. (2013). From in vitro to in vivo: Intracellular determination of imatinib and nilotinib may be related with clinical outcome. *Leukemia*, 27, 1757–1759.
- Bouwman P. & Jonkers J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer*, 12(9), 587–598.
- Bozina N., Bradamante V. & Lovrić M. (2009). Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 60(2), 217–242.
- Brehme M., Koschmieder S., Montazeri M., Copland M., Oehler V.G., Radich J.P., et al., (2016). Combined Population Dynamics and Entropy Modelling Supports Patient Stratification in Chronic Myeloid Leukemia. *Sci. Rep.*, 6, 24057.
- Brookes A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177–186.
- Bruhn O. & Cascorbi I. (2014). Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 10(10), 1337–1354.
- Bruzzoni-Giovanelli H., González J.R., Sigaux F., Villoutreix B.O., Cayuela J.M., Guilhot J., et al. (2015). Genetic polymorphisms associated with increased risk of developing chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget*, 6(34), 36269–77.
- Buryanovskyy L., Fu Y., Boyd M., Ma Y., Hsieh T.C., Wu J.M., et al. (2004). Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochemistry*, 43, 11417–11426.
- Buyru N., Tigli H. & Dalay N. (2003). P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol. Rep*, 10, 711–714.
- Caldemeyer L., Dugan M., Edwards J. & Akard L. (2016). Long-Term Side Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, 11(2), 71–79.
- Camelo-Santos J., do Prado Barbosa A., de Paula Silveira-Lacerda E. & Guillo L.A. (2013). Arginine homozygosity in codon 72 of p53 correlates with failure to imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Biomed. Pharmacother.*, 67(2), 103–107.
- Celli C.M., Tran N., Knox R., Jaiswal A.K. (2006). NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) catalyzes metabolic activation of quinones and anti-tumor drugs. *Biochem Pharmacol.*, 72, 366–376.

- Cervantes F., Rozman M., Rosell J, Urbano-Ispizua A, Montserrat E. & Rozman C. (1990). A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, 76, 27–32.
- Chakraborty S., Stark J.M., Sun C., Modi H., Chen W., O'Connor T.R., et al. (2013). Chronic myelogenous leukemia stem and progenitor cells demonstrate chromosomal instability related to repeated breakage-fusion-bridge cycles mediated by increased nonhomologous end joining. *Blood*, 119(26), 6187–6197.
- Chang B.L., Zheng S.L., Isaacs S.D., Turner A., Hawkins G. A., Wiley K. E., et al. (2003). Polymorphisms in the CYP1B1 gene are associated with increased risk of prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 89(8), 1524–1529.
- Chen D., Sun Q., Cheng X., Zhang L., Song W., Zhou D., et al. (2016). Genome-wide analysis of long noncoding RNA (lncRNA) expression in colorectal cancer tissues from patients with liver metastasis. *Cancer Med.*, 1629–1639.
- Chen Z., Shi T., Zhang L., Zhu P., Deng M., Huang C., et al. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.*, 370(1), 153–164.
- Chowdhury M.K., Moniruzzaman M., Emran A. Al, Mostafa M.G., Kuddus R. H., & Uddin M. A. (2015). TP53 codon 72 polymorphisms and lung cancer risk in the bangladeshi population. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 16(8), 3493–3498.
- Christopher L.J., Cui D., Wu C., Luo R., Manning J.A., Bonacorsi S.J., et al. (2008). Metabolism and disposition of dasatinib after oral administration to humans. *Drug Metab. Dispos.*, 36(7), 1357–1364.
- Collins S.L., Carr D.F. & Pirmohamed M. (2016). Advances in the Pharmacogenomics of Adverse Drug Reactions. *Drug Saf*, 39, 15–27.
- Costa S., Pinto D., Pereira D., Rodrigues H., Cameselle-Teijeiro J., Medeiros R., et al. (2008). Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer*, 8(1), 32.
- Cross, N.C., White, H.E., Muller, M.C., Saglio, G., Hochhaus A. (2012). Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 26(10), 2172–2175.
- Damin A.P., Frazzon A.P., Damin D.C., Roehe A., Hermes V., Zettler C., et al. (2006). Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detect Prev.*, 30, 523–529.
- Davies A., Giannoudis A., Zhang J.E., Austin G., Wang L., Holyoake T. L., et al. (2014). Dual Glutathione-S-Transferase-θ1 and -μ1 Gene Deletions Determine Imatinib Failure in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 96(6), 694–703.
- Davies A., Jordanides N. E., Giannoudis A., Lucas C.M., Hatziieremia S., Harris R. J., et al. (2009). Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34(+) chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia*, 23(11), 1999–2006.
- Davies S.M., Robison L.L., Buckley J.D., Tjoa T., Woods W.G., Radloff G.A., et al. (2001). Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.*, 19, 1279–1287.
- de Lima Marson F. A., Bertuzzo C. S., Secolin R., Ribeiro A.F. & Ribeiro J. D. (2013). Genetic interaction of GSH metabolic pathway genes in cystic fibrosis. *BMC Med. Genet.*, 14, 60.
- Dean M. & Annilo T. (2005). Evolution of the Atp-Binding Cassette (Abc) Transporter Superfamily in Vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 6(1), 123–142.

- Deenen M. J., Cats A., Beijnen J.H. & Schellens J.H. (2011). Part 1: background, methodology, and clinical adoption of pharmacogenetics. *Oncologist*, 16(6), 811–819.
- Deenik W., Van Der Holt B., Janssen J.J., Chu I.W., Valk P.J., Ossenkoppele G.J., et al. (2010). Polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1) predict for molecular resistance in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia receiving high-dose imatinib. *Blood*, 116(26), 6144–6145.
- Deguchi Y., Kimura S., Ashihara E., Niwa T., Hodohara K., Fujiyama Y., et al. (2008). Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines. *Leuk Res*, 32, 980–983.
- Deininger M.W., Goldman J.M. & Melo J.V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96, 3343–3356.
- Dessilly G., Panin N., Elens L., Haufroid V. & Demoulin J.B. (2016). Impact of ABCB1 1236C>t; T-2677G>t; T-3435C>t; T polymorphisms on the anti-proliferative activity of imatinib, nilotinib, dasatinib and ponatinib. *Sci. Rep.*, 6, 29559.
- Dulucq S., Bouchet S., Turcq B., Lippert E., Etienne G., Reiffers J., et al. (2008). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 112(5), 2024–2027.
- Dumont P., Leu J., Della Pietra A.C., George D.L. & Murphy M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.*, 33(3), 357–365.
- Dunna N.R., Vure S., Sailaja K., Surekha D., Raghunadharao D., Rajappa S., et al. (2012). TP53 Codon 72 Polymorphism and Risk of acute leukemia. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 13(1), 347–350.
- Dusinska M., Staruchova M., Horska A., Smolkova B., Collins A., Bonassi S., et al. (2012). Are glutathione S transferases involved in DNA damage signalling? Interactions with DNA damage and repair revealed from molecular epidemiology studies. *Mutat. Res.*, 736(1–2), 130–137.
- Eadie L.N., Saunders V.A., Hughes T.P. & White D.L. (2013). Degree of kinase inhibition achieved in vitro by imatinib and nilotinib is decreased by high levels of ABCB1 but not ABCG2. *Leuk. Lymphoma*, 54, 569–578.
- Eadie L.N., Hughes T.P. & White D.L. (2016 a). ABCB1 Overexpression Is a key initiator of resistance to tyrosine kinase inhibitors in CML cell lines. *PLoS One*, 11(8), 1–18.
- Eadie L.N., Dang P., Saunders V.A., Yeung D.T., Osborn M.P., Grigg A.P., et al. (2016 b). The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia[en prensa]*
- Edwards S.L., Beesley J., French J.D. & Dunning M. (2013). Beyond GWASs: Illuminating the dark road from association to function. *Am. J. Hum. Genet.*, 93(5), 779–797.
- Elefanty A.G., Hariharan I.K. & Cory S. (1990). Bcr-Abl, the Hallmark of Chronic Myeloid Leukaemia in Man, Induces Multiple Haemopoietic Neoplasms in Mice. *EMBO J.*, 9(4), 1069–78.
- Emilia G., Luppi M., Marasca R. & Torelli G. (1997). Relationship between BCR/ABL fusion proteins and leukemia phenotype. *Blood*, 89(10), 3889.
- Engler J.R., Hughes T.P. & White D.L. (2011). OCT-1 as a determinant of response to antileukemic treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 89(4), 608–11.
- Era T. & Witte O.N. (2000). Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(4), 1737–42.

- Erichsen H. & Chanock S. (2004). SNPs in cancer research and treatment. *Br. J. Cancer*, *90*, 747–751.
- Evans H.L. & McLeod W. E. (2003). Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, *348*, 538–549.
- Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R. & Kantarjian H.M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.*, *341*(3), 164–172.
- Fainstein E., Marcelle C., Rosner A., Canaani E., Gale R.P., Drezzen O., et al., (1987). A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia. *Nature*, *330*, 386–388.
- Felix C.A. (1998). Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta.*, *1400*(1–3), 233–255.
- Fialkow P.J., Garler S.M. & Yoshida A. (1976). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA.*, *58*, 1468–1471.
- Figuerola J.D., Sakoda L.C., Graubard B.I., Chanock S., Rubertone M.V., Erickson R.L., et al. (2008). Genetic variation in hormone metabolizing genes and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Causes Control.*, *19*(9), 917–29.
- Foster C.E., Bianchet M.A., Talalay P., Zhao Q. & Amzel L.M. (1999). Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein. *Biochemistry*, *38*(31), 9881–9886.
- Francisco G., Menezes P.R., Eluf-Neto J. & Chammas R. (2011). Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: A comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies. *Int. J. Cancer*, *129*(4), 920–930.
- Fukushima-Uesaka H., Saito Y., Maekawa K., Hasegawa R., Suzuki K., Yanagawa T., et al. (2007). Genetic variations of the ABC transporter gene ABCC3 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, *22*(2), 129–135.
- Fung K.L. & Gottesman M.M. (2010). A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta*, *1794*(5), 860–871.
- Galimberti S., Galeotti L., Ceccherini F., Polillo M., Baratè C., Fontanelli G., et al., (2014). Transmembrane transporters hOCT1 and SLCO1B3 polymorphisms could have a role in patients affected by chronic myeloid treated with nilotinib. *Blood*, *124*, 3608.
- Garte S., Gaspari L., Alexandrie A., Ambrosone C., Autrup H., Autrup J.L., et al. (2001). Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations 1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *10*(96), 1239–1248.
- Giannoudis A., Davies A., Lucas C.M., Harris R. J., Pirmohamed M. & Clark R. E. (2008). Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): Implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Blood*, *112*(8), 3348–3354.
- Giannoudis A., Wang L., Jorgensen A.L., Xinarianos G., Davies A., Pushpakom S., et al. (2013). The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*, *121*(4), 628–637.
- Giannoudis A., Davies A., Harris R.J., Lucas C.M., Pirmohamed M., & Clark R. E. (2014). The clinical significance of ABCC3 as an imatinib transporter in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, *28*(6), 1360–1363.
- Giles F.J., le Coutre P. D., Pinilla-Ibarz J., Larson R. A., Gattermann N., Ottmann O. G., et al. (2013). Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study. *Leukemia*, *27*(1), 107–112.
- Gishizky M.L., Johnson-White J. & Witte O. N. (1993). Efficient transplantation of BCR-ABL-induced

- chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(8), 3755–9.
- Saglio G., Kim D.W., Issaragrisil S., le Coutre P., Etienne G., Lobo C., et al. (2010). Nilotinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 362(24), 2251–2259.
- Glukhov S.I., Rubtsov M.A., Alexeyevsky D.A., Alexeevski A.V., Razin S.V. & Iarovaia O. V. (2013). The Broken MLL Gene Is Frequently Located Outside the Inherent Chromosome Territory in Human Lymphoid Cells Treated with DNA Topoisomerase II Poison Etoposide. *PLoS One*, 8(9), 1–11.
- Gochhait S., Bukhari S.I., Bairwa N., Vadhera S., Darvishi K., Raish M., et al., (2007). Implication of BRCA2 -26G>A 5' untranslated region polymorphism in susceptibility to sporadic breast cancer and its modulation by p53 codon 72 Arg>Pro polymorphism. *Breast Cancer Res.*, 9, 71.
- Gong X., Kole L., Iskander K. & Jaiswal A.K. (2007). NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20s proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res*, 67, 5380–5388.
- Gong X., Gutala R., Jaiswal A.K (2008). Quinone oxidoreductases and vitamin K metabolism. *Vitam Horm.*, 78, 85–101.
- González García J., Cruz M. & Gutiérrez C. (2015). Are submicroscopic chromosomal inversions predisposing factors for the t(9;22)(q34;q11.2) translocation in chronic myeloid leukemia? *Mol. Cytogenet.*, 8(1), 14.
- Grinfeld J., Gerrard G., Alikian M., Alonso-Dominguez J., Ale S., Valgañón M., et al. (2013). A common novel splice variant of SLC22A1 (OCT1) is associated with impaired responses to imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 163(5), 631–639.
- Groffen J., Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram C.R. & Grosvel G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 36, 93–99.
- Gromicho M., Dinis J., Magalhaes M., Fernandes A.R., Tavares P., Laires A., et al. (2011). Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1. *Leuk. Lymphoma*, 52(10), 1980–1990.
- Gschwind H.P., Pfaar U., Waldmeier F., Zollinger M., Sayer C., Zbinden P., et al., (2005). Metabolism and Disposition of Imatinib Mesylate in Healthy Volunteers. *Drug Metab. Dispos.*, 33(10), 1503–1512.
- Gupta S., Wulf G., Henjakovic M., Koepsell H., Burckhardt G. & Hagos Y. (2011). Human organic cation transporter 1 is expressed in lymphoma cells and increases susceptibility to irinotecan and paclitaxel. *J Pharmacol Exp Ther*, 341, 16–23.
- Gurney H., Wong M., Balleine R.L., Rivory L.P., McLachlan A.J., Hoskins J.M., et al. (2007). Imatinib disposition and ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) genotype. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 82(1), 33–40.
- Hamad A., Sahli Z., El Sabban M., Mouteirik M. & Nasr R. (2013). Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem Cells Int.*, 724360
- Hanna I.H., Dawling S., Roodi N., Guengerich F.P. & Parl F.F. (2000). Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res.*, 60, 3440–3444. *Cancer Res.*, 60, 3440–3444.
- Haouala A., Widmer N., Duchosal M.A., Montemurro M., Buclin T. & Decosterd L.A. (2011). Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood*, 117(8), 75–87.
- Harries L.W., Stubbins M.J., Forman D., Howard G.C. & Wolf C. R. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 18(4), 641–644.

- Hasford J.,Baccarani M.,Hoffmann V.,Guilhot J.,Saussele S.,Rosti G.,et al. (2011). Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: The EUTOS score. *Blood*, *118*(3), 686–692.
- Hasford J., Pfirrmann M., Hehlmann R., Allan N.C., Baccarani M., Kluin-Nelemans J.C., et al. (1998). A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst*, *90*(11), 859–858.
- Hayes J. D.,Flanagan J.U. & Jowsey I.R. (2005). Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, *45*(1), 51–88.
- Hazlehurst L.A., Bewry N.N., Nair R.R.& Pinilla-Ibarz J. (2009). Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. *Cancer Control*, *16*(2), 100–107.
- He H.,Zhang X.,Sun J.,Hu S.,Ma Y.,Dong Y.,et al. (2014). Glutathione S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to chronic myeloid leukemia. *Tumour Biol.*, *35*(6), 6119–6125.
- He X &Feng S. (2015). Role of Metabolic Enzymes P450 (CYP) on Activating Procarcinogen and their Polymorphisms on the Risk of Cancers. *Curr Drug Metab*, *16*, 850–863.
- He X.F., Wei J., Liu Z.Z., Xie J.J., Wang W., Du YP, et al. (2014). Association between CYP1A2 and CYP1B1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One.*, *12*(9), e100487.
- Hegedus C., Ozvegy-Laczka C., Apáti A., Magócsi M., Németh K., Orfi L., et al. (2009). Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: Implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br. J. Pharmacol*, *158*, 1153–1164.
- Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J., Kolb H.J., Pralle H., Hossfeld D.K., et al. (1993). Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea.The German CML Study Group. *Blood*, *82*, 398–407.
- Heisterkamp N., Groffen J., Stephenson J.R., Spurr N.K., Goodfellow P.N., Solomon E., et al. (1982). Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature*, *299*, 747–749.
- Heisterkamp N., Stam K., Groffen J., de Klein A., Grosveld G. (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*, *315*, 758–761.
- Heisterkamp N., Stephenson J. R., Groffen J., Hansen P. F., de Klein A., Bartram C. R.,et al. (1983). Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, *306*(5940), 239–242.
- Hirsch-Ginsberg C., Childs C., Chang K. S., Beran M., Cork A., Reuben J., et al. (1988). Phenotypic and molecular heterogeneity in Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood*, *71*(1), 186–195.
- Hiwase D.K., Saunders V.A.,Nievergall E., Ross D.D., White D.L. & Hughes T.P. (2013). Dasatinib targets chronic myeloid leukemia-CD34+ progenitors as effectively as it targets mature cells. *Haematologica*, *98*(6), 896–900.
- Hiwase D.K., Saunders V., Hewett D., Frede A., Zrim S., Dang P., et al. (2008). Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: Therapeutic implications. *Clin. Cancer Res*, *14*, 3881–3888.
- Hochhaus A. & Saglio G. (2013). Nilotinib is associated with a reduced incidence of BCR-ABL mutations vs imatinib in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood*, *121*(18), 3703–3708.
- Höglund M., Sandin F. & Simonsson B. (2015). Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann. Hematol.*, *94*(2), 241–247.

- Hollman A.L., Tchounwou P.B. & Huang H.C. (2016). The Association between Gene-Environment Interactions and Diseases Involving the Human GST Superfamily with SNP Variants. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13(4), 379.
- Holmberg, M. (1992). Is the primary event in radiation-induced chronic myelogenous leukemia the induction of the t(9;22) translocation? *Leuk Res*, 16, 333–336.
- Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D.B. & Johnston P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer*, 13(10), 714–726.
- Hsieh T.C., Yang C.J., Lin C.Y., Lee Y.S., Wu J.M. (2012). Control of stability of cyclin D1 by quinone reductase 2 in CWR22Rv1 prostate cancer cells. *Carcinog.* 33670–677., 33, 670–677.
- Hu W., Feng Z. & Levine A.J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer*, 3(3–4), 199–208.
- Hu S., Franke R.M., Filipinski K.K., Hu C., Orwick S.J., de Bruijn E.A., et al. (2008). Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res*, 14, 3141–3148.
- Hubackova M., Vaclavikova R., Ehrlichova M., Mrhalova M., Kodet R., Kubackova K., et al. (2011). Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas*, 40, 72–8.
- Hubackova M., Vaclavikova R., Ehrlichova M., Mrhalova M., Kodet R., Kubackova K., et al. (2012). Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *Int J Cancer*, 130 (2), 338–48.
- Huettnner C.S., Zhang P., Van Etten R.A. & Tenen D. (2000). Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR–ABL1. *Nat Genet.*, 24, 57–60.
- Hughes T. & Branford. S. (2006). Molecular monitoring of BCR–ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev.*, 20, 29–41.
- Hughes TP, Ross D.M. & Melo J. (2014). *Handbook of Chronic Myeloid Leukemia*. Springer International Publishing Switzerland.
- Hwan D., Kim D., Xu W., Ma C., Liu X., Siminovitch K. et al. (2009). Genetic variants in the candidate genes of the apoptosis pathway and susceptibility to chronic myeloid leukemia, 113(11), 2517–2525.
- Iarovaia O.V., Rubtsov M., Loudinkova E., Tsfasman T., Razin S.V & Vassetzky Y.S. (2014). Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Mol. Cancer*, 13, 249.
- Illmer T., Schaich M., Platzbecker U., Freiberg-Richter J., Oelschlagel U., von Bonin M. et al., (2004). P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia*, 18, 401–408.
- Ingelman-Sundberg M. (2005). The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207, 52–65.
- Iskander K., Barrios R.J. & Jaiswal A.K. (2009). NRH:Quinone oxidoreductase 2-deficient mice are highly susceptible to radiation-induced B-cell lymphomas. *Clin. Cancer Res.*, 15(5), 1534–1542.
- Iskander K. & Jaiswal A.K. (2005). Quinone oxidoreductases in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity. *Chem. Biol. Interact.*, 153–154, 147–157.
- Jabbour E. & Kantarjian H. (2016). Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am. J. Hematol.*, 91(2), 252–265.
- Jamieson D., Wilson K., Pridgeon S., Margetts J.P., Edmondson R.J., Leung H.Y., et al. (2007). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and NRH:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an

- NQO2 exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin. Cancer Res.*, 13(5), 1584–1590.
- Jamieson D., Cresti N., Bray J., Sludden J., Griffin M.J., Hawsawi N.M., et al., (2011). Two minor NQO1 and NQO2 alleles predict poor response of breast cancer patients to adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide therapy. *Pharmacogenet Genomics.*, 21, 808–19.
- Jefferis A.R., Benjes S.M., Smith T.L., Sowerby S.J. & Morris C.M. (1998). The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum. Mol. Genet.*, 7(5), 767–776.
- Jeggo P.A., Pearl L.H. & Carr A.M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat. Rev. Cancer*, 16(1), 35–42.
- Jorgensen H.G & Holyoake T. L. (2001). A comparison of normal and leukemic stem cell biology in Chronic Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol*, 19(3), 89–106.
- Josephs D.H., Fisher D.S., Spicer J. & Flanagan R.J. (2013). Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: Implications for therapeutic drug monitoring. *Ther. Drug Monit.*, 35(5), 562–587.
- Kalemi T.G., Lambropoulos A.F., Gueorguiev M., Chrisafi S., Papazisis K.T. & Kotsis A. (2005). The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Lett.*, 222(1), 57–65.
- Kantarjian H. M. & Talpaz M. (1988). Definition of the accelerated phase of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*, 6, 180–182.
- Kantarjian H.M., Shah N.P., Cortes J.E., Baccarani M., Agarwal M.B., Undurraga M.S., et al. (2012). Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *J Clin Oncol*, 30(11), 1123–1129.
- Kantarjian H.M., Keating M.J., Talpaz M., Walters R.S., Smith T.L., Cork A., et al. (1987). Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med*, 83, 445–454.
- Kassogue Y., Dehbi H., Quachouh M., Quessar A., Benchekroun S. & Nadifi S. (2015). Association of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) genes with chronic myeloid leukemia. *Springerplus*, 4(1), 3–7.
- Kekäle M., Airaksinen M. & Peltoniemi M. (2015). Patient-reported adverse drug reactions and their influence on adherence and quality of life of chronic myeloid leukemia patients on per oral tyrosine kinase inhibitor treatment. *Patient Prefer. Adherence*, 9, 1733–1740.
- Kelliher M.A., McLaughlin J., Witte O.N., & Rosenberg N. (1990). Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87(17), 6649–6653.
- Kerb R., Brinkmann U., Chatskaia N., Gorbunov D., Gorboulev V., Mornhinweg E., et al. (2002). Identification of genetic variations of the human organic cation transporter hOCT1 and their functional consequences. *Pharmacogenetics*, 12(8), 591–595.
- Khalade A., Jaakkola M.S., Pukkala E. & Jaakkola J. (2010). Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Env. Heal.*, 28, 9–31.
- Khorashad J.S., Kelley T.W., Szankasi P., Mason C.C., Soverini S., Adrian L.T., et al. (2013). BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: Frequency and clonal relationships. *Blood*, 121(3), 489–498.
- Kim D. H. (Dennis), Sriharsha L., Xu W., Kamel-Reid S., Liu X., Siminovitch K., et al. (2009). Clinical Relevance of a Pharmacogenetic Approach Using Multiple Candidate Genes to Predict Response and Resistance to Imatinib Therapy in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 15(14), 4750–4758.

- Kimchi-Sarfaty C., Oh J.M., Kim I.W., Sauna Z.E., Calcagno A.M., Ambudkar S.V., et al. (2007). A silent polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity, *Science* 318(5855),1283-1283.
- Kochethu G.,Delgado J.,Pepper C.,Starczynski J.,Hooper L.,Krishnan S.,et al. (2006). Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Res.*, 30(9), 1113–1118.
- Koh Y., Kim D.Y., Park S.H.,Jung S.H.,Park E., Kim H.J.,et al. (2010). GSTT1 copy number gain is a poor predictive marker for escalated-dose imatinib treatment in chronic myeloid leukemia: Genetic predictive marker found using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 203(2), 215–221.
- Kolomietz E.,Al-Maghrabi J., Brennan S.,Karaskova J.,Minkin S.,Lipton J.,et al. (2001). Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood*, 97(11), 3581–3588.
- Koren-Michowitz M., Buzaglo Z., Ribakovsky E., Schwarz M., Pessach I., Shimoni A., et al., (2014). OCT1 genetic variants are associated with long term outcomes in imatinib treated chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol.*, 92, 283–288.
- Kosztzu P., Bukvova R., Dolezel P., Mlejnek P. (2014). Resistance to daunorubicin, imatinib, or nilotinib depends on expression levels of ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells. *Chem. Biol. Interact.*, 219, 203–210.
- Kosztzu P. & Dolezel M.P. (2013). Can P-glycoprotein mediate resistance to nilotinib in human leukaemia cells? *Pharmacol Res*, 67, 79–83.
- Laborde E. (2010). Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.*, 17(9), 1373–1380.
- Lagas J.S., van Waterschoot R.A., van Tilburg V.A., Hillebrand M.J., Lankheet N., Rosing H., et al., (2009). Brain accumulation of dasatinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by elacridar treatment. *Clin. Cancer Res*, 15, 2344–2351.
- Lamm S.H., Engel A., Joshi K.P., Byrd DM 3rd. & Chen R. (2009). Chronic myelogenous leukemia and benzene exposure: a systematic review and meta-analysis of the case-control literature. *Chem Biol Interact. Chem Biol Interact.*, 182, 93–7.
- Leonardi D.B.,Abbate M., Riccheri M.C., Nuñez M., et al., (2016). Improving risk stratification of patients with childhood acute lymphoblastic leukemia : Glutathione-S-Transferases polymorphisms are associated with increased risk of relapse.*Oncotarget* [en prensa]
- Leung Y.K., Lau K.M., Mobley J. &Jiang Z H.S. (2005). Overexpression of cytochrome P450 1A1 and its novel spliced variant in ovarian cancer cells alternative subcellular enzyme compartmentation may contribute to carcinogenesis. *Cancer Res*, 65, 3726–3734.
- Lewis JM. & Schwartz M.A. (1998). Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem*, 273, 14225–14230.
- Li D.N., Seidel A., Pritchard M.P., Wolf C.R., Friedberg T. (2000). Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics*, 10, 343–353.
- Lin, J.H &Lu A.Y. (2001). Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 535–567.
- Liu G.E & Bickhart D.M. (2012). Copy number variation in the cattle genome. *Funct. Integr. Genomics*, 12(4), 609–624.
- Liu Y.C., Hsiao H.H., Yang W.C., Liu T.C., Chang C.S., Yang M.Y.,et al. (2014). MDM2 promoter

- polymorphism and p53 codon 72 polymorphism in chronic myeloid leukemia: The association between MDM2 promoter genotype and disease susceptibility, age of onset, and blast-free survival in chronic phase patients receiving imatinib. *Mol. Carcinog.*, 53(12), 951–959.
- Liu F., Luo L.M., Wei Y.G., Li B., Wang W.T., Wen T.F., et al., (2015). Polymorphisms of the CYP1B1 gene and hepatocellular carcinoma risk in a Chinese population. *Gene*, 564(1), 14–20.
- Long D.J. & Jaiswal A.K (2000). NRH:quinone oxidoreductase2 (NQO2). *Chem Biol Interact.*, 129, 99–112.
- Longley D.B. & Johnston P.G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.*, 205(2), 275–292.
- Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J. & Witte O. (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247, 1079–1082.
- Rodríguez-Antona C. & Taron M. (2015). Pharmacogenomic biomarkers for personalized cancer treatment. *J Intern Med*, 277, 201–217.
- Sim S.C. & Ingelman-Sundberg M. (2011). Pharmacogenomic biomarkers: new tools in current and future drug therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 32, 72–81.
- Ma Q. & Lu A. (2011). Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev.*, 63(2), 437–459.
- Maffioli M., Camós M., Gaya A., Hernández-Boluda J.C., Álvarez-Larrán A., Domingo A., et al. (2011). Correlation between genetic polymorphisms of the hOCT1 and MDR1 genes and the response to imatinib in patients newly diagnosed with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, 35(8), 1014–1019.
- Marin M.C., Jost C.A., Brooks L.A., Irwin M.S., O’Nions J., Tidy J.A., et al. (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet.*, 25(1), 47–54.
- Masood N., Malik FA & Kayani. MA. (2011). Expression of xenobiotic metabolizing genes in head and neck cancer tissues. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(2), 377–382.
- Meaburn K.J., Misteli T. & Soutoglou E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations, 17, 80–90.
- Meek D.W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.*, 469(3), 325–46.
- Megarthy C.F., Gill J.R., Caraher M.C., Stratford I.J., Nolan K.A. & Timson D.J. (2014). The two common polymorphic forms of human NRH-quinone oxidoreductase 2 (NQO2) have different biochemical properties. *FEBS Lett.*, 588(9), 1666–1672.
- Melo J.V., Myint H., Galton D.A. & Goldman J.M. (1994). P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia? *Leukemia*, 8(1), 208–211.
- Melo J.V. (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88, 2375–2384.
- Mendizabal A.M., Garcia-Gonzalez P. & Levine P.H (2013). Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. *Cancer Epidemiol.* 2013;37:247-254., 37, 247–254.
- Morari E. C., Luísa J., Leite P. & Granja F. (2002). The Null Genotype of Glutathione S-Transferase M1 and T1 Locus Increases the Risk for Thyroid Cancer The Null Genotype of Glutathione S-Transferase M1 and T1 Locus Increases the Risk for Thyroid Cancer 1. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 11(November), 1485–1488.
- More S.S., Li S., Yee S.W., Chen L., Xu Z., Jablons D.M. et al., (2010). Organic cation transporters

- modulate the uptake and cytotoxicity of picoplatin, a third-generation platinum analogue. *Mol Cancer Ther*, 9, 1058–1069.
- Moyer A.M., Salavaggione O.E., Wu T.Y., Moon I., Eckloff B.W., Hildebrandt M.A., et al. (2008). Glutathione s-transferase p1: gene sequence variation and functional genomic studies. *Cancer Res*, 68(12), 4791–4801.
- Mughal T.I., Radich J.P., Deininger M.W., Apperley J.F., Hughes T.P., Harrison C.J., et al. (2016). Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica*, 101, 541–58.
- Muller P.A. & Vousden K.H. (2014). Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*, 25(3), 304–317.
- Müller P., Asher N., Heled M., Cohen S.B., Risch A. & Rund D. (2008). Polymorphisms in transporter and phase II metabolism genes as potential modifiers of the predisposition to and treatment outcome of de novo acute myeloid leukemia in Israeli ethnic groups. *Leuk Res*, 32, 919–929.
- Murray G.I., Taylor M.C., McFadyen M.C., McKay J.A., Greenlee W.F., Burke M.D. et al. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57, 57, 3026– 3031.
- Nadji S.A., Mahmoodi M., Ziaee A.A., Naghshvar F., Torabizadeh J, Yahyapour Y., et al., (2007). An increased lung cancer risk associated with codon 72 polymorphism in the TP53 gene and human papillomavirus infection in Mazandaran province, Iran. *Lung Cancer*, 56, 145–151.
- Narjoo C., Favre A., McMullen J., Kiehl P., Montemurro M., Figg W.D., et al. (2014). Important role of CYP2J2 in protein kinase inhibitor degradation: A possible role in intratumor drug disposition and resistance. *PLoS One*, 9(5).
- Nebert D.W & Russell D.W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360, 1155–1162.
- Nebert D.W & Dalton T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 6(12), 947–960.
- Neves H., Ramos C., da Silva M.G., Parreira A. & Parreira L. (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*, 93(4), 1197–1207.
- Ni L.N., Li J.Y., Miao K.R., Qiao C., Zhang S.J., Qiu H.R., et al. (2011). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med. Oncol.*, 28(1), 265–269.
- Nowell P.C. & Hungerford D.A. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497.
- O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A., Gathmann I., Baccarani M., Cervantes F., et al. (2003). Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 348(11), 994–1004.
- O'Hare T., Zabriskie M. S., Eiring A.M. & Deininger M.W. (2012). Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 12(8), 513–526.
- Oyama T., Sugio K., Isse T., Matsumoto A., Nose N., et al. (2008). Expression of cytochrome P450 in nonsmall cell lung cancer. *Front Biosci*, 13, 5787–5793.
- Özten N., Sunguro A. & Bosland M.C. (2011). Variations in glutathione-S-transferase genes influence risk of chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol*, 30(3), 105–155
- Paine M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E. Zeldin D. C. (2006). The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*, 34, 880–886.

- Pandith A.A., Khan N.P., Rashid N., Azad N., Zaroo I., Hafiz A., et al. (2012). Impact of codon 72 Arg > Pro single nucleotide polymorphism in TP53 gene in the risk of kangri cancer: a case control study in Kashmir. *Tumour Biol.*, 33(4), 927–933.
- Park S.K., Andreotti G., Sakoda L.C., Gao Y.T., Rashid A., Chen J., et al. (2009). Variants in hormone-related genes and the risk of biliary tract cancers and stones: A population-based study in China. *Carcinogenesis*, 30(4), 606–614.
- Patrick B.A., Gong X. & Jaiswal. A.K (2011). Disruption of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene in mice leads to 20S proteasomal degradation of p63 resulting in thinning of epithelium and chemical-induced skin cancer. *Oncogene*, 30, 1098–1107.
- Pawlowska E. & Blasiak J. (2015). DNA repair—a double-edged sword in the genomic stability of cancer cells—the case of chronic myeloid leukemia. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(11), 27535–27549.
- Payton A., Miyajima F., Ollier W., Rabbitt P., Pickles A., Weiss V., et al. (2010). Investigation of a functional quinone oxidoreductase (NQO2) polymorphism and cognitive decline. *Neurobiol Aging*, 31, 351–352.
- Pedersen-Bjergaard J., Brøndum-Nielsen K., Karle H. & Johansson B. (1997). Chemotherapy-related - late occurring - Philadelphia chromosome in AML, ALL and CML. Similar events related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors? *Leukemia*, 11, 1571–1574.
- Perrotti D., Jamieson C., Goldman J. & Skorski T. (2010). Chronic myeloid leukemia: Mechanisms of blastic transformation. *J. Clin. Invest.*, 120(7), 2254–2264.
- Piller G. (2001). Leukaemia—a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol.*, 112, 282–292.
- Pim D. & Banks L. (2004). P53 Polymorphic Variants At Codon 72 Exert Different Effects on Cell Cycle Progression. *Int. J. Cancer*, 108(2), 196–199.
- Pirmohamed M. (2006). Genetic factors in the predisposition to drug-induced hypersensitivity reactions. *AAPS J.*, 8, 20–26.
- Quintás-Cardama A. & Cortes J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*, 113(8), 1619–1630.
- Radich J.P., Dai H., Mao M., Oehler V., Schelter J., Druker B. et al. (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 2794–2799.
- Rahgozar S., Moafi A., Abedi M., Entezar-E-Ghaem M., Moshtaghian J., Ghaedi K., et al. (2014). mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biol Ther.*, 15, 35–41.
- Rea D. (2015). Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Ann. Hematol.*, 94(2), 149–158.
- Redon R., Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry G.H., Andrews T.D., et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), 444–54.
- Relling M.V., Boyett J.M., Blanco J.G., Raimondi S., Behm F.G., Sandlund J.T., et al., (2003). Granulocyte colony-stimulating factor and the risk of secondary myeloid malignancy after etoposide treatment. *Blood*, 101, 3862–3867.
- Rix U., Hantschel O., Dürnberger G., Remsing Rix L.L., Planyavsky M., Fernbach N.V., et al. (2007). Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood*, 110(12), 4055–4063.
- Rochat B. (2009). Importance of influx and efflux systems and xenobiotic metabolizing enzymes in

- intratumoral disposition of anticancer agents. *Curr. Cancer Drug Targets*, 9, 652–674.
- Rohrbacher M. & Hasford J. (2009). Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol. Pr. Res Clin Haematol*, 22, 295–302.
- Rojano E., Ranea J.A. & Perkins J. R. (2016). Characterisation of non-coding genetic variation in histamine receptors using AnNCR-SNP. *Amino Acids*.
- Roos P.H. & Bolt H.M. (2005). Cytochrome P450 interactions in human cancers: new aspects considering CYP1B1. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 1(2), 187–202.
- Rotunno M., Yu K., Lubin J.H., Consonni D., Pesatori A.C., Goldstein A.M., et al. (2009). Phase I metabolic genes and risk of lung cancer: Multiple polymorphisms and mRNA expression. *PLoS One*, 4(5).
- Rowley J. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243, 290–293.
- Ruan X.L., Li S., Meng X.Y., Geng P., Gao Q.P. & Ao X.B. (2015). The Role of TP53 Gene Codon 72 Polymorphism in Leukemia. *Medicine (Baltimore)*, 94(38), e1588.
- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S.C., Kakol J.M., Stein L.D., Marth G., et al. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409(6822), 928–933.
- Saglio G., Guerrasio A., Rosso C., Zaccaria A., Tassinari A., Serra A., et al. (1990). New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 76, 1819–1824.
- Sailaja K., Surekha D., Rao D.N., Rao D.R. & Vishnupriya S. (2010). Association of the GSTP1 gene (Ile105Val) polymorphism with chronic myeloid leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 11(2), 461–464.
- Saito S., Iida A., Sekine A., Miura Y., Ogawa C., Kawachi S., et al. (2002). Identification of 779 genetic variations in eight genes encoding members of the ATP-binding cassette, subfamily C (ABCC/MRP/CFTR). *J Hum Genet*, 47(4), 147–71.
- Sakofsky C., Ayyar S. & Malkova A. (2012). Break-Induced Replication and Genome Stability. *Biomolecules*, 2(4), 483–504.
- Salnikova L.E., Belopolskaya O.B., Zelinskaya N.I. & Rubanovich A.V. (2013). The potential effect of gender in CYP1A1 and GSTM1 genotype-specific associations with pediatric brain tumor. *Tumor Biol.*, 34(5), 2709–2719.
- Sankhwar M., Sankhwar S.N., Abhishek A., Gupta N. & Rajender S. (2016). CYP1B1 gene polymorphisms correlate with an increased risk of urinary bladder cancer in India. *Urol Oncol.*, 34(4), 167.e1-8.
- Santovito A., Cervella P., Burgarello C., Bigatti M.P., Sella G. & Delpero M. (2008). Analysis of glutathione S-transferase M1 and glutathione S-transferase T1 gene polymorphisms suggests age-related relationships in a northern Italian population. *Arch. Toxicol.*, 82(12), 903–907.
- Sauna Z.E., Kimchi-Sarfaty C., Ambudkar S.V. & Gottesman M.M. (2007). Silent polymorphisms speak: How they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res.*, 67(20), 9609–9612.
- Sawyers C.L., McLaughlin J., Goga A., Havlik M. & Witte O. (1994). The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*, 77, 121–131.
- Saxena M., Stephens M.A., Pathak H. & Rangarajan A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis.*, 2(7), e179.
- Schaefer-Rego K., Arlin Z., Shapiro L.G., Mears J.G. & Leibowitz D. (1988). Molecular heterogeneity of

- adult Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*, 48(4), 866–869.
- Schaeffeler E., Hellerbrand C., Nies A.T., Winter S., Kruck S., Hofmann U., et al., (2011). DNA methylation is associated with downregulation of the organic cation transporter OCT1 (SLC22A1) in human hepatocellular carcinoma. *Genome Med*, 3, 82.
- Schinkel A.H., Mayer U., Schinkel A.H., Mayer U., Wagenaar E., Mol C.A., et al. (1997). Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4028–4033.
- Schinkel A.H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A. & Borst P. (1995). Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest*, 96, 1698–1705.
- Sebat J., Lakshmi B., Troge J., Alexander J., Young J., Lundin P., et al. (2004). Large-Scale Copy Number Polymorphism in the Human Genome. *Science* 305(2004), 525–528.
- Selleri L. von Liriden M., Hermans A., Meijer D., Torelli G., Grosveld G. (1990). Chronic myeloid leukemia may be associated with several bcr-abl transcripts including the acute lymphoid leukemia-type 7 kb transcript. *Blood*, 75(5), 1146–1153.
- Shi H., Lu D., Shu Y., Shi W., Lu S. & Wang K. (2008). Expression of multidrug resistance related proteins p-glycoprotein, glutathione-s-transferases, topoisomerase-II and lung resistance protein in primary gastric cardiac adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*, 55, 1530–1236.
- Shimada T., Watanabe J., Kawajiri K., Sutter T.R., Guengerich F.P., Gillam E.M., et al. (1999). Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis*, 20, 1607–1613.
- Siddique M. & Sabapathy K. (2006). Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*, 25(25), 3489–500.
- Siegel R, Naishadham D. & Jemal. A. (2012). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 62, 10–29.
- Skoglund K., Moreno S.B., Baytar M., Jönsson J.I. & Gréen H. (2013). ABCB1 haplotypes do not influence transport or efficacy of tyrosine kinase inhibitors in vitro. *Pharmgenomics. Pers. Med.*, 6(1), 63–72.
- Skorski T. (2007). Genomic instability: The cause and effect of BCR/ABL tyrosine kinase. *Curr. Hematol. Malign. Rep.*, 2(2), 69–74.
- Sokal J.E., Cox E.B., Baccarani M., Tura S., Gomez G.A., Robertson J.E., et al. (1984). Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood*, 63(4), 789–199.
- Sollner S. & Macheroux P. (2009). New roles of flavoproteins in molecular cell biology: an unexpected role for quinone reductases as regulators of proteasomal degradation. *FEBS J*, 276, 4313–4324.
- Soverini S., De Benedittis C., Mancini M. & Martinelli G. (2015). Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.*, 15(S), S120–S128.
- Stanulla M., Schrappe M., Brechlin A.M., Zimmermann M. & Welte K. (2000). Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*, 95, 1222–1228.
- Stella F., Weich N., Panero J., Fantl D. B., Schutz N., Fundia A. F., et al. (2013). Glutathione S-transferase P1 mRNA expression in plasma cell disorders and its correlation with polymorphic variants and clinical outcome. *Cancer Epidemiol.*, 37(5), 671–674.
- Strassburg A., Strassburg C.P., Manns M.P. & Tukey R.H. (2002). Differential gene expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NRH:quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue. *Mol. Pharmacol.*, 61(2), 320–325.

- Sullivan A., Syed N., Gasco M., Bergamaschi D., Trigiante G., Attard M., et al. (2004). Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*, 23(19), 3328–3337.
- Sunder-Plassmann R., Rieger S., Endler G., Brunner M., Muller M. & Mannhalter C. (2005). Simultaneous analysis of MDR1 C3435T, G2677T/A, and C1236T genotypes by multiplexed mutagenically separated PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 43(2), 192–194.
- Tabarestani S. & Movafagh A. (2016). New Developments in Chronic Myeloid Leukemia: Implications for Therapy. *Iran. J. Cancer Prev.*, 9(1), 1–8.
- Talpaz M., Kantarjian H.M., McCredie K.B., Keating M.J., Trujillo J. & Gutterman. J. (1987). Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 69(5), 1280–1288.
- Tanwar M., Dada T., Sihota R. & Dada R. (2009). Identification of four novel cytochrome P450B1 mutations (p.I94X, p.H279D, p.Q340H, and p.K433K) in primary congenital glaucoma patients. *Mol. Vis.*, 15, 2926–2937.
- Taspinar M., Aydos S., Comez O., Ah E., Hg K. & Sunguroglu A. (2008). CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukaemia. *Swiss Med Wkly*, 138, 12–18.
- Taspinar M., Aydos S.E., Comez O., Elhan A.H., Karabulut H.G. & Sunguroglu A. (2008). CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukemia. *Swiss Med Wkly*, 138(1–2), 12–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18224491>
- Tew K.D. (2007). Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. *Biochem. Pharmacol.*, 73(9), 1257–1269.
- Tew K.D. & Townsend D.M. (2012). Glutathione-S-Transferases As Determinants of Cell Survival and Death. *Antioxid. Redox Signal.*, 17(12), 1728–1737.
- Thomas J., Wang L., Clark R.E. & Pirmohamed M. (2004). Active transport of imatinib into and out of cells: Implications for drug resistance. *Blood*, 104(12), 3739–3745.
- Thomas M., Kalita A., Labrecque S., Pim D., Banks L. & Matlashewski G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell. Biol.*, 19(2), 1092–1100.
- Tiwari A.K., Sodani K., Dai C.L., Abuznait A.H., Singh S., Xiao Z.J., et al (2013). Nilotinib potentiates anticancer drug sensitivity in murine ABCB1-, ABCG2-, and ABCC10-multidrug resistance xenograft models. *Cancer Lett.*, 328, 307–317.
- Tiwari A.K., Sodani K., Wang S.R., Kuang Y.H., Ashby C.R. Jr, Chen X., et al. (2009). Nilotinib (AMN107, Tasisign) reverses multidrug resistance by inhibiting the activity of the ABCB1/Pgp and ABCG2/BCRP/MXR transporters. *Biochem. Pharmacol*, 78, 153–161.
- Townsend D.M. & Tew K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369–7375.
- Tzvetkov M.V., Seitz T., Bokelmann K., Mueller T., Brockmüller J. & Koepsell H. (2014). Does the haplotype Met408-Del420, which was apparently predictive for imatinib efficacy, really exist and how strongly may it affect OCT1 activity? *Blood*, 123, 1427–1429.
- Vaidya S., Ghosh K., Shanmukhaiah C. & Vundinti B.R. (2015). Genetic variations of hOCT1 gene and CYP3A4 / A5 genes and their association with imatinib response in Chronic Myeloid Leukemia. *Eur. J. Pharmacol.*, 765, 124–130.
- van Erp NP, Gelderblom H. & Guchelaar HJ. (2009). Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* 35: 692–706. *Cancer Treat Rev*, 35, 692–706.
- Vasiliou V., Ross D. & Nebert D.W. (2006). Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Hum. Genomics*, 2(5), 329–335.

- Vella F., Ferry G., Delagrangé P., Boutin J.A. (2005). NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol.*, *71*, 1–12.
- Vikhanskaya F., Siddique M. M. & Lee M. K. (2005). Evaluation of the Combined Effect of p53 Codon 72 Polymorphism and Hotspot Mutations in Response to Anticancer Drugs and Hotspot Mutations in Response to Anticancer Drugs, *53(17)*, 4348–4356.
- Vine J., Cohen S.B., Ruchlemer R., Goldschmidt N., Levin M., Libster D., et al. (2014). Polymorphisms in the human organic cation transporter and the multidrug resistance gene: correlation with imatinib levels and clinical course in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, *55(11)*, 2525–2531.
- Vlaanderen J., Lan Q., Kromhout H., Rothman N., Vermeulen R. (2012). Occupational benzene exposure and the risk of chronic myeloid leukemia: A meta-analysis of cohort studies incorporating study quality dimensions. *Am J Ind Med*, *55*, 779–875.
- Wang D., Johnson A.D., Papp A.C., Kroetz D.L. & Sadee W. (2005). Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*, *15(10)*, 693–704.
- Wang D. & Sadée W. (2006). Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J.*, *8(3)*, E515–E520.
- Wang F., Wang X.K., Shi C.J., Zhang H., Hu Y.P., Chen Y.F., et al. (2014). Nilotinib enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic drugs in CD34(+)/CD38(-) stem cells and ABC transporter overexpressing leukemia cells. *Molecules*, *19*, 3356–75.
- Wang Z., Li M., Li L., Sun H. & Lin X.Y. (2015). Association of single nucleotide polymorphisms in the CYP1B1 gene with the risk of primary open-angle glaucoma: a meta-analysis. *Genet Mol Res*, *14(4)*, 17262–72.
- Weinshilboum R. (2003). Inheritance and drug response. *N. Engl. J. Med.*, *348(6)*, 529–537.
- Weisberg E., Manley P.W., Breitenstein W., Brügger J., Cowan-Jacob S.W., Ray A., et al., (2005). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell.*, *7*, 129–141.
- Weisberg E., Manley P.W., Cowan-Jacob S.W., Hochhaus A. & Griffin J.D. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*, *5*, 345–356.
- Wetzler M, Talpaz M, Yee G, Stass SA, Van Etten RA, Andreeff M, et al., (1995). Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*, 3488–1292.
- White D.L., Saunders V. A., Dang P., Engler J. & Hughes T. P. (2010). OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia*, *24(11)*, 1962–1965.
- Wolking S., Schaeffeler E., Lerche H., Schwab M. & Nies A.T. (2015). Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet.*, *54(7)*, 709–735.
- Yamakawa Y., Hamada A., Uchida T., Sato D., Yuki M., Hayashi M., et al. (2014). Distinct interaction of nilotinib and imatinib with P-Glycoprotein in intracellular accumulation and cytotoxicity in CML Cell Line K562 cells. *Biol Pharm Bull*, *37(8)*, 1330–1335.
- Yee S.W., Mefford J.A., Singh N., Percival M.E., Stecula A., Yang K., et al. (2013). Impact of polymorphisms in drug pathway genes on disease-free survival in adults with acute myeloid leukemia. *J. Hum. Genet.*, *58(6)*, 353–61.

- Yin C.X.,Chen W.W.,Zhong Q.X.,Jiang X.J.,Wang Z.X.,Li X.D.,et al. (2016a). Association between the concentration of imatinib in bone marrow mononuclear cells, mutation status of ABCB1 and therapeutic response in patients with chronic myelogenous leukemia. *Exp. Ther. Med.*, 11(5), 2061–2065.
- Yu K.D, Di G.H., Yuan W.T.,Fan L.,Wu J.,Hu Z.,et al. (2009). Functional polymorphisms, altered gene expression and genetic association link NRH:quinone oxidoreductase 2 to breast cancer with wild-type p53. *Hum. Mol. Genet.*, 18(13), 2502–2517.
- Yuan Z.M., Shioya H., Ishiko T., Sun X., Gu J., Huang Y.Y., et al. (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*, 399, 814–817.
- Zhang F.,Gu W.,Hurles M. E. & Lupski J. R. (2009). Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 10, 451–81.
- Zhang H.,Li L. & Xu Y. (2013). CYP1B1 Polymorphisms and Susceptibility to Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 8(7).
- Zheng Q.,Wu H.,Yu Q., Kim D.H. (Dennis), Lipton J.H.,Angelini S.,et al. (2014). ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.*,15(2), 127–134.
- Zu B.,Li Y.,Wang X.,He D.,Huang Z. & Feng W. (2014). in chronic myeloid leukemia : a meta-analysis Research Article, 15, 667–677.