

HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FACTORES PRONÓSTICO EN LEUCEMIA
MIELOIDE CRÓNICA FILADELFIA
POSITIVA EN PACIENTES
TRATADOS CON INHIBIDORES
DE LA TIROSINCINASA

TESIS DOCTORAL

Doctorando: José Valentín García Gutiérrez

Directora: Dra Pilar Herrera Puente
Codirector: Dr José María de Pablos Gallego

GRANADA 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Valentín García Gutiérrez
D.L.: GR. 2097-2008
ISBN: 978-84-691-6362-7

A mis padres, por auparme en los momentos buenos y levantarme en los malos, por trasmitirme, sin yo darme cuenta, todas las virtudes que los demás ven en mí, por ser en todo momento mi ejemplo a seguir, por el amor que siempre me han dado y con el paso del tiempo comienzo a ver.

A Juan Enrique, quien me ha abierto camino desde que yo recuerdo.

A Maite, mi ejemplo de superación.

AGRADECIMENTOS:

Quizás ésta sea una de las partes que con más cariño se escriben, pero también una de las más complicadas. Es difícil, por no decir imposible, enunciar en estas líneas a todas las personas que de una forma u otra han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, no obstante lo intentaré, mostrando mi más sincero agradecimiento a:

La Dra Pilar Herrera Puente quien, no solamente ha dirigido esta Tesis, sino que ha contribuido de una manera especial, tanto en el desarrollo del trabajo, como en mis años de residencia.

Al Dr de Pablos, codirector de esta Tesis, por su entusiasmo, disposición y cercanía.

A todos los adjuntos del Servicio de Hematología, quienes desde mis primeros pasos en la especialidad me ensaaron lo fascinante de ésta.

Al Dr Odriozola, quién es el causante de que escriba estas líneas, por transmitir sus conocimientos desde el cariño, por su constante apoyo, por confiar en mí.

A la Dra Calbacho, quién ha contribuido, seguramente más de lo que ella piensa, a que este doctorado sea posible y a mi formación desde mis primeros momentos en la práctica médica.

A todos los residentes del Servicio de Hematología, en especial a aquellas que se sentaron a mi lado el primer día de residencia, por su apoyo y cariño, sin duda han hecho todo ésto más fácil.

A Lourdes y Paloma Ramos, quienes con su trabajo desde el Laboratorio de la Unidad de Trasplante han hecho posible este proyecto, por su apoyo constante.

Al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas y en especial a la Dra. Raquel Villuendas.

A María Dolores Rey del Servicio de Genética del Hospital Ramón y Cajal, por su valiosa ayuda.

A Alfonso Muriel del Servicio de Bioestadística del Hospital Ramón y Cajal, por su docencia y completa disponibilidad.

A Rafa, mi futuro cuñado, quien, siempre disponible, ha contribuido de una forma especial a la finalización de este proyecto

A todos mis amigos, ellos saben quienes son, por su comprensión, constante cariño y apoyo, por el tiempo que tenemos que recuperar.

A mi abuelo, el Dr Emilio Gutiérrez, él seguro está orgulloso de estó, por haber transmitido a mis padres, con tanto amor y pasión, esa vocación familiar que yo ahora me siento tan orgulloso de continuar.

A todos los pacientes, desde el cariño, esperando que todo estó sirva para algo.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	24
I. EPIDEMIOLOGÍA	29
II. ETIOLOGÍA.....	30
III. PRESENTACIÓN CLÍNICA.....	31
IV. DIAGNÓSTICO.....	34
1. LMC Cromosoma Filadelfia Negativa	34
- LMC atípica:	35
- Leucemia neutrofílica crónica:.....	36
2. Diagnóstico diferencial.....	36
- Leucemia Mielomonocítica Juvenil:	36
- Leucemia Mielomonocítica Crónica:	37
- Leucemia Eosinofílica Crónica:	37
- Otras patologías cromosoma Filadelfia positivas:	38
V. FISIOPATOLOGÍA DE LA LMC FILADELFIA POSITIVA.....	39
1. Alteraciones genéticas en la LMC.....	39
2. Biología molecular en la LMC.....	41
2.1 La proteína ABL:.....	42
2.2 La proteína BCR:.....	42
2.3 Las proteínas de fusión BCR-ABL:	43
2.4 Sustrato y vías de transducción de señales activadas por BCR-ABL:	44
- Via STAT:.....	44
- Via Ras:.....	45
-Vías MAPK:.....	45

- Fosfatidilinositol-3-cinasa:.....	46
- ROS:.....	46
2.5 Efectos bilógicos de BCR-ABL:	48
VI. TRATAMIENTO	50
1. Tratamiento antes de los inhibidores de la tirosincinasa:	51
1.1. Quimioterapia con Busulfan e Hidroxiurea:.....	51
1.2 Interferón- α (IFN- α):	52
- Duración del tratamiento:.....	52
- Comparación con el trasplante:	53
- Terapia combinada:	53
-Papel actual del Interferón- α :	54
1.3 Papel del trasplante de progenitores hematopoyéticos	55
- Indicaciones actuales del trasplante alogénico de progenitors hematopoyéticos:.....	57
2. Tratamiento con Inhibidores de la tirosincinasa.....	58
2.1. Imatinib (IM).....	60
2.1.1 Desarrollo	60
2.1.2 Mecanismo de acción	60
2.1.3 Resultados clínicos	61
2.1.4 Problemas con Imatinib:.....	67
2.1.5 Resistencias a Imatinib:	68
a) Biodisponibilidad oral:	69
b) Unión plasma proteína:	69
c) Cambios en la variabilidad intracelular del Imatinib:	70
d) Aumento de la expresión de BCR:	72
e) Evolución clonal:.....	72
f) Mutaciones en el dominio ABL-cinasa:	72

2.2 Dasatinib.....	76
2.3. Nilotinib.....	80
2.4 Otros inhibidores de la tirosincinasa	83
2.4.1 Bosutinib.....	83
2.4.5 Inno-406	83
2.4.6 Inhibidores de Aurora-Cinasa.....	83
3. Tratamiento de la LMC en la era Imatinib	84
VII. FACTORES PRONÓSTICO	89
1. Factores pronóstico clásicos en LMC.....	89
2. Factores Pronóstico pre-tratamiento a Imatinib	90
2.1 Índices de Sokal y Hasford.....	90
2.2 Análisis citogenético	92
2.3 Perfiles de expresión de mRNA	93
2.4 El estudio de los mediadores activados (fosforilación proteica medida por citometría de flujo):	94
2.5 Sensibilidad intrínseca a inhibidores tirosincinasa.....	96
2.6 Niveles basales de mRNA BCR-ABL.....	97
2.7 Estudio de mutaciones al diagnóstico.....	98
3. Respuesta a Imatinib.....	99
3.1 Respuesta hematológica	100
3.2 Respuesta citogenética.....	100
3.3 Respuesta Molecular.	101
3.4 Inhibición de las cinasas in vivo.....	102
VIII. MONITORIZACIÓN DE RESPUESTA EN PACIENTES TRATADOS CON INHIBIDORES DE LAS TIROSINCINASAS.....	103
1. Citogenética clásica	103
2. FISH (Hibridación In Situ con Fluorescencia).....	105

3. PCR cuantitativa a tiempo real	106
4. Respuestas según criterios de expertos LEUKEMIA NET	108
5. Detección de mutaciones en el dominio tirosincinasa.....	110
- Metodos de detección:.....	111
6. Monitorización individual para pacientes que reciben inhibidores de las tirosincinasas	112
6.1 Indicaciones al diagnóstico de LMC	112
6.2 Monitorización del paciente que aparentemente responde a tratamiento.....	113
6.3 Indicación de análisis de mutaciones	114
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	115
I. HIPÓTESIS.....	119
II. OBJETIVOS PRINCIPALES.....	120
III. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	120
<i>MATERIA Y MÉTODOS</i>	121
I. PACIENTES	125
II. TRATAMIENTO CON IMATINIB.....	128
III. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO	129
Actitud terapéutica según evolución:	129
IV. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	130
1. Respuesta hematológica	130
2. Respuesta citogenética.....	130
3. PCR cuantitativa “a tiempo real” (Q-PCR).....	131
- Principios de la Q-PCR	131
- Preparación de las muestras	131
- Extracción de RNA	131

- Síntesis de cDNA	132
- Q-RCP “a tiempo real” para la cuantificación de los transcritos Bcr-Abl.....	132
- Cuantificación de los transcritos BCR-ABL.....	135
- Reproducibilidad.....	136
V. MÉTODO DE ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA CASCADA DE SEÑALES QUE INICIA BCR-ABL	137
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	138
1. Análisis descriptivo:	138
2. Análisis de supervivencia y cinética de la respuesta citogenética:.....	138
3. Gestión de datos:	138
RESULTADOS	139
I. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA	143
II. TRATAMIENTO CON IMATINIB.....	146
III. DOSIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE LA TIROSINASA DE SEGUNDA GENERACIÓN	148
1. Dasatinib.....	148
2. Nilotinib.....	148
IV. RESPUESTAS A IMATINIB (IM)	150
1. Respuestas Hematológicas	150
2. Respuestas Citogenéticas.....	150
3. Respuestas Moleculares.....	154
4. Tipo de respuesta según criterios de respuesta al tratamiento establecidos por el comité internacional de expertos LEUKEMIA NET.	156
5. Respuestas sub-óptimas y fallo de tratamiento.	158
5.1 Respuestas sub-óptimas.....	158

5.2 Pérdidas de respuestas moleculares.....	158
5.3 Aumento de dosis de Imatinib	158
5.4 Fallo del tratamiento	159
V. RESPUESTAS A INHIBIDORES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	160
1. Dasatinib.....	160
VI. SUPERVIVENCIA	161
VII. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD POR FOSFORILACIÓN PROTEICA.....	165
1. Predicción de respuesta molecular y citogenética mediante análisis de los niveles de fosfotirosina y stat5-P:	165
2. Resultados análisis fosfoproteico	166
3. Resultados en pacientes tratados con Imatinib, LMC/FC:	167
DISCUSIÓN	169
I. SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA:	173
II. EL TRATAMIENTO DE LA LMC CON IMATINIB: TOLERANCIA, DOSIS ADECUADA, INTERRUPCIONES.....	175
1. Tolerancia.....	175
2. Suspensión e interrupciones	177
3. La cuestión de la dosis inicial.....	179
III. SOBRE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON IMATINIB DE LA LMC PH (+) EN FASE CRÓNICA.	181
1. Respuestas hematológicas	181
2. Respuestas citogenéticas	181
3. Respuestas moleculares	184
4. Tipo de respuesta según criterios de respuesta al tratamiento establecidos por el comité internacional de expertos: Leukemia.Net.	186
5. Respuestas sub-óptimas y fallo de tratamiento.	188

5.1 Respuestas sub-óptimas	188
5.2 Sobre los resultados con aumento de las dosis iniciales:.....	189
5.3 Los fallos del tratamiento	191
IV. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS CON OTROS INHIBIDORES DE TIROSINCINASAS	192
1. Nilotinib.....	192
2. Dasatinib.....	193
V. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	194
VI. FACTORES PRONÓSTICO	195
CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFÍA	203

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Síntomas y signos más frecuentes de la LMC Ph(+) en fase crónica.	32
Tabla 2: Criterios diagnóstico de la Leucemia Mieloide Crónica atípica según la Organización Mundial de la Salud.	35
Tabla 3: Criterios de respuesta hematológica, citogenética y molecular al tratamiento. La respuesta citogenética completa (RCC) y la respuesta citogenética parcial (RCP) pueden expresarse de forma combinada como respuesta citogenética mayor (RCM). La respuesta molecular mayor (RMM) es equivalente a la reducción de 3-log del valor basal que correspondería al 100%.	50
Tabla 4: Factores pronóstico en LMC para pacientes que van a ser sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos según grupo de	56
Tabla 5: Supervivencia global según factores de riesgo publicadas por diferentes grupos	56
Tabla 6: Respuestas hematológicas, citogenéticas y moleculares obtenidas con IM a los 12, 18, 24 y 60 meses de seguimiento en estudio IRIS.	62
Tabla 7: Toxicidades hematológicas/hepáticas grado III-IV observadas en pacientes tratados con Imatinib en fase crónica de la enfermedad en estudio IRIS	65
Tabla 8: Definición de toxicidades hematológicas y hepáticas en estudio IRIS.	66
Tabla 9: Respuestas obtenidas tras tratamiento con Dasatinib en pacientes con LMC Ph (+) en FC resistentes o intolerantes a Imatinib.	79
Tabla 10: Respuestas citogenéticas completas obtenidas con Nilotinib, Imatinib 400 mg e Imatinib 800 mg en pacientes con LMC Ph (+) en FC tratados en primera línea.	82

Tabla 11: Porcentaje de pacientes que alcanzaron respuesta molecular mayor a los 12 meses de tratamiento, tratados con Nilotinib e Imatinib en LMC Ph+ en FC en primera línea	82
Tabla 12: Supervivencia libre de progresión estratificada según índices pronóstico de Sokal en estudio IRIS	92
Tabla 13: Probabilidades de detectar mutaciones en función de la fase de la enfermedad.	98
Tabla 14: Probabilidad de progresión de la enfermedad según el tiempo de evolución tras tratamiento con Imatinib en pacientes diagnosticados de LMC Ph (+) en primera fase crónica.* La progresión incluye pérdida de RHC, RCM o progresión a FA o FB.....	99
Tabla 15: Supervivencias globales en función de las RCG alcanzadas en distintos periodos de tiempo tras inicio de tratamiento con Imatinib en pacientes diagnosticados de LMC Ph (+) en primera fase crónica.	100
Tabla 16: Supervivencias libre de progresión en función de la respuesta molecular alcanzada a los 12 y 18 meses en estudio IRIS.	102
Tabla 17: Relación entre el grado de RCG temprana, la RCC a los 2 años y la SLE a los 42 meses en el estudio IRIS.....	104
Tabla 18: Criterios de respuesta según grupo de expertos de LEUKEMIA NET.....	109
Tabla 19: Tecnología disponible para detección y cuantificación de mutaciones del dominio tirosinasa BCR-ABL	111
Tabla 20: Metodología sugerida para la expresión de los resultados de estudios mutacionales del dominio tirosinasa BCR-ABL.....	112
Tabla 21: Iniciadores y sondas para la Q-PCR cuantitativa. Abreviaturas: EAC: European Against Cancer, ENF: iniciadores del extremo 3', ENP: sonda TaqMan, ENR: iniciador del extremo 5'	134
Tabla 22: Clasificación de los pacientes según índices de Sokal	144
Tabla 23: Clasificación de los pacientes según índices de Hasford	144

Tabla 24: Características clínicas y analíticas de la cohorte de pacientes al diagnóstico	145
Tabla 25: Tiempo en meses para la obtención de RCC.....	151
Tabla 26: Porcentaje de RCC obtenidas en algún momento de la evolución en función del momento de inicio de IM.....	151
Tabla 27: Probabilidad de obtención de respuestas citogenéticas a los 12 meses en función del índice de Sokal. (p= ,067)	152
Tabla 28: Probabilidad de obtención de respuestas citogenéticas a los 18 meses en función de Índice de Sokal. (p= 0,107)	152
Tabla 29: .Media y significación estadística de leucocitos, plaquetas y tamaño del....	153
Tabla 30: Momento en el que los pacientes alcanzan RMM.....	154
Tabla 31: Estado de la última respuesta molecular en función de niveles de riesgo establecidos por índice de Sokal. (p=,065).....	155
Tabla 32: Respuestas según criterios de LEUKEMIA NET alcanzadas a los 12 meses	156
Tabla 33: Respuestas según criterios de LEUMIA NET alcanzadas a los 12 meses... ..	156
Tabla 34: Tipos de respuesta a los 12 meses en función de grupos pronóstico según índices de Sokal. (p=,007)	157
Tabla 35: Tipos de respuesta a los 18 meses en función de grupos pronóstico según índices de Sokal.(p= ,065)	157
Tabla 36: Estudios de fosforilación proteica in vitro en 4 líneas celulares	165
Tabla 37: Tratamiento in vitro con imatinib: Resultados de expresión de p-stat5 detectado por citometría de flujo, en distintas patologías.....	167
Tabla 38: Tratamiento in vitro con Imatinib: Resultados de expresión de p-tyr detectado por citometría de flujo.	168

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cariotipo de un paciente con LMC Ph+. (Gentileza de la Dra.Ferro, Servicio de Genética. Hospital Ramón y Caja)	39
Figura 2: Gen de fusión BCR-ABL. (Tomada de Deininger 1996).	43
Figura 3: Estructura de la proteína Bcr-Abl mostrando sus diferentes dominios y las rutas de transmisión de señales intracelulares iniciadas por ella. (Tomada de Faderlet 1999).....	47
Figura 4: Mecanismo de acción del Imatinib. (SACCHI 1999).....	61
Figura 5: Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia sin fase acelerada o crisis blástica en estudio IRIS (Druker 2006).....	63
Figura 6: Supervivencia alcanzada por los pacientes tratados con Imatinib en primera línea en fase crónica de la enfermedad en función de la respuesta citogenética obtenida a los 12 meses en estudio IRIS (Druker 2006).....	64
Figura 7: Supervivencia alcanzada por los pacientes tratados con Imatinib en primera línea en fase crónica de la enfermedad en función de la respuesta molecular obtenida a los 12 y 18 meses en estudio IRIS (Druker 2006).....	64
Figura 8: Mapa de mutaciones BCR-ABL.	74
Figura 9: Interacción del BCR-ABL con Imatinib	75
Figura 10: Sensibilidad de mutaciones a inhibidores tirosincinasa de segunda generación.....	76
Figura 11: Supervivencia sin fase cronica ni fase acelerada estratificada por grupos pronóstico de Sokal en pacientes con RCC en primera línea de tratamiento en estudio IRIS.....	91
Fig 12: Vías de señales activadas en LMC.....	96

Figura 13: Recomendaciones de monitorización para los pacientes con LMC tratados con Imatinib según el panel de expertos de LEUKEMIA NET.	114
Figura 14: Gráfica de fluorescencia de los plásmidos para el control ABL, con distinto número de copias (103, 104, 105 n° de copias).....	135
Figura 15: Supervivencia global acumulada de la serie.	161
Figura 16: Supervivencia acumulada en función de línea de tratamiento.....	162
Figura 17: Supervivencia global en función de respuestas citogenéticas alcanzadas a los 12 meses. ($p= ,009$)	163
Figura 18: Supervivencia global en función de respuesta citogenéticas alcanzadas. ($p= ,000$).....	164

ABREVIATURAS

Abl	Abelson
AcMo	Anticuerpos monoclonales
Alo-TPH	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
AMO	Aspirado de Médula Osea
Ara-c	Citarabina
ATM	Proteína ataxia telangiectasia
ATP	Adenosiltrifosfato
Bcr	Breakpoint cluster region
CB	Crisis blástica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMNs	Células mononucleares
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
C_T	Ciclo umbral
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAC	European Against Cancer
EE	Error estándar
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
EFG	Factor de crecimiento epitelial
EMR	Enfermedad mínima residual
ENF	Iniciadores del extremo 3'
ENP	Sonda TaqMan
ENR	Iniciador del extremo 5'
FA	Fase acelerada
FAG	Fosfatasa Alcalina Granulocítica
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FC	Fase crónica
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
GIST	Tumores del estroma gastrointestinal
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulomonocíticas
ICSBP	Interferon consensus sequences binding protein
IFN -α	Interferón alfa

IRIS	International Randomized Study of Interferon and STI571
JAK	Cinasa citoplasmática Janus
kd	Kilodaltons
LEC	Leucemia eosinofílica crónica
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crónica
logs	Logaritmo
LOPD	Ley Orgánica Protectora de Datos
MAPK	Proteínas activadoras de mitogénesis con actividad cinasa
MAX	Número de transcritos más elevado para pacientes que tienen más de una determinación.
max	Cociente Bax/Bcl-2 más elevado para pacientes que tienen más de una determinación.
M-Bcr	Mayor breakpoint cluster region
m-Bcr	Minor breakpoint cluster region
mg	Miligramos
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
Ph	Filadelfia
PI3-cinasa	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PTPasa	Proteína tirosin fosfatasa
P190	Proteína de 190 kilodaltons
P210	Proteína de 210 kilodaltons
P230	Proteína de 230 kilodaltons
RQ-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RB	Proteína del retinoblastoma
RCC	Respuesta citogenética completa
RCG	Respuesta citogenética
RCM	Respuesta citogenética mayor
RCm	Respuesta citogenética menor
redox	Oxidoreducción
RH	Respuesta hematológica
RHC	Respuesta hematológica completa

RHP	Respuesta hematológica parcial
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	PCR Transcriptasa inversa
SDS	Sequence Detector System
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SMC	Síndrome mieloproliferativo crónico
sp	Sangre periférica
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TE	Trombocitemia esencial
Tyr	Tirosina
vs	Versus
WHO	Organización mundial de la salud
ΔR_n	Aumento de la intensidad de fluorescencia cuando se alcanza la fase meseta (análisis de las curvas obtenidas con Q-PCR)

Introducción

I. EPIDEMIOLOGÍA	29
II. ETIOLOGÍA.....	30
III. PRESENTACIÓN CLÍNICA.....	31
IV. DIAGNÓSTICO.....	34
1. LMC Cromosoma Filadelfia Negativa	34
- LMC atípica:	35
- Leucémia neutrofílica crónica:.....	36
2. Diagnóstico diferencial.....	36
- Leucémia Mielomonocítica Juvenil:	36
- Leucémia Mielomonocítica Crónica:	37
- Leucemia Esinofílica Crónica:	37
- Otras patologías cromosoma Filadelfia positivas:	38
V. FISIOPATOLOGÍA DE LA LMC FILADELFIA POSITIVA.....	39
1. Alteraciones genéticas en la LMC.....	39
2. Biología molecular en la LMC.....	41
2.1 La proteína ABL:.....	42
2.2 La proteína BCR:.....	42
2.3 Las proteínas de fusión BCR-ABL:	43
2.4 Sustrato y vías de transducción de señales activadas por BCR-ABL:	44
- Via STAT:.....	44
- Via Ras:.....	45
-Vías MAPK:.....	45
- Fosfatidilinositol-3-cinasa:.....	46
- ROS:.....	46
2.5 Efectos biológicos de BCR-ABL:	48
VI. TRATAMIENTO	50
1. Tratamiento antes de los inhibidores de la tirosincinasa:	51
1.1. Quimioterapia con Busulfan e Hidroxiurea:.....	51
1.2 Interferón- α (IFN- α):	52
- Duración del tratamiento:.....	52
- Comparación con el trasplante:	53
- Terapia combinada:	53
-Papel actual del Interferón- α :	54
1.3 Papel del trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	55
- Indicaciones actuales del trasplante alogénico de progenitors hematopoyéticos:.....	57
2. Tratamiento con Inhibidores de la tirosincinasa.....	58
2.1. Imatinib (IM).....	60
2.1.1 Desarrollo	60
2.1.2 Mecanismo de acción	60
2.1.3 Resultados clínicos	61

2.1.4 Problemas con Imatinib:.....	67
2.1.5 Resistencias a Imatinib:.....	68
a) Biodisponibilidad oral:.....	69
b) Unión plasma proteina:.....	69
c) Cambios en la variabilidad intracelular del Imatinib:.....	70
d) Aumento de la expresión de BCR:.....	72
e) Evolución clonal:.....	72
f) Mutaciones en el dominio ABL-cinasa:.....	72
2.2 Dasatinib.....	76
2.3. Nilotinib.....	80
2.4 Otros inhibidores de la tirosincinasa.....	83
2.4.1 Bosutinib.....	83
2.4.5 Inno-406.....	83
2.4.6 Inhibidores de Aurora-Cinasa.....	83
3. Tratamiento de la LMC en la era Imatinib.....	84
VII. FACTORES PRONÓSTICO.....	89
1. Factores pronóstico clásicos en LMC.....	89
2. Factores Pronóstico pre-tratamiento a Imatinib.....	90
2.1 Índices de Sokal y Hasford.....	90
Tabla 12: Supervivencia libre de progression estratificada según índices pronóstico de SokaL en estudio IRIS.....	92
2.2 Análisis citogenético.....	92
2.3 Perfiles de expresión de mRNA.....	93
2.4 El estudio de los mediadores activados (fosforilación proteica medida por citometría de flujo):.....	94
2.5 Sensibilidad intrínseca a inhibidores tirosincinasa.....	96
2.6 Niveles basales de mRNA BCR-ABL.....	97
2.7 Estudio de mutaciones al diagnóstico.....	98
3. Respuesta a Imatinib.....	99
3.1 Respuesta hematológica.....	100
3.2 Respuesta citogenética.....	100
3.3 Respuesta Molecular.....	101
3.4 Inhibición de las cinasas in vivo.....	102
VIII. MONITORIZACIÓN DE RESPUESTA EN PACIENTES TRATADOS CON INHIBIDORES DE LAS TIROSINCINASAS.....	103
1. Citogenética clásica.....	103
2. FISH (Hibridación In Situ con Fluorescencia).....	105
3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	106
4. Respuestas según criterios de expertos LEUKEMIA NET.....	108
5. Detección de mutaciones en el dominio tirosincinasa.....	110
- Metodos de detección:.....	111
6. Monitorización individual para pacientes que reciben inhibidores de las tirosincinasas.....	112
6.1 Indicaciones al diagnóstico de LMC.....	112
6.2 Monitorización del paciente que aparentemente responde a tratamiento.....	113
6.3 Indicación de análisis de mutaciones.....	114

...La leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad neoplásica de las células troncales pluripotenciales. Aunque se caracteriza fenotípicamente por la proliferación de la línea mieloide, puede considerarse una verdadera panmielopatía de naturaleza clonal en la que se ven afectados monocitos, eritroblastos y megacariocitos, así como linfocitos B y T. En la mayor parte de los casos (más del 90%) todos ellos pertenecen a un mismo clon leucémico. Este clon proviene de una translocación recíproca entre los cromosomas números 9 y 22, que conducen a un brazo largo, claramente acortado, de uno de los cromosomas del par 22, conocido como *Cromosoma Filadelfia (Ph)* el cual tiene un reconocimiento homólogo molecular, el gen BCR-ABL (ROWLEY 1973).

Es una enfermedad con un curso típicamente escalonado: desde una fase crónica (FC), cuya evolución se mide en años desde el diagnóstico, a una crisis blástica (CB), que debe considerarse como una verdadera Leucemia Aguda. Esta transformación puede hacerse directamente o bien pasando por lo que se denomina fase acelerada (FA) cuya evolución suele medirse en meses.

I. EPIDEMIOLOGÍA

La LMC supone el 20% de todas las leucemias del adulto con una incidencia anual de 1-2 casos por cada 100.000 habitantes. La mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 53 años, con escasa incidencia en las primeras décadas de la vida. Existe un discreto predominio en varones, con una relación hombre/mujer de 1.4:1.

Por norma general, los pacientes se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico y la patología se descubre como hallazgos de laboratorio (PANE 1997) (GREENLE 2001) (SAWYERS 1999).

II. ETIOLOGÍA

La exposición a altas dosis de radiación ionizante es un probable agente causal en la LMC. Así, se ha observado que, pacientes sometidos a altas dosis de radiaciones ionizantes, como japoneses expuestos a radiación liberada por detonaciones de las bombas atómicas en Nagasaki e Hiroshima (BUSHLE, 1988), británicos tratados con irradiación espinal por espondilitis anquilosante (LEBOWITZ 1976) y las mujeres con carcinoma cervical uterino tratadas con radioterapia (BAUERMEISTER 1971), tuvieron una frecuencia de LMC significativamente mayor a grupos comparables no expuestos.

Los leucemógenos químicos, como benceno y agentes alquilantes, no se han identificado como agentes causantes de LMC a excepción de los inhibidores de la topoisomerasa II del ADN, al tener éstos una propensión a inducir leucemia positiva para (9;22) (HASSELBACH 1986).

No existen datos concluyentes acerca de que exista algún patrón familiar por el que se vea aumentada la incidencia en la LMC.

III. PRESENTACIÓN CLÍNICA

La LMC evoluciona de una manera bi- o trifásica. El paso de una fase a otra se define mediante la evolución de parámetros clínicos y analíticos. El 80% de los pacientes se diagnostican en FC, evolucionando a FA para terminar en CB. El 20% restante evolucionan directamente a CB sin previo paso por FA. De éstos, aproximadamente un 10% se presentan directamente en FA o CB (SPIERS 1995).

La FC se define mediante datos de laboratorio: leucocitos $> 20 \times 10^9/L$ con $<10\%$ blastos en en sangre periférica o médula ósea (THOMPSON 1982). Junto a estos datos es frecuente encontrar actividad de la fosfatasa alcalina de los neutrofilos (FAG) baja o ausente en más del 90% de los pacientes, aumentando hasta casi parámetros normales en presencia de inflamación, infección grave o respuesta al tratamiento (MITUS 1996). Aunque la proporción de eosinófilos no suele estar aumentada, sí se observa con frecuencia elevación del recuento absoluto. En alguna ocasión su número domina sobre los granulocitos, denominándose *LMC eosinófila Ph (+)* (CORTES 1996). Hay un aumento absoluto en la concentración total de basófilos en prácticamente todos los pacientes, pudiendo ser útil este dato en el diagnóstico diferencial. El recuento absoluto de linfocitos está elevado en los pacientes con LMC en el momento del diagnóstico, como consecuencia del aumento equilibrado de de los linfocitos T colaboradores y T supresores (DOWDING 1984). El recuento de plaquetas también está elevado en aproximadamente el 50% de los pacientes en el momento del diagnóstico (MALSON 1974).

Los síntomas más frecuentes referidos por los pacientes por orden de frecuencia serán astenia, anorexia o pérdida de peso, sudoración, fiebre, dolores óseos, cefalea, dolor esternal, hepatomegalia y esplenomegalia (LITHMAN 1987) (*Tabla 1*).

Otros síntomas de presentación menos frecuente serán los ocasionados por hipermetabolismo, como sudoración nocturna, intolerancia al calor, pérdida de peso que simula una tirotoxicosis, artritis gotosa aguda, priapismo, acúfenos, dolores a consecuencia de infartos esplénicos, diabetes insípida sensible a vasopresina (JUAN 1985) o infiltrado perivascular de neutrófilos en la dermis (Síndrome de Sweet) (COHE 1987).

Síntomas y signos	% Pacientes
Astenia	80
Anorexia	60
Pesadez abdominal	40
Sudoración	15
Fiebre	10
Dolores óseos	10
Cefalea	5
Esplenomegalia	85
Dolor esternal	80
Hepatomegalia	40
Esplenomegalia >10cm	21

Tabla 1: Síntomas y signos más frecuentes de la LMC Ph(+) en fase crónica.

La FA se define por la presencia de un 10-30% de blastos en sangre periférica o médula ósea. Es frecuente el aumento progresivo de blastos, promielocitos y basófilos, tanto en sangre periférica como en médula ósea. Se incrementa la presencia de anemia y plaquetopenia. La clínica que presenta el paciente será la consecuencia de la progresión de la enfermedad, siendo ya frecuente la aparición de fiebre, sudoración, dolores óseos, náuseas, dolor abdominal, púrpuras y aumento de infecciones.

La CB se define como más del 30% de blastos en sangre periférica o médula ósea. Puede ser de origen mieloide, linfoide o indiferenciada. La clínica continuará siendo la de la evolución de la enfermedad, con aparición de hemorragias, complicaciones infecciosas, adenopatias y disfunción del sistema nervioso central. Los pacientes en crisis blástica tienen mal pronóstico, con una mediana de supervivencia de 3 a 6 meses (HOROWTZ 1996) (McGLAVE 2000).

IV. DIAGNÓSTICO

En el pasado, el diagnóstico de LMC se establecía mediante criterios clínicos y de laboratorio, los cuales incluían la presencia de esplenomegalia, neutrofilia, leucocitosis con circulación de formas inmaduras de la serie granulocítica, basofilia y FAG baja o ausente. La actividad baja de la FAG se utilizaba clásicamente en el diagnóstico diferencial con la policitemia vera en la que, por lo general, se encuentra aumentada.

Tanto el estudio del frotis de sangre periférica (sp) como el examen citológico del aspirado de médula ósea (AMO) comparten características con otros síndromes mieloproliferativos crónicos (SMC).

Hoy en día, el diagnóstico de la LMC requiere la detección del cromosoma Ph o sus productos, ya sean la fusión del mRNA BCR-ABL o la proteína Bcr-Abl.

1. LMC Cromosoma Filadelfia Negativa

Algunos pacientes con criterios clínicos de LMC presentan ausencia de cromosoma filadelfia (Cromosoma Ph). Esto se observó aproximadamente en el 15% de los pacientes en un extenso estudio prospectivo realizado por el *Medical Research Council*.

En casi la mitad de estos pacientes, se aprecian reordenamientos complejos cromosómicos que enmascaran la traslocación del t (9,22). Otra circunstancia observada es la negatividad del cromosoma Ph mediante cariotipo, pero se evidencia la fusión de los genes BCR-ABL en los análisis de FISH realizados en células en metafases o interfases o en PCR en tiempo real. La evolución en estos dos grupos de pacientes suele ser similar a aquellos con LMC con cromosoma Ph positivo (+).

En aproximadamente un tercio de este grupo no se observa evidencia molecular de fusión de BCR-ABL. En general, estos pacientes presentarán evolución diferente, que incluye disminución de la supervivencia, peor respuesta a tratamiento, ausencia de basofilia, frecuente trombocitopenia, posibilidad a progresión de leucocitosis,

organomegalias, infiltrados extramedulares y fallo medular, algunos de ellos sin fase terminal de leucemia aguda. La mayoría de estos pacientes tendrán una enfermedad que, siendo distinta a la LMC, se debe considerar más bien como un síndrome mielodisplásico (SAVAGE 1997).

- LMC atípica:

Existe conflicto entre hematólogos y hematopatólogos sobre la necesidad o no de la presencia de la fusión de BCR-ABL para establecer el diagnóstico de LMC. No obstante, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (*WHO*) concluyó que el término “LMC atípica”, aunque imperfecto, podría ser mantenido para aquellos pacientes con displasia granulocítica con ausencia de fusión de BCR-ABL (*Tabla 2*). La categoría de síndrome mieloproliferativo/mielodisplásico fue creada para estos pacientes (VARDIMAN 2002).

Criterios diagnóstico de LMC atípica según WHO
<ul style="list-style-type: none"> - Leucocitosis en sangre periférica debida a aumento de formas maduras e inmaduras de neutrófilos - Disgranulopoyesis prominente - Biopsia de médula ósea hipercelular con proliferación granulocítica y displasia granulocítica, con o sin displasia de las líneas eritroides o megacariocíticas. - Precursoros de neutrófilos (promielocitos, mielocitos, metamielocitos) >10 % del total de leucocitos. - Recuento de blastos en sangre periférica o médula ósea menor de 20%. - Inexistente o mínima basofilia absoluta; basófilos < 2% de leucocitos en sangre periférica. - Inexistente o mínima monocitosis absoluta, monocitosis <10% de leucocitos en sangre periférica. - No detección del cromosoma filadelfia o sus genes de fusión.

Tabla 2: Criterios diagnóstico de la Leucemia Mieloide Crónica atípica según la Organización Mundial de la Salud.

- Leucemia neutrofilica crónica:

Algunos pacientes BCR-ABL negativos han sido descritos como leucemia neutrofilica crónica, caracterizada por hiperplasia de formas granulocíticas maduras en sangre periférica y médula ósea, hepatomegalia y, con frecuencia, aumento de la FAG (REILLY 2002).

Aunque estos pacientes rara vez progresan a leucemias agudas, la supervivencia es corta. A pesar de que el tratamiento no está claro, parece ser que algunos de ellos responden a interferon (KURZROCK 2001).

2. Diagnóstico diferencial

Existen un grupo de enfermedades con algunos rasgos clínicos similares a una LMC, que pueden ser diagnosticadas de forma incorrecta como LMC, siendo diferentes, sin embargo, desde el punto de vista molecular y genético. Este grupo incluye:

- Leucemia Mielomonocítica Juvenil:

La Leucemia Mielomonocítica Juvenil es una rara y fatal enfermedad de la infancia y adolescencia (NIEMEYER 2003), caracterizada por sobreproducción clonal de células mieloides maduras, por lo general con exceso de monocitos, que lleva a una infiltración de órganos y muerte temprana por fallo orgánico o infección. Al contrario que en la LMC, el cariotipo es normal y la evolución a leucemia aguda infrecuente (PASSMORE 2003).

- Leucemia Mielomonocítica Crónica:

La leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC) es una entidad clasificada por la *WHO* como enfermedad mielodisplásica/mieloproliferativa con características de ambas. Se caracteriza por la sobreproducción de monocitos maduros y displásicos y, en ocasiones, de neutrófilos, con frecuencia acompañada de anemia y trombocitopenia. La morfología de la médula ósea muestra cambios displásicos en al menos dos líneas mieloides. (BENNETT 1994). La citogenética en el aspirado de médula ósea es variable según los pacientes. En muchas ocasiones no se observan alteraciones algunas y en otras se aprecian anomalías como monosomía del cromosoma 7, delección del (7q) y, en algunas ocasiones, se observan translocaciones como t(5;12), t(9;12) o t(5;7).

Muchas de estas translocaciones producen proteínas de fusión en las que una pareja es una proteína de la familia tirosinasa. Como el producto del cromosoma Ph es también una tirosinasa, la fosforilación aberrante de la tirosina podría ser un mecanismo común en estas patologías mieloides (WALDLEIGH 2005).

- Leucemia Eosinofílica Crónica:

La Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) es un raro desorden clonal mieloproliferativo caracterizado por la sobre-producción de eosinófilos displásicos con concentraciones plasmáticas de Interleukina 3 y 5, y médula ósea hiperlásica y displásica, con tendencia hacia la evolución a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (BAIN 1996). La citogenética en la LEC suele ser normal y, de encontrarse alteraciones, las más frecuentes suelen ser las del cromosoma 5, 7, 15 o 17 (BAIN 2003).

- Otras patologías cromosoma Filadelfia positivas:

Un pequeño porcentaje de los pacientes presentan características clínicas de alguno de los otros síndromes mieloproliferativos, como trombocitosis esencial (TE) o policitemia vera (PV), pero son cromosoma Ph (+) al realizar análisis de citogenética. La mayoría de estos pacientes sufrirán un comportamiento típico de LMC, que incluye progresión eventual a CB y probablemente representarán una forma inusual de presentación (STOLL 1998). No obstante, se ha detectado, mediante técnicas de PCR, transcritos BCR-ABL a bajos niveles en aproximadamente el 50% de los pacientes cromosoma Ph (-) con TE, sin que éstos tengan una evolución diferente a los casos clásicos de TE. Así, el significado de los transcritos de BCR-ABL en estos pacientes necesita mayor investigación (BLICKSTEIN 1997). Fuera de los síndromes mieloproliferativos nos encontramos con el cromosoma Ph (-) en aproximadamente un 20% de las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) de precursores B del adulto, del 5 al 10% de las LLA-B de la infancia y en aproximadamente un 1% de las LMA. La presencia del cromosoma Ph en leucemias agudas empeora considerablemente el diagnóstico después de la quimioterapia (BLOOMFIELD 1989).

V. FISIOPATOLOGÍA DE LA LMC FILADELFIA POSITIVA

1. Alteraciones genéticas en la LMC.

La LMC fue la primera enfermedad neoplásica para la que se describió una alteración genética característica. En 1960 fueron Novell y Hungerford quienes describieron una alteración cromosómica por pérdida aparente del brazo largo del cromosoma numero 21 ó 22 (NOWELL 1961), anomalía que se confirmó posteriormente, denominando al cromosoma afecto cromosoma Filadelfia (Ph) (BAIKE 1960) (TOUGH 1961). Este hallazgo abrió nuevas puertas para futuros estudios patogénicos de enfermedades e introdujo nuevos enfoques terapéuticos. Sería más adelante, en la década de los setenta, cuando estuvieron disponibles técnicas de bandeo para definir estructuras cromosómicas, permitiendo así a Rowley demostrar que el material aparentemente perdido del cromosoma Ph era parte de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 (ROWLEY 1973). (Figura 1).

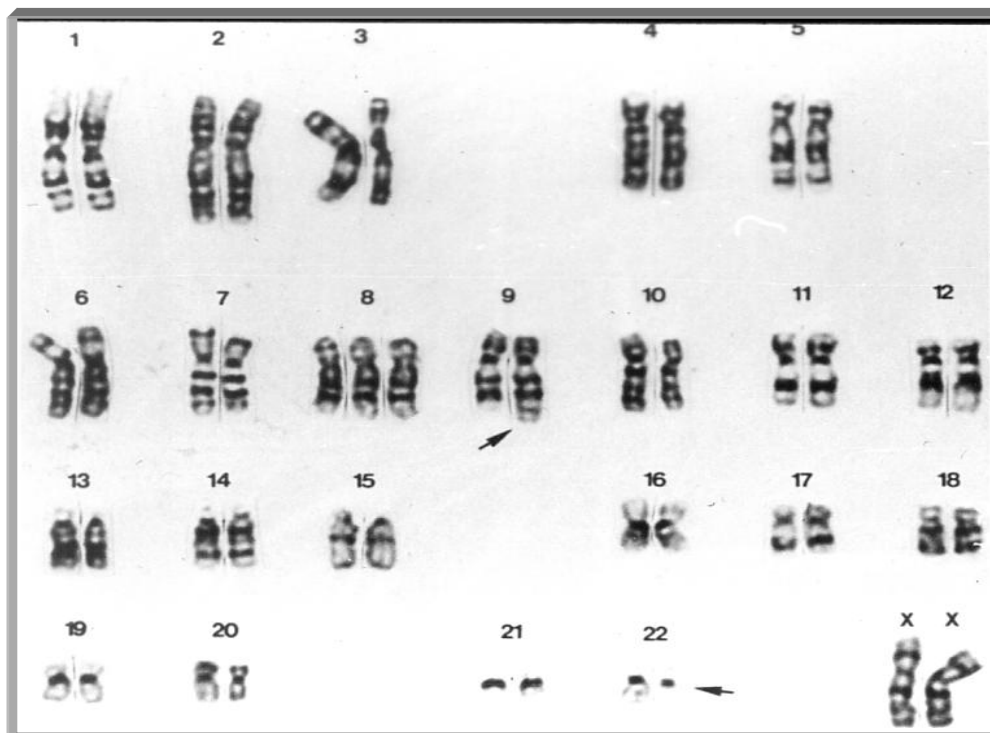


Figura 1: Cariotipo de un paciente con LMC Ph+. (Gentileza de la Dra.Ferro, Servicio de Genética. Hospital Ramón y Caja)

Dicho cromosoma sufre su transformación maligna en la célula troncal hematopoyética afectándose la neutrofilopoyesis, eosinofilopoyesis, basofilopoyesis, monocitopoyesis y la trombocitopoyesis en la LMC en fase crónica (SPIERS 1975). Así mismo, se ha visto que los linfocitos B proceden del clon maligno (FIALKOWS 1978) (BOGGS 1974). Los estudios que examinan al gen de los linfocitos T son más ambiguos, indicando que éstos proceden en algunos, pero no en todos los casos, del clon maligno (FIALKOWS 1978) (BOGGS 1974) (JONAS 1992). Hoy conocemos los puntos de rotura donde se realiza la translocación de ambos cromosomas. Ésta ocurre en el brazo largo del cromosoma 9 (banda 9q34) localizado en el primer intrón de gran longitud entre los exones Ia y Ib del gen ABL y en la mitad más alta del brazo largo del cromosoma 22 (banda 22q11), en la gran mayoría de los casos en la región específica de sus brazos largos denominada *major break point cluster region* (M-BCR), situada en segmento de DNA de 5.8 kilobases. Esta zona consta de 5 exones separada por 4 intrones, en los que se localizará el punto de rotura. Los exones en los que con más frecuencia se localizarán los puntos de rotura están situados entre los exones b2-b3 y b3-b4. La transcripción realizada desde el gen híbrido (9,22) se realiza mediante un RNA mensajero que, por norma general, contiene uno de dos uniones BCR-ABL designados e13a2 y e14a2. No existe evidencia de que el tipo de unión influya en el pronóstico. Las dos moléculas de RNAm BCR-ABL sufren una translocación a una oncoproteína 210-kd que por lo general se refiere como p210. Se han encontrado otros dos puntos de rotura: *minor-BCR* (m-bcr) y *micro-BCR* (μ -BCR). La rotura localizada en m-BCR se suele asociar a LLA siendo muy rara en LMC. El producto de la translocación de este gen es la proteína p190. De igual manera, la rotura localizada en μ -BCR es rara en LMC observándose con mayor frecuencia en leucemia crónica neutrofilica y trombocitosis (KLEIN 1982) (VERFAURRE 1998).

Al diagnóstico de LMC Ph (+), casi el 100% de metafases de médula ósea son positivos para cromosoma Ph. Posteriores translocaciones adicionales son posibles y marcarán una peor evolución, fenómeno conocido como evolución clonal. Entre estas alteraciones destacan por su frecuencia la trisomía 8, las alteraciones en el cromosoma 17q y la trisomía 19. Alteraciones genéticas menores están representadas por las

monosomías en los cromosomas 7, Y, ó 17, trisomias del cromosoma 17 y 21 y translocación balanceada t (3;21) (q26;q22) (FADERL 1999).

El cromosoma Ph no es exclusivo de la LMC, está también presente en el 5% de LLA de los niños y en el 25% de los adultos. Igualmente está descrito en leucemias no linfocíticas y en LMA (PASTERNAK 1998).

2. *Biología molecular en la LMC.*

La clonación de la translocación 9;22 en la LMC abrió nuevas dimensiones en el análisis molecular de la enfermedad. La identificación de secuencias de oligonucleótidos de las regiones de rotura supuso una contribución básica en el estudio de su significado biológico, así como en el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas (PATERNAK 1998).

La yuxtaposición del protooncogén ABL, procedente del cromosoma 9, a la región M-bcr del cromosoma 22, origina el encogen BCR-ABL. Éste da lugar a la síntesis de un RNA mensajero (RNAm) quimérico bcr/abl de 8.5 kilobases, el cual codifica la síntesis de una proteína con actividad tirosincinasa aumentada (p210) que controla el crecimiento y la diferenciación celular, atribuyéndose como causa del comportamiento neoplásico de las células hematopoyéticas (De KLEIN 1982).

El gen recíproco ABL/CBR, originado en el brazo largo del cromosoma 9 como resultado de la translocación 9/22, se ha descrito como activo desde el punto de vista transcripcional de dos tercios de los pacientes, aunque no se ha identificado su papel en el desarrollo de la enfermedad (PATERNAK 1998).

2.1 La proteína ABL:

c-ABL pertenece a la familia de proteínas de las tirosincinasas solubles y contiene diversos dominios, entre los que destacan los de homología a SRC:SH1,SH2 y SH3.

c-ABL contiene un largo fragmento carboxiterminal con un número importante de dominios que incluyen señales de localización nuclear, secuencias ricas en prolina de gran importancia para la unión de proteínas adaptadoras, un dominio de unión al DNA, un sitio de unión a p53 y un dominio de unión a actina.

La proteína c-ABL se ha visto expresada en todos los tejidos estudiados localizándose tanto en el citoplasma como en el núcleo. En el núcleo esta proteína está implicada en la respuesta por daño en el DNA y en la progresión en el ciclo celular, por su habilidad para unirse a p53 y Rb respectivamente (RAITANO 1997). La lesión de C-ABL en fibroblastos disregula la proliferación, lo que facilita la transformación por diversos oncogenes, mientras que su sobreexpresión inhibe la proliferación celular (SAWYERS 1999).

2.2 La proteína BCR:

c-BCR tiene rasgos estructurales que sugieren desempeña algún papel en la translocación de señales. Esta proteína incluye un dominio serin/treonincinasa, un dominio de oligomerización, un dominio de homología al factor intercambiador de nucleótidos Rho-GEF, un sitio de unión a lípidos dependiente de calcio, un lugar de unión a la proteína bap-1 y un dominio activador de proteínas Rac GTPasa.

El dominio de dimerización, el dominio serin/treonincinasa y el sitio de fosforilización de serin/treonincinasa, se mantienen en todos los tipos de proteínas de fusión BCR-ABL (RAITANO 1997).

2.3 Las proteínas de fusión BCR-ABL:

Los oncogenes BCR-ABL están formados por secuencias de distinto tamaño del gen BCR que se unen a la misma secuencia ABL. Probablemente, la secuencia ABL aporta el principio transformante, mientras que el diferente tamaño de la secuencia BCR dicta el fenotipo biológico y clínico, asociado con las variantes de BCR-ABL. En la mayoría de los pacientes con LMC, el punto de rotura en el gen ABL se encuentra en un segmento de más de 300 kilobases, entre los exones Ib y Ia y el punto de rotura entre en el gen BCR se localiza en la región m-BCR, que abarca los exones b1-b5 en la mayoría de los pacientes con LMC. Ello lleva a un UNAM híbrido con un b3a2 o b2a2 empalme que codifica la proteína de fusión p210 BCR-ABL (*Figura 2*).

En raros casos, el puente de rotura en el gen BCR se localiza por encima de la región m-BCR, llevando a un RNAm e1a2 y a una proteína de fusión p190 que se encuentra comúnmente en la LLA.

Recientemente se ha encontrado una proteína de fusión p230 en pacientes con leucemia neutrófila crónica. Esta proteína de fusión es el resultado de la translocación del gen ABL al gen bcr en el exón 19 localizado en la m-BCR, situado por debajo de la región BCR (e19a2) (8,9) (KOLIBADA 1997).

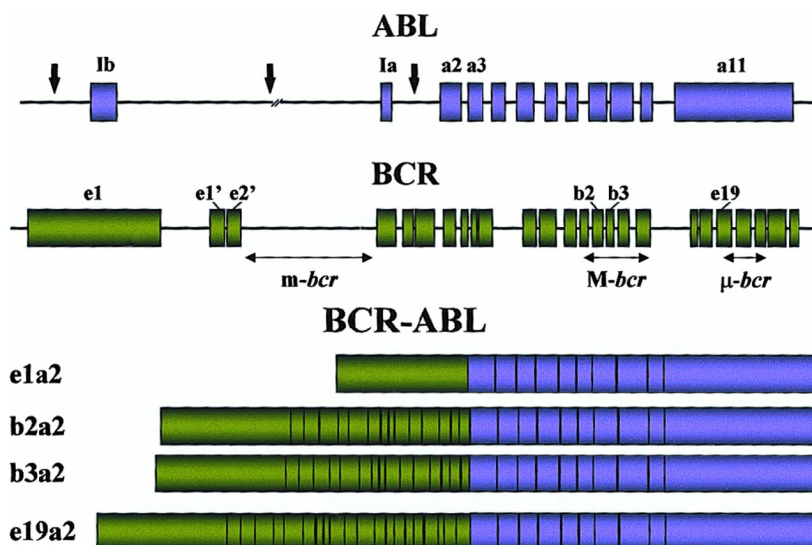


Figura 2: Gen de fusión BCR-ABL. (Tomada de Deininger 1996).

2.4 Sustrato y vías de transducción de señales activadas por BCR-ABL:

En contraste con la fuerte regulación de la localización de la actividad cinasa de c-ABL en la célula, BCR-ABL está constitutivamente activa y localiza únicamente en el citoplasma.

Al unirse a BCR se desenmascara un dominio en el extremo carboxiterminal de ABL que promueve su unión a activa, lo que permite su dimerización constitutiva y puede interferir con la función reguladora negativa del dominio SH3 de ABL por un mecanismo de aclaje intramolecular.

El hecho de que BCR-ABL contenga residuos tirosina, en un dominio SH2 y un dominio SH3 y secuencias ricas en prolina, lleva a la posibilidad de que se produzcan diversas interacciones proteína-proteína. De hecho, BCR-ABL puede unir o fosforilar a un gran número de proteínas.

Son muchas las vías de señales que están activadas de forma mantenida por la oncoproteína BCR-ABL; sin embargo, es difícil relacionar una vía específica de señales con un efecto biológico concreto, sobre todo si consideramos que existe redundancia en muchas de las actividades reguladas por ellas. A continuación se exponen cuatro de las vías que se encuentran activadas de forma constitutiva por el BCR-ABL: STAT (*signal transducer and activator of transcription*), RAS, PI3K (fosfatidilinositol-3) y ROS (*reactive oxygen species*) (Figura 3).

- Via STAT:

El crecimiento de las células hematopoyéticas normales se controla por citocinas. Los receptores para estas citocinas transducen señales mediante activación de Janus (JAK), que es una familia de cinasas citoplasmáticas que fosforilan y activan los factores de transcripción STAT (IHLE 1998).

BCR-ABL activa constitutivamente las vías de señalización de JAK y STAT en células hematopoyéticas, siendo STAT1 y STAT5 las STAT las más importantes tirosin- foforiladas (CARLESSO 1996).

El papel de las STAT5 en la hematopoyesis no está claro, pero parece intervenir en el mantenimiento de la hematopoyesis más inmadura y en la hematopoyesis fetal normal. La activación constitutiva de STAT5, como la descrita en la LMC, puede favorecer el mantenimiento de la viabilidad de las células hematopoyéticas, sustituir a las señales de crecimiento mediadas por citocinas y por tanto, contribuir a la enfermedad mieloproliferativa (ONISHI 1998).

- Via Ras:

La activación de Ras se produce por transducción de señales mediadas por receptores con actividad tirosincinas. Una vez realizada la unión a ligando y dimerización, los receptores tirosincinas activados se unen a moléculas adaptadoras que contienen los dominios SH2 y SH3, como son Grb-2 y SHC, formando complejos de señalización con factores intercambiadores de Ras en la membrana celular. Estos complejos desencadenan una acumulación de la forma de Ras e inducen un efecto antiapoptótico que, aunque sea insuficiente, sí es necesario para la transformación derivada de BCR-ABL. De manera similar a receptores tirosincinasa, BCR-ABL también activa a Ras (PENDERGAST 1993) (CORTES 1995).

-Vias MAPK:

Un primer acontecimiento de señalización que sigue a la activación de Ras, es la activación de vía de la señalización de proteínas activadoras de mitogénesis con actividad cinasa (MAPK).

Se conocen claramente tres cascadas de MAPK: la cinasa regulada extracelularmente (ERK), la vía de las Jun cinasas o cinasas activadas por estrés

(SAPK) y la vía de la p28 cinasa. El punto final para cada una de estas vías es la fosforilación y activación de factores de transcripción.

BCR-ABL y v-ABL activan la vía SAPK, en fibroblastos y células hematopoyéticas.

BCR-ABL también activan promotores dependientes de Jun de manera dependiente de Ras, MEKK y SAPK. Mientras que los efectos de BCR-ABL en la vía JNK parecen claros, estudios de la vía ERK muestran que la BCR-ABL funciona de manera distinta a la mayoría de los receptores con actividad tirosincinasa (ROUSELL 1998).

- Fosfatidilinositol-3-cinasa:

La fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3-cinasa) funciona en la regulación del metabolismo lipídico fosfoinositídico y en la generación de segundos mensajeros lipídicos relacionados con la transducción de señales. Se ha visto que una subunidad de esta proteína se fosforila en residuos tirosina en células que expresan BCR-ABL y forma complejos con CBL-CRKL (RAMEH 1999). PI3K está activado de forma constitutiva por la translocación BCR-ABL jugando un papel importante en su transformación (SLORSKI 1995).

- ROS:

La transformación de las líneas celulares con BCR-ABL presenta un incremento de ROS, comparado con las líneas no BCR-ABL (SATLER 2000). Este incremento es suficiente para la transformación fenotípica en sí misma. Se ha sugerido que ROS podría actuar como segundo mensajero en la regulación de la actividad de las enzimas sensibles a la acción de oxirreducción (redox), como son las cinasas y fosfatasas. La inhibición de la proteína tirosin fosfatasa (PTPasa) mediante la modulación redox, explicaría el amplio espectro de las actividades biológicas de ROS. Un incremento de

ROS amplifica las señales de BCR-ABL, posiblemente regulando las proteínas redox-sensibles, como es la PTPasa celular, la cual también está incrementada (DENU 1998).

También es de particular interés en la LMC humana, el hecho de que un incremento de ROS pueda tener consecuencias a largo plazo en la estabilidad genética. Los niveles de ROS no sólo son modulados por enzimas, antioxidantes y grupos sulfhidrilos, sino también reaccionados con las bases del DNA (DREHER 1996).

Aunque las modificaciones pueden ser corregidas eficientemente por los mecanismos de reparación de DNA, un incremento persistente de ROS podría inducir la acumulación de mutaciones en las células de la LMC, que podrían contribuir a la progresión de la enfermedad.

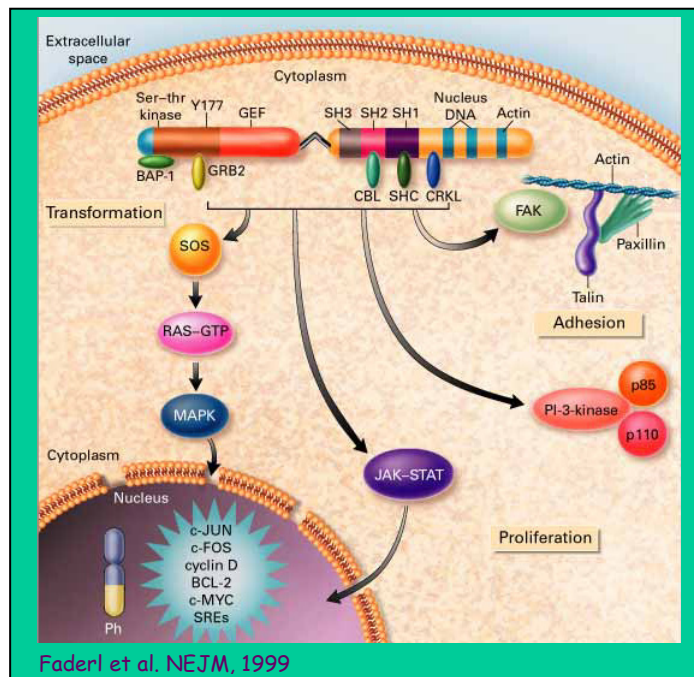


Figura 3: Estructura de la proteína Bcr-Abl mostrando sus diferentes dominios y las rutas de transmisión de señales intracelulares iniciadas por ella. (Tomada de Faderlet 1999).

2.5 Efectos biológicos de BCR-ABL:

El resultado final de la fusión de BCR-ABL, es una profunda alteración de la capacidad de proliferación, adhesión y apoptosis de la celularidad hematopoyética. Los progenitores LMC cultivados *in vitro* presentan un ciclo celular permanentemente activado, de forma independiente a la presencia o ausencia de estroma, mientras que los precursores normales se encuentran fuera de ciclo celular en presencia del mismo (PETZER 1997).

Esta propiedad parece ser debida a diversos factores entre los que se incluyen: la ausencia de control negativo de las ciclinas dependientes de cinasas, la falta de respuesta de los progenitores al efecto inhibitorio del crecimiento de la proteína inflamatoria de los macrófagos y la respuesta alterada de las células LMC al *stem factor* (JONULEIT 1998) (EAVES 1993) (HELGASON 1998).

La expresión de BCR-ABL en líneas celulares humanas factor-dependientes, previene de la apoptosis cuando se retiran los factores de crecimiento, un efecto que depende de la actividad tirosincinasa ya que se correlaciona con la activación de Ras. Además, las líneas celulares BCR-ABL positivas son resistentes a la apoptosis inducida por daño en el DNA. Sin embargo, los mecanismos biológicos que determinan estos hechos no están del todo aclarados aunque podrían intervenir varios de ellos, incluyendo el bloqueo de la liberación de citocromo C y por tanto, la activación de las caspasas, la activación de BCL2/BCL-XL o la inhibición de la proteína ICSBP (*interferon consensus sequences binding protein*) (BEDI 1995) (WANG 1998) (HAO 2000).

La proteína de fusión BCR-ABL también se localiza en el citoesqueleto por medio de su unión a la actina del extremo C-terminal. La actina del citoesqueleto es importante como soporte estructural y tiene funciones en las señales de transducción. La alteración del funcionamiento del citoesqueleto contribuye a que los progenitores LMC exhiban una adhesión disminuida a las células estromales de la médula ósea y de la matriz extracelular. Este hecho constituye un factor clave que no sólo explica la liberación de células inmaduras a sangre periférica (PEZER 1996), sino también la adhesión al estroma, lo que regula negativamente la proliferación celular y por tanto, las células LMC escapan de esta regulación, en virtud de su capacidad alterada para la adhesión.

Este diferente comportamiento biológico de las células LMC respecto de las células normales tiene importantes implicaciones terapéuticas. Experimentos realizados *in vitro* sugieren que, tanto el IFN como los inhibidores de tirosincinasas, ejercen efecto induciendo apoptosis (SELLERI 1997) (DWYER 2000).

VI. TRATAMIENTO

A lo largo de la historia, la Leucemia Mieloide Crónica ha sido tratada con distintas líneas de fármacos que han ido evolucionando a la par que se conocían más datos sobre la patogenia de la enfermedad. De igual manera, con el progreso de los nuevos medicamentos, los objetivos terapéuticos han evolucionado, desde la obtención de una respuesta hematológica (RH), a la de una respuesta molecular (RM), pasando por una respuesta citogenética completa (RCC). Existen distintos criterios establecidos para cada tipo de respuesta, que a su vez dividen éstas en diversos grados: desde valores normales hematimétricos hasta la desaparición de células inmaduras en sangre periférica y médula ósea y la reducción del número de células Ph positivas en ésta, así como de los transcritos BCR-ABL también en sangre periférica (tabla 3).

RESPUESTA HEMATOLÓGICA (RH)	RESPUESTA CITOGÉNÉTICA (RCG)	RESPUESTA MOLECULAR (RM)
Completa: - Plaquetas $<450 \times 10^9$ -Leucocitos $<10 \times 10^9$ -Plaquetas $>450 \times 10^9$ -Ausencia de granulocitos inmaduros con menos de 5% de basófilos -Desaparición de esplenomegalia -Desaparición de síntomas atribuibles a la enfermedad	Completa: Ph positivo 0% Parcial: Ph positivo 1-35% Mínima: Ph positivo 66-95% Nula Ph positivo $>95\%$	Completa: Transcritos no detectables ni cuantificables Mayor: < 0.10
La respuesta completa hematológica (RCH) debe ser confirmada en dos ocasiones consecutivas.	La respuesta citogenética completa (RCGC) debe ser confirmada en dos ocasiones consecutivas y en al menos 20 metafases. El FISH de sangre periférica se utilizará únicamente si no se pueden obtener células de aspirado de médula ósea.	La respuesta molecular mayor (RMM) deberá ser confirmada en dos ocasiones consecutivas. La RMM se evaluará en sangre periférica según escalas internacionales validadas.

Tabla 3: Criterios de respuesta hematológica, citogenética y molecular al tratamiento. La respuesta citogenética completa (RCC) y la respuesta citogenética parcial (RCP) pueden expresarse de forma combinada como respuesta citogenética mayor (RCM). La respuesta molecular mayor (RMM) es equivalente a la reducción de 3-log del valor basal que correspondería al 100%.

Antes de la introducción de los inhibidores de la tirosincinasa, las opciones terapéuticas para la LMC incluían:

- Quimioterapia con Busulfan e Hidroxiurea
- Interferón (IFN)- α
- Trasplante de progenitores hematopoyéticos
- Tratamientos experimentales

1. Tratamiento antes de los inhibidores de la tirosincinasa:

1.1. Quimioterapia con Busulfan e Hidroxiurea:

El **busulfan** (1,4-dimetanosulfoniloxibutano) fue el tratamiento fundamental para la LMC en FC hasta la llegada de hidroxiurea y/o IFN- α . El objetivo de este tratamiento era el de controlar la fase crónica de la enfermedad, tratando de reducir, en lo posible, la morbi-mortalidad. De esta forma se obtenía el descenso de las cifras de leucocitos circulantes, lo que influía favorablemente en las secuelas inmediatas de la leucocitosis excesiva, la reducción de la esplenomegalia y el aumento del hematocrito, así como la mejoría subjetiva del estado general. Estas respuestas no eran muy duraderas, ni por lo general, salvo en muy esporádicos casos, se conseguía disminuir el porcentaje de cromosomas Ph (SAWYERS 1999) (FADERL 1999).

En la actualidad el busulfan se utiliza únicamente como tratamiento de acondicionamiento para el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos o en los pacientes que no se consideran idóneos para alo-TPH, ni para otro tipo de tratamientos alternativos.

La **hidroxiurea**, inhibidor de la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA), ha sido el fármaco de elección para el tratamiento médico de la LMC en fase crónica, hasta que sus resultados se vieron superados por los del IFN y también para aquellos pacientes que no toleraban éste, excluyendo los candidatos a trasplante (SAWYERS

1999). Se conseguía un porcentaje muy elevado de remisiones hematológicas (RH) que no se acompañaba sin embargo, sino de muy esporádicas respuestas citogenéticas. En comparación con el busulfan, la supervivencia fue más prolongada (44% a 5 años vs. 32%) (HEHLMANN 1982).

1.2 Interferón- α (IFN- α):

El IFN, descubierto en 1957 en cultivos celulares infectados por virus, pertenece a una amplia familia de proteínas (tipos I y II, α , β , γ , δ) y entre ellos, los IFN- α comparten receptores dentro de una red de citoquinas con otros interferones y presentan propiedades antiproliferativas, inmunomoduladoras y adherentes sobre las poblaciones neoplásicas de la LMC (ISAACS 1957) (PESTKA 1997).

El tratamiento con IFN- α se ha asociado a toxicidad significativa. Esta toxicidad incluye síntomas como fiebre, escalofríos y sintomatología gripal en la mayoría de los pacientes tratados. Aunque por lo general estos síntomas desaparecen tras unas semanas de tratamiento, otros como fatiga crónica y trastornos cognitivos y de memoria pueden aparecer de forma frecuente y aumentan con la edad del paciente. También se ha asociado esta terapia con trastornos inmunes diversos y, aunque con menos frecuencia, con insuficiencia cardíaca congestiva, porfiria cutánea tarda, glomerulonefritis membranosa, vitíligo y púrpura microangiopática (SACCHI 1995).

- Duración del tratamiento:

A día de hoy persisten diferentes dudas sobre el uso del IFN- α , que incluyen la determinación de la dosis óptima, la duración del tratamiento, si puede ser suspendido o disminuido en pacientes respondedores y cómo predecir rápidamente aquellos pacientes que van a tener respuesta citogenética (MAHON 2002).

- Comparación con el trasplante:

No existen estudios prospectivos en los que se compare el IFN- α con el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Un análisis retrospectivo, comparando 548 trasplantes alogénicos del registro internacional de trasplante, con los estudios randomizados de hidroxiurea/IFN- α del grupo alemán concluye que:

- Existe mayor mortalidad en el grupo del trasplante en los 18 primeros meses (RR 5,9)

- La mortalidad fue similar en los dos grupos en los meses 18-56.

- Después de los 56 meses la mortalidad fue significativamente menor en el grupo del trasplante (RR0.16).

- La probabilidad de supervivencia a los 7 años fue mayor para el grupo del trasplante (58% frente a 32%).

- La ventaja en la supervivencia global (SG) comienza a ser significativa para el grupo del trasplante a los 5.5 años (GALE, 1998).

- Terapia combinada:

Con el objetivo de mejorar las respuestas obtenidas con el IFN- α , todo el interés se centró en la posibilidad de combinarlo con otras terapias como citarabina, hidroxiurea, busulfan o IFN- γ .

El IFN- α con dosis altas de quimioterapia o busulfan provocaba más mielosupresión que los 2 fármacos de manera asociada.

El IFN- α como mantenimiento después de quimioterapia no mejoraba los resultados obtenidos con su aplicación de forma aislada (KANTARJIAN 1991). Los estudios donde se combinaban IFN- γ junto con IFN- α no mejoraron los resultados del IFN- α sólo (TALPAZ 1991). La combinación de IFN- α con hidroxiurea demostró una menor incidencia de efectos adversos, así como mayor número de respuestas

hematológicas que las observadas con éste de forma aislada, aunque no se objetivó mejoría estadísticamente significativa en cuanto a respuestas citogenéticas (KANTARJIAN 1993).

Tras demostrarse el efecto selectivo anti LMC *in vitro* de la citarabina a bajas dosis, comenzaron los estudios en los que se combinaba esta droga junto a IFN- α . Se realizaron dos grandes estudios prospectivos por los grupos francés e italiano en los que se comparaban los resultados de IFN- α y citarabina vs IFN- α sólo. En ambos grupos la respuesta hematológica completa fue mayor para el brazo de IFN- α y citarabina. La respuesta citogenética fue también mayor en los dos grupos en la rama que combinaba ambas drogas, aunque estadísticamente significativa solamente en el estudio del grupo francés. Basándose en estos análisis, la combinación de IFN- α con dosis bajas de citarabina se convirtió en el tratamiento de elección para aquellos pacientes de nuevo diagnóstico de LMC no candidatos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (GUILHOT 1997) (BACCARANI 1997) (KANTARJIAN 1998).

-Papel actual del Interferón- α :

Después de los últimos años en el que todo el interés en el tratamiento de la LMC se ha centrado en los inhibidores de las tirosincinasas, una importante pregunta aún queda por contestar: ¿cuál es el papel del IFN - α hoy en día?

Sin lugar a dudas, el Imatinib (IM) ha revolucionado el manejo de la LMC. Ha suprimido casi por completo el trasplante de progenitores hematopoyéticos en esta patología y se ha convertido en el tratamiento de primera opción para la gran mayoría de los pacientes. Pero la experiencia también está demostrando que el IM por sí solo no es capaz de erradicar la enfermedad. A este dato se une el hecho de la aparición de resistencias, la intolerancia y las toxicidades asociadas, así como su alto coste.

Tiene por tanto gran importancia el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. La combinación de agentes que puedan tener efecto sinérgico, así como el desarrollo de nuevas moléculas serán fundamentales para el objetivo de erradicar la enfermedad residual. Recientemente está cobrando importancia la revisión del papel del IFN- α y el

beneficio que éste podría aportar en el momento actual. Aunque está claro que no sustituye al IM en primera línea, podría ser una opción como tratamiento de la enfermedad mínima residual tras tratamiento con IM, encontrando así el IFN- α su papel actual. Conforme se vayan conociendo más datos sobre el mecanismo antileucémico de actuación del fármaco, seremos capaces de diseñar mejores indicaciones (LISA 2007).

1.3 Papel del trasplante de progenitores hematopoyéticos

A pesar de todos los avances que se han producido en el tratamiento de la LMC, en el momento actual, el trasplante de progenitores hematopoyéticos continua siendo el único tratamiento con efecto curativo demostrado.

El Centro Internacional de Registro de Trasplantes (*CIBMTR*) ha recogido un total de 4513 pacientes, con una edad media de 35 años, que fueron trasplantados entre 1978 y 1997. La supervivencia global de los pacientes que se encontraban en primera fase crónica (3372) fue de del 50% y de aquellos que se encontraban en segunda fase crónica (1141) del 20%. La incidencia acumulada de recaídas a los 18 meses fue del 25 % para aquellos pacientes en primera fase crónica y del 37% para los de segunda fase crónica (GOLDMAN 2004).

El seguimiento más duradero realizado para pacientes trasplantados de un donante relacionado ha sido el de la *EBMT* sobre 2628 pacientes trasplantados entre 1980 y 1990. La supervivencia global fue del 34% para la totalidad de los pacientes, 41% para los trasplantados en primera fase crónica de un donante HLA idéntico y del 49% para aquellos pacientes que tenían un índice pronóstico *EBMT* de 0-1 (SCHMITZ 2006).

Actualmente existen una serie de parámetros basados en grupos de riesgo con variaciones en la supervivencia del 72 % al 11% (todos los pacientes) y del 75% al 25% (los trasplantados en fase crónica tardía) (Tablas 4 y 5).

FACTORES PRONÓSTICO	PUNTUACIÓN
Edad	0 si <20 años 1 si 20-40 años 2 si >40 años
Tiempo desde el diagnóstico	0 si <1 año 1 si > año
Fase de la enfermedad	0 si crónica 1 si acelerada 2 si blástica
Discrepancia de sexo del donante	1 si donante femenino y receptor masculino 2 para cualquier otra combinación
Tipo de donante	0 si HLA-identico 1 para cualquier otro

Tabla 4: Factores pronóstico en LMC para pacientes que van a ser sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos según grupo de EBMT (GRATWOHL 1998).

RIESGO	EBMT series	CIBMTR (Todos los pacientes)	CIBMTR (FC precoz)
0-1	72%	69%	70%
2	62%	63%	67%
3	48%	44%	50%
4	40%	26%	29%
5-7	22%	11%	25%

Tabla 5: Supervivencia global según factores de riesgo publicadas por diferentes grupos (GRATWOHL 1998).

El progreso en la tipificación molecular del DNA de los alelos HLA, el avance en el manejo de las infecciones oportunistas, las modificaciones en los regímenes de acondicionamiento, así como la terapia inmunosupresora, han contribuido a mejorar los resultados del alotrasplante (BARRET 2003). Para los pacientes con LMC que reciben trasplante convencional, el uso de células procedentes de sangre periférica no ha demostrado ninguna ventaja sobre las de médula ósea (OEHLER 2005). El empleo de acondicionamientos de intensidad reducida ha permitido trasplantar a personas mayores que, con otros esquemas, no serían candidatos, aunque la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, así como la calidad de vida, no han podido ser comparadas aún (BACCARANI 2006).

El papel del Autotrasplante como tratamiento en recaídas ha sido objeto de estudio en numerosas revisiones. Algunos trabajos han propuesto este procedimiento para alcanzar remisiones y alargar la supervivencia, pero parece ser que el autotrasplante no tiene ninguna ventaja estadísticamente demostrable, sobre el tratamiento con IFN- α (RICHARDS 2005).

- Indicaciones actuales del trasplante alogénico de progenitors hematopoyéticos:

En la práctica actual, el TPH ha experimentado un descenso espectacular. Según las últimas recomendaciones del panel de expertos de la Red Europea de Leucemia, en la actualidad no existe ninguna razón por la que a un paciente con LMC no se le ofrezca Imatinib (IM) como primera opción terapéutica, siendo la respuesta a este tratamiento la que reforzará o debilitará la indicación de alo-TPH. Sin embargo, debemos recordar que, a la espera de un mayor seguimiento de los pacientes tratados con nuevos inhibidores de tirosincinasas, el alo-TPH es el único procedimiento que, hasta el momento, ha demostrado potencial definitivamente curativo.

Resumimos de forma esquemática aquellas situaciones especiales en las que estaría indicado valorar la realización de un trasplante:

- Pacientes en FA o CB: intentar revertir la enfermedad a la fase crónica para, a continuación, realizar si fuera posible trasplante autólogo.

- Pacientes en FC con fracaso a IM: considerar el trasplante si se han administrado previamente dosis altas del fármaco y el riesgo del procedimiento es razonable. En caso de que el riesgo sea alto, se aconseja antes la administración de otros inhibidores de tirosincinasa. Ante mutaciones del gen ABL que confieran resistencia a IM y a otros inhibidores, considerar el trasplante alogénico como segunda opción.

- Pacientes en FC con respuesta sub-óptima a IM: como primer paso se aconseja aumentar la dosis de IM. Si con ello no se obtiene una respuesta óptima, considerar el alo-TPH si el paciente es un buen candidato. Si no lo es, administrar un inhibidor de tirosincinasas “de segunda generación”.

- Intolerancia o toxicidad excesiva a IM: valorar la administración de otros inhibidores de la tirosincinasa antes de considerar el trasplante.

- Pacientes en fase crónica con signos de alerta (del 9q+, alteraciones citogenéticas adicionales al cromosoma Ph, índice de Sokal alto o mutación T315I) (BACARANI 2006).

2. Tratamiento con Inhibidores de la tirosincinasa

Las tirosincinasas son enzimas que transfieren un fosfato del ATP a las proteínas sustrato que regulan procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia, con un papel fundamental en la regulación de la apoptosis. El inicio irregular en la activación de una tirosincinasa concreta puede tener una gran importancia en la transformación maligna. Esto es lo que ha hecho a la inhibición de las tirosincinasas una diana terapéutica atractiva (DRUKER 2000). La inhibición de las proteínas tirosincinasas implicadas en una determinada neoplasia puede producir beneficio terapéutico. Las siguientes consideraciones apoyan este hecho:

- La necesaria activación de proteínas tirosincinasas para la proliferación o supervivencia de células tumorales.

- La potencia o especificidad del inhibidor.

- La toxicidad del inhibidor, o sea, tanto las consecuencias específicas como las no específicas de la inhibición de la actividad tirosincinasa “normal”.

- Las propiedades de los inhibidores, incluyendo la permeabilidad celular, la estabilidad, el metabolismo de productos activos e inactivos, la solubilidad y la distribución intracelular.

La eficacia de un inhibidor de tirosincinasas dependerá del papel de éstas en el origen de la enfermedad. Por ejemplo, en la LMC, un inhibidor de la tirosincinasa ABL puede ser efectivo en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, en otros procesos o, incluso en fases avanzadas de LMC, donde la actividad tirosincinasa es sólo una de las anormalidades, se requerirá una combinación con otras acciones terapéuticas (RAITANO 1997).

Desde que se observó que todas las proteínas-cinasas usan ATP como donante de fosfato con un alto grado de conservación entre los dominios tirosincinasas, se pensó que los inhibidores de los puentes de unión del ATP podrían tener especificidad suficiente para ser clínicamente útiles.

Así, en 1988, *Yaish et al.*, desarrollaron el primer inhibidor sintético de la tirosincinasa conocido como el *tyrphostins*, que demostró especificidad entre diferentes tirosincinasas. Algunos ejemplos de inhibidores específicos de las tirosincinasas son:

- PD153035 (inhibidor de EGFR que es activo en concentraciones picomolares): bloquea selectivamente procesos celulares mediados por EGF, incluyendo mitogénesis, expresión génica y transformación oncogénica.

- CGP57148: diseñado a partir de la estructura cristalina del sitio de unión al ATP de las tirosincinasas, inhibe a la cinasa Abl y al PDGFR a concentraciones submicromoleculares. Se ha observado que este compuesto destruye específicamente células que expresan BCR-ABL) *in vivo* e *in vitro* (YAISH 1988).

2.1. Imatinib (IM)

2.1.1 Desarrollo

EL Imatinib (IM), un derivado de la 2 fenilaminopirimidina, se desarrolló como un potente inhibidor del receptor PDGF (BUCHDUNGER 2000). Posteriormente se comprobaría que era un potente y selectivo inhibidor de las tirosincinasas ABL, incluidas la 210-KD BCR-ABL y la BCR-ABL de la 185 a la 190. La única otra tirosincinasa inhibida por el IM era el *c-kit*, el receptor para el factor de crecimiento celular. Otros receptores de la tirosincinasa, como el factor de crecimiento epidermoide, FLT1 y FLT3 fueron ineficaces (HEINRICH 2000).

En 1996 Druker *et al* comunicaron que el IM inhibía específicamente o acababa con la proliferación de líneas celulares que contenían BCR-ABL y en cambio era mínimamente efectivo en líneas de células normales (DRUKER 1996). Más adelante se observaría que el IM suprimía también el crecimiento de células en pacientes con LLA Ph +, incluso en aquellos con BCR-ABL de la 185-190 (BERAN 1998). Los esfuerzos posteriores se centrarían en extrapolar los resultados experimentales *in vitro* para ver así la eficacia del IM *in vivo*. Los primeros estudios en animales mostraron dosis-dependencia en la inhibición del crecimiento del tumor BCR-ABL en ratones tratados en secuencia diaria, pero en ningún caso se objetivó la erradicación del tumor. Dicha erradicación si se observó al usar un esquema de tratamiento de tres veces al día (DRUKER 2000). Los estudios posteriores se centraron en comprobar la seguridad y biodisponibilidad del fármaco por vía oral para la supresión o erradicación de BCR-ABL y con una buena tolerancia.

2.1.2 Mecanismo de acción

El IM bloquea la capacidad de ABL para transferir grupos fosfato a partir del ATP y fosforilar residuos tirosina en proteínas sustrato. Este bloqueo impide la transducción de las señales para la proliferación y para la apoptosis dependientes de ABL. Así, IM inactiva la vía de transducción de señales activadas de manera anormal, inducida por BCR-ABL (Figura 4) pero, debido a la redundancia en las vías de transducción, este

fenómeno sólo parece tener repercusiones clínicas cuando está presente la translocación (DRUKE 1996).

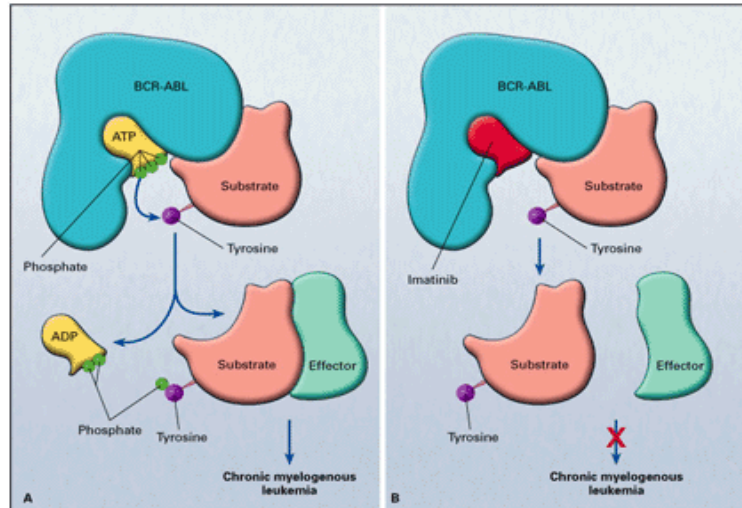


Figura 4: Mecanismo de acción del Imatinib. (SACCHI 1999).

2.1.3 Resultados clínicos

El estudio IRIS (Internacional Randomized Study of Interferon and STI571) es el estudio de mayor seguimiento en pacientes con LMC tratados con IM. Se trata de un estudio randomizado, abierto, fase 3. Pacientes de nuevo diagnóstico se randomizaron para recibir IM a dosis de 400 mgr o Interferón- α y citarabina. Se permitió cruce de tratamiento si los pacientes no obtenían respuesta, perdían la respuesta, presentaban aumento de la cifra de leucocitos o no podían tolerar el tratamiento.

El objetivo principal del estudio fue valorar la supervivencia libre de incidencias.

Tras una mediana de seguimiento de 60 meses, el 69% de los pacientes que fueron randomizados al brazo de IM continuaron en éste. Únicamente el 3% de los pacientes randomizados al brazo de IFN / Ara C continuaron en él.

Los resultados para respuestas hematológicas, citogenéticas y moleculares a los 12, 18, 24 y 60 meses se expresan en la tabla 6:

Meses	RHC %	RMC %	RCC
12	96	85	69
18	97	88	76
24	97	90	80
60	98	92	87

Tabla 6: Respuestas hematológicas, citogenéticas y moleculares obtenidas con IM a los 12, 18, 24 y 60 meses de seguimiento en estudio IRIS.

Los pacientes en los que se permitió el cruce entre tratamientos, así como aquellos que abandonaron el tratamiento por motivos diferentes a la progresión, fueron excluidos del análisis estadístico.

Los índices de respuestas acumuladas estimadas aumentan con el paso del tiempo para las RHC, RCM, RMM y también se observaron respuestas tardías.

La supervivencia libre de eventos (SLE) y la supervivencia sin FA o CB fue de 83% y 93% respectivamente (Figura 5).

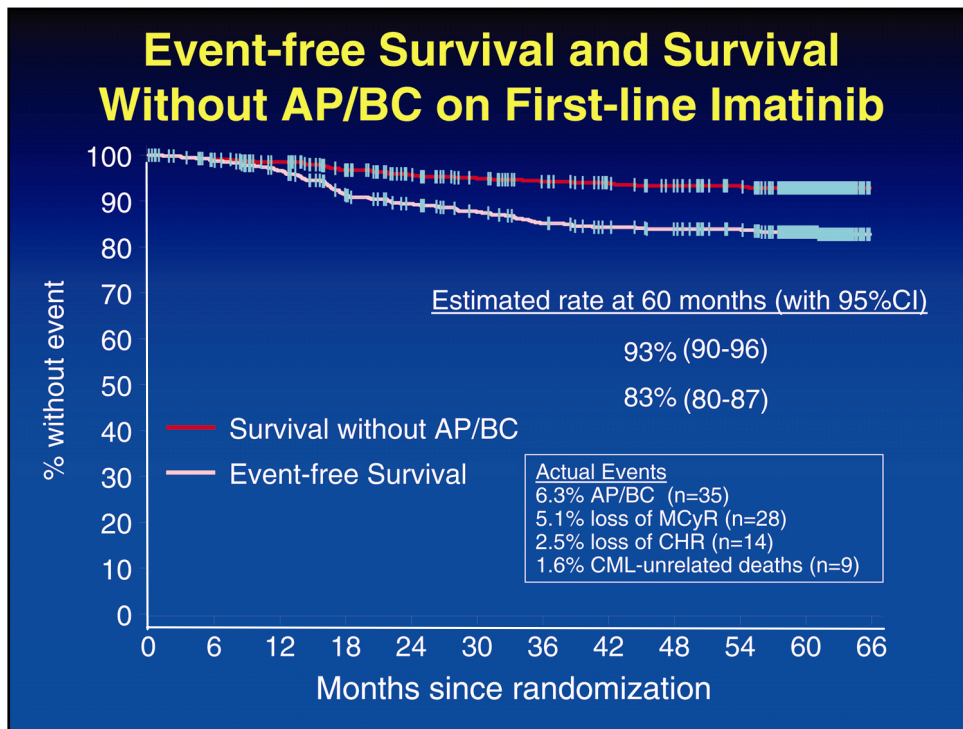


Figura 5: Supervivencia libre de enfermedad y supervivencia sin fase acelerada o crisis blástica en estudio IRIS (Druker 2006)

Las incidencias fueron definidas como: muerte por cualquier causa durante el tratamiento, progresión a FA o CB de la LMC, pérdida de la RHC, pérdida de RCM o aumento de leucocitos en sangre periférica.

Se observaron un 15.5% de incidencias durante el tratamiento con IM. De este resultado resulta una supervivencia libre de incidencias estimada a los 60 meses del 83%.

La supervivencia estimada libre de progresión a FA o CB a los 60 meses es del 93%.

El porcentaje anual de incidencias relacionadas, así como de progresión de la enfermedad, disminuye con el paso del tiempo.

Conforme mayor grado de respuesta citogenética, se observa mayor protección frente a la progresión. Ningún paciente con RCC y RMM a los 12 o 18 meses progresó a FA o CB tras 12 meses de tratamiento. Los pacientes sin RCC a los 18

meses, presentaron un pronóstico peor a los 60 meses que aquellos que sí la obtuvieron. (Figura 6). Esta misma protección frente a la progresión se observa igualmente conforme mayor es el grado de respuesta molecular (Figura 7).

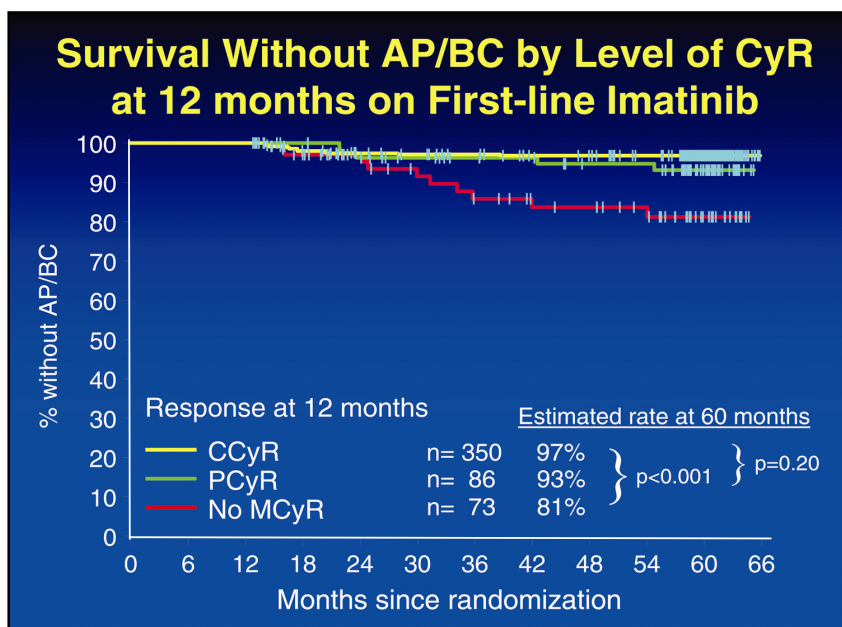


Figura 6: Supervivencia alcanzada por los pacientes tratados con Imatinib en primera línea en fase crónica de la enfermedad en función de la respuesta citogenética obtenida a los 12 meses en estudio IRIS (Druker 2006).

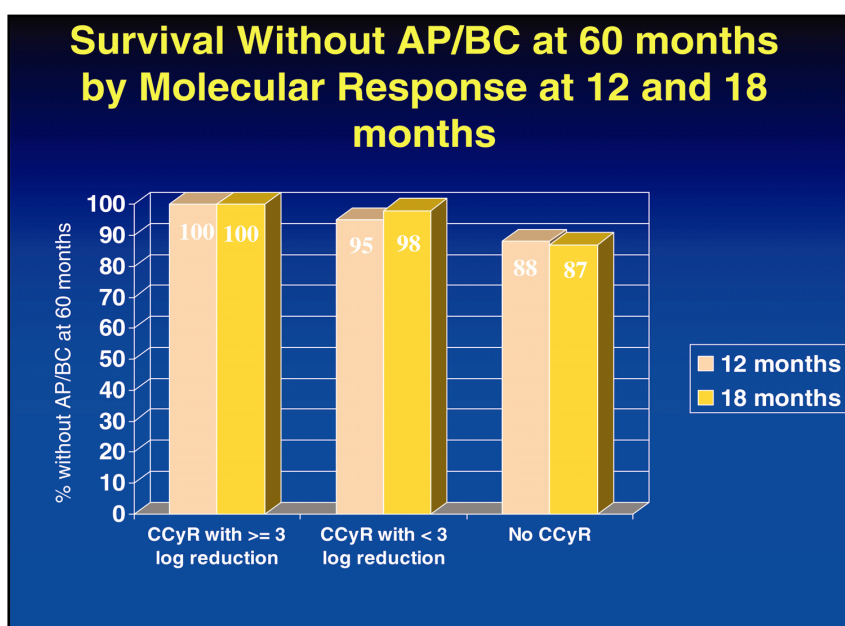


Figura 7: Supervivencia alcanzada por los pacientes tratados con Imatinib en primera línea en fase crónica de la enfermedad en función de la respuesta molecular obtenida a los 12 y 18 meses en estudio IRIS (Druker 2006)

Se analizó la seguridad y toxicidad del fármaco: La conclusión es que el IM es un fármaco que se tolera bien. La mayoría de los efectos adversos fueron grado 1 (leves) o grado 2 (moderados), tendiendo éstos a ocurrir en el primer año de la toma del medicamento. La interrupción de éste, por efectos adversos relacionados con él, fue de menos del 4%, con una mediana de seguimiento a los 60 meses.

En la tabla 7 se muestran la frecuencia de los tipos de toxicidad hematológica y no hematológica causados por el fármaco.

Toxicidades grado III-IV	Incidencia total acumulada (%).	Incidencia a los 2 años	Incidencia a los 4 años
Hematológicos/ Hepáticos:			
- Neutropenia	16,7	3,7	1
- Trombopenia	8,9	1,5	0,2
- Anemia	4,4	1,8	0,5
- Elevación de Enzimas hepáticas	5,3	0,4	0
Otros efectos secundarios no hematológicos	17	5	2

Tabla 7: Toxicidades hematológicas/hepáticas grado III-IV observadas en pacientes tratados con Imatinib en fase crónica de la enfermedad en estudio IRIS (DRUKER 2006).

Los grados de toxicidades se definen en la tabla 8:

	Grado III	Grado IV
Neutropenia	0.5-1.0 x 10 ⁹ /L	<0.5 x 10 ⁹ /L
Trombocitopenia	10-50 x 10 ⁹ /L	<10 x 10 ⁹ /L
Anemia	65 - 80 g/L	<65 g/L
Enzimas hepáticas: GOT y GPT	Valor basal aumentado de 5-20 veces	Valor basal aumentado más de 20 veces

Tabla 8: Definición de toxicidades hematológicas y hepáticas en estudio IRIS.

Las conclusiones finales del estudio IRIS fueron:

- La terapia con IM se tolera bien y ha demostrado que consigue respuestas duraderas.
- El alto índice de respuestas a Im continúa aumentando con el paso del tiempo.
- La toxicidad grado 3-4 disminuye con el paso del tiempo.
- La supervivencia total es del 89% (95% si se descuentan las muertes no relacionadas con el proceso)
- El índice anual de progresión disminuye con el paso del tiempo
- La RCC y la RMM se asocian con la prolongación de la supervivencia.
- La RCC se superpone estadísticamente con el índice pronóstico de Sokal (DRUKER 2006).

2.1.4 Problemas con Imatinib:

Dado el alto porcentaje de RCC con IM, se necesita monitorización mediante PCR cuantitativa para la medición de la enfermedad mínima residual. En una proporción importante de los pacientes con RCC se comprueba una RMM. La experiencia adquirida con la monitorización de estos pacientes demuestra que la reducción del número de transcritos BCR-ABL se relaciona con un mejor pronóstico (MERX 2002).

La disminución media de los transcritos de BCR-ABL puede verse hasta 24 meses después del inicio del tratamiento. Más adelante, en algunos casos decrecen las reducciones medias, lo que sugiere que la enfermedad residual se va haciendo menos sensible al IM (GRAM 2002).

Aunque los resultados con IM son mejores incluso que lo previsto, aún quedan muchos problemas por resolver:

- En primer lugar, en los pacientes en FA o CB, las respuestas al tratamiento, así como la supervivencia, no son comparables con aquellos en FC: desde la introducción del IM la mediana de la supervivencia ha aumentado únicamente de 2-3 meses hasta los 7.5.

- En segundo lugar, se han observado recaídas tras el abandono al IM en pacientes previamente en respuesta completa, sugiriendo que el IM debe administrarse de forma indefinida.

- En tercer lugar, las resistencias al IM pueden resultar de la progresión a fases más avanzadas de la enfermedad o bien, de la aparición de resistencias mediante el desarrollo de mutaciones.

- En cuarto lugar, en raras ocasiones, la intolerancia al IM puede causar reacciones inflamatorias de la piel, elevación de transaminasas o retención de líquidos. También puede originar citopenia que, aunque transitoria, a veces requiere la interrupción temporal del fármaco. Finalmente, efectos a largo plazo, como las aberraciones

centrosómicas que producen alteraciones en el metabolismo óseo y mineral o en la función cardíaca, son todavía una incógnita (APPERLEY 2007).

2.1.5 Resistencias a Imatinib:

La existencia de pacientes resistentes a IM se hizo evidente tan pronto como se comenzó a utilizar el fármaco. También se observaron escasas respuestas en fases avanzadas, aunque muchas veces fueron transitorias. Esta falta de efectividad en muchos pacientes se debe a cambios genéticos adicionales que confieren mecanismos de proliferación y maduración diferentes.

Los laboratorios hicieron esfuerzos para el análisis de las resistencias, con líneas celulares sometidas a aumentos graduales de concentraciones de IM. Los mecanismos más evidentes fueron la sobreexpresión del BCR-ABL asociada a amplificación de BCR-ABL, la sobreexpresión de la P-glicoproteína resistente a drogas y sin duda, el mecanismo más frecuente, las mutaciones puntuales en el dominio cinasa ABL.

No obstante, la resistencia a cualquier fármaco se debe a mecanismos multifactoriales. Dado que el IM es un fármaco administrado por vía oral, está sujeto a variaciones en su biodisponibilidad, en las que jugará un papel importante la absorción, el metabolismo y la unión a transportadores plasmáticos e intracelulares. También pueden jugar un papel modificador de la acción del fármaco la inactivación enzimática, los cambios en la expresión de la molécula y las mutaciones de la propia molécula, así como el desarrollo de mecanismos alternativos en la transducción de señales (PENG 2004) (le COUTRE 2004) (PICARD 2007).

Estos mecanismos serán los que pasaremos a explicar a continuación:

a) Biodisponibilidad oral:

Estudios recientes han mostrado importantes variabilidades entre pacientes en las concentraciones del IM. La biodisponibilidad oral está condicionada por la absorción gastrointestinal y un primer paso del metabolismo hepático del fármaco. Estas variaciones podrían estar relacionadas con variaciones en las concentraciones de la isoenzima del citocromo p450, la cual lo neutraliza casi en su totalidad. Picard *et al* estudiaron niveles plasmáticos de IM en 68 pacientes que habían sido tratados por un tiempo mínimo de 12 meses confirmando importantes variaciones. Aún más importante, vieron que, en aquellos pacientes en los que las concentraciones fueron mayores, se correspondieron con un índice de respuestas citogenéticas y moleculares más elevadas que en aquellos con niveles de IM inferiores (PICARD 2007) (LARSON 2007).

b) Unión plasma proteína:

El IM se fija en un 89-96% a una proteína que predominantemente es la albúmina y, en menor proporción, a la 1- α -acidoglicoproteína, una proteína hepática de fase aguda que se fija a los cationes de las drogas en proporción 1:1 molar. Gambacorti-Passerini *and colleges* hipotizaron que, una excesiva fijación de IM a esta encima, podría repercutir sobre los efectos terapéuticos de la molécula (GAMBACORTI-PASSARINI 2002), si bien es cierto que estos estudios no fueron reproducidos por otros grupos. Aunque las concentraciones de la 1-alfa acidoglicoproteína interfieren con las mediciones plasmáticas de IM, la mayor parte de la molécula se une a la albúmina, por lo que, el atribuir a esta enzima el ser agente causal de resistencia al IM, no es aceptado como mecanismo (JOGENSEN 2002).

c) Cambios en la variabilidad intracelular del Imatinib:

En 1970 se describió ya un eflujo activo de la quimioterapia como mecanismo de resistencia a las drogas. La sobreexpresión en la superficie celular de la transmembrana ATPasa ABCB1 parece jugar un papel importante en las concentraciones de agentes quimioterápicos que alcanzan el interior celular mediante la activación de transportadores que sacarían al fármaco de la superficie intracelular. Diferentes estudios, posteriormente confirmados, relacionaron la sobreexpresión de la ABCB1 como posible mecanismo de resistencia al IM, aunque su papel en la resistencia clínica está aún por definir (MAHON 2000) (MAHON 2003) (MUKAI 2003).

Los transportadores de drogas potencialmente pueden jugar un importante papel en las resistencias farmacológicas, ya sea transportando la droga fuera de la superficie celular o bien trasportándolas fuera de las células del tracto gastrointestinal. ABCG2 es un conocido mecanismo de resistencia a algunos agentes quimioterápicos. Tanto ABCB1 como ABCG2 se expresan en membranas atípicas intestinales y de canalículos biliares, pudiendo afectar al transporte gastrointestinal y con ello a la biodisponibilidad oral (DOYLE 2003). La exposición continuada de los mecanismos intestinales de transporte de drogas *caco-2 cells* a IM inducen aumento de la expresión de ABCB1 y ABCG2 a nivel de mRNA y niveles proteicos. La exposición crónica de *caco-2 cells* se ha relacionado con descenso de concentraciones intracelulares de IM (BURGER 2005). El papel de ABCG2 en células resistentes a agentes quimioterápicos se identificó cuando se apreció que el gefitinib (inhibidor de la tirosinasa) disminuía la resistencia a topotecan induciendo así, la combinación de estos dos fármacos, toxicidad celular. Este hallazgo sugirió que gefitinib pudiera actuar inhibiendo la vía de ABCG2. Dado que ABCG2 se expresa en células madre normales, este mecanismo se convirtió en un posible candidato para interaccionar con IM a modo de resistencia (ZHOU 2001). Houghton *et al* confirmaron que el IM jugaba un importante papel en la resistencia de otras drogas, pero no pudieron confirmar que IM por sí sólo fuera un sustrato de ABCG2. La sobreexpresión de ABCG2 en líneas celulares BCR-ABL negativas no afectaron a la sensibilidad de IM pero sí produjo una importante disminución de la resistencia mediada por ABCG2 de algunos agentes quimioterápicos (OZVEGY-LACZKA 2004). Todos los estudios realizados para identificar interacciones entre ABCG2 e IM se realizaron en células en las que se expresaban ABCG2 mediante

recombinación genética, pero la cuestión fundamental se centraba en observar qué mecanismo predominaría en células primarias, si bien una baja regulación de ABCG2 o una resistencia mediada por ABCG2. Jordanides *et al* identificaron un aumento de la expresión de ABCG2 en células de LMC primitivas de pacientes de nuevo diagnóstico en comparación con células hematopoyéticas primitivas. Este grupo comprobó también que IM es un inhibidor, pero no un sustrato de ABCG2 (JORDANIDES 2006). La inhibición de mecanismos transportadores de drogas a nivel intracelular ha sido objeto de estudio por diferentes grupos considerándolo en la actualidad como un mecanismo alternativo que afecta a la biodisponibilidad intracelular de la droga. (THOMAS 2004) (CROSSMAN 2005). La familia completa de transportadores de drogas tiene 12 miembros, todos ellos transportadores de cationes orgánicos poliespecíficos (OCTs). Se conoce que los poliformismos de *OCT-1* afectan al transporte del sustrato y existen evidencias sobre los mecanismos de transporte intracelular de IM mediante OCT-1 (CROSSMAN 2005).

Prazosin, un inhibidor de *OCT-1*, disminuye concentraciones intracelulares de IM en células expuestas a la droga. No obstante, *OCT-1* no puede ser el único mecanismo de transporte intracelular debido a que, cuando se usan concentraciones altas de prazosin, no se previene por completo la entrada de IM, aunque diferencias en *OCT-1* sí pudieran explicar la variabilidad de unos pacientes a otros. El papel que juega *OCT-1* en las resistencias clínicas es menos claro. Thomas *et al* estudiaron la expresión de *OCT-1* en seis pacientes sin poder sacar conclusiones (THOMAS 2004). Estudios posteriores mostraron cómo niveles aumentados de *OCT-1* se relacionaron con fallos en la obtención de RCC (CROSSMAN 2005). El estudio de los mecanismos de transporte al interior de la célula, así como los de extracción celular, pueden jugar un papel fundamental en la adquisición de resistencias y podrían tener un papel importante en el uso racional de inhibidores de tirosinasa (APPERLEY 2007) (WHITE 2006).

d) Aumento de la expresión de BCR:

En un estudio realizado por Mahon *et al* en líneas celulares desarrolladas para adquirir resistencias, se identificó la sobreexpresión de BCR-ABL como la causa más frecuente de resistencia (MAHON 2000). Posteriormente se vió que estos hallazgos no se correspondían con la práctica clínica, observándose que este mecanismo es mucho menos frecuente que las mutaciones puntuales del dominio tirosincinasa como origen de resistencia clínica. Se ha especulado que la expresión “exagerada” de BCR-ABL causa problemas de viabilidad a las líneas celulares. Por otro lado, células con alta expresión de de BCR-ABL son mucho menos sensibles al IM y lo que es más importante, les lleva menos tiempo producir subclonas mutadas resistentes a inhibidores (BARNES 2005) (TIPPING 2001).

e) Evolución clonal:

La progresión de la enfermedad se ha visto asociada a la evolución clonal, entendiéndola ésta como la aparición de nuevas anomalías cromosómicas en la población cromosoma Ph (+). La presencia de evolución clonal se correlaciona con una menor respuesta a IM en términos de respuestas hematológicas y citogenéticas, así como con una disminución en la supervivencia (CORTES 2003).

Se ha observado que las pérdidas de respuestas se correlacionaban con mayor frecuencia en pacientes que habían sufrido una evolución clonal que en aquellos que presentaban mutaciones puntuales del dominio tirosincinasa. Estos hallazgos eran todavía más evidentes en los pacientes que habían evolucionado a crisis blástica (LAHAYE 2005) (JABBOUR 2006).

f) Mutaciones en el dominio ABL-cinasa:

Las mutaciones puntuales en el dominio ABL-cinasa han sido descritas como el mecanismo de reactivación de BCR-ABL en el clon leucémico (von BUBNOFF 2002)

(ROCHE-LESTIENNE 2002). Según la conformación estructural del IM, se sugiere que éste podría actuar bloqueando la proteína BCR-ABL en su forma inactiva. Esta forma impediría la transfección de adenosin trifosfato (ATP) a otros sustratos que bloquearían las señales de transducción. Las mutaciones parecen actuar al interrumpir el punto de contacto entre el IM y BCR-ABL o, más frecuentemente, induciendo un cambio de forma inactiva a activa, forma a la que el IM no se puede unir. Según los distintos estudios clínicos, el repertorio de mutaciones encontrados en relación a resistencias se han adquirido de una manera lenta pero inexorable, con un rango de frecuencia que oscila entre el 26 y el 90% de los pacientes, lo que probablemente refleja su heterogeneidad genética.

Muchos de estos estudios se han realizado en pacientes con LMC y LLA Ph (+) y los criterios de selección, así como las definiciones de resistencia, fueron también diferentes de unos estudios a otros (SOVERINI 2005). Las mutaciones en el dominio cinasa (KD) pueden ser parte de la evolución natural de la enfermedad, independientemente de la terapia con IM. Análisis de PCR alelos específicos, realizados en ejemplos preterapéuticos, revelaron el mismo tipo de mutación que la detectada en la recaída, lo cual es concordante con la selección de resistencias durante la terapia (SHAH 2002). Un estudio similar de ejemplos pre-IM, en pacientes con LMC no seleccionados, detectaron mutaciones KD a bajos niveles en aquellos con FA/FB pero no en pacientes con FC. La presencia de mutaciones se correlacionó con evolución clonal citogenética. Una posible explicación es que sólo clones mutantes de KD originados en la célula madre leucémica pueden mantener la hematopoyesis maligna y en cambio, mutaciones generadas en otras células progenitoras diferentes se auto-eliminan por patrones cinéticos/proliferativos incompatibles (WILLIS 2005).

En la práctica no se recomienda practicar un análisis de alta sensibilidad para mutaciones en la fase pretratamiento. Otra cosa es que una mutación clonal predomine antes del tratamiento con IM, ya que ninguno de estos pocos pacientes responderá al IM. Un dato más a añadir es la demostrada capacidad de autorenovación de un clon mutado, una vez que el paciente está en recaída, con mutaciones del dominio cinasa (SOREL 2004).

Actualmente están descritas más de 50 mutaciones de las que algunas se presentan en mayor frecuencia que otras (figura 8).

MAPA DE MUTACIONES BCR-ABL

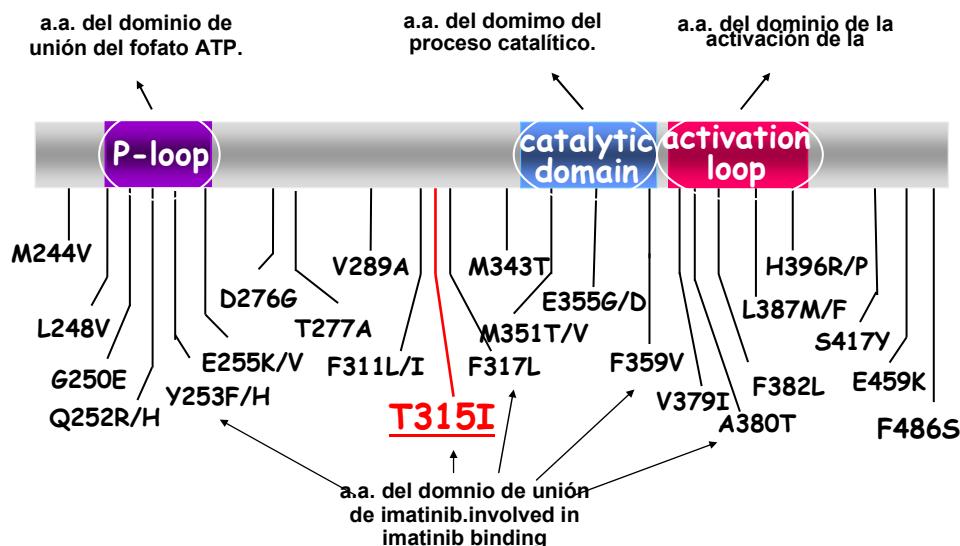


Figura 8: Mapa de mutaciones BCR-ABL.

La sustitución del aminoácido 15 se encuentra en más del 85% de las mutaciones y las responsables del 66% de los casos ocurren sólo en 7 lugares (G250, Y253, E255, T315, F359, H369). Algunas de las mutaciones parecen ocurrir con más probabilidad según la fase de la enfermedad. Así, las mutaciones en M244, L248, F317, H396 y S417, se presentan con mayor frecuencia en su fase crónica, mientras que aquellas como Q252, Y253, E255, T315, E459 y F486 se han observado preferentemente en fases avanzadas. La importancia funcional de estos hallazgos no está aún bien definida: ¿son responsables de la progresión de la enfermedad o representan un marcador del incremento de la inestabilidad genética asociada a fases avanzadas de ésta? (APPERLEY 2007). La acción inhibitoria del IM se produce por su capacidad de reconocer la forma inactiva de ABL (figura 9). Este reconocimiento ocurre gracias a la especificidad del IM para BCR-ABL. En la configuración inactiva, la activación del *loop A* (aminoácidos del 381-402 del ABL), el cual es el mayor regulador de elementos del dominio cinasa, bloquea el centro catalítico. Las mutaciones en el *loop A* desestabilizarán el dominio cinasa o prevendrá a ésta de adoptar una configuración inactiva. Se han detectado mutaciones adicionales que forman acúmulos (o mosaicos)

en el dominio C catalítico (aminoácidos del 350 al 363). Algunos grupos han encontrado que las mutaciones *P loop* se asocian con una progresión mucho más rápida a fases avanzadas que las ocurridas en otras regiones de la molécula (BRANDFORD 2003).

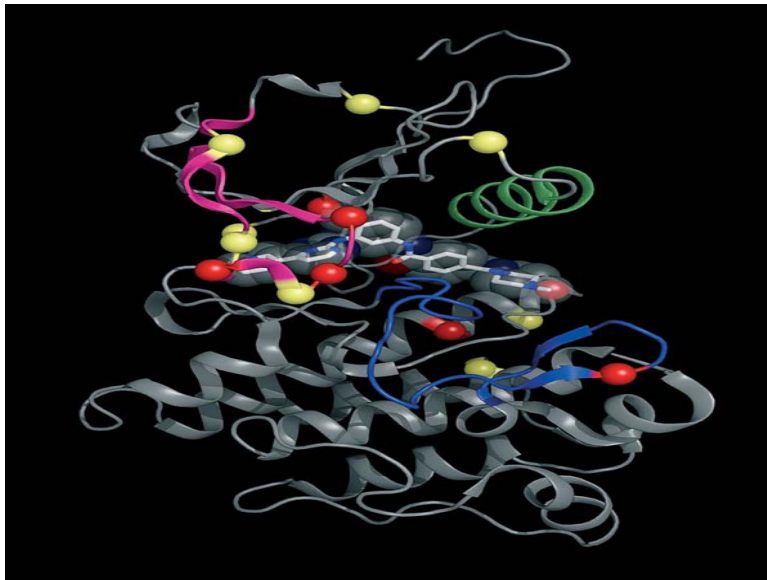


Figura 9: Interacción del BCR-ABL con Imatinib. Interacción de BCR-ABL en rosa y p-loop en azul. Siete de las más frecuentes mutaciones se muestran en rojo, ocho de las siguientes más frecuentes en amarillo

A pesar de los múltiples estudios publicados sobre estas mutaciones, existe gran dificultad para establecer su incidencia, así como para identificar aquellos factores que aumentan el riesgo de desarrollar mutaciones. Ésto se debe principalmente a dos hechos, en primer lugar, a que las técnicas usadas para su detección varían mucho de un laboratorio a otro y en segundo lugar, a que los estudios se centran en diferentes grupos de pacientes que difieren en estadio de la enfermedad. Muchos de los estudios que describen mutaciones son de pacientes con resistencias adquiridas, las cuales son mucho más frecuentes en fases avanzadas. Más aún, estos casos recibieron IM como tratamiento de segunda línea tras el fallo de otros tratamientos entre los que se incluía IFN. En este grupo de pacientes, la presencia de mutaciones en el momento de la pérdida de respuesta ocurre con una frecuencia del 44 al 100% según las series. Las mutaciones en pacientes tratados desde el principio del diagnóstico con IM se han visto

en una frecuencia mucho menor y por lo general, se detectan a partir de la resistencia (APPERLEY 2007).

Desde que se han identificado las mutaciones en el dominio cinasa como causa de resistencia al IM, se han explorado distintas estrategias, basadas en estudios retrospectivos, para intentar predecir el espectro de mutaciones que será resistente a IM. Estudios similares se están realizando para inhibidores de segunda generación (figura 10). Una recopilación de tres estudios independientes *in vitro* para resistencias al Nilotinib mostró que las mutaciones de las posiciones Y253, E255, y T315 son, por este orden, las que se encuentran con mayor frecuencia (RAY 2007). Estudios similares se realizaron para Dasatinib, observando que las mutaciones que se hallaron con mayor incidencia fueron aquellas que limitaban los puntos de contacto, destacando por frecuencia V299, T315 y F 317 (BURGESS 2005).

Sensibilidad de mutaciones a concentraciones farmacológicas de Dasatinib y Nilotinib.

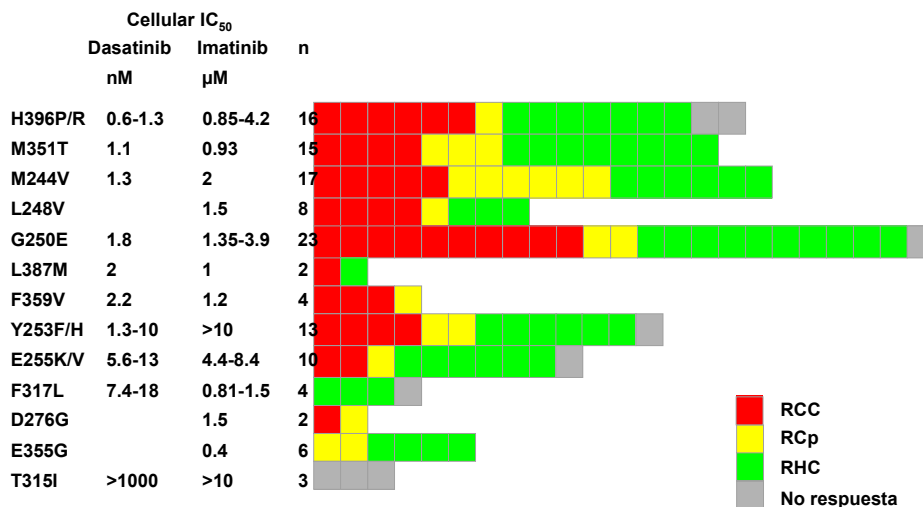


Figura 10: Sensibilidad de mutaciones a inhibidores tirosincinasa de segunda generación.

2.2 Dasatinib

El Dasatinib (BMS-354825, Bristol-Meyers Squibb) es un nuevo inhibidor dual SRC/ABL denominado de segunda generación. La diferencia fundamental respecto al IM es la posibilidad de unirse, tanto de forma activa como inactiva, al dominio ABL cinasa, aunque estudios recientes sugieren que el Dasatinib pudiera ser excluido de las conformaciones inactivas (MANLEY 2006). Un mecanismo de resistencia adquirida al IM en LMC es el desarrollo de mutaciones del *BCR-ABL activation loop* que estabiliza el *Kinsae activation loop* en la conformación activa, previniendo así la unión al IM, el cual se une al dominio cinasa únicamente cuando el *activation loop* de la cinasa se encuentra en la conformación inactiva o cerrada. Estudios estructurales de los inhibidores duales SRC/ABL, han mostrado que éstos se unen al lugar de unión en ABL, el cual puede estar tanto en la conformación activa como inactiva. Estas moléculas pueden inhibir la actividad cinasa en la mayoría de las resistencias BCR-ABL de las formas mutadas del *activation loop* (MARCUS 2006). Dasatinib *in vitro* es 325 veces más potente que IM en células que se habían transducido con BCR-ABL no mutado (SHAH 2004) (LOMBARDO 2004) e inhibe incluso un espectro diferente de cinasas que IM (TALPAZ 2006).

El Dasatinib también tiene actividad frente a distintas mutaciones del dominio cinasa que confieren resistencias al IM. En modelos de líneas celulares se observó que el Dasatinib inhibía 21 de las 22 mutaciones BCR-ABL que conferían resistencia a IM con un rango de concentración similar al que se requiere para inhibir a las formas salvajes de BCR-ABL. La única excepción es la mutación T315i, la cual se encuentra en el *ATP-binding pocket* del dominio tirosincinasa y que confiere un gran grado de resistencia, tanto al Dasatinib, como al IM y su análogo Nilotinb (KANTARJIAN 2007).

El primer ensayo realizado con esta nueva molécula fue un estudio fase I, abierto, en el que se escalaba la dosis en pacientes con LMC Ph (+) intolerantes o resistentes al IM. En él se observó que el Dasatinib inducía respuestas citogenéticas mayores que eran bien toleradas en todas las fases de LMC en pacientes intolerantes o resistentes a IM e incluso en pacientes con LLA Ph (+). Los pacientes catalogados como intolerantes a IM y que fueron tratados con Dasatinib no volvieron a padecer el efecto tóxico no hematológico.

El mayor efecto secundario fue la mielosupresión, reversible en la mayor parte de las ocasiones.

El fenómeno adverso no hematológico más importante fue el derrame pleural no maligno. Otros fenómenos adversos menos frecuentes fueron cefaleas, dolores musculares y náuseas (TALPAZ 2006).

Se realizó un segundo estudio en fase 2 cuyo principal objetivo era analizar las RCM que alcanzaban los pacientes afectados de LMC en fase crónica resistentes o intolerantes a IM. El estudio de extensión fue el que permitió la aprobación por la *United States Food and Drug Administration* (FDA) para Dasatinib en pacientes resistentes o intolerantes a IM en LMC en Junio del 2006.

Respuestas hematológicas completas se observaron en el 90% de los pacientes tratados con Dasatinib, siendo de 87% y 97% para aquellos resistentes e intolerantes a IM respectivamente. Dasatinib induce respuestas citogenéticas en pacientes en fase crónica de LMC resistentes o intolerantes a IM. RCM se observó en un 52% de los pacientes. Análisis posteriores mostraron que el 38% de los pacientes con falta de respuesta citogenética previa a IM y el 44% de los que recibieron dosis mayores de 600 mg/día, obtuvieron RCM con Dasatinib. Estas respuestas fueron duraderas, se mantuvieron en el 96% de los pacientes con resistencia y en el 100% de los intolerantes. Las respuestas moleculares fueron igualmente marcadas. La media de la *ration* de transcritos BCR-ABL cayó del 66% basal al 2,6% a los 9 meses de seguimiento con Dasatinib (tabla 9).

	6 meses de seguimiento			8 meses de seguimiento		
	Total	Resistencia	Intolerancia	Total	Resistencia	Intolerancia
		Imatinib	Imatinib		Imatinib	Imatinib
N	186	127	59	186	127	59
RHC, no, (%)	168(90)	111(87)	57(97)	168(90)	111(87)	57(97)
Respuestas citogenéticas, no, (%)						
Mayor	83(45)	40(31)	43(73)	97(52)	50(39)	47(80)
Completa	61(33)	28(22)	33(56)	73(39)	35(28)	38(64)
Parcial	22(12)	12(9)	10(17)	24(13)	15(12)	9(15)
Minor	9(5)	8(6)	1(2)	7(4)	6(5)	1(2)
Mínima	19(10)	17(13)	2(3)	16(9)	15(12)	1(2)

Tabla 9: Respuestas obtenidas tras tratamiento con Dasatinib en pacientes con LMC Ph (+) en FC resistentes o intolerantes a Imatinib.

Se observaron respuestas citogénicas y moleculares en todos los genotipos de BCR-ABL, con la única excepción de la mutación T315i.

El Dasatinib por lo general se ha tolerado bien, ya que sólo el 9% de los pacientes interrumpieron el tratamiento por efectos adversos a los 8 meses de seguimiento. Las incidencias fueron comparables a las de la cohorte de pacientes intolerantes o resistentes a IM.

La toxicidad hematológica más frecuente fue la de las citopenias, que en general respondieron al ajuste de dosis.

Los efectos adversos no hematológicos fueron en general de intensidad media a moderada. Entre los más frecuentes se encontraron cefaleas, trastornos gastrointestinales, fatiga y astenia. Un 3% de los pacientes sufrieron derrame pleural grado 3-4 (HOCHHAUS 2007).

2.3. Nilotinib

El Nilotinib (AMN107, Novartis), es un nuevo principio de disponibilidad oral, derivado de la aminopiromidina, más potente *in vitro* contra las células LMC que el IM. Desarrollado en el 2002 para poder aportar beneficio terapéutico a aquellos pacientes resistentes o intolerantes al IM, hoy en día ha sido aprobado en más de 35 países, incluyendo Estados Unidos y la Unión Europea. La indicación actual del Nilotinib es el tratamiento de la LMC Ph (+) en fase crónica y acelerada, con resistencia o intolerancia a una línea previa de terapia que incluya IM (INDEX, FICHA TÉCNICA, TASIGNA). Al igual que el IM, la función del Nilotinib es la de inhibir, mediante vía competitiva, el lugar de unión del ATP del BCR-ABL, produciendo así la inhibición de la fosforilación de las proteínas que desempeñan la transducción de BCR-ABL. El Nilotinib posee una mayor afinidad y selectividad de unión que la que posee el IM con una potencia inhibitoria de 20 a 50 veces mayor que el IM. Se ha demostrado incluso la actividad del Nilotinib en 32 de las 33 líneas celulares resistentes al IM con mutaciones ABL cinasa (KANTARJIAN 2006).

Un estudio fase 2, abierto, evaluó 321 pacientes con resistencia al IM (N=227) o intolerancia (N=94). En este análisis todos los pacientes recibieron Nilotinib por un periodo de tiempo superior a 6 meses, con una media de exposición al fármaco de 394 días. En el momento de la exposición de los resultados, el 52% de los pacientes continuaban recibiendo el fármaco, que demostró unas rápidas respuestas. El 77% de los pacientes sin RHC, la alcanzaron en una media de 1 mes. La mediana de tiempo para alcanzar la primera RCM fue tan sólo 2.8 meses. Un 57% de los pacientes alcanzaron

RCM y un 41% RCC. Los resultados preliminares han mostrado una supervivencia global a los 12 y 18 meses del 95% y 91% respectivamente.

El Nilotinib ha demostrado una aceptable tolerabilidad. Los pacientes han logrado mantener niveles de dosis óptimos con mínimas toxicidades grado $\frac{3}{4}$ y de éstas, las aparecidas con mayor frecuencia han sido las hematológicas, que incluyen anemia (10%), trombocitopenia (28%) y neutropenia (30%). Dentro de las no hematológicas destaca la elevación asintomática de la lipasa sérica (15%). En el momento de la exposición de los datos, sólo un 17% de los pacientes habían abandonado el tratamiento a consecuencia de efectos adversos relacionados con el fármaco (KANTARJIAN 2007).

El mismo estudio evaluó también la eficacia del Nilotinib en pacientes con fase acelerada resistentes o intolerantes a IM. Las respuestas hematológicas fueron del 54%, alcanzando RHC en un 26%. Las respuestas citogenéticas fueron de un 31% para RCM y del 19% para las RCC. El Nilotinib ofrece un claro beneficio de supervivencia en un periodo inicial de seguimiento ya que la estimada para los 12 y 18 meses fue de 81%. A los 12 meses, el 57% no habían progresado. La tolerabilidad del fármaco fue aceptable, con toxicidades similares a las encontradas para fase crónica (COUTRE 2007).

Actualmente se están realizando estudios que evalúan el beneficio de pacientes con LMC en fase crónica tratados con Nilotinib en primera línea frente a dosis de IM de 400 mg y 800 mg. Resultados presentados recientemente han mostrado un beneficio del Nilotinib frente a ambas dosis de IM. Los pacientes tratados con Nilotinib obtuvieron RCC en menor tiempo que aquellos tratados con IM a cualquiera de las dosis mencionadas (tabla 10).

Estos beneficios del tratamiento con Nilotinib también se extrapolaron a las respuestas moleculares. Los pacientes tratados con Nilotinib obtuvieron RMM en un porcentaje mayor que aquellos tratados con IM a dosis altas y ninguno la perdió mientras mantuvo el tratamiento (tabla 11) (CORTES 2007).

Meses de tratamiento	Nilotinib 400mg/12h	Imatinib 400mg	Imatinib 800mg
3	31(97)	49(37)	202(62)
6	20(100)	48(54)	199(82)
12	11(100)	48(65)	197(86)

Tabla 10: Respuestas citogenéticas completas obtenidas con Nilotinib, Imatinib 400 mg e Imatinib 800 mg en pacientes con LMC Ph (+) en FC tratados en primera línea.

Nilotinib 400mg/12h	Imatinib 400mg	Imatinib 800mg
45%	24%	47%

Tabla 11: Porcentaje de pacientes que alcanzaron respuesta molecular mayor a los 12 meses de tratamiento, tratados con Nilotinib e Imatinib con LMC ph+ en FC en primera línea

El Nilotinib ha demostrado actividad *in vitro* frente a 32 de 33 mutaciones BCR-ABL que produjeron resistencia al IM. Por análisis de mutaciones se demostró que el Nilotinib obtiene respuestas en pacientes con algunas mutaciones resistentes al IM (HUGHES 2007).

2.4 Otros inhibidores de la tirosincinasa

2.4.1 Bosutinib

El Bosutinib (SKI-606) es un inhibidor de SRC/ABL cinasa. Recientemente se ha presentado la experiencia en 76 pacientes en fase crónica de LMC resistentes o intolerantes al IM. Casi la mitad de ellos obtuvieron RCC a los 3 meses, con efectos secundarios muy inferiores a los que se suelen ver con los inhibidores de la tirosincinasas conocidos hasta ahora (GAMBACORTI-PASSERINI 2007).

2.4.5 Inno-406

Este agente es otra variante de la aminopirimidina, variante del IM, modificado en su diseño para mejorar la unión al nicho de ATP de Bcr-Abl. Es activo frente a Bcr-Abl y Lyn, por lo que puede ser clasificado, al igual que el Dasatinib, como un inhibidor dual. Ensayos preclínicos han mostrado que es de 20-50 veces más activo *in vitro* que el IM frente a líneas celulares con mutaciones Bcr-Abl diferentes a la 315I (YOKOTA 2007).

2.4.6 Inhibidores de Aurora-Cinasa

La imposibilidad de los agentes denominados inhibidores de la tirosin-cinasa de segunda generación para evitar la progresión de la enfermedad, cuando ésta se asocia a la mutación BCR-ABL/T315I, ha llevado al estudio de nuevas moléculas. *Ambit Biosciences* ha descrito la habilidad de una nueva molécula inhibidora de la Aurora-Cinasa VX-680 (conocida como MK-0457), de unirse a la mutación ABL/T315I. Estudios en fase I han demostrado la efectividad de este fármaco, observándose RCC en pacientes portadores de dicha mutación (GILES 2007). En la actualidad, al menos dos nuevas moléculas inhibidoras de la Aurora-Cinasa con actividad para inhibir BCR-ABL/T315I están en fase de desarrollo: PHA739358 y XL-228.

3. Tratamiento de la LMC en la era Imatinib

La aparición del IM ha resuelto el largo debate sobre cuál puede ser el mejor tratamiento en primera línea de LMC Ph (+). Todos los pacientes que se diagnostiquen con LMC en fase crónica deberían iniciar tratamiento con IM. La dosis recomendada de comienzo en el estudio IRIS fue de 400mg/día, independientemente del peso y talla del paciente (GOLDMAN 2007). Hoy en día, investigadores en Houston han comenzado a tratar pacientes en primera línea con dosis de 800 mg diarios y han obtenido respuestas hematológicas, citogenéticas y moleculares más precoces que en los grupos históricos del estudio IRIS a dosis de 400mg/día (CORTES 2007).

Un estudio similar del grupo australiano, comenzaba con dosis de 400 mg diarios, que se incrementaban si no se alcanzaban unos objetivos establecidos en intervalos de 3 meses. A pesar de estos estudios, no existe evidencia actual de que, comenzar el tratamiento con dosis mayores a 400 mg diarios o escalar dosis en aquellos pacientes que aparentemente no están respondiendo, reduzca el riesgo de progresión de la enfermedad, pero otros estudios que están actualmente en marcha deberán responder a este interrogante (KANTARJIAN 2004) (BRANDFORD 2006).

Una pregunta frecuente es el tiempo que el IM debería ser mantenido en caso de alcanzar respuestas óptimas con él. Hay evidencias de que la incidencia de progresión de la enfermedad en respondedores disminuye y aparentemente la toxicidad no aumenta con la duración del tratamiento (GOLDMAN 2007). Existen series de pacientes que, por diferentes motivos, han abandonado el tratamiento con IM cuando no se detectaban transcritos BCR-ABL. En la más larga publicada, 6 de los 12 pacientes estudiados mostraron evidencia de recaída a los 5 meses de interrumpir el tratamiento, pero los otros 6 permanecieron en RMC a los 15 meses (ROUSSELOT 2007). Estudios como éste plantean la posibilidad de que el IM pudiera erradicar la enfermedad residual en un grupo seleccionado de pacientes, probablemente en aquellos que han recibido IFN previamente (GRAM 2002).

Una vez que el paciente ha adquirido una respuesta adecuada al tratamiento será fundamental su monitorización. Sin lugar a dudas, el método de monitorización más

sensible es la cuantificación de la enfermedad mínima residual (EMR) mediante la determinación de transcritos BCR-ABL mediante RQ-PCR, expresada, bien en ratio BCR-ABL o bien en escala logarítmica. Los esfuerzos se dirigen actualmente a convertir los resultados dados por los distintos laboratorios a una escala internacional que sea aplicable en todo el mundo (HUGHES 2006). La frecuencia con la que se deberían realizar las técnicas de monitorización ha sido también motivo de debate. Hoy en día se acepta que la monitorización por citogenética en AMO debería realizarse con un intervalo de 6 meses hasta que se alcanza la RCC y, una vez alcanzada, repetirse con intervalos de 1 año, aunque la respuesta molecular se mantenga, ya que se han descrito casos de evolución clonal en pacientes Ph (+) que han sido tratados con IM (DEININGER 2007). Los estudios moleculares de cuantificación de transcritos de BCR-ABL, mediante RQ-PCR en sangre periférica, deben ser realizados cada 3 meses (HUGHES 2006).

El fallo en la obtención de respuesta se denomina resistencia primaria. Hoy en día parece estar claro que el riesgo de desarrollar progresión de la enfermedad está altamente relacionado con la respuesta obtenida. La NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) y la *European Leukemia Net* han establecido criterios de respuesta en base a la obtención de respuestas hematológicas (RH) y citogenéticas (RC). La resistencia hematológica es un hecho raro (2 al 4% de los casos), definiéndose ésta como el no obtener RH a los 3-6 meses de iniciar tratamiento. Hoy en día existe consenso en que, la no obtención de ningún grado de RC a los 6 meses, no obtener RCM a los 12 o no obtener RCC a los 18, se consideran evidencia de fallo al tratamiento. El porcentaje de pacientes que no alcanzan una respuesta adecuada a los 6-18 meses, es aproximadamente del 15-25% y la detección de estos casos requerirá un seguimiento de monitorización frecuente (SIMONSSON 2005).

Aquellos pacientes que cumplen algunos o todos estos parámetros de respuesta y posteriormente pierden su respuesta a IM se consideran en resistencia secundaria (GUILHOT 2004). Para la obtención de RC se necesitan dos mecanismos diferentes: adecuada inhibición de BCR-ABL y un microambiente apropiado de la médula ósea con una reserva hematopoyética idónea (SHAH 2007). Dado que no existe hoy en día estrategia médica para contrarrestar una ineficaz reserva hematopoyética, no se discutirá este tema.

El no obtener una adecuada inhibición del BCR-ABL puede deberse a múltiples causas. Existe evidencia que el tener bajos niveles plasmáticos de IM se relaciona con fallo en la obtención de RC. Estos niveles plasmáticos dependen de factores como absorción, metabolismo y transportadores. En estos casos podría ser efectivo aumentar la dosis de IM como se ha demostrado en diferentes estudios (KANTARJIAN 2004). Por otra parte, los trabajos que han comparado dosis altas de IM frente a inhibidores de segunda generación, en pacientes con fallo a terapia con IM, han mostrado mejores respuestas en los brazos de los tratamientos de segunda generación (KANTARJIAN 2007) (HOCCAUS 2007).

La resistencia primaria y secundaria no son dos conceptos exclusivos mutuamente. Así, la resistencia primaria implica un importante factor de riesgo para la mutación secundaria. Los mecanismos por los que se producen resistencias secundarias son bien conocidos. La mayoría de los casos, como ya se ha comentado, se van a originar por mutaciones en el dominio cinasa con BCR-ABL que dificultan la unión efectiva de IM por la sobreexpresión de BCR-ABL, mediante amplificación genómica o por la adquisición de cromosomas Ph adicionales en el clon resistente (O'HARE 2005). A efectos prácticos, el manejo de pacientes, tanto con resistencia primaria como secundaria, es similar. Una vez que el clínico se ha asegurado que el paciente toma la dosis adecuada de IM, el siguiente paso a realizar será el de incrementar esta dosis a 600 o 800 mg diarios, lo que suele inducir o reinducir respuestas citogenéticas, aunque lo cierto es que éstas pueden no prolongarse en el tiempo (KANTARJIAN 2003). El aumento de dosis de IM, ha sido una actuación habitual entre los clínicos que no encontraban respuestas adecuadas de sus pacientes, sobre todo cuando no se disponía de otras estrategias terapéuticas y en la actualidad se sigue realizando. El hecho de que la dosis aumentada de IM tenga un efecto positivo en la probabilidad de respuesta citogenética se fundamenta en que se han observado niveles infraterapéuticos en pacientes con resistencia primaria. Además, una dosis superior de IM puede mejorar respuestas inducidas por aumento de niveles de BCR-ABL producidos por amplificación genómica (PICARD 2007) (DRUKER 2006).

Lo cierto es que, a día de hoy, la escalada de dosis está cuestionada por algunos centros ya que, en estudios recientes, se han demostrado mejores respuestas con inhibidores de segunda generación que con IM a dosis de 800 mg, con una toxicidad

aceptable (KANTARJIAN 2007). En términos generales, un paciente con criterios de resistencia citogenética, en tratamiento con la dosis máxima tolerada de IM, debería ser considerado para tratamiento con inhibidores de segunda generación de tirosincinasa. En este momento, debería realizarse un estudio de posibles mutaciones del dominio cinasa. Si el paciente no es portador de la mutación T315I, no existe en la literatura actual recomendaciones en cuanto qué inhibidor de segunda generación, Dasatinib o Nilotinib, se debe elegir. No obstante, basándonos en los estudios de los que disponemos, consideramos que la decisión debería tomarse de acuerdo con los antecedentes personales del paciente, con especial interés en cardiopatía, patología respiratoria, retención de líquidos, así como las posibles mutaciones que pueda presentar, dado que como ya se ha comentado, las mutaciones presentan una sensibilidad mayor o menor a cada fármaco (APPERLEY 2007).

Si se identifica la mutación T315I, con casi total probabilidad, la respuesta a inhibidores de segunda generación de los que se dispone en la actualidad será muy pobre. Lo razonable sería cambiar tratamiento a IFN, Citarabina o entrar en protocolos con nuevos inhibidores de la Aurora Cinasa en pacientes que no fueran candidatos a trasplante o no dispusieran de donante compatible. Si el paciente es candidato a trasplante, debería realizarse éste (GOLDMAN 2007).

En la actualidad los clínicos y los pacientes tienen que valorar el hecho de que hoy en día, el trasplante, aunque asociado a importantes riesgos, puede curar la enfermedad frente al conocimiento actual que ofrecen los resultados de la terapia con IM, los cuales muestran un aumento muy importante de la SG, pero sin esperanzas reales de cura, sin olvidar que los efectos tóxicos con esta terapia a largo plazo no son aún conocidos. Aún así, el número total de trasplantes ha disminuido considerablemente en los últimos años. En la práctica, la mayoría de los hematólogos comienzan tratamiento con IM, aunque los pacientes sean de bajo riesgo para la realización de trasplante.

Podrían existir dos excepciones a esta regla: la primera en algunos pediatras que creen que el tratamiento inicial para niños con donante HLA-idéntico relacionado debería ser el trasplante, aunque con controversias sobre el tema. La segunda sería en aquellas situaciones en las que, debido al coste del fármaco, éste no pudiera ser administrado de forma indefinida.

En cuanto a la posibilidad de trasplante en segunda línea de tratamiento en pacientes que por edad y riesgo fueran candidatos, no existe consenso. Dados los resultados que ofrecen los inhibidores de segunda generación, lo lógico sería probar con uno de estos inhibidores durante 6-9 meses y proceder al trasplante si no se observa respuesta adecuada. Una vez que se ha decidido realizar el trasplante, el hecho de acondicionar a dosis estándar o reducidas, es una cuestión aún no resuelta a día de hoy. Para pacientes de edad avanzada el acondicionar con dosis reducidas parece la medida ideal (GOLDMAN 2007).

VII. FACTORES PRONÓSTICO

El establecimiento de factores pronóstico dentro de las distintas patologías aporta una importantísima información en la medicina moderna ya que permite el intento de selección de un tratamiento óptimo y la búsqueda de una terapia ajustada al riesgo, así como la de grupos homogéneos de pacientes en los ensayos clínicos, imprescindible para poder interpretar de forma adecuada los resultados obtenidos y para la comparación con otros estudios.

1. Factores pronóstico clásicos en LMC

A falta de factores pronósticos al diagnóstico que pudiéramos denominar intrínsecos o sea, independientes de la terapia que después reciben los pacientes, en la LMC se ha evidenciado que los índices han ido variando con la aparición de los distintos tratamientos, de forma que los que tuvieron validez como indicadores de la previsible evolución de los pacientes con un determinado tratamiento, la perdían al analizarla con otro.

En la década de los ochenta, distintos autores realizaron estudios de supervivencia para los pacientes diagnosticados de LMC que recibían tratamiento con quimioterapia, bien Busulfan o Hidroxiurea. Sokal estableció en 1984 el índice que lleva su nombre, mediante el cual, con las variables de edad, porcentaje de blastos en sangre periférica, esplenomegalia y número de plaquetas, discriminaba tres grupos de alto, medio y bajo riesgo en cuanto a supervivencia (SOKAL 1984).

Tras la incorporación del IFN- α en el tratamiento de la LMC, el grupo del MD Anderson observó que el índice de Sokal no discriminaba pacientes de medio y alto riesgo tratados con IFN- α (OHNISHI 1995), desarrollando un nuevo sistema para distinguir entre diferentes evoluciones basado en la edad, raza, esplenomegalia, número de plaquetas y porcentaje de basófilos, con la ventaja sobre los modelos anteriores de no precisar una fórmula complicada. Este sistema fue examinado en una cohorte de

pacientes alemanes por Hasford et al sin conseguir diferenciar grupos con diferentes supervivencias (KANTARJIAN 1990) (HASFORD 1996).

A partir de esta evidencia, Hasford en 1998, comienza un proyecto con el fin de establecer y validar un sistema de estadiaje pronóstico para pacientes con CML tratados con IFN- α . Para ello, realizó un metanálisis en el que se estudiaron 1193 pacientes de diferentes países europeos. Tras estudiar más de 26 variables, se encontraron con que las únicas que presentaban correlación con la supervivencia eran la edad, la esplenomegalia y el número de plaquetas, basófilos y blastos. El nuevo sistema de estadiaje diferenció grupos de medio, alto y bajo, riesgo con supervivencias medias de 98, 65 y 42 meses respectivamente (HASFORD 1998). Sin embargo, la EBMT (European Blood and Marrow Transplantation) observó que el índice de Hasford no predecía la supervivencia en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos con LMC (GALE 1991). Un nuevo índice pronóstico se estableció mediante cinco variables, pudiendo diferenciar grupos con diferente supervivencia en pacientes diagnosticados de LMC a los que se les iba a someter a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (GRATWHOL 1998). Este índice sería posteriormente revisado y validado por diferentes grupos (PASSWEG 2004) (de SOUZA 2005).

2. Factores Pronóstico pre-tratamiento a Imatinib

2.1 Índices de Sokal y Hasford

En el año 2002 se introduce el Imatinib como fármaco de primera línea en pacientes con LMC cambiando con éste el curso de la enfermedad. Como se ha mostrado, el pronóstico de los pacientes afectados de LMC ha cambiado drásticamente. No obstante, el identificar aquellos pacientes que no van a responder de una manera adecuada al tratamiento sigue siendo aún una realidad, y probablemente lo será aún más cuando con el paso del tiempo se vayan introduciendo nuevas moléculas. Son numerosos los autores que han realizados grandes esfuerzos para identificar factores de riesgo en el momento del diagnóstico que nos permitan diferenciar grupos pronóstico.

Hasta ahora, ningún estudio ha encontrado factores de riesgo en el momento del diagnóstico con peso suficiente como para cambiar la estrategia terapéutica en función de éstos.

Los índices pronóstico de Sokal y Hasford, como ya hemos comentado, no fueron diseñados para definir grupos de riesgo en pacientes tratados con inhibidores de las tirosincinasas. Sin embargo, distintos autores han demostrado que tienen una validez al menos parcial también para los pacientes tratados con ellos. En el estudio IRIS se ha confirmado que el índice de Sokal predice SLP, tanto de aquellos que habían obtenido RCC como de la serie global (figura 11, tabla 12).

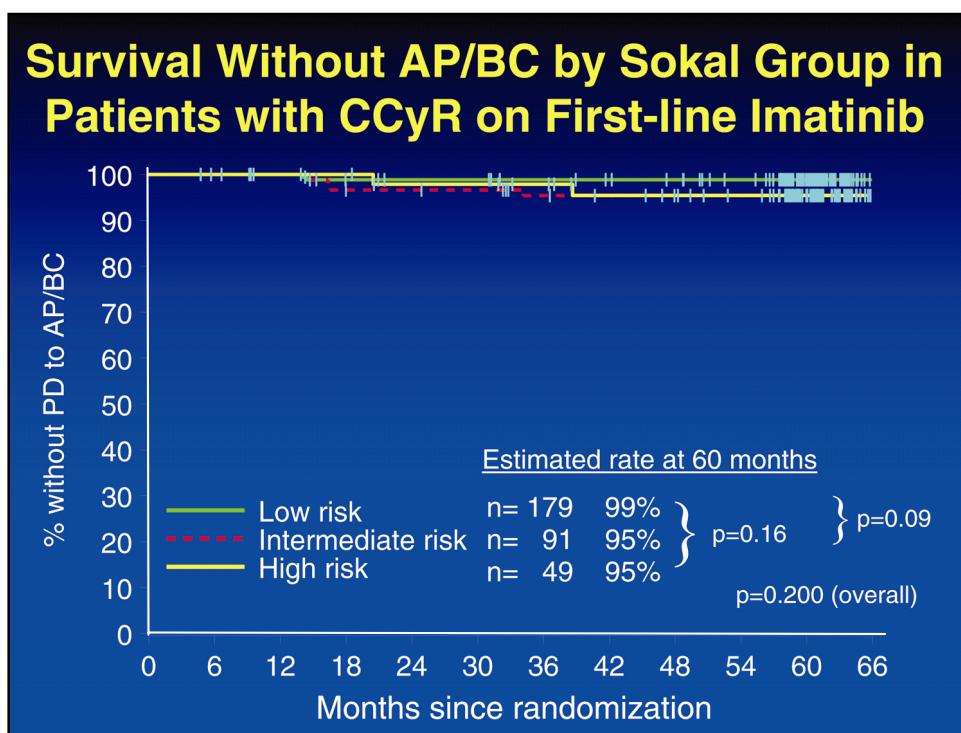


Figura 11: Supervivencia sin fase crónica ni fase acelerada estratificada por grupos pronóstico de Sokal en pacientes con RCC en primera línea de tratamiento en estudio IRIS (The 5-year update from Iris study. 2006 ASCO annual meeting. June 2-6, 2006. Atlanta, Ga. Abstrac 6506).

Supervivencia libre de progresión acorde al índice de Sokal	
- Riesgo bajo-----	91%
- Riesgo intermedio-----	84%
- Riesgo alto-----	69%

Tabla 12: Supervivencia libre de progression estratificada según índices pronóstico de Sokal en estudio IRIS (The 5-year update from Iris study. 2006 ASCO annual meeting. June 2-6, 2006. Atlanta, Ga. Abstrac 6506).

Muchos otros autores han confirmado que estos índices pronóstico predicen respuestas a tratamiento, SLP y SG (HASFORD 2003) (ZHONGGUO 2006) (USMAN 2007) (PALANDRI 2008) (CERVANTES 2003).

Parece ser, por lo tanto, que el índice pronóstico más importante en el momento del diagnóstico es el de Sokal, pero que va perdiendo relevancia una vez que el paciente adquiere una RCC (DRUKER 2006).

2.2 Análisis citogenético

El análisis citogenético de M.O. ha sido la técnica habitual para el diagnóstico de la LMC. Mientras que la adquisición de anomalías citogenéticas al Cromosoma Ph a lo largo del tiempo, se asocia a una peor respuesta al tratamiento en estos pacientes (CORTES 2003), el significado de las alteraciones cromosómicas adicionales en el momento del diagnóstico está menos claro. Dadas las mejores respuestas observadas en pacientes con evolución clonal tratados con dosis mayores de IM, sería razonable comenzar con dosis de 600-800 mgr/día en aquellos en los que se encuentren alteraciones citogenéticas adicionales en el momento del diagnóstico (O'DOWYER 2002). La delección del 9q+, que clásicamente se había asociado a peor pronóstico, hoy en día, con los inhibidores de la tirosinasa, parece que pierde este significado (QUINTAS-CARDAMA 2005).

2.3 Perfiles de expresión de mRNA

Se ha intentado identificar rutas y genes, en células primarias de LMC alteradas, en pacientes afectos de LMC para realizar estudios de microarrays al diagnóstico, con el fin de poder predecir las distintas sensibilidades al tratamiento y así poder facilitar una terapia individualizada. Hasta el momento no se ha podido definir ningún factor pronóstico con suficiente peso como para ser incorporado en las guías terapéuticas (HUGHES 2006). En un estudio reciente, Young *et al* realizaron un análisis de microarrays de células CD 34+ recogidas al diagnóstico. Identificaron baja expresión de CD7 combinada con expresión de proteinasa 3 en células CD34+ como un fuerte valor predictivo de aumento de la supervivencia. No obstante, estos datos fueron obtenidos antes de la era IM y todavía este grupo no ha publicado estudios en pacientes tratados con este fármaco (YOUNG 2006). Sí se han realizado diferentes estudios de expresión genómica en cohortes de pacientes que han recibido IM (ZHENG 2006) (RADICH 2006). En ellos, el objetivo principal fue predecir una respuesta citogenética precoz. En pacientes del estudio IRIS se identificaron 31 genes que fueron considerados como factores predictivos de alcanzar RCM; no obstante, el valor predictivo de estos genes no ha sido estudiado prospectivamente (McLEAAN 2004). Un estudio que buscaba expresión genómica en leucocitos de pacientes seleccionados por alcanzar o no una respuesta citogenética al IM, no pudo demostrar la existencia de una asociación entre éstos y el hecho de conseguir una RCC (CROSSMAN 2005). Otro trabajo más reciente en el mismo grupo de pacientes si encontró diferencias significativas en la expresión de CD34+ en función de la RCC (CROSSMAN 2005). Serán necesarios análisis prospectivos en cohortes mayores de pacientes para comprobar si la identificación de determinadas expresiones genómicas podría indicar estrategias diferentes según los casos.

2.4 El estudio de los mediadores activados (fosforilación proteica medida por citometría de flujo):

Se sabe que la traslocación recíproca t(9,22) codifica una proteína quimérica BCR-ABL, con una actividad tirosincinasa activada de forma constitutiva que estimula un gran número de cadenas de señales mediante la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP a residuos de tirosina de proteínas celulares específicas (HEISTERKAMP 1984).

El mayor conocimiento de las vías de señales que se activan a partir de BCR/ABL, así como su comportamiento ante los nuevos inhibidores de tirosincinasas disponibles en la actualidad, supondrá un avance que no sólo facilitará el desarrollo de nuevos tratamientos cada vez más dirigidos contra dianas específicas de la enfermedad, sino que además permitiría conocer el grado de actividad de los fármacos en cada paciente concreto, así como la detección precoz de posibles resistencias a los distintos tratamientos. Por otra parte, el estudio de sinergias medicamentosas de fármacos que actuarán sobre diferentes cascadas de señales, también se vería reforzado.

Las cascadas de señales celulares están a menudo inducidas por la fosforilación de proteínas que a su vez activan determinados efectores para llevar a cabo una acción concreta. La fosforilación de tirosinas no se conoce tan bien como la de las serinas o treoninas (MAYER 1988). Algunos estudios preliminares apuntan a que algunos péptidos fosforilados responden al tratamiento con IM en líneas celulares de leucemia mieloide crónica. Asimismo, parece que existen diferencias en los lugares de la fosforilación (WHITE 2005).

En este sentido se han desarrollado los estudios fosfoespecíficos, basados en la premisa de que, el estado de fosforilación de una proteína concreta, se correlata con su estatus biológico. Por lo tanto, midiendo el grado y el nivel de la fosforilación de determinadas proteínas, sería teóricamente posible determinar qué vías de señales se modifican en respuesta a un determinado estímulo. Se sabe además que aquellos pacientes que no alcanzan una buena inhibición del ABL-cinasa, medida mediante Crkl fosforilado en células mononucleares procedentes de sangre periférica, tienen menor

probabilidad de alcanzar RMM a los 12 y 24 meses (WHITE 2005), (JILANI 2008), (NAM, 2007).

Los estudios de fosforilación iniciales se llevaron a cabo utilizando técnicas de laboratorio complejas y engorrosas basadas fundamentalmente en el método de Western blot. Esta técnica precisa para su realización correcta una gran cantidad de células, lo que es difícil de conseguir a partir de las muestras de sangre periférica de los pacientes. Por este motivo su utilidad en la práctica clínica se ha visto muy mermada. Sin embargo, la medición de los estados de fosforilación de proteínas específicas se ha simplificado con la aparición de anticuerpos fosfoespecíficos contra determinados epítomos de proteínas (SINGER 2006).

Dichos anticuerpos son capaces de reconocer esas proteínas activadas pudiendo diferenciar el estado estimulado o suprimido de las cascadas en las que participan. Diversos grupos han conseguido teñir fosfoepítomos y detectarlos por citometría de flujo. En este caso, los anticuerpos van unidos a fluoroporos que emiten fluorescencia que puede ser cuantificada. El nivel de fluorescencia detectado se correlata con el grado de actividad de la vía estudiada (HOEVE, 1998), (ODA, 1994).

Son muchas las cadenas celulares que se activan por la acción de la proteína bcr/abl, incluyendo las relacionadas con las vías Ras, Raf, MAPK, ERK, PIK3, Janus kinasa 2 y STAT5. La activación oncogénica de estas vías estimula la proliferación celular, protege frente a la apoptosis y aumenta la capacidad de invasión tumoral de las células leucémicas al modificar la adhesión celular al estroma (Fig. 12). Los análisis “fosfo-específicos” se basan en la premisa de que, midiendo el estado de la fosforilación, se puede determinar qué vías de señales se usan en respuesta a un determinado estímulo. De esta manera, y en líneas generales, se observa un descenso de los niveles de fosfoproteínas en los pacientes que muestran respuesta citogenética y molecular a IM a los 12 y 18 meses de tratamiento respectivamente. Sin embargo, se observa un mínimo descenso de dichos valores o incluso un incremento de los mismos en los pacientes que resultan resistentes al IM (JILANY 2005), (NAM 2008), (WHITE, 2006), (LA ROUSÉE, 2008), (HAMILTON, 2006).

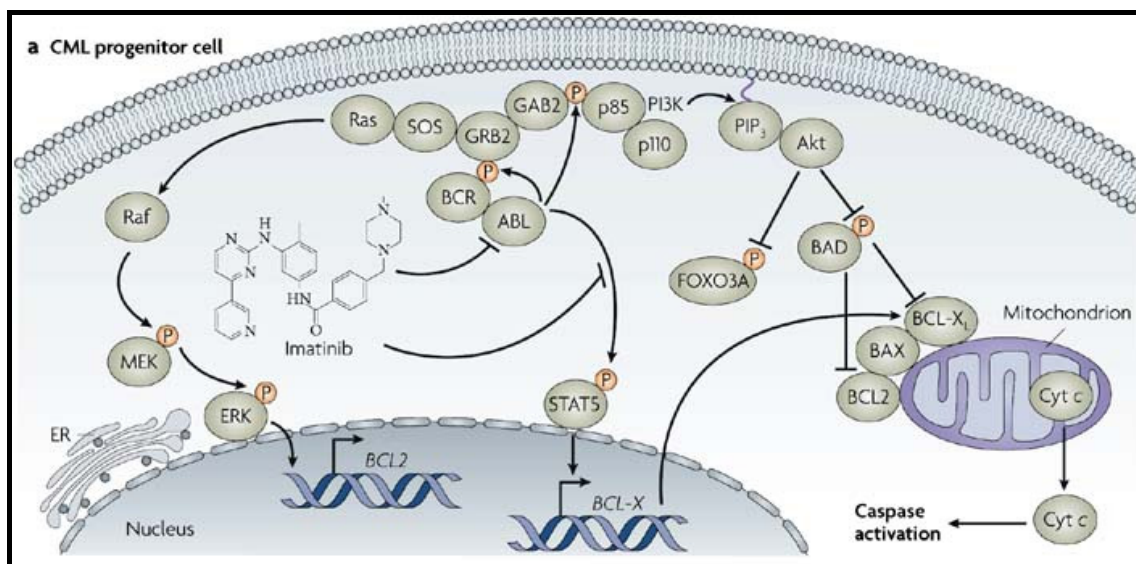


Fig 12: Vías de señales activadas en LMC

2.5 Sensibilidad intrínseca a inhibidores tirosincinasa.

La sensibilidad de las células de CML al bloqueo por IM puede calcularse determinando la concentración de éste fármaco que se necesita en cada caso para inhibir *in vitro* la actividad de la cinasa BCR-ABL. Midiendo este parámetro en células mononucleares recolectadas antes del tratamiento con IM, los resultados varían notablemente de unos pacientes a otros. La importancia de este parámetro (IC50 a IM) radica en que una alta sensibilidad *in vitro* (IC50 baja) se correlaciona con una mayor probabilidad de alcanzar RMM (WHITE 2005).

IC50 IM no ofrece un paralelismo total con el índice pronóstico de Sokal, pero la combinación de estos dos factores sí que ayuda a pronosticar aquellos pacientes que van a alcanzar una respuesta molecular. Así, la probabilidad de alcanzar una RMM a los 12 meses en pacientes con baja IC50 IM es del 47% frente al 23% en aquellos con alta IC50 IM (p=0.03). Si se asocia un índice de Sokal bajo a baja IC50 IM, la probabilidad de alcanzar la RMM es del 73% frente al 31% en pacientes con índice alto de Sokal y alta IC50 IM (WHITE 2005).

Estas diferencias encontradas en los rangos de sensibilidad al IM entre los distintos pacientes en el momento del diagnóstico, se deben principalmente a la diversidad de mecanismos de asimilación y retención del fármaco. Los factores que parecen estar más implicados son la bomba *OCT-1* y la expresión de *WT1*, ya comentados con anterioridad. Una disminución en *OCT-1* parece relacionarse con menores concentraciones de IM. En estos casos sería aconsejable el aumento de dosis del fármaco o la utilización de inhibidores de segunda generación como Nilotinib, que al parecer se asimila por un mecanismo independiente de *OCT-1* (CROSSMAN 2005).

La reducción en la expresión de *WT-1* en células de LMC expuestas *in vitro* a IM antes del tratamiento, se ha relacionado como factor pronóstico favorable para alcanzar RCC. Expresiones variables de *WT-1* pueden suponer diferencias en la concentración de IM (CILLONI 2004). Recientemente se ha publicado la correlación entre los niveles farmacocinéticos de IM con la respuesta clínica, la supervivencia libre de eventos (SLE) y los efectos adversos (EA) en pacientes tratados con 400 mg de IM procedentes del estudio IRIS. En éste se observa que los niveles plasmáticos altos de IM se asocian a mayor probabilidad de RCC, RMM y SLE. También se demostró que los niveles plasmáticos de IM son predictivos de RCC, independientemente del índice de Sokal (LARSON 2008).

2.6 Niveles basales de mRNA BCR-ABL

En la actualidad no existe evidencia de que los niveles basales de BCR-ABL en sangre en el momento del diagnóstico tengan valor predictivo. Cuando se siguen pacientes con altos niveles basales de BCR-ABL y se comparan con un grupo con niveles bajos no se pueden apreciar diferencias significativas cuando ha pasado tiempo después del inicio de IM.

Por lo tanto, el interés del estudio molecular al diagnóstico reside en confirmar la presencia de transcritos B2A2 o B3A2 (o ambos) y por lo tanto, identificar aquellos pacientes que no podrán ser monitorizados con las técnicas habituales de RQ-PCR, aparte de servir para la cuantificación posterior del efecto individual sobre BCR-ABL. (HUGHES 2006).

2.7 Estudio de mutaciones al diagnóstico

En pacientes en fase crónica de LMC tratados con IM, puede observarse en ocasiones una progresión precoz a fase aguda con evidencia de mutaciones BCR-ABL (1-5%) (HUGHES 2005). No obstante, no se ha relacionado con una peor evolución de la enfermedad, la identificación de mutaciones antes del inicio del tratamiento

El estudio de mutaciones parece más apropiado en pacientes con fases avanzadas, cuando su aparición es más frecuente. Dada su baja incidencia, en el momento del diagnóstico en los pacientes que reciben IM en primera línea (tabla 13), no se considera coste-efectivo realizar estudio mutacional al diagnóstico en toda la población (HUGHES 2006).

Probabilidad de detectar mutaciones en función de la fase de la enfermedad	
-Al inicio-----	7.3%
-Segunda línea de tratamiento-----	26%
-Fase Acelerada-----	61%

Tabla 13: Probabilidades de detectar mutaciones en función de la fase de la enfermedad.

3. Respuesta a Imatinib

En el momento actual no existe duda que el factor pronóstico más importante que va a predecir la evolución de la enfermedad es la respuesta a IM. Desde su aparición ha cambiado el pronóstico de la enfermedad con supervivencias libres de progresión que no eran imaginables con los tratamientos anteriores (figura 5). Así, en la actualidad, existen diversos parámetros clínicos y analíticos que van a ir definiendo esa respuesta al tratamiento en función del tiempo desde su inicio.

Como se aprecia en la siguiente tabla (tabla 14), la probabilidad de progresión de la enfermedad disminuye en concordancia con el tiempo de exposición a IM.

Años	Progresión* %	Progresión a FA o FB %
1	3.4	1.5
2	7.5	2.8
3	4.6	1.6
4	2.3	2.0

Tabla 14: Probabilidad de progresión de la enfermedad según el tiempo de evolución tras tratamiento con Imatinib en pacientes diagnosticados de LMC Ph (+) en primera fase crónica.* La progresión incluye pérdida de RHC, RCM o progresión a FA o FB

3.1 Respuesta hematológica

Adquirir una respuesta hematológica precoz es un factor que contribuye a predecir la adquisición de una respuesta citogenética y por otro lado, muy pocos pacientes dejan de obtener una RHC con IM. La no obtención de una RHC después de 3 meses se considera fallo del tratamiento y debe considerarse la alternativa terapéutica con un inhibidor de segunda generación. Las citopenias no se consideran factor pronóstico adverso, pero es cierto que la necesidad de interrumpir el fármaco o bajar la dosis administrada, se asocia a una menor probabilidad de adquirir una RMM (HUGHES 2005).

3.2 Respuesta citogenética

Tradicionalmente la respuesta al tratamiento se ha analizado por la determinación citogenética del número de metafases Ph positivas en M.O. Una respuesta citogenética parcial (RCP) representa 1%-35% metafases positivas y 0% indica respuesta citogenética nula (RCN). Una respuesta citogenética mayor (RCM) incluye repuestas parciales. La adquisición de RCC en algún momento de la enfermedad será un importante índice de protección de SLP. A mejor respuesta citogenética, mayor protección frente a la progresión de la enfermedad (tabla 15) (DRUKER, 2006).

	RCC	RCP	No RCm
12 meses	97%	93%	81%
18 meses	99%	90%	83%
24 meses	99%	93%	82%

Tabla 15: Supervivencias globales en función de las RCG alcanzadas en distintos periodos de tiempo tras inicio de tratamiento con Imatinib en pacientes diagnosticados de LMC Ph (+) en primera fase crónica.

3.3 Respuesta Molecular.

Después de contrastar los resultados de citogenética con los de RQ-PCR, se comprueba que el 98% de los pacientes que consiguen una reducción de 1-2 logaritmos con respecto a los valores basales, se encuentran en RCM y el 91% de los pacientes que adquieren una reducción de 2-3 logaritmos se encuentran en RCC. Esto significa que, en los periodos iniciales del tratamiento, el molecular es un buen indicador del nivel de reducción de la leucemia, con una correlación excelente con el grado de respuesta citogenética (ROSS 2006).

El nivel de los transcritos BCR-ABL es además, un buen predictor de Supervivencia Libre de Progresión (SLP). En el estudio IRIS, la determinación seriada mediante RQ-PCR confirmó que la reducción de BCR-ABL es un buen predictor de la respuesta futura y del riesgo de progresión. La adquisición de una RMM en los primeros 12 meses proporcionaba un 100% de probabilidad de SLP. Este dato, a los 12 meses, se observó en el 40% de los pacientes de este estudio, y en el 55% y 75% a los 24 y 44 meses respectivamente (tabla 16) (GOLDMAN 2005). Se desconoce todavía si adquirir una RMM antes de los 12 meses es igualmente predictivo de bajo riesgo de progresión de la enfermedad, al igual que si adquirir una RMM usando una dosis mayor de IM mejora en la misma proporción la SLP (KANTARJIAN 2004).

	12 meses	18 meses
RMM con reducción >3log	100%	100%
RMM con reducción <3log	95%	90%
No RMM	85%	87%

Tabla 16: Supervivencias libre de progresión en función de la respuesta molecular alcanzada a los 12 y 18 meses en estudio IRIS.

Recientemente se ha publicado que el aumento de medio logaritmo de transcritos BCR-ABL presupone un alto riesgo de recaída en pacientes con RCC (PRESS 2007).

3.4 Inhibición de las cinasas in vivo

Estudios posteriores al estudio IRIS sugieren que aquellos pacientes que no alcanzan una buena inhibición del ABL cinasa, medida mediante Crkl fosfolirado en células mononucleares procedentes de sangre periférica, tienen menor probabilidad de alcanzar RMM a los 12 y 24 meses. Como factores relacionados con la inhibición *in vivo* de las cinasas se comprobaron la dosis recibida de IM así como su IC50 (WHITE 2005).

VIII. MONITORIZACIÓN DE RESPUESTA EN PACIENTES TRATADOS CON INHIBIDORES DE LAS TIROSININAS

El uso del IM en primera línea en pacientes diagnosticados de LMC es un hecho que hoy día nadie discute. No obstante, y a pesar de la corta experiencia con esta molécula, se ha observado que no todos los pacientes se comportan de la misma manera, siendo impredecible en el momento actual la respuesta al tratamiento. Debido a la disparidad de respuestas y a la aparición de nuevas moléculas ya aprobadas como tratamiento de segunda línea, surge la necesidad de monitorización de estas respuestas y con ello la aparición de nuevas y más eficaces técnicas. Esta monitorización tendrá importantes consecuencias, no solo pronósticas sino también terapéuticas, ya que permitirá la detección precoz tanto de recaídas como de resistencias al tratamiento, ofreciendo un escenario ideal para nuevas estrategias terapéuticas.

Desde que se descubrió el cromosoma Ph como anomalía genética causante de la LMC, su identificación y posible cuantificación ha sido un objetivo para muchos investigadores, tanto para definir las respuestas a los tratamientos como para observar la evolución de la enfermedad.

1. Citogenética clásica

El análisis citogenético de metafases de médula ósea ha sido la técnica estándar para el diagnóstico de la LMC, así como para identificar anormalidades citogenéticas añadidas al cromosoma Ph. Si bien la aparición de estas anormalidades durante la evolución de la enfermedad se asocia a peores respuestas, el significado de diagnosticarlas al comienzo no está aún bien definido (CORTES 2003). Ya hace varias décadas que los investigadores del *MD Anderson Cancer Institute* describieron la posibilidad de inducir respuestas citogenéticas completas mediante el tratamiento con IFN- α (TALPAZ 1983) (ITALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP 1999). Desde entonces ha habido otros análisis que confirmaron que una RCM pronosticaba un

aumento de la supervivencia y que se podía usar como marcador indirecto de supervivencia (TALPAZ 1983) (ITALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP 1999).

El estudio IRIS demostró que los pacientes tratados con IM adquirían RCC y RCM en un porcentaje mucho mayor que los tratados con IFN- α . Las respuestas citogenéticas se correspondían también, al igual que pasaba con IFN, con un aumento demostrable de la supervivencia.

La valoración de la respuesta citogenética tradicionalmente se ha evaluado mediante la determinación del número de metafases en médula ósea (tabla 17).

Los análisis del estudio IRIS han evidenciado que el factor pronóstico más importante es una respuesta citogenética temprana, con una relación directa entre el momento en que ésta se alcanza y el nivel de respuesta, con la supervivencia libre de eventos y la supervivencia libre de progresión (tabla 17)

Tiempo de tratamiento y respuestas citogenéticas	Probabilidad de RCC a los 2 años(%)	Supervivencia libre de eventos a los 42 meses (%)
3 meses		
Parcial	90	Dato no disponible
Menor	60	Dato no disponible
Mínima/nula	50	Dato no disponible
6 meses		
Completa/parcial	Dato no disponible/80	95
Menor o mínima/nula	50/15	75
12 meses		
Completa/parcial	Dato no disponible/50	90
Menor, mínima o nula	≤ 20	65

Tabla 17: Relación entre el grado de RCG temprana, la RCC a los 2 años y la SLE a los 42 meses en el estudio IRIS.

A partir de este mismo estudio se observó a los 54 meses supervivencia libre de progresión a FA/CB del 97 % si existe RCC a los 12 meses; 95% para aquellos con RCP y 81% para aquellos que a los 12 meses obtuvieron peor respuesta que una RCP (SIMONSSON 2005).

En general se recomienda realizar citogenética de MO en el momento del diagnóstico y al menos cada 6 meses hasta que se alcanza y confirma RCC, momento en el cual se podrá pasar a realizar una cada 12 meses. Una vez se confirma RMM los estudios citogenéticos pueden pasar a realizarse con menos frecuencia, según la clínica y los hallazgos hematológicos y moleculares (BACCARANI 2006).

2. FISH (Hibridación In Situ con Fluorescencia)

La realización de técnicas de FISH en células en interfase ofrece la ventaja potencial de evaluar muchas más células y usar sangre periférica en lugar de médula ósea. Desde que los datos obtenidos hasta ahora se basan en citogenética convencional, se recomienda el uso de FISH sólo antes del inicio de tratamiento para identificar aquellos casos Ph (-), BCR-ABL positivos, así como aquellos con translocaciones variantes, amplificaciones del Ph o del 19q positivo (BACCARANI 2006). El uso de FISH para el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) será únicamente válido en aquellas fases de la enfermedad en la que el nivel de leucemia es aún muy alto. No se puede considerar sustituto de citogenética debido a que no detecta anormalidades citogenéticas adicionales. El FISH será útil en aquellos casos donde no está disponible la citogenética. Una vez obtenida una RMM, ninguna técnica de FISH es suficientemente sensible para monitorizar respuestas (HUGHES 2006).

3. PCR cuantitativa a tiempo real

Durante la última década, diversos estudios han demostrado que, en las enfermedades hematológicas, un número incluso muy pequeño de células malignas, lo que se considera enfermedad mínima residual (EMR), predice la evolución clínica, constituyendo por tanto una información necesaria para la toma de decisiones.

En la LMC, la EMR va a orientar al clínico sobre la evolución y puede constituir motivo suficiente por sí sola para la toma de decisiones terapéuticas.

La metodología para la identificación de transcritos BCR-ABL ha evolucionado a lo largo de los años. Inicialmente sólo era posible identificar la presencia o ausencia de transcritos BCR-ABL, ya fuera bien por un único paso de amplificación o bien mediante la amplificación mediante dos pasos con iniciadores para aumentar la sensibilidad (MORGAN 1989) (HUGHES 1991). En 1993, Cross introduce una técnica competitiva que permite expresar el número de transcritos por microgramo de RNA de leucocito o bien mediante un cociente de BCR-ABL/ABL en una escala logarítmica (HOUCHHAUS 1996). Este método se adaptó a la medición de PCR en tiempo real en cuanto la tecnología estuvo disponible. Las ventajas de realización de PCR en tiempo real son la posibilidad de cuantificación de los productos de PCR durante la fase exponencial de amplificación del proceso, lo que contrasta con la clásica medición por PCR cuantitativa a tiempo final en la que no era posible conocer el número de células tumorales al final de la muestra. Otra ventaja de la técnica es la obtención de información en un corto periodo de tiempo reduciendo drásticamente el riesgo de contaminación del producto PCR (BRANDFORD 1999) (WANG 2002). Actualmente existen tres tipos de técnicas de RT-PCR: con la tinción *SYBR*, con muestras hidrolizadas y con hibridación (VELDEN 2003). La elección de un adecuado gen control es imprescindible para dotar al análisis de fiabilidad y reproductibilidad.

Los requisitos son el nivel de expresión BCR-ABL similar al del diagnóstico de LMC, la estabilidad similar al BCR-ABL, así como que los indicadores del gen no amplifiquen secuencias del genoma DNA tales como pseudogenes.

Los tres genes que han sido evaluados con mayor frecuencia han sido el BCR, ABL y *beta glucorinidasa (GUSB)*. Aunque el ABL es por lo general el gen control más usado, BCR y GUSB son igualmente eficaces.

Existen diferentes métodos para expresar los resultados y, aunque pueden expresarse como copias de BCR-ABL por microgramos de RNA, se comprobó que este procedimiento no tenía suficiente reproductibilidad por las variaciones cualitativas del RNA.

La forma más frecuente de expresar las copias BCR-ABL es como un cociente con el número de copias del gen control o bien como un porcentaje sobre las copias en el momento del diagnóstico que se expresarán como el 100%. Otra manera de expresar los resultados es como las diferencias respecto a un promedio de los transcritos basales (pacientes no tratados) que establece *a priori* cada laboratorio (HUGHES 2003). Con el fin de hacer comparables las mediciones de las reducciones de los transcritos de BCR-ABL en laboratorios repartidos por todas las geografías, Hughes *et al* introducen el concepto de reducción logarítmica. Algunos clínicos encontraron este tipo de medición más cómoda que la que se expresaba mediante porcentajes (HUGHES 2003) (GABERT 2003).

Como se deduce de todo lo anterior, coexisten en la actualidad varias opiniones y tendencias sobre la técnica más idónea para la determinación de la RT-PCR, así como sobre la expresión de los resultados.

Aunque hay suficiente consenso sobre el gen control adecuado, las técnicas aún no han sido estandarizadas para todos los laboratorios y todavía se carecen de guías homogéneas para alcanzar niveles aceptables de reproductibilidad y sensibilidad.

Cuando un paciente se monitoriza en un laboratorio que no es de referencia, la información será sin duda de gran beneficio para el paciente para valorar la progresión de su enfermedad, pero los resultados no estarán estandarizados internacionalmente y no serán comparables.

No obstante, desde que el adquirir RMM no solo tiene factor pronóstico, sino que las guías terapéuticas se basan en ésta para la toma de decisiones, es necesario que los laboratorios establezcan el nivel de BCR-ABL mediante sus propios métodos, que se

correspondan con la el nivel de RMM establecida por el estudio IRIS. Para facilitar esto, se ha propuesto una escala internacional (IS) donde el valor absoluto de BCR-ABL que representa la RMM, es estandarizada en 0.10%. Un valor de 1.0% es aproximadamente equivalente a alcanzar una RCC. El establecer un IS facilitará una mayor adherencia a las guías terapéuticas (HUGHES 2006). El propósito de IS en cuanto a la expresión de los valores de BCR-ABL se centra en eliminar los términos “*standardized baseline*” y “*log reduction*” que actualmente definen las respuestas moleculares. En su lugar se expresarán en una escala estandarizada BCR-ABL *control gene percentage ratio value*. La escala ha sido diseñada por los laboratorios que realizaron los análisis en el estudio IRIS (SALDAÑA 2007). En la actualidad se está trabajando para que en un futuro se simplifique la estandarización mediante el lanzamiento de kits dentro de la rutina clínica con unas altas prestaciones que permitan expresar los resultados en escala IS (JOBAGY 2007).

4. Respuestas según criterios de expertos LEUKEMIA NET.

A partir de los resultados anteriores, un comité internacional de expertos (LEUKEMIA.NET) ha elaborado una serie de recomendaciones prácticas que definen las situaciones de fracaso terapéutico, respuesta subóptima y alarma o aviso, en función de que se objetiven determinados parámetros en plazos concretos, sugiriendo cambios de actitudes terapéuticas en función de estas (BACCARANI 2006).

En síntesis: si a los 3 meses no se consigue al menos alguna respuesta hematológica, a los 6 meses una mínima citogenética ($Ph^+ < 95\%$) o a los 18 no hay una respuesta citogenética completa (RCC), o en cualquier momento se pierden las conseguidas previamente, o se detecta una mutación de las que indican un alto nivel de insensibilidad, se considera fracaso y hay que optar por una alternativa. (tabla 18).

<p>Respuesta subóptima</p> <ul style="list-style-type: none"> • No RHC a los 3m • Peor que respuesta parcial (Ph+ células > 35%) a los 6m • No RCC a los 12m • No RMM a los 18m (ratio BCR-ABL/ gen control < 0.10%) • Alteraciones citogenéticas adicionales en células Ph+, pérdida RMM * o adquisición de mutaciones** en cualquier momento
<p>Fallo del tratamiento</p> <ul style="list-style-type: none"> • No respuesta hematológica (enf. estable o progresión) a los 3m • No RHC o respuesta citogenética (Ph+células> 95%) los 6m • Peor que respuesta citogenética parcial (Ph+ células > 35%) a los 12m • Peor que RCC a los 18m <p>Pérdida RHC, pérdida RCC o adquisición de mutaciones en cualquier momento</p>
<p>Advertencias</p> <ul style="list-style-type: none"> • Al diagnóstico: alto riesgo, delección Cr 9, otras anormalidades cromosómicas. • A los 12 meses: menos de RMM • En cualquier momento: cualquier incremento de transcritos BCR-ABL, adquisición de anormalidades cromosómicas.

Tabla 18: Criterios de respuesta según grupo de expertos de LEUKEMIA NET.

5. Detección de mutaciones en el dominio tirosincinasa

En la actualidad está ya establecido que la expansión de un clon con mutación del dominio tirosincinasa se puede asociar a resistencia al tratamiento con IM y, en algunos de estos casos, preceder la aparición de estas mutaciones a la progresión de una fase más avanzada de la enfermedad (BRANDFORD 2003) (SOVERINI 2005).

Las recientes recomendaciones de los expertos sugieren que la monitorización de los pacientes no se debería limitar a la medición de los transcritos BCR-ABL, sino que se debería incorporar el estudio del dominio cinasa en caso de fallo de tratamiento, respuesta subóptima o incremento de los niveles de BCR-ABL. Dado que las mutaciones son el mecanismo de resistencia a IM más frecuente, se recomienda que los laboratorios moleculares incorporen estos análisis (BACCARANI 2006).

La realización de un estudio de mutaciones puede ser muy relevante ante la adquisición de resistencias en pacientes tratados con inhibidores de segunda generación. En dos estudios se comprobó la adquisición de resistencias a tratamiento con Dasatinib en pacientes que habían fallado a la terapia con IM. Estas mutaciones no habían sido detectadas previamente a la terapia con IM (SHAH 2007), (SOVERINI 2007).

El problema es la baja probabilidad de encontrar estas mutaciones en aquellos pacientes que tienen un nivel estable o en descenso de los transcritos de BCR-ABL. La incidencia de mutaciones en fases crónicas, previas al tratamiento con IM, así como en pacientes ya en RCC, es asimismo muy baja (BRANDFORD 2004) (WILIS 2005).

En la actualidad no existe consenso sobre cuándo debe realizarse el *screening* de las mutaciones, qué técnica emplear, ni qué nomenclatura emplear para definir las.

Ahora que los nuevos inhibidores de las tirosincinasas están ya disponibles para enfermedades resistentes a IM, es muy importante definir criterios diagnósticos y guías de actuación para las mutaciones.

Las mutaciones han sido descritas en más de 40 posiciones diferentes del dominio BCR-ABL (figura 8).

- Metodos de detección:

La secuenciación directa del DNA tiene una sensibilidad de aproximadamente el 20% y es probablemente el mejor método de rutina actual. La amplificación deberá hacerse de BCR-ABL mejor que de ABL. Es probable que métodos de detección más sensibles como *D-HPLC* puedan remplazar a la secuenciación directa en el futuro (BACCARANI 2006) (Tabla 19).

Tecnología	Sensibilidad	Especificidad	Bias*	Accesibilidad
Secuenciación directa	15-25%	++	NO	+++
Subclonación y secuenciación	9%	+++	NO	++
<i>DHLPC(desnaturing high performance chromatography)</i>	0.1-10%	++	NO	++
Pirosecuenciación	5%	++	NO	+
Electroforesis de doble gradiente de desnaturalización	5%	++	NO	+
Fluorescencia PCR y PNA clamping	0.2%	++	SI	+
<i>ASO-PCR(allele specific oligonucleotide PCR)</i>	0.01%	++	SI	+

Tabla 19: Tecnología disponible para detección y cuantificación de mutaciones del dominio tirosincinasa BCR-ABL (BACCARANI 2006). *Bias* indica que el test ha sido diseñado para detectar mutaciones específicas.

Tras la identificación de mutaciones nos encontramos con el problema de expresarlas. Se ha sugerido que las mutaciones individuales deberían expresarse con terminología que indicara tanto el cambio de aminoácido como el de nucleótido. De igual manera sería recomendable expresar el tanto por ciento de los transcritos mutados

respecto al de los no mutados. Dado que la mayoría de los métodos utilizados, salvo la pirosecuenciación, son semicuantitativos, éste será naturalmente un valor aproximado más que una cuantificación precisa. Los resultados podrían expresarse tal y como se muestran en la siguiente tabla (tabla 20) (BACCARANI 2006):

Cambio aminoácido	Cambio nucleótido	Implicación <i>P-loop</i>	% alelo mutado	Resistencias		
				Imatinib	Dasatinib	AMN107

Tabla 20: Metodología sugerida para la expresión de los resultados de estudios mutacionales del dominio tirosincinasa BCR-ABL.

6. Monitorización individual para pacientes que reciben inhibidores de las tirosincinasas

6.1 Indicaciones al diagnóstico de LMC

En todo paciente que se sospeche un síndrome mieloproliferativo crónico, la detección de los transcritos de BCR-BL en sangre periférica es probablemente el mejor método para diagnosticar una LMC. En cada paciente, antes del inicio del tratamiento, debería medirse la cantidad de transcritos BCR-ABL circulantes en sangre periférica, así como la citogenética en médula ósea. Si el aspirado de M.O. no fuera posible, se deberá realizar un análisis mediante *FISH* en la sangre periférica del paciente como segundo método de confirmación del diagnóstico y éste tendrá la ventaja de poder

detectar reordenamientos BCR-ABL “silenciados” e incluso deleciones en el 9q+, los cuales podrian o nó, tener valor pronóstico.

La citogenética de M.O. es esencial para identificar translocaciones inusuales o anormalidades citogenéticas adicionales. La determinación de RQ-PCR (cualitativa) para BCR-ABL en el momento del diagnóstico, debe realizarse para comprobar la presencia de uno de los transcritos de fusión que no pueden ser amplificados con los sets habituales (BACCARANI 2006).

6.2 Monitorización del paciente que aparentemente responde a tratamiento

Una vez que el paciente ha iniciado tratamiento con inhibidores de la tirosincinasa se recomienda la cuantificación de transcritos BRC-ABL cada 3 meses. En la actualidad está siendo cuestionada la realización de citogenética de M.O. a los pacientes que aparentemente están respondiendo al tratamiento. En estos pacientes se podría obviar el examen a los 3 meses y realizarlo a los, 6 para confirmar la negativización del cromosoma Ph (HUGHES 2003). Una vez que el paciente alcanza la RCC, se recomienda la determinación de transcritos BCR-ABL por RT-PCR en intervalos no superiores a 3 meses. En cuanto a la realización de citogenética en M.O., parece razonable reducir la frecuencia del examen a 12 meses a partir del primer año. Si se abandonasen estos exámenes por completo, una posible displasia o evolución clonal de la enfermedad no sería detectada (LORIAUX 2004). El uso de técnicas FISH realizadas en sangre periférica es menos sensible que técnicas de RQ-PCR. El FISH no puede diferenciar pacientes en RCC que han adquirido RMM de aquellos con menor reducción de los transcritos. De igual manera no puede diferenciar pacientes con transcritos bajos pero ya en aumento, por lo que no se considera una técnica apropiada para la monitorización (BACCARANI 2006).

En pacientes en los que se observa un incremento de transcritos BCR-ABL, las determinaciones deberían realizarse con mayor frecuencia, para descartar la aparición de una de las modalidades de respuesta inconveniente: alarma, respuesta subóptima o fracaso terapéutico (BACCARANI 2006).

6.3 Indicación de análisis de mutaciones

No existe evidencia en la actualidad, en pacientes en fase crónica, de que un índice de riesgo de Sokal o Hasford elevado, se relacione con una mayor probabilidad de desarrollar mutaciones. No obstante, si al inicio de un tratamiento con inhibidores de la tirosincinasa aparece una inadecuada respuesta o cualquier signo de pérdida de ésta, sí se debe realizar el estudio correspondiente.

Por otro lado, mutaciones del dominio tirosincinasa deben sospecharse en cualquier paciente en fases avanzadas de la enfermedad (fase acelerada o crisis blástica). El estudio deberá repetirse en aquellos pacientes que no responden a inhibidores de la tirosincinasa o en aquellos que, habiendo respondido, se observa un incremento de transcritos (BACCARANI 2006).

El algoritmo de las pruebas a realizar para la correcta monitorización de los pacientes se encuentran resumidas en la figura 13:

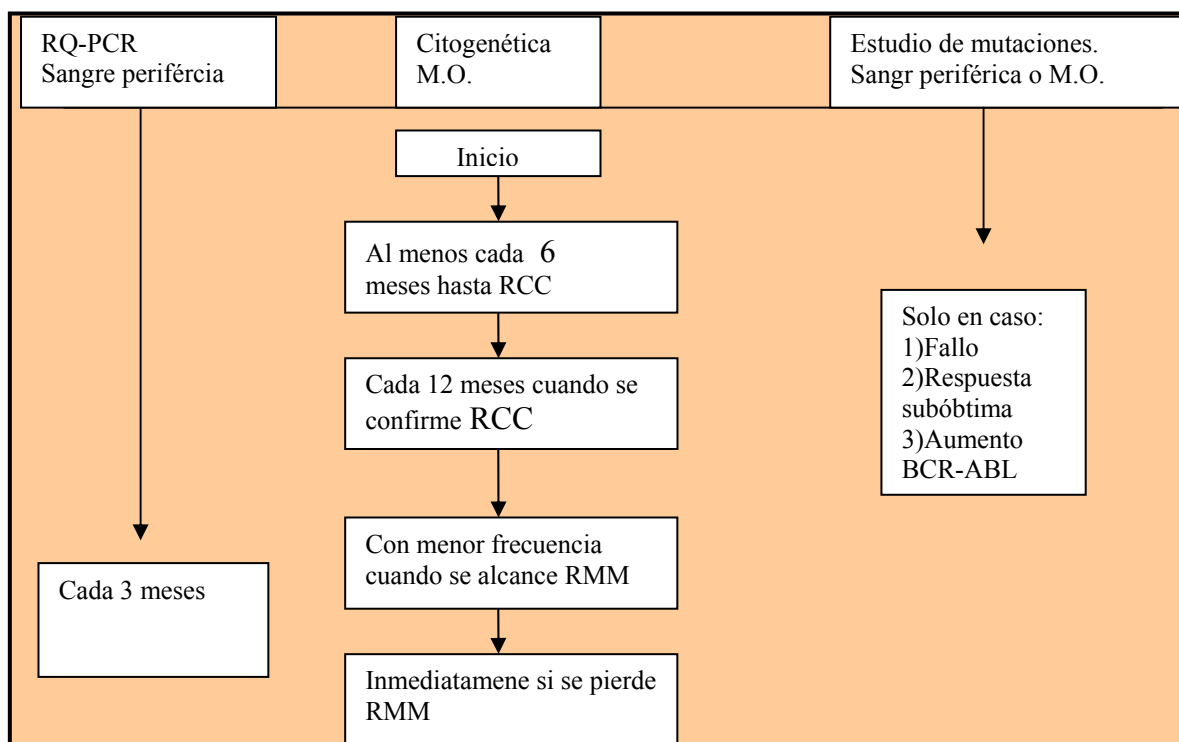


Figura 13: Recomendaciones de monitorización para los pacientes con LMC tratados con Imatinib según el panel de expertos de LEUKEMIA NET.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I. HIPÓTESIS	119
II. OBJETIVOS PRINCIPALES.....	120
III. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	120

I. HIPÓTESIS

El Imatinib (IM) es un fármaco introducido recientemente en el tratamiento de la LMC. Aunque los resultados obtenidos hasta ahora son muy prometedores, existe un pequeño porcentaje de pacientes que no responden de forma adecuada y se ha observado que esta falta de respuesta es determinante en la evolución global de la enfermedad.

Hasta ahora, todos los factores pronósticos para la LMC fueron definidos en pacientes tratados con otros procedimientos terapéuticos, destacando el IFN entre los tratamientos médicos más valorados a este respecto.

En el siguiente trabajo nos planteamos valorar si estos criterios nos permitirían diferenciar en el momento del diagnóstico aquellos pacientes que no van a responder de forma adecuada a este nuevo fármaco, así como identificar otros factores pronóstico para pacientes que van a ser tratados con éste y otros inhibidores de las tirosincinasas.

II. OBJETIVOS PRINCIPALES

1-Valorar la respuesta al tratamiento con 400 mgr de Imatinib en pacientes con LMC en primera fase crónica según los criterios propuestos por el grupo de LEUKEMIA NET.

2-Identificar factores pronósticos que permitan diferenciar grupos de pacientes con distinta probabilidad de respuesta al tratamiento y su posible repercusión en la supervivencia.

III. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1- Confirmar el papel de la respuesta al tratamiento con Imatinib como principal factor pronóstico.

2-Valorar el papel del índice pronóstico de Sokal en pacientes tratados con Imatinib.

3- Identificar nuevos factores pronóstico.

MATERJALY MÉTODOS

I. PACIENTES	125
II. TRATAMIENTO CON IMATINIB.....	128
III. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO	129
Actitud terapéutica según evolución:	129
IV. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	130
1. Respuesta hematológica	130
2. Respuesta citogenética.....	130
3. PCR cuantitativa “a tiempo real” (Q-PCR).....	131
- Principios de la Q-PCR	131
- Preparación de las muestras	131
- Extracción de RNA	131
- Síntesis de cDNA	132
- Q-RCP “a tiempo real” para la cuantificación de los transcritos Bcr-Abl.....	132
- Cuantificación de los transcritos BCR-ABL.....	135
- Reproducibilidad.....	136
V. MÉTODO DE ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA CASCADA DE SEÑALES QUE INICIA BCR-ABL	137
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	138
1. Análisis descriptivo:	138
2. Análisis de supervivencia y cinética de la respuesta citogenética:.....	138
3. Gestión de datos:	138

I. PACIENTES

Se han valorado 86 pacientes diagnosticados de LMC Ph (+) en fase crónica. Cuarenta estaban incluidos en el Ensayo de Acceso Expandido 113 (Novartis). De ellos, 15 pacientes fueron diagnosticados en nuestro Centro y el resto provenían de otros Hospitales. Un total de 11 pacientes recibieron tratamiento con Inhibidores de la Tirosinasa denominados de segunda generación (Nilotinib o Dasatinib). Diez de ellos, tras no alcanzar respuestas óptimas o intolerancia a Imatinib (IM), según ensayo clínico abierto en nuestro centro (AMN-107 Nilotinib, BMS-354825 Dasatinib), en el momento que se objetivó la resistencia o intolerancia a IM. De éstos, 7 pacientes fueron tratados por resistencia a IM, 1 por respuesta subóptima y el resto por intolerancia. Un paciente inició tratamiento con Nilotinib en primera línea, tras entrar en ensayo clínico en el que se evaluaba la eficacia de IM 400 mg/d, frente dosis de 600mg/d y 800mg/d de Nilotinib.

El periodo de observación ha abarcado desde Septiembre del 2000 hasta Mayo del 2008.

Los criterios de inclusión para los pacientes que pertenecieron al ensayo 113 y que se mantuvieron para aquellos tratados fuera de dicho protocolo, fueron:

- Resistencia hematológica: no alcanzar respuesta hematológica completa durante al menos un mes, tras seis meses o más de tratamiento con IFN- α

- Resistencia citogenética: persistencia de $>$ de 65% de metafases Ph (+) en médula ósea tras 1 año de tratamiento con IFN- α

- Refractoriedad citogenética: aumento de al menos 30% del número de células Ph (+) en médula ósea en dos determinaciones, con un intervalo de un mes o un incremento del $>$ 65%.

- Refractoriedad hematológica: aumento del número de leucocitos (incremento >100% de la cifra de leucocitos, con una cifra total >de 20×10^9 en dos ocasiones con un intervalo de al menos 2 semanas) durante el tratamiento con IFN- α .

- Intolerancia al IFN- α : presencia de toxicidad no hematológica documentada grado 3 o mayor que persista más de dos semanas. Para considerar que un paciente era intolerante tenían que haber transcurrido tres meses desde el inicio del tratamiento.

Los criterios de inclusión para pacientes tratados fuera del ensayo tras la comercialización de IM fueron:

- Pacientes diagnosticados de LMC en fase crónica definida por los siguientes parámetros: porcentaje de blastos o basófilos en sangre periférica o médula ósea <15%, <30% de blastos más promielocitos en sange periférica o médula ósea y plaquetas >100x10⁹.

- Cromosoma Philadelphia (+) documentado mediante cariotipo o FISH.

Los criterios de inclusión para tratamiento con Inhibidores de Tirosincinas de segunda generación fueron resistencia o intolerancia a IM.

La relación varones/mujeres fue 46/40 con una mediana de edad al diagnóstico de 55.0 años (rango 16-82). En el 54% de los pacientes se inició tratamiento con IM en segunda línea tras tratamiento previo con INF- α , en el resto de los pacientes tratados con IM, éste se inició en primera línea de tratamiento. La indicación de IM en los pacientes de segunda línea fue refractoriedad o resistencia al tratamiento con INF- α en el 32% y 37% respectivamente e intolerancia al INF- α en el 31% de los casos. La mediana de duración del tratamiento con IFN- α fue de 14.5 meses (rango 1-108). La mejor respuesta citogenética alcanzada con el INF- α fue: RCC en el 6.1%, RCM en el 8.2%, RCm o mínima en el 34.7% y nula en el resto de los pacientes. Once pacientes habían recibido un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

Se calculó el Índice Pronóstico de Sokal (SOKAL 1984) al diagnóstico según el modelo del *International CLG Prognosis Study Group*, mediante la fórmula matemática:

Función de tasa de riesgo (Hazard Ratio): $\lambda_1/\lambda_0 = \text{Exp}[(0.0116 (\text{edad}-43.4) + 0.0345 (\text{bazo en cm desde reborde costal}-7.51) + 0.188 (\text{plaq}/700)^2 -0.563) + 0.0887(\%\text{blastos en sp}-2.1)]$.

El Índice de Hasford (HASFORD 1998) se calculó mediante la fórmula matemática: *0.666 cuando edad ≥ 50 años, 0.042 x tamaño del bazo por debajo del reborde costal en centímetros); 1.0956 cuando plaquetas $\geq 1500 / 10$ a la 9/L; 0.0584 por % de mieloblastos; 0.0413 x % de eosinófilos; 0.2039 cuando basófilos $\geq 3\%$.*

El Índice Sokal y Hasford no se pudo calcular para todos los pacientes porque, en algunos de los individuos remitidos desde otros centros, la información era incompleta, (n=6) para índice de Sokal y (n=16) para índice de Hasford.

En el momento del diagnóstico se procedió a la realización de historia clínica y exploración física del paciente. La realización de ecografía abdominal para medición de megalias fue opcional.

Los controles clínicos y analíticos habituales se han realizado semanalmente durante el primer mes y después una vez al mes hasta el tercero y en secuencia trimestral desde entonces, salvo incidencias.

Los cariotipos en médula ósea han sido semestrales, excepto en los pacientes en respuesta molecular completa mantenida después del segundo año, en los que esta prueba pasa a ser anual.

La comprobación de RT-PCR en sangre periférica se realizó al diagnóstico y de forma secuencial programada cada 3 meses.

II. TRATAMIENTO CON IMATINIB

El imatinib (IM) se administró a dosis de:

- 400 mg/día en 83 pacientes

- 600 mg/día en 1 paciente debido a retraso del inicio de tratamiento por diagnosticarse durante periodo de gestación.

- 800 mg/día en 1 paciente según ensayo clínico.

Si se producía una reacción adversa severa, el tratamiento se interrumpía hasta la resolución de esta:

a) Interrupción temporal:

- Toxicidad no hematológica: Si se producían aumentos en la bilirrubina >3 veces el límite superior normal institucional (LSNI) o en las transaminasas hepáticas >5 veces LSNI, el IM se interrumpía hasta que los niveles de bilirrubina volvían a <1.5 veces el LSNI y el nivel de transaminasas a <2.5 veces el LSNI. El tratamiento con IM podía entonces continuarse a dosis de 300 mg/día.

- Toxicidad hematológica: para toxicidades grado III-IV (neutrófilos $<1.0 \times 10^9$ /L y/o plaquetas $<50 \times 10^9$) se interrumpió el tratamiento hasta su recuperación. Si recurría la neutropenia y/o trombopenia severa, tras una nueva interrupción del tratamiento, se reanudaba a dosis de 300mgr/día.

b) La interrupción definitiva se indicaba en caso de toxicidad grado IV no hematológica, alergia tipo I o alteraciones metabólicas severas.

III. EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO

El seguimiento de los pacientes se realizó, durante el primer mes semanalmente y en los 6 meses siguientes cada mes, para continuar posteriormente con controles trimestrales, siempre que la situación clínica lo permitiera.

Actitud terapéutica según evolución:

El incremento de dosis de IM, o cambio a tratamiento de segunda línea con inhibidores tirosincinasas, según ensayos clínicos abiertos en nuestro centro en el momento de la constatación de la respuesta no adecuada, se realizó en aquellos casos que se apreció que cumplían criterios de respuesta subóptima, fallo de tratamiento o intolerancia según las recomendaciones del panel de expertos de LEUKEMIA NET (BLOOD 2006).

IV. MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

En la evaluación de la respuesta del tratamiento con IM se emplearon los criterios utilizados por Talpaz *et al* (TALPAZ 1986) de respuesta hematológica y citogenética a los que incorporamos una técnica de biología molecular, Q-PCR “a tiempo real”, para la cuantificación de los transcritos BCR-ABL.

1. Respuesta hematológica

La respuesta hematológica completa se definió según los criterios reflejados en la tabla 3. Pacientes con respuesta hematológica parcial (RHP) son aquellos con al menos una reducción del 50% de la cifra de leucocitos (sólo si los leucocitos eran menores de $20 \times 10^9/L$), pero con la presencia de granulocitos inmaduros en sangre periférica o esplenomegalia. Una respuesta inferior que la parcial fue considerada como no-respuesta. La respuesta hematológica se debe mantener al menos un mes para su clasificación.

2. Respuesta citogenética

El cariotipo se realizó en muestras de médula ósea de acuerdo al procedimiento establecido, cada tres o seis meses. Los cariotipos se interpretaron según las recomendaciones del *Internacional System for Human Cytogenetic Nomenclatura* (SANDBERG 1992).

El método utilizado fue el estándar, usando la técnica de banda, con variaciones y adaptaciones a los distintos laboratorios (MORHEAD 1996) (SEABRIGHT 1971) (FERROMT 1992). En la mayor parte de los casos se analizaron 20 metafases; aquellos casos con menos de 15 metafases no se consideraron valorables.

3. PCR cuantitativa “a tiempo real” (Q-PCR)

- Principios de la Q-PCR

Esta técnica permite obtener la concentración inicial del ADN molde. El método utilizado fue el sistema de detección 5'-nucleotidasa o prueba de Taq-man. En ésta se marca uno de los oligonucleótidos cebadores con un compuesto fluorescente y una molécula apagadora en cada extremo. Cuando los cebadores se unan a su secuencia diana, la actividad 5'-exonucleasa de la polimerasa Taq, degrada y libera el compuesto fluorescente del apagador. De esta manera, se genera una señal que aumenta de forma proporcional al número de moléculas iniciales. El sistema de detección es capaz de inducir y detectar la fluorescencia en tiempo real a medida que avanza el proceso de PCR.

- Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de médula ósea obtenidas antes de iniciar el tratamiento y posteriormente cada seis meses, según el seguimiento habitual de estos pacientes. También se emplearon muestras de sangre periférica (10 ml de sangre anticoagulada) obtenidas de una vía periférica por venopunción estándar cada tres-seis meses. Las células mononucleares (CMNs) se obtuvieron mediante centrifugación con gradiente de densidad utilizando un preparado comercial (Lympropep™, Nycomed).

- Extracción de RNA

La obtención de RNA se realizó a partir de leucocitos de muestras de médula ósea o sangre periférica, en menos de dos horas desde la extracción, con Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), según el protocolo de los fabricantes. Posteriormente, para asegurar la pureza de la extracción del RNA de las muestras, éstas se procesaron con Rneasy Mini Kit (Quiagen, Crawley, West Sussex, UK). Alícuotas de RNA se

utilizaron para la detección de BCR-ABL y el control ABL mRNA. Para la digestión del DNA genómico se usó RNase-Free DNase Set (Quiagen), según el protocolo de los fabricantes. La integridad del RNAs se determinó mediante gel de azarosa teñido con bromuro de etidio. Sólo las muestras con RNAs 28s y 18s íntegro se consideraron adecuadas para la realización de la Q-PCR. La concentración de RNA se midió por espectrofotometría (Gene Quant, Pharma- Biotech).

- Síntesis de cDNA

Para la transcripción en DNA complementario a partir de RNA total (1 microgramo), se usaron 250 nanogramos de una hexanucleótidos aleatorios (*Random Hexamers*. Promega, Southampton, UK), 100 unidades de transcriptasa inversa SuperScript II Rnasa, hasta un volumen final de 20 microlitros, según las recomendaciones del fabricante. La reacción se incubó 10 minutos a 25 grados, seguido de 30 minutos a 48 grados y por último 5 minutos a 95 grados. Los controles negativos se obtuvieron añadiendo agua en lugar de transcriptasa inversa. Las muestras se congelaron a -80 grados hasta su procesamiento para la Q-PCR.

- Q-RCP “a tiempo real” para la cuantificación de los transcritos Bcr-Abl

Se han empleado iniciadores y sondas de la PCR para amplificar y detectar las dos variantes del BCR-ABL que dan lugar a la proteína p210 (b2a2 y b3a2), la proteína p190 (e1a2) y, como control interno de la reacción, el gen ABL. Los iniciadores y las sondas elegidos han sido los propuestos por Gabert *et al* (GABERT 1994) usando el *Primer Express software* (Applied Biosystems) (tabla 21), que han demostrado gran sensibilidad, alta eficiencia en la amplificación (pendiente de la curva cercana a -3.32), no presentar artefactos por amplificaciones inespecíficas y un incremento de la fluorescencia > 1.0 en el momento de alcanzar la “fase meseta” de la reacción.

Para la determinación de los transcritos que dan lugar a la proteína p210 se utilizó ENF-501 como iniciador 3, que se localiza en el BCR-exón 13 (exón b2), y amplifica

las dos variantes b2a2 y b3a2; ENR-561 como iniciador ABL del extremo 5' y ENP-451 como sonda, localizándose ambos en el segundo exón del gen ABL.

Para identificar los transcritos para la proteína p190 se utilizó como iniciador 3' ENF-402, localizado en el exón Bcr 1; el iniciador 5' y la sonda son los mismos que los empleados para el M-BCR. Las sondas TaqMan para M-BCR, m-BCR y control interno ABL se localizan distales al iniciador 3'. Los iniciadores y las sondas fueron fabricados por Ipsogen (Marsella, Francia). La amplificación del control interno, el gen ABL, permitió la normalización de las variaciones en la eficiencia de transcriptasa inversa y de la PCR y la verificación de la integridad del RNA.

La amplificación Q-PCR a tiempo real se realizó en placas de 96 pocillos con una cubierta óptica (Applied Biosystems) con un volumen final de reacción de 30 μ l. La mezcla para la reacción contenía 5 μ l de cDNA, 12.5 μ l de Master Mix (Applied Biosystems) y una concentración de los iniciadores de 300 nM y de las sondas de 200 nM. Todo ello se precalentaba 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos bifásicos de 15 segundos a 95°C para desnaturalizar y 1 minuto a 60°C para conseguir la alineación y amplificación. En cada placa se incluían las curvas estándar para p210 o p190 y Abl, control negativo y las muestras de cada paciente por triplicado.

Para las curvas estándar se emplearon 5 μ L de muestras con distinto número de copias de los plásmidos correspondientes (10, 10², 10³, 10⁵, 10⁶ copias para M-BCR y m-BCR y 10³, 10⁴, 10⁵ copias en el caso del ABL) (Ipsogen). Las curvas estándar se consideraron válidas si el coeficiente de correlación era mayor de 0.990 con una pendiente de -3.1 a -3.5 (figura 14).

Para aceptar los resultados de amplificación como válidos, la curva obtenida debe situarse dentro del rango de las curvas estándar de los plásmidos, considerado de forma lineal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización iniciador/sonda				
Gen	Código	Exon	Posición	Secuencia 5'-3'
EAC		5'-3' (tamaño)		
Abl				
Iniciador 3'	ENF-1003	2	372-401 (30)	TGGAGATAACACTC TAAGCATAACTAAAGG T
Sonda	ENP-1043	3	467-440(28)	Fam- CCATTTTGGTTTGGGC TTCACACCATT-TAMRA
Iniciador 5'	ENR-1063	3	495-475 (21)	GATGTAGTTGCTTG GGACCCA
M-Bcr-Abl				
Iniciador 3'	ENF-501	13	3173-3193 (21)	TCCGCTGACCATCA ATAAGGA
Sonda	ENP-541	2	230-254 (25)	Fam- CCCTTCAGCGGCCAGT AGCATCTGA-TAMRA
Iniciador 5'	ENR-561	2	277-257 (21)	CACTCAGACCCTGA GGCTCAA
m-Bcr-Abl				
Iniciador 3'	ENF-402	1	1727-1744	CTGGCCCAACGATG GCGA
Sonda	ENP-541	2	230-254 (25)	Fam- CCCTTCAGCGGCCAGT AGCATCTGA-TAMRA
Iniciador 5'	ENR-561	2	277-257 (21)	CACTCAGACCCTGA GGCTCAA

Tabla 21: Iniciadores y sondas para la Q-PCR cuantitativa. Abreviaturas: EAC: European Against Cancer, ENF: iniciadores del extremo 3', ENP: sonda TaqMan, ENR: iniciador del extremo 5'

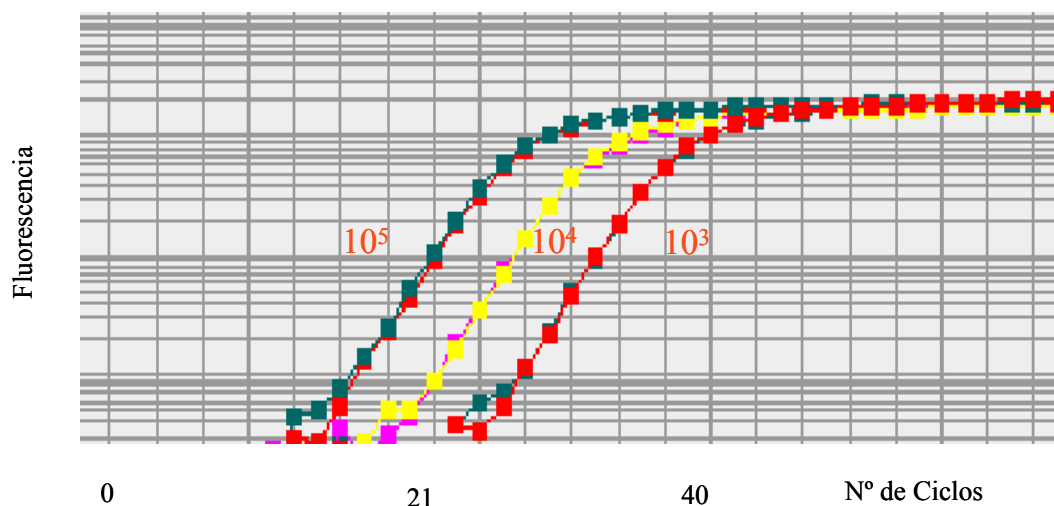


Figura 14: Gráfica de fluorescencia de los plásmidos para el control ABL, con distinto número de copias (103, 104, 105 n° de copias); para cada concentración de plásmidos se realiza el estudio por duplicado

- Cuantificación de los transcritos BCR-ABL

Durante la PCR, la fluorescencia emitida fue monitorizada ciclo a ciclo para medir la acumulación de la emisión del fluorocromo 6-FAM. Usando el paquete informático *Sequence Detector System* (SDS) del ABI 7700, se hizo el cálculo del ciclo umbral (C_T) para cada muestra, el cual se define como el número de ciclo donde la señal de fluorescencia supera un umbral definido estadísticamente, que es directamente proporcional al número inicial de copias. El C_T de las curvas estándar se puede ajustar para adecuar la relación entre el C_T y cantidad de transcritos al comienzo del proceso, de manera que el coeficiente de correlación entre la curva que enfrenta C_T con el log del número de transcritos sea de 1.

Usando el mismo software SDS, y basándose en el C_T , como recomiendan los fabricantes, la medida observada para el transcrito fusión BCR-ABL ($Bcr-Abl_{obs}$) de la muestra en estudio se compara con la curva estándar de los plásmidos BCR-ABL correspondiente, para así obtener el número de transcritos. De la misma forma se calculaba el número de transcritos para el control interno ABLI (Abl_{obs}) extrapolando el dato a las curvas estándar de los plásmidos ABL. Para obtener un valor normalizado del número de transcritos para la muestra estudiada se aplica la fórmula $BcCR-ABL_{norm} =$

$BCR-ABL_{obs} \times 1 / ABL_{obs}$. La razón para esta normalización es evitar el sesgo por la diferencia en la eficiencia de la PCR en cada muestra.

Para considerar un valor positivo, el control negativo no debe amplificar y para considerar un valor negativo, el control negativo no debe amplificar y el gen control interno sí y las curvas patrón con los plásmidos deben ser adecuadas. Cuando el control interno o las curvas estándar no amplifican adecuadamente, los resultados no se valoran y el estudio se repite.

- Reproducibilidad

Se realizaron controles internos de reproducibilidad de la técnica y externos con la colaboración del departamento de biología molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Dra Villuendas) para asegurarnos la representatividad de los resultados.

En la actualidad nuestro equipo de investigadores participa en un programa para la estandarización en centros españoles de la técnica de RT-PCR.

V. MÉTODO DE ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA CASCADA DE SEÑALES QUE INICIA BCR-ABL

Para realizar el estudio en muestras *in vivo* se determinaron los niveles de fosforilación en sangre periférica de pacientes al diagnóstico (previo a cualquier tipo de tratamiento) y después de 7, 15 y 30 días tras el inicio de Imatinib a dosis de 400 mg/día.

Se definió tentativamente como “respuesta” el descenso significativo de los niveles de fosfoproteínas con respecto al diagnóstico y como “resistencia”, la persistencia de niveles elevados de fosfoproteínas.

Los análisis “fosfo-específicos” se basan en la premisa de que, midiendo el estado de la fosforilación, se puede determinar qué vías de señales se usan en respuesta a un determinado estímulo. En nuestro caso hemos comparado valores de CRKL, p38, Stat 5 y ERK en 2 momentos evolutivos: al diagnóstico y 2-3 ó 4 semanas post-inicio del tratamiento.

El objetivo es detectar de manera precoz pacientes “respondedores” a IM (descenso de los niveles de fosfoproteínas con respecto al diagnóstico) y “no respondedores / no sensibles” (mantenimiento de niveles elevados/hiperfosforilación) para apoyar la decisión de un incremento de dosis o la de buscar tratamientos alternativos. Así mismo se pretende correlatar dichos niveles de fosforilación con la respuesta genética y molecular del paciente.

Como parte de la optimización de la técnica, también se están realizando estudios “*in vitro*” con líneas celulares y otras situaciones clínicas distintas de la LMC en fase crónica, con concentraciones variables entre 1-20uM durante 2 horas.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1. Análisis descriptivo:

Para las variables cuantitativas se calcularon medianas y rangos, medias y desviaciones estándar. Para las cualitativas, porcentajes y proporciones.

2. Análisis de supervivencia y cinética de la respuesta citogenética:

El análisis de supervivencia global fue calculado con el método de Kaplan-Meier desde el inicio de tratamiento con IM hasta la fecha de la muerte o el último seguimiento, con 95% de intervalo de confianza (KAPLAN 1958).

El análisis se hizo en bruto y estratificado por otras variables. Se han considerado las siguientes variables cualitativas: indicación del tratamiento con IM, respuesta citogenética a los 12 meses y respuesta citogenética a los 18 meses. Las curvas obtenidas por el método Kaplan.Meier se compararon mediante la prueba de Log Rank.

El análisis se realiza con el programa SPSS versión 13.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL).

3. Gestión de datos:

La gestión de los datos recogidos durante el estudio así como el manejo de las historias clínicas y muestras clínicas cumplen en todo momento con las exigencias de la Ley Orgánica de Protección de Datos (LOPD).

RESULTADOS

I. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA.....	143
II. TRATAMIENTO CON IMATINIB.....	146
III. DOSIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE LA TIROSINCINASA DE SEGUNDA GENERACIÓN	148
1. Dasatinib.....	148
2. Nilotinib.....	148
IV. RESPUESTAS A IMATINIB (IM)	150
1. Respuestas Hematológicas	150
2. Respuestas Citogenéticas.....	150
3. Respuestas Moleculares.....	154
4. Tipo de respuesta según criterios de respuesta al tratamiento establecidos por el comité internacional de expertos LEUKEMIA NET.	156
5. Respuestas sub-óptimas y fallo de tratamiento.	158
5.1 Respuestas sub-óptimas.....	158
5.2 Pérdidas de respuestas moleculares.....	158
5.3 Aumento de dosis de Imatinib	158
5.4 Fallo del tratamiento.....	159
V. RESPUESTAS A INHIBIDORES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	160
1. Dasatinib.....	160
VI. SUPERVIVENCIA	161
VII. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD POR FOSFORILACIÓN PROTEICA.....	165

1. Predicción de respuesta molecular y citogenética mediante análisis de los niveles de fosfotirosina y stat5-P:	165
2. Resultados análisis fosfoproteico	166
3. Resultados en pacientes tratados con Imatinib, LMC/FC:	167

I. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA

Se han estudiado un total de 86 pacientes diagnosticados de LMC en primera fase crónica (FC) que han recibido tratamiento con Imatinib (IM). De ellos, 10 pacientes recibieron tratamiento con inhibidores de segunda generación (Nilotinib o Dasatinib), tras haber recibido previamente tratamiento con IM y 1 paciente recibió tratamiento con inhibidores de segunda generación (Nilotinib), en primera línea de tratamiento.

De los 86 pacientes, 46 habían recibido otras terapias previamente y en los 40 restantes, el IM fue el tratamiento de primera línea. El tiempo medio de seguimiento de los pacientes ha sido de 46 meses de mediana (rango 6-89 meses).

La mediana de edad al inicio del tratamiento fue de 55 años (rango 16-82 años), siendo el intervalo medio entre el diagnóstico y el comienzo de éste de 12 meses (rango 1- 121 meses).

Se clasificaron a los pacientes en grupos pronóstico, según criterios de Sokal y Hasford, basados en datos clínicos y analíticos en el momento del diagnóstico. Los grupos de riesgo en los que se clasificaron fueron medio, intermedio o alto. Según los criterios de Sokal, 34 pacientes fueron clasificados de bajo riesgo, 38 de riesgo intermedio y 8 de alto riesgo. Según criterios de Hasford, 31 pacientes fueron clasificados de bajo riesgo, 24 de riesgo intermedio y 15 de riesgo alto (tablas 22 y 23).

Otros datos obtenidos en el momento del diagnóstico fueron: el tamaño del bazo, medido en centímetros desde el reborde costal y número de plaquetas $\times 10^9/L$, hemoglobina gr/dl, porcentajes de blastos, eosinófilos y basófilos, medidos en sangre periférica (tabla 24).

RESULTADOS

	Pacientes (n)	% de pacientes
Riesgo bajo	34	42.5
Riesgo medio	38	47.5
Riesgo alto	8	10.
Total de pacientes	80	100

Tabla 22: *Clasificación de los pacientes según índices de Sokal*

	Pacientes (n)	% de pacientes
Riesgo bajo	31	44,
Riesgo medio	24	35
Riesgo alto	15	21
Total de pacientes	70	100

Tabla23: *Clasificación de los pacientes según índices de Hasford*

RESULTADOS

	Pacientes (n)	Intervalo	Media
Edad	86	16-66	55
Esplenomegalia cm	80	2-22	2
Eosinófilos s.p. (%)	71	0-20	20
Hemoglobina (g/L)	80	7.7-14.7	12.1
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	80	94-2170	440

Tabla 24: Características clínicas y analíticas de la cohorte de pacientes al diagnóstico

II. TRATAMIENTO CON IMATINIB

La mediana de seguimiento con inhibidores de la tirosincinasa (de primera y segunda generación) fue de 46 meses (rango de 6-92 meses). La mediana de seguimiento con Imatinib fue de 43 meses (rango 6-83 meses).

La dosis con la que se inició tratamiento, salvo en dos pacientes, fue de 400 mg diarios. En una paciente se inició a dosis de 600 mg/d debido al largo periodo de tiempo transcurrido entre diagnóstico e inicio de tratamiento, por diagnosticarse la enfermedad en transcurso de gestación. En otro paciente, la dosis inicial de IM fue de 800 mg/diarios ya que participó en un ensayo clínico en el que se evaluó la eficacia del IM 400 mg/d vs 800 mg/d, en pacientes de nuevo diagnóstico.

En general, el tratamiento con IM fue bien tolerado. Se observó toxicidad no hematológica leve, grados I-II, en 5 casos, la mayoría de ellos consistente en toxicodermia leve y retención de líquidos. Únicamente se observó toxicidad no hematológica grado III-IV, que obligó a reducción de la dosis y, finalmente a la suspensión del fármaco, en 3 pacientes; los dos restantes se tratan en la actualidad con un inhibidor de segunda generación de tirosincinasa (Dasatinib).

Los efectos secundarios debido a toxicidad hematológica fueron los más frecuentes, observándose en un total de 19 pacientes. Cuatro de ellos sufrieron citopenias severas grado III-IV y en tres, esta circunstancia forzó la suspensión definitiva del fármaco, tras no objetivarse respuestas con dosis menores a 200 mg/d. En 15 pacientes se observaron citopenias que se resolvieron en un primer momento con suspensiones transitorias del fármaco y reducciones de la dosis. En un total de 10 pacientes se mantuvo el tratamiento a dosis inferiores de 400 mgr por no tolerar dosis habituales por citopenias. De éstos, 8 pacientes eran mayores de 70 años, 3 de ellos obtuvieron RCC y RMM a los 18 meses, 4 obtuvieron RMM tardía que mantienen en último control y 2 permanecen en RCC sin alcanzar RMM. El paciente restante se mantiene en RHC sin haber alcanzado RCC.

Es interesante reseñar aquí que, una vez concluida la fase en la que los pacientes recibían el fármaco mediante ensayos clínicos, con sus correspondientes requisitos, nuestra experiencia con el tratamiento, unida a la aplicación de G-CSF y de eritropoyetina en las citopenias, ha reducido drásticamente los casos en que la mielosupresión supuso la reducción o interrupción de la terapia.

En 18 pacientes fue necesario el incremento de la dosis de IM debido a respuesta insuficiente. Las indicaciones de subida de dosis y la respuesta a ésta fueron variadas y se comentan en el apartado IV.

La sustitución de IM por otros inhibidores de la tirosincinasa (Dasatinib o Nilotinib), se realizó en 10 casos que asimismo, van a ser comentados en el apartado III con más detalle.

En 15 pacientes se suspendió de manera definitiva la terapia con IM. En 10 por progresión de la enfermedad y en 5 por intolerancia al fármaco.

Tres pacientes suspendieron voluntariamente el tratamiento con IM cuando se encontraban en respuestas óptimas. En el primer caso se suspendió la terapia tras 24 meses de tratamiento encontrándose en RMM; transcurridos 3 años se diagnosticó al paciente de crisis blástica por lo que recibió tratamiento con quimioterapia. En el segundo caso el paciente abandonó IM tras 1 mes de tratamiento encontrándose en RHC; después de 4 meses se le diagnosticó de segunda fase crónica. En el tercer caso, la paciente se encontraba en RMM abandonando transitoriamente el tratamiento por embarazo deseado en dos ocasiones, en las que se apreció pérdida de ésta, con aumento progresivo de la enfermedad mínima residual.

III. DOSIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE LA TIROSINASA DE SEGUNDA GENERACIÓN

1. *Dasatinib*

En 9 pacientes se inició tratamiento con Dasatinib. En 6 de ellos tras objetivarse fallo con IM, en uno por respuesta subóptima y en 2 por intolerancia a éste (toxicodermia).

La dosis recibida varió, dado que 7 de estos pacientes recibieron Dasatinib antes de su comercialización al entrar en 2 ensayos clínicos en los que uno de los objetivos era encontrar la dosis óptima del fármaco. Las dosis recibidas fueron de 100 mg/d en una única administración en 4 pacientes, 50mg/12h en 2 de ellos y 70mg/12 h en los 3 restantes. Los efectos secundarios más frecuentes, al igual que con el tratamiento con IM, se debieron a la toxicidad hematológica, que en algún caso obligó a bajar la dosis e incluso a la suspensión transitoria del fármaco. El efecto secundario más frecuente por toxicidad no hematológica fue el derrame pleural,

La respuesta al tratamiento en estos pacientes fue variable y se comenta en apartado 4.

2. *Nilotinib*

Se inició tratamiento con Nilotinib en 2 pacientes. En uno tras objetivarse fallo del tratamiento con IM, al comprobarse la pérdida de respuesta citogenética. En otro paciente se inició tratamiento con Nilotinib en primera línea tras incluirse en un ensayo clínico en el que se comparaba respuestas con Imatinib 400mg/d vs Nilotinib 600mg/d, Nilotinib 800 mg/d, en pacientes diagnosticados de LMC Ph (+) en primera línea de tratamiento.

Este fármaco, en nuestra corta experiencia, ha mostrado una buena tolerancia. No hubo toxicidad hematológica y de la toxicidad no hematológica, el único efecto adverso

acontecido fue el aumento de amilasa y lipasa sin repercusión clínica, que cedió tras bajada de dosis.

Las respuestas al fármaco no son valorables debido a que un paciente presentó progresión de la enfermedad tras objetivarse la mutación T315i y en el otro, en el momento del análisis de datos, sólo tenemos seguimiento tras un mes del inicio del fármaco, aunque se ha objetivado ya RHC.

IV. RESPUESTAS A IMATINIB (IM)

1. Respuestas Hematológicas

La administración de IM condujo a un rápido descenso de la cifra de leucocitos y a la normalización de la fórmula leucocitaria en todos los pacientes, con un intervalo inferior a un mes.

El tiempo hasta la obtención de RHC fue independiente de la dosis de IM, así como del grupo de riesgo del paciente.

2. Respuestas Citogenéticas

El análisis citogenético, mediante aspirado de médula ósea, se realizó cada tres-seis meses. Para ser valorables los resultados, fue imprescindible el análisis de al menos 20 metafases; dicho número de metafases no se obtuvieron en todos los casos debido a la hipocelularidad de la médula ósea, probablemente consecuencia del tratamiento con IM.

En la tabla 25 se resume el número de RCC a los 6, 12 y 18 meses de tratamiento, el número de pacientes que hicieron respuestas tardías (por encima de los 18 meses), así como aquellos que no obtuvieron RCC en ningún momento del seguimiento del tratamiento con IM.

Se ha analizado el porcentaje de respuestas citogenéticas en función del momento del inicio de IM, encontrándose un porcentaje de respuestas completas, significativamente mayor, en los pacientes en los que se inició IM en primera línea frente aquellos que lo recibieron en segunda o más líneas de tratamiento (tabla 26).

RESULTADOS

Tiempo para RCC en meses	N	%
RCC 6 meses	32	40
RCC 12 meses	17	21.5
RCC 18 meses	5	6.3
RCC tardía(>18 meses)	4	5
No alcanzan RCC	21	26

Tabla 25: Tiempo en meses para la obtención de RCC

	RCC (%)	No RCC (%)
Primera línea	91	9
Segunda o más línea	52	48

Tabla 26: Porcentaje de RCC obtenidas en algún momento de la evolución en función del momento de inicio de IM.

- **Correlación entre los grupos de riesgo y las respuestas citogenéticas a los 12 y 18 meses de tratamiento:** se aprecia una tendencia lineal de menor índice de RCC en concordancia con el índice pronóstico, aunque no se ha encontrado significación estadística ($p= ,065$ para RCC a los 12 meses y $p= ,107$ para RCC a los 18 meses) (tablas 27 y 28).

Índice de riesgo según Sokal	RCC (n) RCC(n)	No No	RCC (%) RCC(%)	No No
Bajo	26	8	76	23
Medio	20	15	57	42
Alto	4	4	50	50

Tabla 27: Probabilidad de obtención de respuestas citogenéticas a los 12 meses en función del índice de Sokal. ($p= ,067$)

Índice de riesgo según Sokal	RCC (n) RCC(n)	No No	RCC (%) RCC(%)	No No
Bajo	24	7	77	22
Medio	22	12	64	35
Alto	4	4	50	50

Tabla 28: Probabilidad de obtención de respuestas citogenéticas a los 18 meses en función de Índice de Sokal. ($p= 0,107$)

RESULTADOS

De igual manera, se ha realizado estudio estadístico univariable de los datos clínicos y analíticos observados al diagnóstico y la probabilidad de obtener RCC a los 12 y 18 meses en función de éstos.

Se ha observado una importante asociación entre el aumento del tamaño del bazo y la probabilidad de alcanzar RCC a los 18 meses que, aunque sin alcanzar significación estadística, sí se acerca bastante a ella ($p= ,097$) (tabla 29).

Se estudió la asociación entre el número de leucocitos al diagnóstico, el número de plaquetas al diagnóstico y la probabilidad de alcanzar RCC a los 18 meses, sin que haya sido posible establecer una relación (tabla 29).

RESPUESTA CITOGENETICA A LOS 18 meses		N	Media	Sig
Leucocitos $\times 10^9/L$	RCC	44	3651.165	.169
	NO RCC	21	141.5714	
Plaquetas $\times 10^9/L$	RCC	46	522.3913	.651
	NO RCC	22	591.7273	
Bazo cm desde reborde costal.	RCC	44	4.432	.097
	NO RCC	23	8.304	

Tabla 29: .Media y significación estadística de leucocitos, plaquetas y tamaño del bazo al diagnóstico en función de haber alcanzado RCC a los 18 meses

3. Respuestas Moleculares

Se ha realizado seguimiento seriado de la respuesta molecular mediante la medición de transcritos de BCR-ABL en sangre periférica. Dicho seguimiento se ha realizado a partir del momento del diagnóstico y con una frecuencia de 3 meses desde que estuvo disponible la técnica en nuestro centro (Marzo 2003). En los pacientes en los que fue posible la monitorización de la respuesta molecular, se obtuvo una RMM en el mes 18 en el 57,2%, ésta se alcanzó de forma tardía en un 16,6% y no se alcanzó en el 26,2% de los pacientes (tabla 30).

Momento que se alcanza RMM	N	%
18 meses	24	57,2
Tardía	7	16,6
No alcanza	11	26,2

Tabla 30: Momento en el que los pacientes alcanzan RMM.

Entre los pacientes que obtuvieron RMM a los 18 meses, el 92% la mantenían en el último control disponible. El resto habían perdido la RMM pero continuaban con RCC.

Hemos estudiado el estado de la respuesta molecular de los pacientes en el último control disponible. De los 77 pacientes en los que disponemos de un último control molecular, 44 de ellos se encontraban en RMM y 33 no alcanzaban esta RMM.

- **Correlación entre los grupos de riesgo y el estado de la última respuesta molecular disponible:** Se ha analizado la relación entre el último control de RMM y grupos de riesgo según criterios de Sokal, encontrando una tendencia lineal en la que, a un índice de Sokal más bajo, hay una mayor probabilidad de obtener RMM y, aunque no se alcanza significación estadística, sí se queda muy cerca de ella ($p=0,065$) (tabla 31).

Índice de riesgo según Sokal	RMM(n)		RMM (%)	
	RMM(n)	No RMM(n)	RMM (%)	No RMM (%)
Bajo	23	9	72	28
Medio	16	15	51	48
Alto	3	4	43	57

Tabla 31: Estado de la última respuesta molecular en función de niveles de riesgo establecidos por índice de Sokal. ($p=,065$)

De esta forma observamos que, al pasar de índices de Sokal bajo a intermedio, se duplica la probabilidad de no encontrarse en RMM en el último control, mientras que, al pasar de índice de Sokal bajo a alto, se cuadruplica la probabilidad de no encontrarse en RMM.

4. Tipo de respuesta según criterios de respuesta al tratamiento establecidos por el comité internacional de expertos LEUKEMIA NET..

El tipo de respuestas alcanzado según criterios de LEUKEMIA NET a los 12 y 18 meses, en nuestra población estudiada, ha sido variable y se muestran en las tablas 32 y 33.

	N	%
Respuesta óptima	52	63
Respuesta sub-óptima	10	12
Fallo del tratamiento	25	25

Tabla 32: Respuestas según criterios de LEUKEMIA NET alcanzadas a los 12 meses

	N	%
Respuesta óptima	24	38
Respuesta sub-óptima	15	24
Fallo del tratamiento	23	36

Tabla 33: Respuestas según criterios de LEUMIA NET alcanzadas a los 12 meses.

- Correlación entre los grupos de riesgo y tipo de respuesta según criterios LEUKEMIA NET: En nuestra cohorte estudiada se aprecia correlación con significación estadística entre los grupos pronóstico al diagnóstico, según criterios de Sokal, y el tipo de respuesta obtenida según criterios de LEUKEMIA NET a los 12 meses ($p= ,007$) (tabla 34), así como importante relación lineal entre índices de Sokal y tipo de respuestas según criterios de LEUKEMIA NET a los 18 meses ($p= ,065$) (tabla 35).

RESULTADOS

	Respuesta óptima		Respuesta subóptima		Fallo	
	n	%	n	%	n	%
Riesgo bajo	26	76	7	21	1	3
Riesgo intermedio	21	63	2	6	10	34
Riesgo alto	4	50	0	0	4	50

Tabla 34: Tipos de respuesta a los 12 meses en función de grupos pronóstico según índices de Sokal. ($p=,007$)

	Respuesta óptima		Respuesta subóptima		Fallo	
	n	%	n	%	n	%
Riesgo bajo	12	52	8	35	13	33
Riesgo intermedio	9	36	6	24	10	40
Riesgo alto	3	38	1	12	4	50

Tabla 35: Tipos de respuesta a los 18 meses en función de grupos pronóstico según índices de Sokal. ($p=,065$)

5. Respuestas sub-óptimas y fallo de tratamiento.

5.1 Respuestas sub-óptimas

De las 15 respuestas sub-óptimas a los 18 meses, 6 pacientes acabaron haciendo RMM tardía en algún momento de la evolución. El resto permaneció sin alcanzar la RMM e incluso en 2 casos se objetivó pérdida de la RCC.

5.2 Pérdidas de respuestas moleculares

Teniendo en cuenta toda la cohorte, los controles moleculares trimestrales han detectado incrementos en los niveles de transcritos BCR-ABL, en pacientes que se encontraban en RMM, en 11 de ellos en distintos momentos evolutivos. Entre éstos, 7 casos se encontraban en respuesta óptima a los 18 meses según criterios de LEUKEMIA NET, de ellos, 2 pacientes no volvieron a alcanzar RMM y el resto han permanecido con oscilaciones entre pérdida y RMM. Los otros 4 pacientes obtuvieron respuesta óptima tardía (>18 meses) y de éstos, 2 no se encontraban en RMM en el último control y los otros 2 restantes oscilaron en el tiempo entre RMM y pérdida de ésta.

5.3 Aumento de dosis de Imatinib

Se procedió a subir la dosis de IM en 18 pacientes. De éstos, en 2 se realizó por respuesta sub-óptima al tratamiento, alcanzando RMM en uno de ellos. En los 16 pacientes restantes se realizó la subida de la dosis por fallo al tratamiento, de ellos 3 alcanzaron RMM, otros 3 alcanzaron RCC pero no RMM y en los demás pacientes no se alcanzó mejoría de la respuesta a pesar del aumento de dosis.

5.4 Fallo del tratamiento

En nuestra serie se han descrito un total de 24 pacientes con fallo del tratamiento, en dos de ellos se describió por pérdida de respuesta citogenética cuando a los 18 meses habían alcanzado RCC. En éstos, la actitud terapéutica ha sido bien distinta. Se procedió a cambio de fármaco por inhibidores de la tirosincinasa de segunda generación en 8 pacientes (7 Dasatinib y 1 Nilotinib), siendo las respuestas diferentes y serán comentadas más adelante en el apartado V. En 4 pacientes se procedió a realizar trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos por no estar disponible tratamiento con inhibidores de segunda generación. En el resto de los pacientes, bien se observó progresión de la enfermedad o perdimos su seguimiento.

V. RESPUESTAS A INHIBIDORES DE SEGUNDA GENERACIÓN

1. *Dasatinib*

Se han estudiado 9 pacientes tratados con Dasatinib. Las respuestas al tratamiento han variado en función de la indicación del mismo:

- Los 2 pacientes que fueron tratados con Dasatinib por intolerancia a IM se encuentran en la actualidad en RMM.

- En el paciente que se inició por respuesta subóptima se ha objetivado disminución de más de un logaritmo en la respuesta molecular tras 3 meses de tratamiento, aunque aún es pronto para realizar valoraciones sobre la respuesta.

- De los pacientes que iniciaron tratamiento con Dasatinib por fallo a IM, un 50% alcanzó RCC, 1 paciente alcanzó respuesta citogenética parcial, 1 paciente no alcanzó ningún tipo de RC, aunque no se evidenció progresión de la enfermedad y en 1 paciente se objetivó progresión de la enfermedad y falleció.

VI. SUPERVIVENCIA

La supervivencia global de la serie fue del 82 % a los 4 años (error típico ,061); la mediana de seguimiento todavía no ha sido alcanzada. El primer evento sucede a los 16 meses (figura 15).

Se ha analizado la supervivencia en función del momento de la evolución de la enfermedad en el que se inició IM, encontrando así diferencias significativas. Para el grupo en que el IM se inició en segunda o más líneas de tratamiento, la supervivencia global a los 41 meses fue del 71% (error típico ,13), frente a una supervivencia del 93% a los 39 meses (error típico ,043) para aquellos pacientes en los que se inició la terapia con IM en primera línea de tratamiento. En ninguno de los casos se ha alcanzado la mediana de seguimiento (figura 16).

Supervivencia acumulada

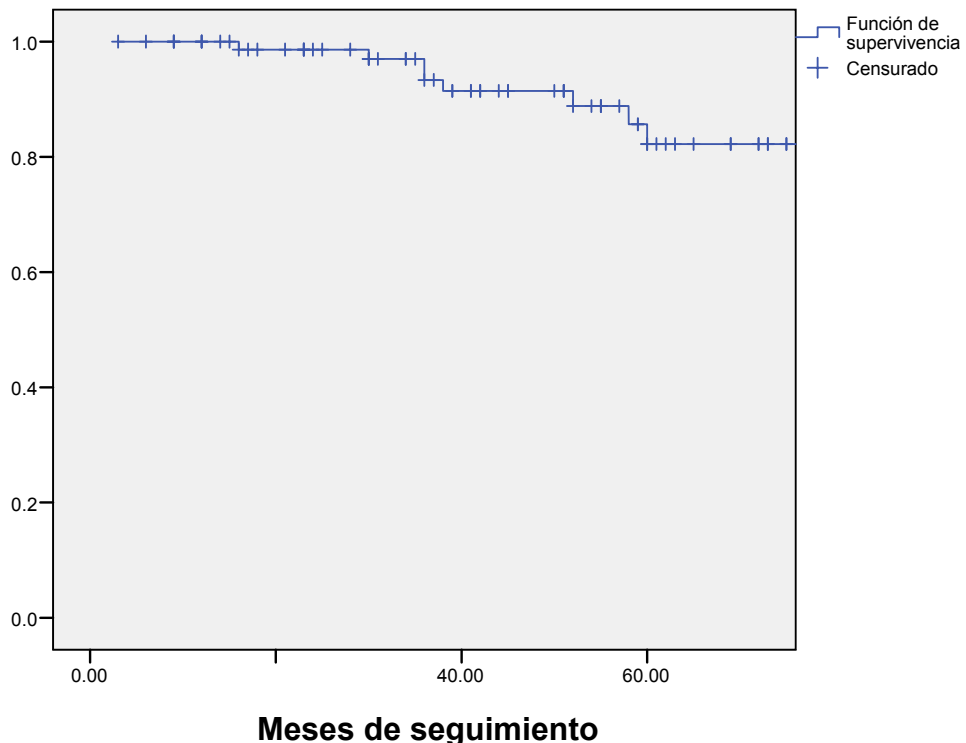


Figura 15: Supervivencia global acumulada de la serie.

Supervivencia acumulada

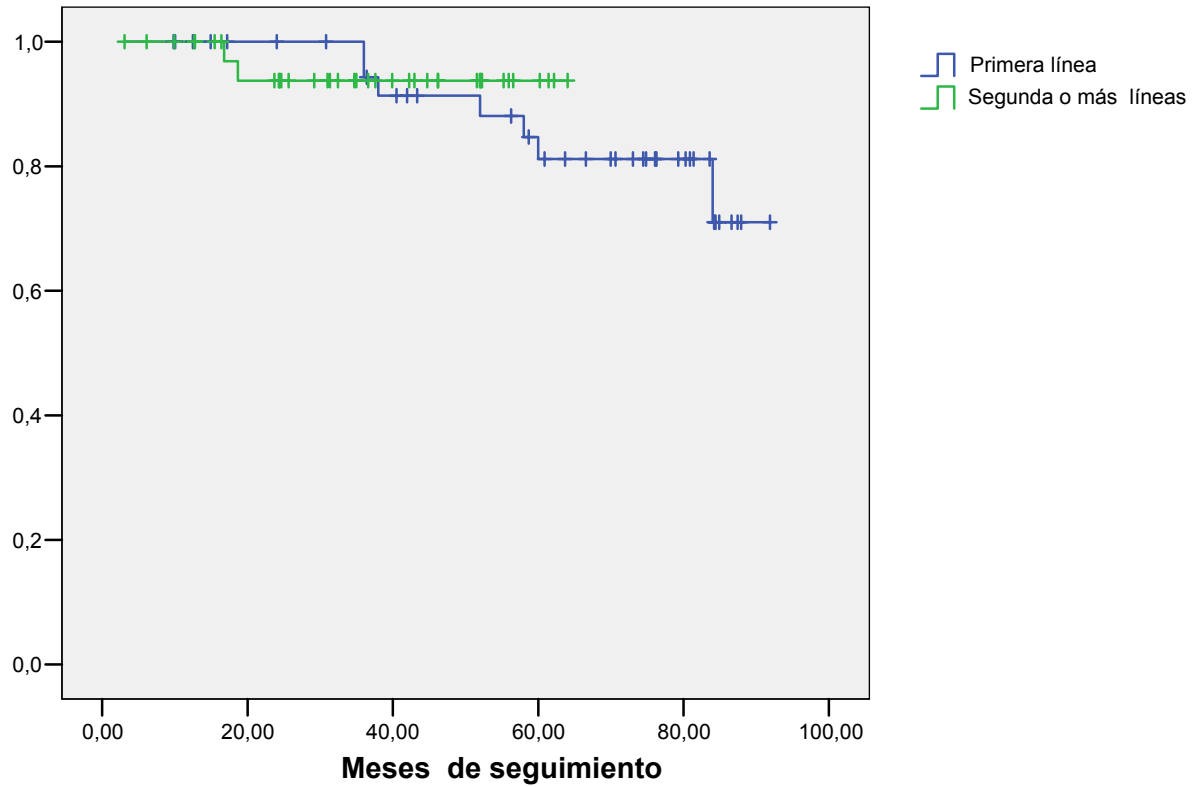


Figura 16: Supervivencia acumulada en función de línea de tratamiento

- **Análisis de supervivencia en función de índices de Sokal:** Se ha analizado la supervivencia en función de las respuestas citogenéticas alcanzadas, encontrando diferencias en función del tipo de respuestas obtenidas, siendo en ambos casos estadísticamente significativas (figuras 17 y 18)

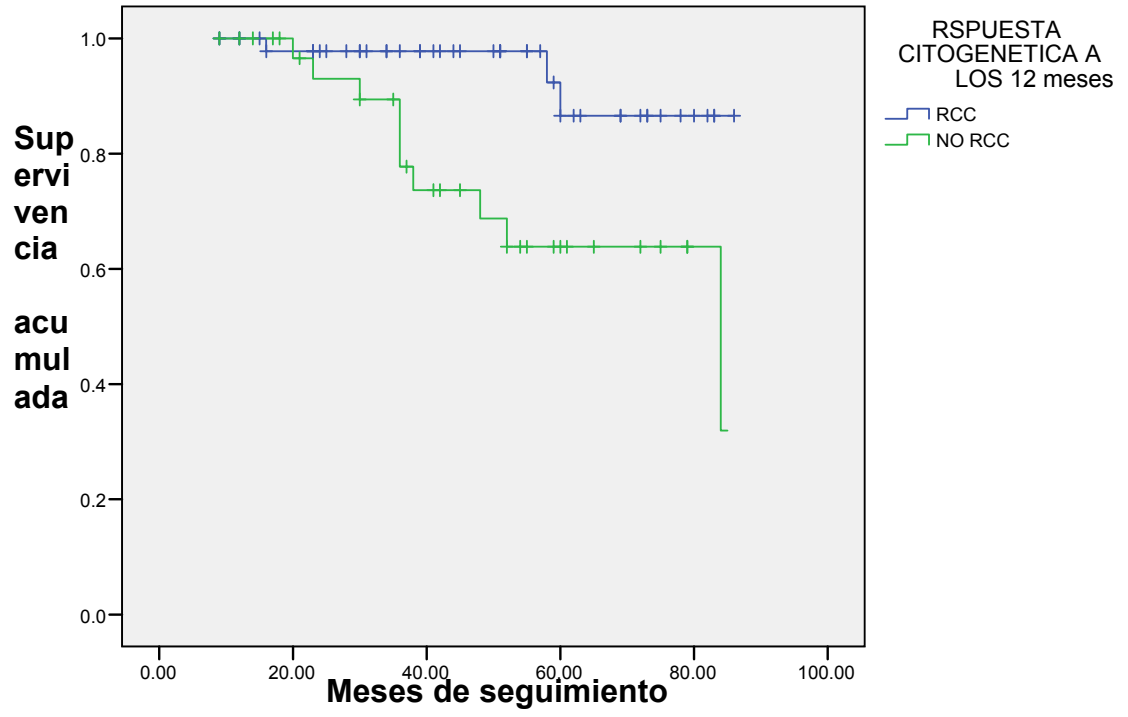


Figura 17: Supervivencia global en función de respuestas citogenéticas alcanzadas a los 12 meses. (p=,009)

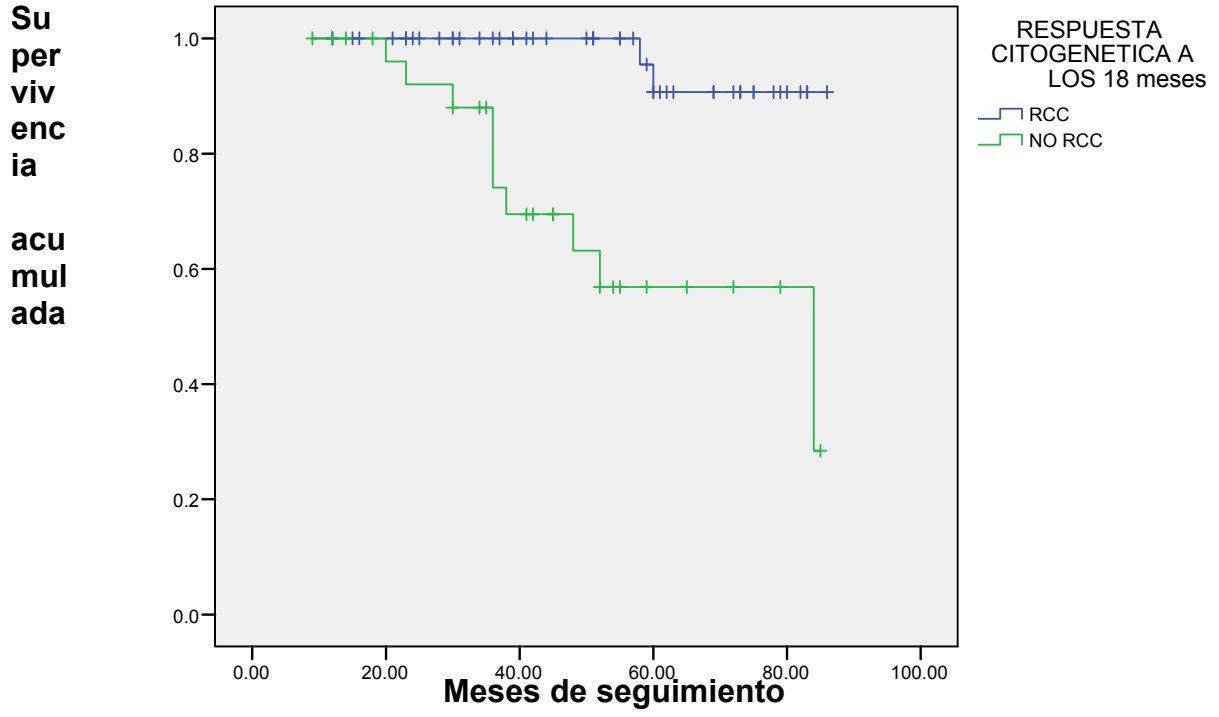


Figura 18: Supervivencia global en función de respuesta citogenéticas alcanzadas. (p= ,000)

VII. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD POR FOSFORILACIÓN PROTEICA

1. Predicción de respuesta molecular y citogenética mediante análisis de los niveles de fosfotirosina y stat5-P:

Se ha desarrollado un test por citometría de flujo para medir la respuesta de las células al tratamiento con IM tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

Con el objetivo de diferenciar de manera precoz a los pacientes respondedores a IM de los que desarrollarán resistencia, se han estudiado los valores en sangre periférica de tres fosfoproteínas, cuya activación persistente contribuye a la progresión maligna de la leucemia mieloide crónica: p38, Stat 5 y ERK.

Previo a la aplicación de la técnica *in vivo* utilizando células de pacientes, se realizó el mismo estudio en 3 líneas celulares de leucemia mieloide crónica sensible a IM (K562, kcl22 y em2) y 1 línea celular de leucemia mieloide crónica resistente a IM (SD1) Se observó una inhibición entre un 45 y un 70% en las líneas celulares sensibles, mientras que la línea resistente no redujo su expresión.

	IC50	Stat 5-P	P-tyr
K562	0.29 uM	Reducción del 45%	Reducción del 64%
KCL22	0.41 uM	Reducción del 70%	Reducción del 60%
Em2		Reducción del 63%	Reducción del 30%
SD1	31.57 uM	Aumenta 150%	Reducción del 45%

Tabla 36: Estudios de fosforilación proteica *in vitro* en 4 líneas celulares.

Se ha observado una inhibición entre un 45 y un 70% en las líneas celulares K562, kcl22, EM2, mientras que la línea SD1 (línea celular resistente) no redujo su expresión. La reducción se ha visto con ambos marcadores (stat5-P y fosfotirosina)

De esta manera, y en líneas generales, se observa un descenso de los niveles de fosfoproteínas en los pacientes que muestran respuesta citogenética y molecular a IM a los 12 y 18 meses de tratamiento respectivamente. Sin embargo, se observa un mínimo descenso de dichos valores, o incluso un incremento de los mismos, en los pacientes que resultan resistentes al IM.

Interesa señalar aquí que la medición de las fosfoproteínas por citometría de flujo ofrece varias ventajas con respecto a las técnicas de Western blot. Su rapidez y sensibilidad permite su aplicación rutinaria en la práctica clínica. Esta técnica podría utilizarse además para detectar otras tirosincinasas activadas en otras patologías como por ejemplo c-kit y Flt-3 en leucemia mieloide aguda.

2. Resultados análisis fosfoproteico

Estudio previo en 50 determinaciones, en los pacientes, aparte de los análisis “in vitro”: observamos una clara reducción de los marcadores stat5-p y p-tyr en líneas celulares, LLA y fases aceleradas de LMC (tabla 37)

En los casos de LMC en fase crónica se observa una leve reducción, menor que la que se observa en donantes sanos aunque en los casos resistentes no se observa reducción. Un aumento de la casuística analizada tendría que permitir la obtención de un resultado más preciso. El propósito ha sido determinar perfiles de expresión génica que puedan estar involucrados en la resistencia a los inhibidores a las tirosincinasas BCR-ABL (resistencia a la terapia diagnosticada mediante los criterios de RT-PCR y citogenéticos).

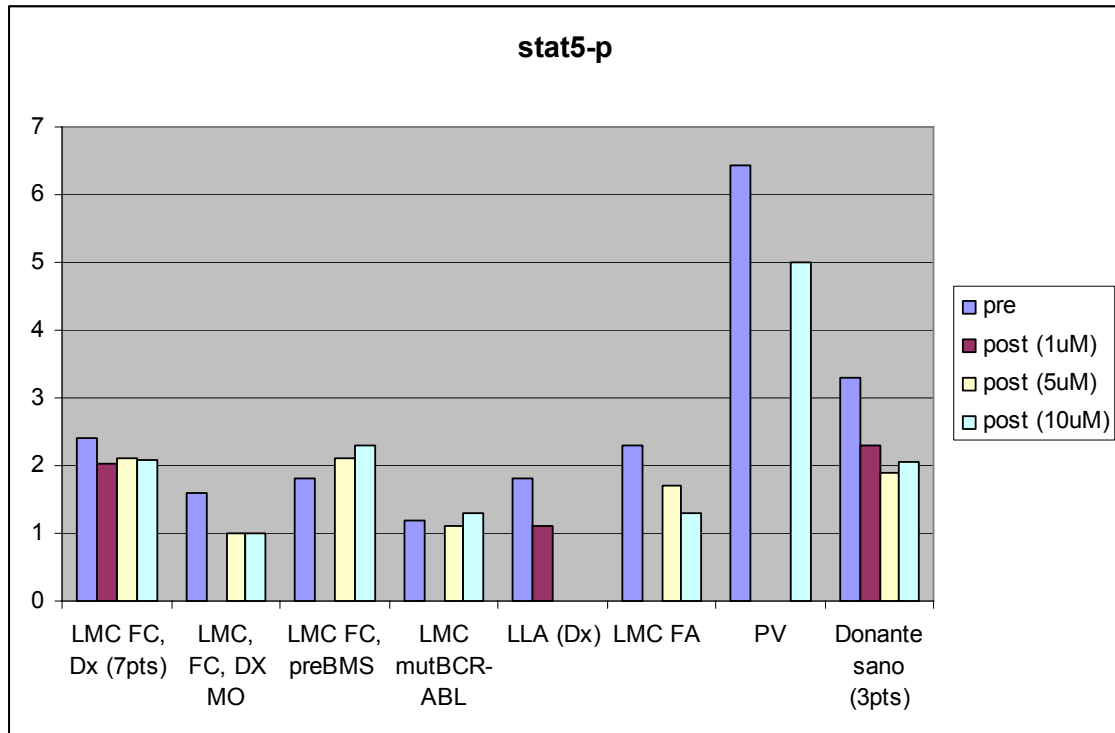


Tabla 37: Tratamiento in vitro con imatinib: Resultados de expresión de p-stat5 detectado por citometría de flujo, en distintas patologías.

3. Resultados en pacientes tratados con Imatinib, LMC/FC:

Hemos comparado valores de las fosfoproteínas CRKL, p38, Stat 5 y ERK en un total de 22 pacientes, en al menos 2 momentos evolutivos: al diagnóstico y 2-3 ó 4 semanas post-inicio del tratamiento.

Los resultados deben considerarse provisionales, ya que por un lado el número de casos es pequeño para este tipo de valoración, y por otra, debe cotejarse la diferencia entre las positividades de cada población celular para las fosfoproteínas correspondientes con la evolución a medio plazo de cada paciente.

Es interesante que en 3/6 pacientes valorados para CRKL con peor evolución que los otros 3 se aprecian diferencias que pudieran tener significado pronóstico en comparación con los otros 3 paciente. Pese a ser una muestra tan exigua, el hecho de que se trate de 3 vs 3 casos, con significado clínico coincidente, permite especular con que un seguimiento más prolongado de los pacientes estudiados aportará información que permita discriminar grupos de más/ menos sensibilidad a IM aplicando concretamente los índices de fosforilación de CRKL.

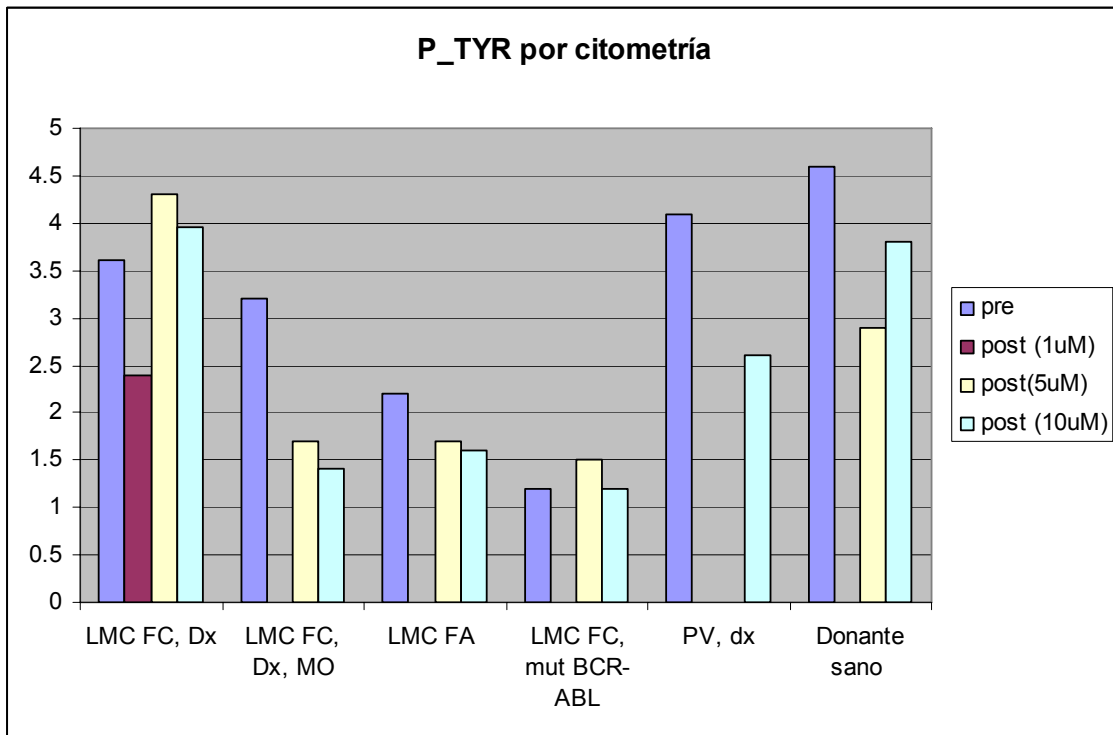


Tabla 38: Tratamiento in vitro con Imatinib: Resultados de expresión de p-tyr detectado por citometría de flujo.

DISCUSIÓN

I. SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA:	173
II. EL TRATAMIENTO DE LA LMC CON IMATINIB: TOLERANCIA, DOSIS ADECUADA, INTERRUPCIONES.....	175
1. Tolerancia	175
2. Suspensión e interrupciones	177
3. La cuestión de la dosis inicial.....	179
III. SOBRE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON IMATINIB DE LA LMC PH (+) EN FASE CRÓNICA.	181
1. Respuestas hematológicas	181
2. Respuestas citogenéticas	181
3. Respuestas moleculares	184
4. Tipo de respuesta según criterios de respuesta al tratamiento establecidos por el comité internacional de expertos: Leukemia.Net.	186
5. Respuestas sub-óptimas y fallo de tratamiento.	188
5.1 Respuestas sub-óptimas.....	188
5.2 Sobre los resultados con aumento de las dosis iniciales:.....	189
5.3 Los fallos del tratamiento	191
IV. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS CON OTROS INHIBIDORES DE TIROSINCINASAS	192
1. Nilotinib.....	192
2. Dasatinib.....	193
V. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	194
VI. FACTORES PRONÓSTICO	195

I. SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA:

La muestra analizada incluye 86 pacientes diagnosticados de LMC Ph (+) en primera fase crónica, en seguimiento por nuestro centro, que han recibido tratamiento con inhibidores de la tirosincinasas, de los cuales, todos menos uno, recibieron IM. De estos 85 pacientes con IM, 10 recibieron inhibidores de tirosincinasa “de segunda generación” tras el tratamiento previo con IM y 1 paciente, inhibidor de tirosincinasas de segunda generación en primera línea de tratamiento.

Dada la incidencia de la enfermedad, (se estima en 1-2 casos por cada 100.000 habitantes/año) y teniendo en cuenta que el área sanitaria de nuestro centro abarca a 500.000 habitantes, el tamaño de la muestra es bastante superior al que debería correspondernos. Este tamaño de muestra relativamente importante tratándose de un único centro se explica por tres factores fundamentales:

En primer lugar, 24 pacientes intolerantes o resistentes a IFN fueron derivados desde otros centros al nuestro entre 2000-2002, tras ser designado como referencia para el ensayo Novartis “expanded Access” con STI-571: lo que en aquel momento representaba la única forma de acceder al tratamiento con IM. Las consecuencias de esta derivación de pacientes serán tenidas en cuenta a lo largo de la discusión, pero ya adelanto aquí que básicamente supusieron una mayor proporción de casos con un tiempo de evolución más prolongado desde el diagnóstico hasta el inicio de tratamiento con IM, lo cual, como ya se ha comentado, confiere peor pronóstico.

El segundo punto que ha hecho aumentar nuestra muestra ha sido disponer en nuestro centro de la técnica de la PCR-cuantitativa para medición de EMR (transcritos BCR-ABL) en un momento en el que todavía no estaba disponible en muchos otros centros, lo que hizo que algunos hospitales, tanto de la comunidad autónoma de Madrid como de otras comunidades, nos enviaran periódicamente muestras para el seguimiento de sus pacientes.

El tercer factor que ha hecho aumentar la muestra y ha podido influir en el análisis de nuestra cohorte ha sido la participación de nuestro centro en los primeros ensayos clínicos para tratamiento con otros inhibidores de tirosincinasas (llamados de segunda generación) de pacientes intolerantes o resistentes a IM; se derivaron por lo tanto a nuestro centro pacientes que no habían respondido a IM, lo cual representa sin duda una “selección negativa”, que altera la homogeneidad de la cohorte.

En conjunto, el hecho de haber analizado pacientes referidos de otros centros introduce probablemente un sesgo en el análisis de la respuesta global, pero también ha propiciado, mediante la inclusión de un número proporcionalmente elevado de no respondedores, la mejor identificación de grupos de riesgo de malas respuestas al tratamiento, principal objetivo de la tesis.

El tiempo medio de seguimiento de los pacientes ha sido de 46 meses de mediana (rango 6-89 meses). Este tiempo de seguimiento es superior a la mayoría de las series estudiadas y recogidas en la literatura y es debido a los ensayos abiertos en nuestro centro que permitieron a los pacientes beneficiarse del tratamiento con IM antes de que éste fuera comercializado .

La distribución de nuestros pacientes por grupos de riesgo según los índices pronósticos de Sokal y Hasford se asemeja a la publicada por otros grupos tanto en la era IM como en la post-IM, si bien es cierto que esta distribución varía mucho de unos grupos a otros. En comparación con otras series, la nuestra presenta una distribución de los pacientes en función de grupos pronósticos de Sokal y Hasford similar a las grandes muestras publicadas, en las que la incidencia de pacientes con índice de Sokal alto se presenta muy cercana al 10%, que es el porcentaje encontrado por nosotros. La edad media, la hemoglobina, el número de plaquetas y el tamaño del bazo, en el momento del diagnóstico, son similares a las grandes series publicadas (KANTARJIAN 2006) (PALANDRI 2008) (CERVANTES 2003) (HOCHHAUS 2008).

II. EL TRATAMIENTO DE LA LMC CON IMATINIB: TOLERANCIA, DOSIS ADECUADA, INTERRUPCIONES.

La incorporación del IM al tratamiento de la LMC Ph (+) ha cambiado de forma drástica la evolución de la enfermedad. Desde su aparición en 1999, este fármaco ha demostrado que es capaz de bloquear la cadena de tirosincinasas sobre-activada por la oncoproteína BCR-ABL, impidiendo el progreso de la leucemia en una gran mayoría de los pacientes en fase crónica. Con estos resultados, se ha convertido en la opción terapéutica de primera línea en esta enfermedad (DRUKER 2001) (BACCARANI 2006).

1. Tolerancia

Tras 10 años de experiencia en el uso de IM, la tolerabilidad del fármaco puede calificarse como excelente (sobre todo contrastándola con las alternativas hasta el momento). Han sido varios los efectos que se ha atribuido al uso de la droga, pero con la experiencia acumulada en el uso de ésta, la mayoría pueden manejarse con relativa facilidad (DEININGER 2003). El estudio IRIS (*Estudio Internacional Randomizado sobre Imatinib*) ha constatado una incidencia acumulada de toxicidad no hematológica de 17%, que fue en general relativamente tolerable. Este mismo estudio documentó interrupciones del fármaco a causa de efectos secundarios en menos del 4%. En nuestra serie hemos observado toxicidad no hematológica que obligó a la reducción de la dosis administrada y posteriormente a la suspensión del fármaco en 3 pacientes y de éstos, en dos fue debido a una eritrodermia grave y en uno a fallo cardiaco.

El resto de eventos catalogados como toxicidad no hematológica se debieron en su mayoría a edemas parpebrales y en menor frecuencia a acumulación de líquido en otras zonas que, en general, se resolvieron sin problemas tras la administración de tratamiento diurético.

La toxicidad hematológica ha sido ya descrita como el efecto secundario más frecuente encontrado en pacientes tratados con IM. Neutropenia, anemia y trombopenia se han observado con una frecuencia del 16.7% en el estudio IRIS (DEININGER 2005). En nuestra serie hemos observado toxicidad hematológica en un total de 19 pacientes. De ellos 4 sufrieron citopenias severas grado III-IV que obligaron a suspensión definitiva del tratamiento tras reducción de la dosis. En el resto de los pacientes la toxicidad observada fue de grado I-II siendo en general bien tolerada, con suspensiones transitorias del fármaco, reducciones de dosis y tratamiento de soporte. En un total de 10 pacientes, a consecuencia de la toxicidad hematológica, se mantuvo el tratamiento a dosis aceptadas hoy en día como infraterapéuticas (<400mg/día). La dosis inicial de IM recomendada es de 400 mg/día para pacientes en fase crónica (PENG 2004) y 600 mg /día para aquellos en fase acelerada o blástica. Dosis menores de 400 mg se consideran sub-óptimas y en muy raras ocasiones deberían ser usadas (DININGER 2003) (TANAKA 2008).

En la actualidad, el no poder mantener una dosis adecuada de tratamiento, se considera factor pronóstico adverso (LARSON 2008). Es por esto que hoy en día, y propiciada por la experiencia tras el paso del tiempo, la estrategia a seguir cuando nos encontramos con citopenias secundarias al fármaco es bien distinta a la que realizábamos en los primeros ensayos clínicos “expanded access” en los que nos veíamos obligados a reducciones del fármaco y suspensiones transitorias. La tendencia actual es anticiparse a estos efectos secundarios mediante la administración de tratamientos complementarios con G-CSF y agentes eritropoyéticos, tras observar reducciones en el número total de neutrófilos, así como de la hemoglobina respectivamente (HEIM 2003) (MARIN 2003). Con estas intervenciones terapéuticas hemos conseguido disminuir de forma significativa el número de efectos adversos relacionados con la medicación, así como aumentar el número de pacientes que reciben las dosis aceptadas como óptimas para el tratamiento de la enfermedad.

No obstante, lo cierto es que, a pesar de estas estrategias, en nuestra cohorte, en 10 pacientes (8,6%), nos hemos visto obligados a mantener dosis de IM inferiores a 400 mg/día. De estos pacientes, 8 eran mayores de 70 años y las respuestas obtenidas con estas dosis fueron más satisfactorias que las esperadas para ellas. Siete pacientes se

encuentran en el último control en RMM, y de ellos, en 4 casos se trataron de RMM tardías.

Como se comenta con algún detalle en la introducción, hoy en día se está prestando un especial interés a los niveles plasmáticos de IM alcanzados, existiendo un proyecto internacional de análisis de estos niveles plasmáticos del fármaco con el que colabora nuestro centro, con el propósito de discernir entre los pacientes que, tras no alcanzar respuestas óptimas con las dosis de inicio habituales, podrían beneficiarse con su aumento (LARSON 2008).

El hecho de que la mayoría de nuestros pacientes en los que nos vimos obligados a reducciones de la dosis fueran mayores de 70 años y la mayoría de éstos, a pesar de ello, se encuentran en RMM, nos hace pensar que, quizás para estos pacientes, una dosis inferior a 400 mgr/día podría llevar al efecto terapéutico deseado y permitir la tolerancia del fármaco, dado que con ella se podrían alcanzar niveles plasmáticos adecuados de IM en personas mayores de 70 años. La razón de observar estos resultados no puede ser explicada con los datos de los que disponemos y podría estar en relación con el hecho de que al aumentar la edad, la metabolización del fármaco quizás esté disminuida, aumentando así la concentración plasmática, aunque estos hallazgos deberán ser corroborados por análisis complementarios y en un número de pacientes que permita la correlación con estas diferencias evolutivas presumibles.

2. Suspensión e interrupciones

Un tema que hoy día aún se debate por algunos autores es la duración del tratamiento con IM y la posibilidad de suspensión en pacientes con RMC. Los estudios *in vitro* sugieren que los fármacos inhibidores de la tirosinasa son potentes inhibidores de la producción y diferenciación de las células leucémicas presentes en sangre periférica, pero menos de las que se encuentran en la médula ósea (ANGSTREICH 2005) (MICHOR 2005) (COPLAND 2006). La experiencia publicada en pacientes que han abandonado el tratamiento con IM difiere de unos grupos a otros y no permite aún sacar conclusiones sobre este punto. No obstante sí que conocemos que, los pacientes que se podrían beneficiar de abandono del tratamiento, serían aquellos que

han obtenido al menos RMM. La serie más larga publicada es la de Rousselot *et al* en la que describen un total de 12 pacientes que abandonaron tratamiento con IM tras encontrarse en RMC. De los 12 pacientes estudiados, 6 de ellos mostraron evidencia de recaída a los 5 meses de interrumpir el tratamiento, aunque en los otros 6 se mantuvo una RMM. (ROUSSELOT 2007). Así, hoy en día, no tenemos experiencia para afirmar si es posible la suspensión del fármaco en aquellos pacientes que han mantenido las mejores respuestas. Actualmente y, gracias a la experiencia sobre pacientes que pierden la respuesta, puede señalarse que la mayoría vuelven a alcanzarla tras la reintroducción del fármaco. En un estudio en marcha (ROUSELOT 2007), se randomiza entre voluntarios con el objetivo principal de identificar grupos de pacientes en los que podría justificarse la suspensión del tratamiento, con un estrecho seguimiento de la EMR.

En nuestra cohorte, en los tres únicos casos que, por distintos motivos, suspendieron el tratamiento, hemos constatado la progresión de la enfermedad tras intervalos de tiempo, eso sí, muy variables. A falta de datos seguros y de un tiempo de seguimiento adecuado, no podemos considerar hoy en día que el abandono del tratamiento pueda ser una opción recomendable para nuestros pacientes.

Mención aparte merece el manejo de este tema en pacientes que suspenden IM porque desean quedarse embarazadas. El mayor estudio publicado de mujeres que se han quedado embarazadas durante el tratamiento con IM es el de Pye SM (PYE 2008): El 50% de las pacientes estudiadas que mantuvieron tratamiento con IM llegaron a gestación sin complicaciones e hijos sanos. El otro 50% sufrieron complicaciones que fueron desde muertes fetales a importantes malformaciones. Este mismo grupo había publicado antes una serie de 10 pacientes que suspendieron la terapia con IM durante la gestación (AULT 2006), aunque sólo una de ellas cuando se encontraba en RCC, e incluso una no había obtenido RHC. De estas pacientes, 6 presentaron empeoramiento de la respuesta citogenética y en 5 de ellas se observó pérdida de la respuesta hematológica. Una vez llevado a término el embarazo, se reintrodujo el IM, alcanzando 9 de las pacientes la RHC y mejoría de las respuestas citogenéticas, aunque RCC a los 18 meses únicamente se observaron en 3 pacientes, lo cual es bastante inferior a las series ya comentadas.

En nuestra serie, sólo una paciente deseó un embarazo programado y nuestra actitud fue la de esperar a la obtención de una RMM para la suspensión transitoria del medicamento, con una comprobación frecuente de los niveles de EMR, observando la pérdida de la respuesta molecular pero no de la hematológica, aunque el embarazo no llegó a término a causa de un aborto en el segundo mes.

Tras este primer intento, la terapia con IM fue reintroducida, obteniéndose de nuevo respuesta molecular completa a los cuatro meses de tratamiento. Después de completar seis meses de seguimiento, de acuerdo con la paciente se suspendió de nuevo IM y ésta se encuentra en la actualidad en el 7º mes de un nuevo embarazo, sin complicaciones, con pérdida de respuesta molecular, pero sin criterios citológicos ni clínicos de progresión de la LMC.

3. La cuestión de la dosis inicial

El IM fue aprobado por la FDA como tratamiento de la LMC Ph (+) en 2002, siendo la dosis inicial recomendada de 400 mg/día. Con el fin de mejorar las respuestas obtenidas por IM en primera línea de tratamiento sin aumentar demasiado los efectos secundarios, han sido varios los intentos por distintas compañías farmacéuticas por introducir nuevos inhibidores de la tirosincinasa en primera línea de tratamiento, así como de aumentar la dosis de IM. Los ensayos clínicos más destacados han sido los que comparaban IM a dosis de 800mg/día (HUGHES 2003) (CORTES 2003) con Nilotinib (CORTES 2007), Dasatinib, así como Bosutinib (JABBOUR 2008), todos en primera línea de tratamiento.

Nuestra experiencia con las nuevas indicaciones para tratamiento en primera línea en LMC Ph (+) no es evaluable, sino como “case study”: Un paciente que se trató dentro del ensayo clínico que comparaba entre IM 800mg Vs Nilotinib, fue asignado a la rama de IM 800mg, que tuvo que abandonar por eritrodermia. Este paciente no toleró de igual manera la dosis de 400 mg de IM por lo que la toxicidad es difícilmente atribuible a las dosis superiores de IM. En la actualidad se encuentra recibiendo tratamiento con Dasatinib, sin eritrodermia pero con limitante derrame pleural. Otro paciente entró en el ensayo clínico que comparaba Nilotinib 600 mg/día, Nilotinib 800

mg/día y Imatinib 400 mg/día, siendo asignado de forma aleatoria a la rama de Nilotinib 600 mg día y presentó toxicidad no hematológica grado III, consistente en elevación de amilasa y lipasa, que se normalizó tras la suspensión de 24 horas del fármaco y éste pudo ser reanudado a las dosis asignadas sin volver a experimentar dicha complicación.

Aún es pronto para evaluar las respuestas al tratamiento. Aunque nuestra experiencia con estos fármacos en primera línea de tratamiento es corta para sacar conclusiones sobre eficacia, sí que podemos concluir que, los efectos secundarios que hemos observado con el uso de estas nuevas terapias, son los esperados tras las descripciones realizadas en la literatura y en general, son manejables con un manejo adecuado y anticipado.

III. SOBRE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON IMATINIB DE LA LMC PH (+) EN FASE CRÓNICA.

1. Respuestas hematológicas

Según los criterios aceptados por el grupo LEUKEMIA NET, la evaluación de la respuesta a IM, a los 3 meses de tratamiento, se puede realizar únicamente mediante la respuesta hematológica al tratamiento, de tal manera que todo lo que no sea alcanzar RHC a los 3 meses se considera respuesta sub-óptima y el no alcanzar ningún grado de RH se considera fallo del tratamiento.

Todos los pacientes que completaron los 3 primeros meses de la terapia con IM, obtuvieron RHC dentro de ese plazo. Estas cifras son algo superiores a las esperadas según el estudio IRIS, que observó RHC en un 97% de los pacientes (O'BRIEN 2003). El hecho de no haber observado ninguna RH inferior a la completa a los 3 meses del tratamiento se debe, en nuestra opinión, a un tamaño muestral muy inferior al del estudio IRIS, así como la variabilidad entre nuestros pacientes y los de este estudio.

2. Respuestas citogenéticas

Las RC obtenidas en nuestra serie por intención de tratamiento han variado en función del tiempo. El número de RCC acumuladas ha sido del 40% a los 6 meses, del 61,5% a los 12 y del 67,8% tras 18 meses, observando hasta un 5% de respuestas tardías; el 26% de nuestra serie nunca obtuvo RCC (tabla 25). Los resultados obtenidos concuerdan con los de la literatura, donde están recogidos diferentes porcentajes de RCC. En estas revisiones se aprecian importantes diferencias entre los porcentajes de RCC en función de la administración de IM en primera línea o en posteriores líneas de tratamiento. Así, en estudios que incluían pacientes que habían sido tratados con anterioridad con IFN, bien por intolerancia o por progresión, el porcentaje de RCC a los 48 meses fue del 55% (KANTARJIAN 2002). En el estudio IRIS, en el que se compararon pacientes tratados en primera línea con IM frente IFN

más citarabina, la obtención RCC fue del 69% a los 12 meses, 76% a los 18 y un total de 11 % más alcanzaron RCC de forma tardía (DRUKER 2006).

Los resultados de nuestra serie constatan que los porcentajes de respuestas citogenéticas completas varían en concordancia directa con las diferencias en los tiempos previos al comienzo con IM, tal como está reflejado en la literatura y son peores en promedio cuando los tiempos son más prolongados (pacientes en segunda línea terapéutica). Para demostrar que, en nuestra serie, la obtención de respuestas citogenéticas, algo peores que las descritas por algunos grupos, se debe al importante número de pacientes que recibieron IM en segunda línea, nuestro grupo analizó las respuestas citogenéticas en función de la indicación de IM (HERRERA 2007), encontrando para los pacientes tratados en segunda línea un porcentaje de RCC, en algún momento del seguimiento, del 58%, mientras que para los pacientes que recibieron IM en primera línea, el 93% de los pacientes alcanzaron esta RCC en algún momento del seguimiento (tabla 26).

En nuestros resultados hemos hecho especial hincapié en las respuestas citogenéticas obtenidas a los 12 y 18 meses, ya que, el hecho de alcanzarla en estas fechas, se ha relacionado con mayor tasa de respuestas moleculares mayores, así como con mayor supervivencia libre de progresión, (KANTARJIAN 2003) (O'BRIEN 2003) (QIN 2008), al igual que vemos en nuestra serie donde la supervivencia global varía significativamente en función del tipo de respuesta citogenética alcanzada en estos meses.

Así, considerando que la respuesta a IM es hoy en día el factor pronóstico de mayor importancia en la evolución de la LMC y que, una de las principales formas de evaluar esta respuesta, es la de la obtención de RCC a los 12 y 18 meses, hemos analizado los datos obtenidos en el momento del diagnóstico con el fin de poder predecir, ya en este momento, los pacientes que van a responder o no de forma adecuada al tratamiento.

De esta forma, hemos analizado la probabilidad de obtener RCC a los 12 y 18 meses en función del índice de Sokal, y hemos comprobado una clara correlación entre las RCC y los índices de Sokal, expresada en una tendencia lineal: menor índice de

RCC en paralelo con peor índice pronóstico (tablas 27 y 28) Esta correlación, sin llegar a alcanzar la significación estadística, se encuentra muy cerca de ella ($p=,065$ para los 12 meses y $p=,107$ para los 18 meses). Estos resultados concuerdan con los encontrados en la literatura de los grupos con mayor número pacientes. El estudio IRIS recoge obtención de RCC de 89%, 82% y 69% para pacientes de bajo, intermedio y alto riesgo según Sokal (DRUKER 2006). El grupo de MD Anderson en el que estudian a 279 pacientes tratados con IM en primera línea de tratamiento, observan RCC de 87%, 94% y 69%, para pacientes de bajo, medio y alto riesgo según Sokal (KANTARJIAN 2006). De igual manera, hemos estudiado variables clínicas y analíticas cuantitativas, obtenidas en el momento del diagnóstico, con el fin de poder diferenciar pronósticos en función de estos grupos de riesgo. El estudio se ha realizado de forma univariable en lugar de multivariante, en primer lugar debido a que muchos de estos datos ya están incluidos en el índice de Sokal, por lo que no se hizo regresión logística múltiple por colinealidad entre la variable de Sokal y las otras variables. Además, el número de variables que se pueden utilizar en un estudio multivariante son 1 por cada 10 pacientes de la cohorte, necesiándose, al menos, 5 eventos (ya sean muerte, no respuesta o progresión de la enfermedad) en cada variable, lo que en nuestro caso dado el escaso número de eventos no es posible.

Los datos al diagnóstico estudiados han sido: el tamaño del bazo medido en cm desde el reborde costal, el número total de leucocitos, así como el recuento total de plaquetas en el momento del diagnóstico. En nuestra serie hemos encontrado una importante asociación entre el aumento del tamaño del bazo y la probabilidad de alcanzar una RCC, aunque sin llegar a la significación estadística ($p=,097$). Valorando el resto de parámetros no se ha encontrado ninguna otra asociación (tabla 29). Estos datos cotejan bien con algunos ya recogidos en la literatura, aunque en general, intentando relacionarlos con la supervivencia global y con la supervivencia libre de progresión. (KANTARJIAN 2006).

3. Respuestas moleculares

Hay que recordar aquí que el propósito de una monitorización molecular para la LMC es anterior a la aparición de los tratamientos con inhibidores de tirosincinasas. Así, la PCR “competitiva” ya se había usado para medir la leucemia residual con el tratamiento con IFN- α y también después del alo-TPH: el número de transcritos BCR-ABL en sangre se correspondía con el porcentaje de metafases Ph (+) en médula ósea (CROSS 1993). Se demostró que el aumento en el número de transcritos en pacientes post-trasplantados predecía la recaída hematológica y citogenética. Pero ha sido en los pacientes tratados con IM en los que la medida de la enfermedad residual mediante RT-PCR se ha generalizado hasta constituir un parámetro de máxima aplicabilidad en la clínica (HUGHES 2006).

La extensión de su uso ha propiciado el de nuevos índices de respuesta: la llamada respuesta molecular. El parámetro biológico que mejor se correspondía con la evolución clínica hasta este momento era el porcentaje de células Filadelfia (Ph) negativas en el cariotipo, con las correspondientes distinciones entre niveles de respuesta, desde completa a nula. En principio, la RT-PCR aporta una sensibilidad muy superior (hasta 10^4 células), lo que es particularmente importante en todos los casos de negativización persistente del cromosoma Ph, comprobada por FISH (BRANFORD 1999).

Nuestro grupo corroboró la excelente concordancia de la RT-PCR con los resultados de citogenética, examinando su valor como test con el método estadístico de valoración mediante curvas ROC. Con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95%, a un paciente con nivel de transcritos BCR-ABL inferior a 0.2%, le corresponde estar en RCC y en RMM (HERRERA 2004).

En cuanto a la posibilidad de comparar los resultados obtenidos por distintos centros, existe y está en marcha en la actualidad un proyecto de estandarización de las técnicas, tanto a nivel nacional como internacional, para validarlas con muestras normalizadas en un laboratorio central. También se pretende consensuar y aplicar un índice de corrección para hacer comparables los resultados de centros que utilizan distintos genes control. Nuestro grupo del Hospital Ramón y Cajal colabora en este proyecto (HUGHES 2006).

En nuestra serie, al igual que pasaba con la obtención de respuestas citogenéticas, las respuestas moleculares varían en función del tiempo, encontrándose RMM a los 12 y 18 meses en un 38,6% y en un 56,3% respectivamente. Hemos observado RMM tardías en un 16,2% de los pacientes, mientras que un 26,6% de ellos nunca han alcanzado RMM (tabla 30).

Estas respuestas son inferiores a las obtenidas en el estudio IRIS donde se recogen RMM a los 12 meses del 53% y tardías de hasta el 80%. Las diferencias encontradas se deberán, al igual que observamos en las RCC, a la diferencia de la muestra estudiada.

La importancia en evaluar la respuesta molecular a los 12 y 18 meses de tratamiento es debido a que, con un seguimiento de 60 meses, en el estudio IRIS no se ha observado progresión de la enfermedad en aquellos pacientes que alcanzaron RMM.

Descrita así la obtención de la RMM como un importante factor pronóstico, nuestro grupo, una vez más, ha intentado correlacionar el estado de la última respuesta molecular medida en cada paciente en función del índice de Sokal al diagnóstico. Hemos observado una importante correlación lineal en la que, a peor índice pronóstico, se observa una probabilidad más baja de encontrarse en RMM en el último control realizado. Describimos así probabilidades de encontrarse en RMM del 71,9%, 51,6% y 42,9% para grupos de bajo, medio y alto riesgo según Sokal respectivamente (tabla 31).

El estado de la última respuesta molecular disponible en cada paciente se ha correlacionado con el índice de Sokal y observamos que, al pasar de índices de Sokal bajo a intermedio, se duplica la probabilidad de no encontrarse en RMM en el último control, mientras que, al pasar de índice de Sokal bajo a alto, se cuatriplica la probabilidad de no encontrarse en RMM.

4. Tipo de respuesta según criterios de respuesta al tratamiento establecidos por el comité internacional de expertos: Leukemia.Net.

Tras demostrarse la importancia de la respuesta a IM como factor pronóstico más relevante de la evolución de la LMC, la monitorización individual de la respuesta es ya hoy en día una técnica habitual en cada centro.

Esta monitorización, no solo incluirá las respuestas hematológicas, citogenéticas y moleculares, sino, lo que es más importante, una combinación de estas respuestas en el tiempo, respuestas que se han denominado como fallo, advertencia, respuesta sub-óptima y respuesta óptima, según los criterios establecidos por el comité internacional de expertos LEUKEMIA NET.

El poder identificar el tipo de respuesta de cada paciente en el tiempo, no solo nos permitirá predecir la evolución de la enfermedad, sino que, hoy en día, las recomendaciones terapéuticas se basan en estas respuestas. Así, como ya se ha comentado, con un largo seguimiento de la enfermedad, no se han observado progresiones en aquellos pacientes que obtuvieron RCC y RMM a los 12 o 18 meses (respuesta óptima), por lo que la recomendación actual es la de continuar con el fármaco.

No obstante, la actitud a seguir debe ser diferente cuando se objetiva fallo al tratamiento, dado que la supervivencia disminuye respecto a adquirir respuesta sub-óptima o respuestas óptimas. Así, el estudio Iris describe, además de esa SLE ya comentada del 100% para aquellos pacientes que obtienen RCC y RMM a los 12 y 18 meses, supervivencias de 95% y 98% para los que adquieren RCC, pero remisiones moleculares <Ratio 0,1 a los 12 y 18 meses, frente a supervivencias de 88% y 87% para aquellos pacientes que no obtienen RCC a los 12 y 18 meses. Aunque estas SLE son bastantes superiores a las conseguidas con las terapias anteriores y, a pesar de haberse descrito porcentajes de respuestas tardías, dado que existen nuevas estrategias, en la actualidad, la recomendación es la de aumento de dosis de IM o cambio a uno de los nuevos inhibidores de la tiroisincinasa, ya sea alguno de los ya aprobados como tratamiento de segunda línea (Dasatinib o Nilotinib), o bien incluyendo al paciente en alguno de los ensayos clínicos con nuevas moléculas que se están realizando en el

momento actual. Así, en este momento, no parece haber existir duda en la actitud a seguir en aquellos pacientes que presentan respuestas óptimas o fallo del tratamiento. No será el caso de la actitud a seguir en pacientes que presentan respuestas sub-óptimas y es éste el punto que está siendo más debatido por los diferentes grupos en el momento actual. Por una parte, parece razonable el aspirar a un porcentaje de SLE del 100% en los pacientes, aunque esto implique un cambio de estrategia terapéutica, pero lo cierto es que esa misma SLE es de aproximadamente el 98% para pacientes con respuestas sub-óptimas (DRUKER 2006), dado que, como ya se ha comentado, se han observado respuestas tardías, sin olvidar que el cambio de estrategia terapéutica no garantiza el mejorar la respuesta en estos pacientes con buena respuesta citogenética y no tan buena molecular. Por otra parte, otros grupos con importante número de pacientes como es el caso del Imperial London Collage, con más de 200 pacientes tratados en primera línea, encuentran correlación entre alcanzar RCC con la SLP pero, una vez alcanzada ésta, no encuentran mejorías al alcanzar RMM.

He analizado el tipo de respuesta de los pacientes a los 12 y 18 meses con el fin de poder correlacionar estas respuestas con los datos obtenidos al diagnóstico y poder identificar así, en el momento del diagnóstico, grupos de riesgo que permitan predecir el tipo de respuesta en función de estos grupos y con ello la evolución de la enfermedad.

Así, para aquellos pacientes en los que estuvo disponible la monitorización de la enfermedad mínima residual desde un momento precoz, las tasas de respuestas óptimas fueron del 62 y del 39% a los 12 y 18 meses respectivamente, las respuestas sub-óptimas se observaron en el 12 y 24% a los 12 y 18 meses y los fallos de tratamiento en el 25 y 37% respectivamente para las mismas fechas (tablas 32 y 33). Estas respuestas, significativamente inferiores a las reflejadas por otros grupos, se deben, como ya se ha comentado, a que esta cohorte, al contrario que otras series de muchos pacientes reflejadas en la literatura, no es uniforme en cuanto a la indicación de IM encontrándose además un importante sesgo en cuanto a las respuestas medidas por criterios de LEUKEMIA NET, dado que, los pacientes que no respondieron de forma adecuada a tratamiento fueron derivados a nuestro centro para optar a los nuevos inhibidores de segunda línea. Por otra parte, existe un buen número de pacientes en primera línea en los que todavía no se ha llegado a la monitorización del mes 18. Estos pacientes,

presumiblemente se acercan más al tipo de paciente que se describen en las grandes series y, posiblemente, mejorarán las respuestas de nuestra serie.

En nuestra cohorte, estas respuestas predicen la evolución de la enfermedad tal y como mostramos al comentar las gráficas de supervivencia. Con el fin de poder identificar grupos de riesgo en el momento del diagnóstico que pudieran relacionarse con el tipo de respuesta, hemos analizado el índice de Sokal, encontrando una correlación estadística entre los grupos de riesgo y el tipo de respuesta obtenida a los 12 meses ($p=,007$), así como una importante correlación lineal entre el índice de Sokal y el tipo de respuesta a los 18 meses ($p=,065$) (tablas 34 y 35). Estos datos concuerdan con los reflejados en la literatura en donde se observa que el índice de Sokal predice respuestas citogenéticas y moleculares en las series con mayor número de pacientes, independientemente de haber recibido tratamiento previo o no (O'BRIEN 2003) (CERVANTES 2003).

5. Respuestas sub-óptimas y fallo de tratamiento.

5.1 Respuestas sub-óptimas

En nuestra serie encontramos un total de 18 respuestas sub-óptimas. La evolución de éstas, al igual que en la experiencia recogida en la literatura, resulta poco homogénea: En 8 pacientes, se alcanzó RMM en algún momento de la evolución, mientras que el resto no la alcanzó e incluso en 2 casos se objetivaron pérdidas de RCC. Hemos observado que hay una probabilidad de 50% de no alcanzar RMM para los pacientes con respuestas sub-óptimas y un 11% de pérdidas de respuestas citogenéticas, en comparación con una probabilidad del 8 % de perder la RMM y ningún caso de pérdida de RCC para aquellos pacientes que obtuvieron respuestas óptimas (todo ello en los intervalos señalados por la propuesta de LEUKEMIA NET).

A pesar de que se han descrito con relativa frecuencia RMM tardías, el hecho de no alcanzar RMM a los 18 meses, aunque se haya conseguido una RCC, debe ser considerado, de acuerdo con los expertos de LUKEMIA NET, como un factor de riesgo

hacia la progresión. El clínico avisado debería hacer un seguimiento estrecho del paciente, así como plantearse posibles estrategias terapéuticas alternativas.

El grupo de la Universidad de Oregón estudió 85 pacientes con RCC de un conjunto heterogéneo que incluía pacientes tratados en primera y segunda línea. De éstos, el 51% no alcanzó RMM en el momento de la RCC, comparándolos con aquellos que sí hicieron RMM y encontraron una ventaja en la SLE estadísticamente significativa para los pacientes que obtuvieron la RMM, así como una probabilidad 7 veces mayor para la progresión de la enfermedad para los pacientes que no obtuvieron RMM. En el análisis multivariante realizado por este grupo, el hecho de no alcanzar una respuesta molecular mayor en ningún momento de la evolución fue el único factor predictivo de progresión (PRESS 2006).

5.2 Sobre los resultados con aumento de las dosis iniciales:

En 18 pacientes se consideró que se daban las circunstancias para proceder a un aumento en las dosis de IM. Entre estos casos, hubo dos en los que se cumplían los criterios de la denominada respuesta sub-óptima al tratamiento y se consiguió una RMM en uno de ellos. En los 16 restantes, la subida de las dosis se decidió por constatar fallo del tratamiento: en 3 pacientes se consiguió RMM, otros 3 alcanzaron RCC pero no RMM y en los demás pacientes (10 casos) no se alcanzó mejoría de la respuesta a pesar del citado aumento de dosis.

El aumento de dosis en pacientes con respuesta sub-óptima, como ya se ha reflejado, en la actualidad no es una actitud habitual en todos los centros y por tanto existe a día de hoy poca experiencia. Parece existir la opinión de que, la subida de dosis está más indicada cuando, durante la monitorización del paciente, se observa un aumento progresivo de los transcritos BCR-ABL, que en aquellos casos en los que éstos, aún sin llegar a alcanzar la RMM, se mantienen estables y se mantiene una respuesta citogenética completa (PRESS 2006) (PRESS 2007). Esta experiencia, unida a la evidencia de la importante incidencia de respuestas moleculares mayores “tardías” (intervalo >18 meses), hace difícil extraer conclusiones que puedan generalizarse para todas las evoluciones. Quizás los resultados de los ensayos clínicos (en los que nuestro

centro ha participado) en los que se compara el aumento de dosis de IM con la utilización de nuevos inhibidores, ante la presencia de criterios de respuesta sub-óptima, proporcionen alguna información fiable sobre esta cuestión.

Punto y aparte merece el tema del aumento de dosis en pacientes con fallo terapéutico. El número elevado de pacientes en los que optamos por esta estrategia vino condicionado por ser el único tratamiento disponible en aquel momento en algunos pacientes, antes de someterlos a un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. (MARIN 2003) (JABBOUR 2006). En nuestro caso se alcanzaron RCC en el 37 % de los pacientes, de los cuales la mitad obtuvieron además una RMM. Estos resultados son quizás algo inferiores a los conseguidos con el uso de nuevos inhibidores de la tirosinasa. (HOCHHAUS 2007) (KANTARJIAN 2007) (PUTTINI 2006), pero hay que señalar con respecto a ello que el tamaño de la serie y sus características no la hacen comparable.

Existen pocos estudios sobre la eficacia del aumento de dosis de IM en pacientes resistentes o intolerantes a éste y la experiencia es similar en todas las series descritas. En una pequeña serie se constataron efectos ventajosos con la subida de 300 mg a 600 mg/día o de 400 a 800 mg/día, obteniendo un 56% de RCM (ZONDER 2003). En una comparación con mayor número de pacientes se intentó valorar la eficacia del tratamiento con dosis de IM de 800 mg/día frente al tratamiento con Dasatinib en pacientes tratados previamente con dosis de 600 mg/día. Se obtuvieron 52% de RCM en el brazo de Dasatinib, frente a sólo un 33% en el brazo con dosis altas de IM. En un pequeño grupo de pacientes con mutaciones afectando al *P-loop*, las respuestas fueron 50% y 0%, respectivamente (MARTINELLI 2007).

Aunque estos resultados no son muy satisfactorios, la estrategia parece estar justificada al existir estudios que muestran resistencias de algunas mutaciones de BCR-ABL con menor sensibilidad a IM, pero no resistencia completa. Esa amplificación y sobreexpresión de BCR-ABL puede conferir resistencias que en algunos casos pueden verse superadas por aumento de dosis. (ROUMIANTSEV 2002) (AZAM 2003) (SHAH 2002). En base a estos datos, parece que estaría justificado en los fallos intentar aumento de dosis a 400 o mejor 600 mg /día (siempre y cuando no se identifiquen

mutaciones en el *P- loop*), pero, si no se obtiene respuesta con esta dosis de 600 mg/día, la estrategia más adecuada sería el cambio a inhibidores de segunda generación.

5.3 Los fallos del tratamiento

En nuestra serie hemos encontrado un total de 24 fallos al tratamiento. De éstos, en dos casos fue por pérdida de respuestas citogenéticas después de haber alcanzado respuesta sub-óptima a los 18 meses.

Pudimos realizar un cambio de estrategia en 12 pacientes: En 4 se realizó alotrasplante de progenitores hematopoyéticos, dado que no estaban disponibles inhibidores de segunda generación y los pacientes fueron considerados como buenos candidatos para el procedimiento; todos ellos fallecieron por causa relacionada con el procedimiento. En 8 pacientes se procedió al cambio de inhibidores de la tirosincinasas de segunda generación (Nilotinib en 1 paciente y Dasatinib en 7) cuyos resultados se comentarán en el apartado IV.

De los 24 fallos terapéuticos, en 3 pacientes se perdió el seguimiento (casos enviados por otros hospitales) y en 5 se evidenció progresión de la enfermedad. Estos datos se asemejan a los del estudio IRIS, donde se pronostica y comprueba una SLP de aproximadamente el 80%, incluso para aquellos paciente que no consiguieron RC parciales.

Se observaron RCC tardias en 3 pacientes (12%), una proporción un tanto menor que la observada en el estudio IRIS, donde se recogen probabilidades de aproximadamente 20% de alcanzar RCC en aquellos pacientes que no la obtuvieron a los 12 meses. Un paciente continúa a día de hoy con RHC, pero sin alcanzar RCC.

IV. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS CON OTROS INHIBIDORES DE TIROSINCINASAS

1. *Nilotinib*

En nuestra serie, la experiencia con Nilotinib es difícilmente valorable al tratarse de un número de pacientes mínimo y con la indicación, hasta el momento (en la cohorte a la que se refiere esta tesis), solamente para pacientes intolerantes o resistentes a IM, en el marco de ensayos clínicos.

En una paciente se inició el tratamiento con Nilotinib tras constatarse una resistencia secundaria a IM (después de tener una remisión citogenética completa confirmada en los primeros 12 meses). Poco después de dar comienzo el tratamiento con Nilotinib supimos que el estudio por secuenciación de DNA, que se realiza en los pacientes resistentes, había revelado la presencia de una mutación T315I. Poco tiempo después la enfermedad progresa a crisis blástica, sin respuesta a la terapia que se intenta y se produce el fallecimiento.

El tratamiento de esta mutación T315I hoy en día es objetivo de ensayos clínicos específicos con moléculas recién descubiertas que han evidenciado alguna eficacia para su control (MK-0457). Otra opción es intentar un trasplante alogénico, dado que los inhibidores de segunda línea que están hoy día disponibles no parecen ser eficaces contra las LMC que presentan esta mutación (O'HARE 2007) (GILES 2007) (KHORASHAD 2006).

La experiencia con el otro paciente con tratamiento en primera línea en ensayo clínico, no puede ser valorable, por la brevedad del seguimiento, en el momento de escribir esta discusión.

2. Dasatinib

Como se ha detallado en los *resultados*, hemos tenido ocasión de utilizar Dasatinib en el marco de varios ensayos clínicos fase II y fase III de BMS y por lo tanto en distintas indicaciones, lo que sin duda ha condicionado de alguna manera los tipos de respuestas observadas.

- Los dos pacientes que fueron tratados por intolerancia a IM se encuentran en la actualidad en RMM, aunque uno de ellos con limitante derrame pleural. Estas respuestas, en nuestra corta experiencia, mejoran las publicadas, que describen tasas de RCC para pacientes intolerantes a IM de 68%.

- De los 6 pacientes que iniciaron Dasatinib por fallo de tratamiento, hemos observado un 50% de RCC, 1 paciente con respuesta citogenética parcial, otro con RC nula y 1 paciente en el que se objetivó progresión de la enfermedad y falleció. Estas respuestas son superponibles a las publicadas de los diferentes ensayos clínicos y este fármaco parece una opción interesante para aquellos pacientes con fallo a IM. Dado que hoy en día, salvo el trasplante de progenitores hematopoyéticos, fuera de ensayos clínicos, no existen otras opciones para pacientes resistentes o intolerantes a IM, el uso de inhibidores de segunda generación es una opción más que justificada. No obstante, aún debemos aprender el manejo adecuado de éstos, entre lo que se incluye el saber cuando debemos valorar la respuesta a estos fármacos para plantearnos, en caso de ausencia de respuesta, nuevas opciones terapéuticas (CONSTANTINE 2008).

V. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

La supervivencia global de la serie a los 4 años de tratamiento fue de 82% (Error típico ,061) con una mediana de seguimiento aún no alcanzada (figura 15).

Estas supervivencias son algo inferiores a las recogidas en las grandes series a las que hemos hecho mención, pero hay que recordar que éstas se refieren fundamentalmente a pacientes tratados en primera línea. Por nuestra parte, cuando analizamos la supervivencia en función de la línea de tratamiento, observamos cómo es significativamente mayor en los pacientes tratados en primera línea (figura 16).

Es muy interesante observar que, para los pacientes tratados en primera línea, todos los eventos ocurrieron en los 2 primeros años del inicio de tratamiento, alcanzándose posteriormente una meseta, tal y como se describen en las series más numerosas (figura 16).

Serían por lo tanto los pacientes tratados en primera línea los que se asemejarían más a los estudiados en las series publicadas, aunque con un seguimiento algo menor. La progresión de la enfermedad que hemos observado en el 8% de los pacientes, representa un porcentaje muy similar a los reflejados en la literatura.

Igualmente se observa, con significación estadística, cómo estas supervivencias alcanzadas se modifican en función de la respuesta citogenética obtenida a los 12 y 18 meses del tratamiento (figuras 17 y 18), por lo que, al igual que como ocurre en otras series ya comentadas, la obtención de RCC marcará la evolución de la enfermedad, convirtiendo, de esta manera, la respuesta a IM como el factor pronóstico de mayor peso en la evolución de la LMC.

VI. FACTORES PRONÓSTICO

Durante toda la presentación y discusión de los resultados se han comprobado las excelentes respuestas que hoy día se alcanzan con IM y, al haber cambiado este tratamiento demostradamente la evolución “natural” de la enfermedad en una muy alta proporción de los pacientes, sin lugar a dudas, el principal factor pronóstico en la LMC hoy en día, será la respuesta que el paciente obtenga con IM.

Las respuestas hematológicas, citogenéticas y moleculares con IM han supuesto, valoradas en los intervalos concretos previstos, el índice más fiable para distinguir entre los pronósticos de nuestros enfermos y para detectar con antelación la aparición de problemas evolutivos.

A pesar de estos resultados tan satisfactorios, existe un grupo de pacientes que no van a responder a la terapia con IM. Hemos visto cómo, en los pacientes que no consiguen una respuesta óptima, no sólo empeora el pronóstico, sino que el manejo en ese momento es, a día de hoy, bastante complejo. Es por esto que consideramos de gran interés poder identificar en el momento del diagnóstico aquellos grupos de pacientes que no van a responder de forma adecuada a la terapia con IM y por tanto su SLE estará muy menguada, para realizar así un seguimiento estrecho de este grupo de riesgo y, quien sabe si en un futuro, valorar si constituyen un subgrupo de enfermos que podría beneficiarse de alternativas al IM, ya sea con inhibidores de segunda o tercera generación, con el trasplante alogénico o con otros procedimientos que puedan surgir.

Con este propósito hemos tratado de identificar el poder predictivo para el tipo de respuesta mediante una sencilla fórmula matemática de parámetros clínicos y analíticos al diagnóstico, de fácil realización.

El índice de Sokal se correlaciona, con significación estadística, con el tipo de respuesta al IM que alcanzará un paciente según los criterios de LEUKEMIA NET, de

tal forma que los pacientes de alto riesgo SOKAL tienen una probabilidad significativamente inferior de alcanzar respuestas catalogadas como óptimas.

Hemos encontrado también una importante correlación que, aunque sin alcanzarla, se aproxima a la significación estadística, entre los grupos de riesgo según criterios de Sokal, el tamaño del bazo y el tipo de respuestas citogenéticas que alcanzan los pacientes que, como ya se ha repetido, es el factor que marca con mayor peso la evolución de la enfermedad.

Tras demostrar la excelente concordancia entre la RT-PCR con los resultados citogenéticos, vemos las respuestas moleculares como el método diagnóstico más sensible del que disponemos para monitorizar las evoluciones, midiendo la “cantidad” de efecto terapéutico, la dimensión del bloqueo sobre la actividad tirosinasa patológica.

Si ya se ha descrito que una respuesta citogenética mantenida a lo largo del tiempo es una garantía muy importante contra las probabilidades de padecer la progresión de la enfermedad, una respuesta molecular mayor o completa mantenida, es sin duda un factor predictivo de máxima relevancia. Y es interesante señalar que los pacientes de alto riesgo SOKAL tienen cuatro veces más probabilidades de no encontrarse en RMM a lo largo de la evolución, que los pacientes de bajo riesgo.

Por fin, nos hemos interesado en la búsqueda de otros criterios biológicos, como las fosfoproteínas implicadas en la cadena de señales, analizadas por citometría de flujo, para intentar distinguir entre distintas sensibilidades al inhibidor de tirosinasa. Precisamente con la molécula CRKL (ó fosfo-CRKL: pCRKL) el grupo de la universidad de Mannheim ha comunicado resultados en el sentido de que diferencias en las líneas celulares en cuanto a la inhibición de esta fosfoproteína, distinguen entre pacientes resistentes a Imatinib en tratamiento con Nilotinib (LA ROSEE 2008). En nuestro análisis de 6 pacientes, pCRKL discriminaba a 3 pacientes sin alto nivel de inhibición vs. los otros 3 casos con buena respuesta

Posiblemente tenga que ser una combinación entre los datos clínicos al diagnóstico, tipo índice de SOKAL, las respuestas moleculares en un plazo determinado

de tiempo (en la línea LEUKEMIA NET), afinadas mediante un seguimiento más prolongado) y algún criterio biológico que detecte diferencias individuales en las cadenas enzimáticas implicadas, lo que proporcione en el futuro esta discriminación pronóstica.

CONCLUSIONES

1. Nuestra experiencia corrobora que el tratamiento con Imatinib en la dosis inicial de 400mg/día, es en la actualidad el tratamiento de elección en LMC Ph+ en FC, ya que consigue, en la mayoría de los pacientes, remisiones hematológicas, citogenéticas y moleculares, como nunca se habían obtenido con los tratamientos anteriores, y con un incremento significativo de la supervivencia global.
2. Hemos comprobado con significación estadística que el tipo de respuestas citogenéticas obtenidas a los 12 y 18 meses predice la evolución de la enfermedad, lo que convierte la respuesta a Imatinib en el factor pronóstico más importante. Destacan las notables diferencias entre los pacientes tratados en primera línea respecto a los que recibieron Imatinib en segunda o más líneas de tratamiento.
3. Los criterios propuestos por el comité Leukemia.net tienen aplicabilidad en la práctica clínica, pero lo que se denomina en estos criterios “respuesta subóptima” precisa de la comprobación de parámetros complementarios si ha de ser útil para la discriminación pronóstica individual, por la heterogeneidad de las evoluciones agrupadas en este nivel de respuesta.
4. Los grupos pronósticos que se fundamentan en los datos al diagnóstico correlatan con las respuestas a Imatinib, observando que un índice Sokal de alto riesgo se corresponde con una proporción mucho más elevada de fracasos terapéuticos que la de los niveles intermedio y bajo.
5. La medición de la fosfoproteína CRKL mediante citometría de flujo es una interesante línea de investigación para poder discriminar, en el momento del diagnóstico, aquellos pacientes que no van a responder de forma adecuada a la terapia con Imatinib.

BIBLIOGRAFIJA

- Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993; 75:175-185
- Angstreich GR, Matsui W, Huff CA et al. Effects of imatinib and interferon on primitive chronic myeloid leukaemia progenitors. *Br J Haematol* 2005; 130:373-381.
- Apperley JF. Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Lancet Oncol* 2007; 8:1018-1029.
- Ault P, Kantarjian H, O'Brien S et al. Pregnancy among patients with chronic myeloid leukemia treated with Imatinib. *J Clin Oncol* 2006; 24:1204-1208.
- Azam M, Latek RR, Daley GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003; 112:831-843.
- Baccarani M, Saglio G, Goldman J et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia, recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108: 1809-1820.
- Baccarini M, Rosti G, de Vivo A et al. A randomized study of interferon- α versus interferon- α and low dose arabinosil cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 99(5):1527-1535.
- Baikalov AG, Court Brown WM, Buckton KE et al: A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature*.1960; 188:1165-1166.

- Bain BJ. Cytogenetic and molecular genetic aspects of eosinophilic leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 122:173-179.
- Bain, BJ. Eosinophilic leukaemias and the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 1996; 95:2-9.
- Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E et al. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2005; 65: 8912-8919.
- Barret J. Allogenic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2003; 40: 59-71.
- Bauermeister DE: Quantitation of bone marrow reticulin: A normal range. *Am J Clin Pathol* 1971; 56:24-31.
- Bedi A, Barber JP, Bedi HC et al. Bcr-Abl mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995; 86:1148-1158.
- Bennett, JM, Catovsky, D, Daniel, MT et al. The chronic myeloid leukaemias: Guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol* 1994; 87:746-754.
- Blickstein D, Aviram A Luboshitz J, et al. BCR-ABL transcripts in bone marrow aspirates of Philadelphia-negative essential thrombocytopenia patients: Clinical presentation. *Blood* 1997; 90:2768-2771.

- Bloomfield, CD, Secker-Walker, LM, Goldman, AI et al. Six-year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40:171-85.
- Boggs DR: Hematopoietic stem cell theory in relation to possible lymphoblastic conversion in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1974; 44:449-451.
- Brandford S, Ruzdzki Z, Parkinson I et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 2004; 104:2926-2932.
- Brandford S, Ruzdzki Z, Walsh S et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003; 102: 276-283.
- Brandford S, Seymour JF, Griff A, Arthur AS, Lynch K, Hughes T. Increasing frequency and marked stability of the complete molecular response is observed in imatinib-treated CML patients with long-term follow up. *Blood*. 2006; 108. Abstract no. 430.
- Brandorf S, Hughes TP, Ruzdzki Z et al. Monitoring chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol* 1999; 107: 587-599.
- Brandford S, Hughes TP, Ruzdzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol*. 1999; 107:587-599.

- Branford S, Rudzki Z, Walsh S et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003; 102: 276–283.
- Burger H, van Tol H, Brok M, et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 747-752.
- Burgess MR, Skaggs BJ, Shah NP et al. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:3395-3400.
- Burgess MR, Skaggs BJ, Shah NP et al. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:3395-3400.
- Buschle M, Janssen JWG, Drexler H et al: Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: Clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation . *Leukaemia* 1988; 10:658-660.
- Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by BCR/ABL. *J Exp Med* 1996; 183: 811-820.

- Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Steegman JL et al. Imatinib mesylate therapy of chronic phase chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to interferon: results and prognostic factors for response and progression-free survival in 150 patients. *Haematologica* 2003; 88:1117-1122.
- Cervantes F, Hernandez-Boluda JC, Steegmann JL et al. Imatinib mesylate therapy of chronic phase chronic myeloid leukemia resistant or intolerant to interferon: results and prognostic factors for response and progression-free survival in 150 patients. *Haematologica* 2003; 88:1117-1122.
- Cilloni D, Messa F, Gottard E, et al. Sensitivity to imatinib therapy may be predictive by testing Wilms tumor gene expression and colony growth after in vitro incubation. *Cancer* 2004; 101:979-989.
- Cohen PR, Talpaz M, Kurzrock R: Malignancy associated Sweet's syndrome: a review of the world's literature. *J Clin Oncol* 1988; 12:1887-1897.
- Copland M, Hamilton A, Elrick LJ et al. Dasatinib (BMS354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 2006; 107: 4532-39.
- Cortes J, O'Brien S, Jabbour E et al. Efficacy of nilotinib (AMN 107) in patients with newly diagnosis previously untreated Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia in early chronic phase (CML-CP). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 110:29.
- Cortes JE, Talpaz M, Giles F et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 101:3794-800.

- Cortes JE, Talpaz M, Kantarkian H: Chronic myelogenous leukaemia: a review, *Am J Med.*1996; 100:255-270.
- Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signaling requirements for BCR-ABL mediated trasformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5531-5541.
- Coutre P, Giles F, Apperley J et al. Nilotinib is safe and effective in acelérate phase chronic lyelogenous leukemia patients with imaitinib resistance or intolerante. *Blood* 2008; 111:1834-1839.
- Cross NC, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive Polymerase Chain Reaction to Estimate the Number of BCR-ABL Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia Patients After Bone Marrow Transplantation. *Blood* 1993; 82:1929-1936.
- Crossman LC, Druker BJ, DeiningerMW et al. Hoct1 and resistance to imatinib. *Blood* 2005; 106:1133-1134.
- Crossman LC, Luriaux M, Vartanian K et al. Gene expresión profiling of CML CD34+ cells prior to imatinib therapy reveals differences between patients with and without subsequent complete cytogenetic response. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2005; 106:1222a.
- Crossman LC, Mori M, Hsieh YC et al. In chronic myeloid leukemia white cells from cytogenetic responders and non-responders to imatinib have very similar gene expression signaturas. *Haematologica* 2005; 90:459-464.
- De klein, A., van kssel, A., Grosveld, G. et al. A celular oncogeme is translocated to the Philadelphia cromosoma in chronic myelocityc leucemia. *Nature* 1982; 300:765-767.

- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105:2640-2653.
- Deininger MW, Cortes L, Paquette R et al. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. *Cancer* 2007; 110:1509-1519
- Deininger MW, O'Brien SG, Ford JM et al. Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J Clin Oncol* 2003; 21:1637-1647.
- Denu JM, Tanner KG. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide. Evidence for a sulfenic and intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 1998; 37:5633-5642.
- Dowding C, Th'ng KH, Goldman JM, Gallon DAG. Increased T lymphocyte numbers in chronic granulocytic leukaemia before treatment. *Exp Hematol* 1984; 12:811-815.
- Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogen* 2003; 22:7340-7358.
- Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 30-38.
- Druker B J. Circumventing resistance to kinase-inhibitor therapy. *N Engl J Med* 2006; 354:2594-2596.
- Druker BJ, et al. Five-years follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355:2408-2417.

- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM et al. Activity of a specific inhibitor of the BCRABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001; 344:1038-1042.
- Druker BJ. Long term Benefit of imatinib for patients newly diagnosed with chronic myeloid leukemia in chronic phase: The 5-year update from IRIS study. 2006. ASCO Annual Meeting; June 2-6; Atlanta, Abstract 6506
- Dwyer ME, Rathbun K, Druker BJ, Bagby GC. STI571 induces apoptosis of Bcr-Abl positive cells in vitro: the role of caspase 3, 9 and TRAIL. *Blood* 2000; 96: 343a.
- Eaves CJ, Cashman JD, Wolpe SD, Eaves AC. Unresponsiveness of primitive chronic myeloid leukemia cells to macrophage inflammatory protein 1 alpha an inhibitor of primitive normal hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:12015-12019.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z et al. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med* 1999; 131:207-219.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. Mechanism of disease: the biology of chronic myelogenous leukemia. *N.Engl J Med* 1999; 341:164-172.
- Ferro MT, Steegman JL, Escribano L, Heiurichs B et al. Ph-positive chronic myeloid leukemia with t (8;21)(q22;q22) in blastic crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 58:96-99.
- Fialkow PJ, Denman AM, Jacobsen RJ, Lowenthal MN: Chronic myelocytic leukemia. Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *J Clin Invest* 1978; 62:815-823.

- Ficha técnica Tasigna (nilotinib) summary of production characteristics. Basel, Switzerland Novartis pharma AG; 2007.
- Gabert J, Beillard E, van del Velden VHJ et al. Standardization and quality control studies of “real time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003; 17: 2318-2357.
- Gale RP, Hehlmann R, Zhang MJ et al. Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 1998; 91:1810-1819.
- Gambacorti-Passerini C, Brummerdorf T, Kantarjian H, et al. Bosutinib (SKI-606) exhibits clinical activity in patients with Philadelphia chromosome positive CML or ALL who failed imatinib. ASCO meeting Abstract 2007; 25: abstract no. 7006.
- Gambacorti-Passerini CB, Rossi F, Verga M, et al. Differences between in vivo and in vitro sensitivity to imatinib of Bcr/Abl+ cells obtained from leukemic patients. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 28:361-72.
- Giles F, Cortes J, Jones D et al. MK-0457 a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia and acute lymphocytic leukemia with the T315i BCR-ABL mutation. *Blood* 2007; 109:500-502.
- Goldman J. How I. Treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood* 2007; 110:2828-2837.

- Goldman JM, Hughes T, Radich J et al. Continuing reduction in level of residual disease after 4 years in patients with CML chronic phase responding to first-line imatinib in the IRIS Study. ASH Annual Meeting Abstracts 2005; 106:166a.
- Goldman JM, Rizzo JD, Jabocinski KA, et al. Long term outcome after allogeneic stem cell transplantation for CML. Hematol J 2004; 5(Suppl 2):98, abstract 266.
- Gram JM, Gordon MY. Primitive, quiescent Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. Blood 2002; 99:58-60.
- Gram SM, Jorgensen HG, Allan E et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. Blood 2002; 99:58-60.
- Gratwohl A, Hermans I, Goldman JM et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party or the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Lancet 1998; 352:1087-1092.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T et al. Cancer statistics 2001. CA Cancer J Clin; 51:15-36.
- Guilhot F, Chastang C, Michallet M et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukaemia. French Chronic Myeloid Leukemia group. New Engl J Med 1997; 337:223-229.

- Guilhot F. Sustained durability of responses plus high rates of cytogenetic responses result in long-term benefit for newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with imatinib: update from the IRIS Study. *Blood* 2004; 104:10a.
- Hagop M. Kantarjian, Moshe Talpaz, J.C. Kluin-Nelemans, A. Delannoy, and A. Louwagie Questions Raised by the Benelux CML Study Group: Results From the Randomized Study With Hydroxyurea Alone Versus Hydroxyurea Combined With Low-Dose Interferon- α 2b for Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 1998; 92: 2984-2987.
- Hamilton A, Elrick L, Myssina S et al. BCR-ABL activity and its response to drugs can be determined in CD34+ CML stem cells by CRKAL phosphorylation status using flow cytometry. *Leukemia* 2006; 20:1035-1539.
- Hao SX, Ren R. Expression of interferon consensus sequences binding protein (ICSBP) is down-regulated in Bcr-Abl-induced murine chronic myelogenous leukemia-like disease, and forced coexpression of ICSBP inhibits Bcr-Abl-induced myeloproliferative disorder. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1149-1161.
- Hasford J, Pflumm M, Hehlmann R, Baccarani M et al. Prognosis and prognostic factors for patients with chronic myeloid leukemia: nontransplant therapy. *Semin Hematol* 2003; 40(1):4-12.
- Hasselbalch H, Junker P, Lisse I et al. Serum markers for type IV collagen and type III procollagen in the myelofibrosis-osteomyeloid-sclerosis syndrome and other chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1986; 23:101-111.

- Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J et al: Randomized comparison of busulfan and hydroxiurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hidroxiurea. *Blood* 1993; 82:398-407.
- Heim D, Ebnother M, Meyer–Monard S, Tsakiris D et al. G-CSF for imatinib-induced neutropenia. *Leukemia* 2003; 4:805-807.
- Heisterkamp N, Stam K., Groffen, J, de Klein A. GStructural localization of the bcr gene and its role in the Ph1 translocation. *Nature* 1985; 315:758-761.
- Helgason CD. Damen JE, Rostern P et al. Targeted disruption of SHIP leads to hematopoietic perturbations, lung pathology and a shortened life span. *Genes Dev* 1998; 12:1610-1620.
- Herrera P, Odriozola J, Calbacho M et al. Respuesta al tratamiento de la LMC con inhibidores de tirosina quinasas monitorizada mediante biología molecular y citogenética. *Haematologica* 2007; 92 (extra2): 97.
- Herrera, P. Monitorización de los pacientes con leucemia mieloide crónica en tratamiento con Imatinib. Tesis doctoral: 9 de Septiembre de 2004. Universidad Autónoma de Madrid.
- Hochhaus A, Druker B, Sawyers Ch. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. *Blood* 2008; 111(3):1039-1043.
- Hochhaus A, Kantarjian H.M, Baccarani M et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in Chronic-phase chronic myeloid luekemia after failure of imatinib therapy. *Blood* 2007; 109:2303-2309.

- Hochhaus A, Lin F, Reiter A et al. Quantification of residual disease in chronic myeloid leukemia patients on interfero-alpha therapy by competitive polymerasa Chain reaction. *Blood* 1996; 87:1549-1555.
- Hochhaus A. Management of Bcr-Abl-positive leukemias with dasatinib. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7(11):1529-1536.
- Horowitz MM, Rowlings PA, Passweg JR. Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17(suppl 3):S5-S6.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A et al. Monotoring CML patients responding to treatment with tyrosine Kinase inhibitors: recomendations for “harmonizing” current methodologing for detecting BCR-ABL transcripts and Kinase domanin mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108:28-37.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors- review and recommendations for “harmonizing” current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108:28-37.
- Hughes T, Saglio G, Martinelli G et al. Responses and disease progresión in CML-CP patients treated with nilotinib alter imatinib failure apperar to be affected by the BCR-ABL mutation status and types. *Blood* 2007; 110: Abstract 320.
- Hughes T. ABL Kinase Inhibitor Theraphy for CML: Baseline Assessments and Response Monotoring. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 211:8.

- Hughes TP, Brandford S, Reynolds J et al. Maintenance of imatinib dose intensity in the first six months of therapy for newly diagnosed patients with CML is predictive of molecular response, independent of the ability to increase dose at a later point. ASH Annual Meeting Abstracts. 2005;106:164a.
- Hughes TP, Brandford S, Reynolds J et al. Maintenance of imatinib dose intensity in the first six months of therapy for newly diagnosed patients with CML is predictive of molecular response, independent of the ability to increase dose at a later point. ASH Annual Meeting Abstracts. 2005;106:164^a.
- Hughes TP, Brandford S, Matthews J, Seymour J et al. Trial of higher dose imatinib with selective intensification in newly diagnosed CML patients in the chronic phase. Blood 2003; 102: suppl 1. 31a.203.
- Hughes TP, Kaeda J, Brandford S et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosis chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2003; 349:1423-1432.
- Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P et al. Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation: role of PCR in predicting relapse. Blood 1991; 77:874-878.
- Ihle JN, Thierfelder W, Teglund S et al. Signaling by the cytokine receptor superfamily. Ann NY Acad Sci 1998; 865:1-9.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus Interference, I: the interferon. Proc R Soc Ser B 1957; 147:58-267.
- Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. A prospective study of α -interferon and autologous bone marrow transplantation en chronic myeloid leukemia. Haematologica 1999; 84:707-715.

- Jabbour E, Cortes J, Jones D et al. Allogenic stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia and acute lymphocytic leukemia after Bcr-Abl kinase mutation-related imatinib failure. *Blood* 2006; 108:1421-1423.
- Jabbour E, Cortes JE, Ghanem H, O'Brien S et al. Targeted therapy in chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8(1):99-110.
- Jabbour E, Kantarjian H, Jones D et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 2006; 20:1767-1773.
- Jilani I, Kantarjian H, Gorre M et al. Phosphorylation levels of BCR-ABL, CrkL, AKT and STAT5 in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells implicate alternative pathway usage as a survival strategy. *Leuk Res* 2008; 32(4):643-649.
- Jobbagy Z, van Atta R, Murphy KM et al. Evaluation of the Cepheid GeneXpert BCR-ABL assay. *J Mol Diagn* 2007; 9:220-227.
- Jogensen HG, Elliot MA, Allan EK et al. Alpha 1-acid-glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. *Blood* 2002; 99:713-715.
- Jonas D, Lubbert M, Kawassaky ES et al. Clonal analysis in bcr-abl rearrangement in T lymphocytes from patients in the chronic myelogenous leucemia. *Blood*. 1992; 79(4):1017-1023.
- Jonuleit T, Peshol C, Schwab R et al. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol* 1998; 100:295-303.

- Jordanides NE, Jorgensen HG, Holyoake TL et al. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and inhibited by imatinib mesylate. *Blood* 2006; 108:1370-1373.
- Juan D, Hsu S-D, Hunter J: Case report of vasopressin –responsive diabetes insipidus associated with chronic myelogenous leukaemia. *Cancer* 1985; 56:1468-1469.
- Kantarjian HM, Bueso-Ramos CE, Talpaz M et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002; 346:645.
- Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R et al. Chronic myelogenous leukemia:a concise up date. *Blood* 1993; 82(3):2975-2984.
- Kantarjian HM, Giles F, Wunderle L et al. Nilotin in Imatinib-resistant CML and Philadelphia Chromosoma-Positive ALL. *N Engl J Med.* 2006; 354:2542-2551.
- Kantarjian HM, Giles F, Wunderle L et al. Nilotinib in imatinib-resistanceCMLand philadelphia-chromosome positive ALL. *N Engl J Med* 2006; 354:2542-2551.
- Kantarjian HM, Hocchhaus A, Cortes J et al. Nilotinib is highly active and safe in chronic phase chronic myelogenous leukemia patients with imatinib-resistance or intolerante. *Blood* 2007; 110:226^a.
- Kantarjian HM, Pasquíni R, Hamerschak N et al. Dasatinib or High-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of first-line imatinib: a randomized phase 2trial. *Blood* 2007; 109:5143.

- Kantarjian HM, Sawyers C, Hochhaus A et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002; 346: 645-652.
- Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S et al. High-dose of imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 103:2873-2878.
- Kantarjian HM, Talpaz M, Keating EH et al. Intensive chemotherapy induction followed by interferon-alpha maintenance in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 1991; 68(6):1201-1207.
- Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S et al. High dose of imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:2873-2878.
- Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S. Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon-based regimens in newly diagnosed chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2006;108(6):1835-1840.
- Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S et al. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2003; 101:473-475.
- Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S et al. High dose of imatinib mesylate therapy in newly diagnosis Philadelphia therapy chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:2873-2878.
- Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:547-550.

- Khorashad J, Anand M, Marin D et al. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia*. 2006; 20:658-663.
- Kolibaba, K.S., Druker, B.J. Protein tyrosine and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333:217-248.
- Kujawski LA, Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine and Growth Factors Reviews* 2007; 18: 459-471.
- Kurzrock, R, Bueso-Ramos, CE, Kantarjian, H et al. Bcr rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia revisited. *J Clin Oncol* 2001; 19:2915-2916.
- La Rousée, Høla-Eriksen S, Lonig H, et al. Phospho-CRKL monitoring for the assessment of BCR-ABL activity in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia or Ph+ acute lymphoblastic leukemia patients treated with nilotinib. *Haematologica* 2008; 93(5):765-769.
- Lahaye T, Riehm B, Berger U. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL positive leukemias treated with imatinib in a single center-A 4.5 follow up. *Cancer* 2005;103:1659-1669.
- Larson RA, Druker BJ, Guilhot F et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008; 112:4022-4028.

- Larson RA, Druker BJ, Guilhot F. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008;111(8):4022-4028.
- Larson R et al. Imatinib Plasma Conc and Sokal Risk Score are independent prognostic for CCyR in Pat with CP CML. *Blood* 2007, 110, 11 Abstract 1935, ASH 2007.
- Le Coutre P, Kreuzer, KA, Pursche S et al. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP14588. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53: 313-323.
- Lebowitz P, Papac R, Ghosh Pk. Impaired retinoblastoma susceptibility (Rb) gene expression in agnogenic myeloid metaplasia. *Blood* 1990; 76:236A.
- Lithman MA, Heal J, Rowe Jm. Hyperleukocyte leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 1987; 1:725.
- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004; 47:6658-6661.
- Loriaux M, Deininger M. Clonal abnormalities in Philadelphia chromosome negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leuk Lymph* 2004; 45:2197-2203.
- Mahon FX, Belloc F, Lagarde V et al. MDR1 gene over expression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003; 101: 2368-2373.

- Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000; 96:1070-1079.
- Mahon, Fx, Delbrel, X, Cony-Makhoul, P et al. Follow-up of complete cytogenetic remission in patients with chronic myeloid leukemia after cessation of interferon alfa. *J Clin Oncol* 2002; 20:214-220.
- Malson JE, DeVita VT, Canellos GP. Thrombocytosis in chronic Granulocytic Leukaemia: incidence and clinical significance. *Blood* 1974 44:483.
- Manley P, Cowan-Jacobb SW, Fendrich G et al. Bcr-Able binding modes of dasatinib, imatinib and nilotinib: an NMR study. *Blood* 2006;108:224^a. Abstract 747.
- Marcus M, Schittenhelm , Sharon Shiraga et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL Kinase inhibitor, inhibits the Kinase Activity of Wild-Type, Juxtamenbrane, and Activation Loop Mutant KIT isoforms Associated with Human Malignancies. *Cancer Res* 2006; 66:473-481.
- Marin D, Goldman JM, Olavarria E et al. Transient benefit only from increasing imatinib dose in CML patients who do not achieve complete cytogenetic remissions on conventional doses. *Blood* 2003; 102:2702-2703.
- Marin D, Marktel S, Foot N, Bua M et al. Granulocyte colony-stimulating factor reverses cytopenia and may permit cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Haematologica*. 2003; 88:227-229.

- Martinelli G, Rousselot P, Robak T et al. Comparison of dasatinib to highdose imatinib in patients who experience imatinib failure: Results from a randomized, phase-II trial (CA180017, START-R). *Haematologica* 2007; 92(suppl 1):319
- Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 1988; 32:272-275.
- McGlave PB, Shu XO, Wen W et al. Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years' experience of the National Marrow Donor Program. *Blood* 2000; 95:2219-2225.
- McLean LA, Gathmann I, Capdeville et al. Pharmacogenomic analysis of cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Clin Cancer Res* 2004; 10:155-165.
- Merx K, Muller MC, Kreil S et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia* 2002; 16:1579-1583.
- Michor F, Hughes TP, Iwasa Y et al. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature* 2005; 435:1267-1270.
- Mitus WJ, Kiosoglou KA: Leukocyte alkaline phosphate in myeloproliferative syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1968; 155:976.
- Morgan GJ, Hughes T, Janssen JWG et al. Polymerase chain reaction for detection of residual leukaemia. *Lancet* 1989; 1:928-929.

- Mukay M, Che XF, Furukawa T et al. Reversal of the resistance to STI571 in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Cancer Sci* 2003; 94 557-563.
- Nam S, Williams A, Vultur A L. Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(4):1400-1405.
- Niemeyer, CM, Kratz, C. Juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Oncol Rep* 2003; 5(6):510-515.
- Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic graunlocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1960; 25:85.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larsen RA et al. Imatinib compared with interferon and low dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348:994-1004.
- O'Dowyer ME, Mauro MJ, Kurilik G et al. The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate in accelerate phase CML. *Blood* 2002; 100:1628-1633.
- O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP et al. In vitro activity of cinically relevant imatinib-resistance Abl kinase domain mutants. *Cancer* 2005; 65:4500-4505.
- O'Hare, T, Eide Ca, Deininger MWN. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance and the road to a cure of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007; 110:2242-2249.

- Oda T, Heaney C, Hagopian, JR et al. Crkal is the mayor tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myeloid leucemia. *J Biol Chem.* 1994; 269:22925-22928.
- Oehler VG, Radich JP, Storer Bet al. Randomized trial of allogenic related bone marrow transplantation versus peripheral blood stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:85-92.
- Onishi M, Nosaka T, Misawa K et al. Identification and characterization of a constitutively active STAT5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3871-3879.
- Palandri F, Iacobucci I, Castagnetti F et al. Front line treatment of Philadelphia positive chronic myeloid leukemia with imatinib and interferon- α :5 -year outcome. *Haematologica* 2008; 93:770-774.
- Pane F, Frigeri F, Sendona M et al. Neutrophilic chronic myeloid leukaemia : a distinct disease with specific molecular markle. *Blood* 1996; 88(7): 2410-2414 (erratum in *Blood* 1997; 89(11):4244.
- Passmore SJ, Chessells JM, Kempski H et al. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: a population-based study of incidence and survival. *Br J Haematol* 2003; 121:758-767.
- Pasternak, G, Hochhaus, A, Schultheis, B et al. Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 643-660.
- Peng B, Hayes M, Resta D et al. Pharamacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* 2004; 53:313-323.

- Pestka, S. The interferon receptors. *Semen Oncol* 1997; 24:s9-18-s9-40.
- Petzer AL, Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC. Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytoleine-supplemented cultures fo purified cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1997; 90: 64-69.
- Petzer AL, Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC. Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytoleine-supplemented cultures fo purified cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1997; 90: 64-69.
- Petzer AL, Eaves CJ, Klansdorp PM, Ponchio L et al. Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemic. *Blood* 1996; 88:2162-2171.
- Picard S, Titier K, Etienne G et al. Through imatinib plasma levels are associated with both cytogenetics and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 109:3496-3499.
- Press RD, Love Z, Tronnes A et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006; 107(11): 4250-4256.
- Press RD, Galderisi C, Yang R et al. A half-log inrease in BCR-ABL RNA predicts a higher Risk of relapse in patients with chronic myeloid leukemia with an imatinib-induced complete cytogenetic response. *Clin Cancer Res* 2007; 13(20):6136-6143.

- Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F et al. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib resistant Bcr-Abl + neoplastic cells. *Cancer Res* 2006; 66:11314-11322.
- Pye SM , Cortes J , Ault P. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood* 2008; 111:5505-5508.
- Qin Y, Jiang B , Jiang Q et al. Molecular responses of late chronic phase chronic myeloid leukemia patients after achieving complete cytogenetic responses with imatinib treatment: a 6-year follow-up. *Annals of Hematology* 2008: Julio 24 (Pub Med).
- Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Talpaz M et al. Imatinib mesylate therapy may overcome the poor prognostic significance of deletions of derivate chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2005; 105:2281-2286.
- Radich JP, Dai H, Mao M et al. Gene expression changes associated with progresión and response in chronic myeloid lukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:2794-2799.
- Raitano AB., Whang YE, Sawyers CL. Signal transduction by wild-type and leukemiogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333(3):F 201-216.
- Rameh LE. Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 1999; 274:8347-8350.
- Ray A, Cowan-Jacobb SW, Manley PW et al. Identification of Bcr/Abl point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN 107(Nilotinib) by a random mutagenesis study. *Blood* 2007; 109:5011-5015.

- Reilly JT. Chronic neutrophilic leukaemia: a distinct clinical entity?. *Br J Haematol* 2002; 116:10-18.
- Richards SM, Apperley J, Carella A et al. Autografting in chronic myeloid leukaemia: a metanalysis of six randomized trials. *Haematologica* 2005; 90(suppl2):152-153, abstract 0385.
- Roche –Lestienne C, Soenen-Cornu V, Granel-Duflos N et al. Several types of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002; 100:1014-1018.
- Ross DM, , Brandford S, Moore S et al. Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL. *Leukemia*. 2006; 20:664-670.
- Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:10700-10705.
- Rousell MF. Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv Cancer Res* 1998; 74:1-24.
- Rousselot P, Huguet F, Rea D et al. Imatinib mesylate discontinuing in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* 2007; 109:58-60.
- Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leucemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290-3.

- Sacchi S, Kantarjian H, O'Brien S et al. Immune mediates and unusual complications during interferon alfa therapy in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1995;13:2401-2407.
- Saldaña J, Silvy M, Beafils N et al. Characterization of a reference material for BCR-ABL (M-BCR) mRNA quantitation by real-time amplification assays: towards new standards for gene expression measurements. *Leukemia* 2007; 21:1481-1487.
- Sandberg A, Bridge JA. Techniques in cancer cytogenetics: an overview and update. *Cancer Invest* 1992; 10(2):163-172.
- Satler M, Verma S, Shrikhande G et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2000; 275:24273-24278.
- Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 1997; 96:111-116.
- Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A et al. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994; 77:121-131.
- Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340:1330-1340.
- Schmitz N, Eapen M, Horowitz MM, et al. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2006;108(13):4288-4290.

- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 2:971-972.
- Selleri C, Sato T, Del-Vecchio L et al. Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon-alpha in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1997; 89:957-964.
- Shah N, Skaggs B, Brandford S et al. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest* 2007; 117(9):2562-2569.
- Shah N. Medical management of CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007;2007:371-5.
- Shah NP, Nicoll JM, Nagar B et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2:117-125.
- Shah NP, Tran C, Lee FY et al. CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004; 305:399-401.
- Simonsson B. On behalf of the IRIS study group. Beneficial effects of cytogenetic and molecular response on long term outcome in patients with newly diagnosis chronic myeloid leukemia in chronic phase (CMI-CP) treated with Imatinib(IM) :update from the IRIS study. *Blood* 2005; 106:52a, abstract 166.
- Singer CF, Hudelist G, Lamm W. Active (p)CrkL is overexpressed in human malignancies: potential role as a surrogate parameter for therapeutic tyrosine kinase inhibition. *Oncol Rep* 2006; 15(2):353-359.

- Slorski T, Kanakaraj P, Nieborowskaskorska M et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by bcr/abl and is required for the growth of philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995; 86: 726-736.
- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S et al. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984; 63:789-799.
- Sorel N, Bonnet ML, Guillier M et al. Evidence of ABL-kinase domain mutations in highly purified primitive stem cell populations of patients with chronic myelogenous leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323:728-730.
- Soverini S, Colarossi S, Gnani A et al. Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica* 2007; 92:401-404.
- Soverini S, Martinelli G, Rosti G et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GINEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23:4100-4109.
- Spiers ASD, Bain BJ, Turner JE. The peripheral blood in chronic granulocytic leukemia : a study of 50 untreated Philadelphia positive cases. *Scand J Haematol* 1975; 18:25.
- Spiers, A.S.D. Clinical manifestations of chronic granulocytic leukemia. *Seminars in Oncology* 1995; 22:380-395.

- Stoll, DB, Peterson, P, Exten, R et al. Clinical presentation and natural history of patients with essential thrombocythemia and the Philadelphia chromosome. *Am J Hematol* 1988; 27:77.
- Sugita J, Tanaka J, Kurosawa M et al. Effects of the mean daily doses of imatinib during the first year on survival of patients with chronic myeloid leukemia in Japan: a study of the Hokkaido Hematology Study Group. *Eur J Haematol* 2008; 80(2):160-163.
- Talpaz M, Kurzrock, R, Kantarjian H, et al. A phase II study alternating alpha-2^a-interferon and gamma-interferon therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1991; 69(10):2125-2130.
- Talpaz M, McCrede KB, Mavligit GM et al. Leukocyte interferon-induced myeloid cytore. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman W, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes culture from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20:613-616.
- Talpaz M, McCrede KB, Mavligit GM et al. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1983; 62: 689-692.
- Talpaz M, Shah N, Kantarjian H et al. Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leucemias. *N Engl J Med* 2006; 354:2531-2541.
- Tam SC, Kantarjian HM, Garcia-Manero G. Failure to achieve a major cytogenetic response by 12 months defines inadequate response in patients receiving nilotinib or dasatinib as second or subsequent line therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 112(3):516-518.

- Ten Hoeve, Morris C, Heisterkamp N et al. Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human crkl-like gene. *Oncogene* 1993; 8:2469-2474.
- Thomas J, Wang L, Clark RE et al. Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance to imatinib. *Blood* 2004; 104:3739-3745.
- Thompson RB, Stainsby D: The clinical and haematological features of chronic granulocytic leukaemia in the chronic phase, in *Chronic Granulocytic Leukaemia*, edited by MT Shaw, pp137-167. Praeger, East Sussex, UK, 1982.
- Tipping AJ, Mahon FX, Lagarde V et al. Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistance chronic myeloid leukemia cells. *Blood* 2001; 98:3864-3867.
- Tough IM, Court Brown WM, Buckton KE, et al. Cytogenetic studies in chronic leukemia and acute leukemia associated with mongolism. *Lancet* 1961; 1:411.
- Usman M, Syed NN, Katepoco GN et al. Chronic phase chronic myeloid leukemia: response to imatinib mesylate and significance of Sokal score, age and disease duration in predicting the hematological and cytogenetic responses. *J Assoc Physicians India* 2007;55:103-107.
- Vardiman, JW, Harris, NL, Brunning, RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100:2292-2302.
- Verfaillie CM. Biology of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12:1-28.

- VHJ van der Velden, A Hochhaus, G Cazzaniga et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17:1013-1034.
- Von Bubnoff N, Scheller F, Peschel V et al. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukemia to STI571: A prospective study. *Lancet* 2002; 359:487-491.
- Wadleigh M, Deangelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood* 2005; 105:22-30.
- Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996; 87: 629-638. cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* 1998; 91:1700-1705.
- Wang L, Pearson K, Pilleteri C et al. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the bone marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 118 771-777.
- White D, Saunders V, Lyons AB et al. In vitro sensitivity to imatinib-induced inhibition of ABL kinase activity is predictive of molecular responses in patients with de novo CML. *Blood* 2005; 106:2520-2526.
- White DL, Saunders VA, Brandfors S et al. The in vivo level of imatinib-induced kinase inhibition achieved in de-novo CML patients during the first 28 days of therapy is a powerful predictor of molecular Outcome. *ASH Annual meeting Abstracts*. 2005; 106:436a.

- White DL, Saunders VA, Dang P et al. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 2006; 108:697-704.
- Willis S, Lange T, Demehri S et al. High sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 2005; 106: 2128-2137.
- Yaish P, Gazit A, Gilon C et al. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 1988; 242:933-935.
- Yokota A, Kimura S, Masuda S et al. INNO-406 a novel Bcr-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph⁺ leukemia cells in the central nervous system, and cyclosporine A augments its vivo action. *Blood* 2007; 109:306-314.
- Young AS, Szydlo RM, Goldman JM et al. Molecular profiling of D34⁺ cells identifies low expression of CD7, along with high expression of propinase 3 or elastase, as predictors of longer survival in patients with CML. *Blood* 2006; 107:205-212.
- Zheng C, Li L, Haak M et al. Gene expression profiling of CD34⁺ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia* 2006; 20:1028-1034.
- Zhongguo Shi, Yan Xue Ye Xue Za Zhi. Prognostic analysis of chronic myeloid leukemia with Cox model and the Sokal. Hasford Score 2006; 14(4):662-666.

- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a Wide variety of stem cells and is a molecular determinant of tue side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7:1028-1034.
- Zonder JA, Pemberton P, Brandt H et al. The effect of dose increase of imatinib mesylate in patients with chronic or accelerated phase chronicmyelogenous leukemia with inadequate hematologic or cytogenetic response to initial treatment. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2092–2097.