



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

TESIS DE MAESTRIA

**MONITOREO DE RESPUESTA MOLECULAR PARA LA
DETECCION DE ENFERMEDAD RESIDUAL MINIMA
EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA TRATADOS
CON INHIBIDORES DE TIROSINA QUINASA**

MAESTRIA EN INVESTIGACION CLINICA

Tesista: Dr. Flavio Albarracín Garramuño Director: Dr. Valentín Labanca

Mendoza - 2014



“En el año 2001, yo iniciaba mi Residencia en Hematología en el Hospital de Clínicas de Buenos Aires. Mi abuela María del Carmen, una asidua lectora de revistas norteamericanas, en un viaje a San Juan de visita a mi familia, me mostró esta tapa de la revista “Time” donde se hacía alusión al lanzamiento del Imatinib. Sus palabras las recuerdo más o menos así: “Mira Flavito, estuve leyendo esta nota con respecto a esta droga nueva que promete cambiar el paradigma de tratamiento en el cáncer, además tiene que ver con una enfermedad que se llama Leucemia Mieloide Crónica, es de la especialidad que vos elegiste hacer”.

A doce años de ese momento estoy presentando mi tesis de maestría con esta misma temática. Siempre he preferido no creer en las casualidades y mejor pensar en aquellas palabras de Borges: “a la realidad le gustan las simetrías y los leves anacronismos”.

“A mi abuelo David Lisandro “Tata”, porque algunos tuvimos la suerte de tener dos papás”.

“A mi abuela María del Carmen “Lita”, mi gran maestra, educadora y formadora”

“A mis padres, porque siempre creyeron en mí y este logro es también de ellos”

“A mis hermanos, porque siempre hemos sido un gran equipo y nunca dejamos de apoyarnos uno al otro”

“A mis tíos Patricia y Roberto, por los valores, empuje y consejos que nunca dejaron de darle a su sobrino médico”

“A mis suegros Cristina y Jorge, por quererme como a un hijo”

“A mis hijas Catalina y Agustina, por ayudarme a intentar cada vez ser un mejor padre”

“A mi esposa Laura, porque cada día que pasa soy más feliz a su lado”

Indice:

Resumen	6
Introducción.....	7
Inhibidores de tirosina quinasa.....	16
Resistencia a Imatinib.....	18
Determinación de respuesta.....	21
Hipótesis, Objetivos generales y específicos.....	26
Metodología.....	27
RQ-PCR.....	27
Diseño del estudio.....	29
Población y muestra.....	30
Consentimiento informado.....	30
Procesamiento y equipamiento.....	31
Análisis estadístico.....	32
Resultados.....	33
Discusión.....	37
Conclusiones.....	40
Nuevos planteos y desafíos.....	40
Referencias.....	40
Agradecimientos.....	45

Tabla 1.....	9
Tabla 2.....	29
Tabla 3.....	33
Tabla 4.....	35
Figura 1.....	11
Figura 2.....	12
Figura 3.....	13
Figura 4.....	14
Figura 5.....	17
Figura 6.....	22
Figura 7.....	27
Figura 8.....	36

Resumen:

Hipótesis y Objetivo: El grado de reducción de la expresión del clon neoplásico Philadelphia (Phi +) / bcr-abl (+) en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) que obtienen remisión citogenética completa (RCC) por acción de los inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) imatinib, dasatinib y nilotinib, evaluado por el método estandarizado Real Time Quantitative – PCR (RQ-PCR) al inicio del estudio, se asocia con una mejor sobrevida libre de progresión de enfermedad.

Pacientes y Metodología: Estudio prospectivo, multicéntrico, que evaluó la presencia del gen de fusión bcr-abl en 34 pacientes con LMC en RCC tratados con los ITQ Imatinib, Nilotinib o Dasatinib. Se realizó una RQ-PCR cuantitativa a la entrada al estudio y luego cada 6 meses por un período de 2 años.

Resultados: De 32 pacientes analizables que ingresaron en RCC, 2 (6,25%) perdieron su RCC y 7 (21,8%) nunca alcanzaron al menos una remisión molecular mayor (MaMR: Red \geq 3 log) al final del estudio. Del grupo con mayor reducción de transcritos en remisión molecular completa o mayor (CMR: Red \geq 4 log/MaMR) (23/32 ptes) hubo un (1) paciente que aumentó en más de 2 logaritmos su nivel de transcritos respecto al basal. Mientras que del grupo con respuesta subóptima (9/32) en remisión molecular menor, mínima o nula (MeMR: Red \geq 2 log /MiMR: Red $<$ 2 log /NuMR: Red $<$ 1 log) hubo dos (2) recaídas citogenéticas y un (1) paciente con aumento de transcritos en más de dos logaritmos respecto al basal. Los pacientes del grupo CMR/MaMR tuvieron una significativamente mejor sobrevida libre de recaída citogenética a 24 meses en comparación con el grupo de respuesta subóptima (100% vs 78,7 \pm 13,4%, p= 0,025), sin diferencias en cuanto a sobrevida global.

Conclusiones: Alcanzar al menos una MaMR en cualquier momento del monitoreo molecular en pacientes con LMC en RCC, es un importante predictor de sobrevida libre de progresión de enfermedad.

Introducción:

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo clonal de una célula progenitora pluripotente ¹, primeramente descrita por John Hughes Bennet en 1845 en el *Royal Infirmary* de Edinburgo. ². Se la clasificó como un desorden mieloproliferativo junto con metaplasia mieloide agnogénica, policitemia vera y trombocitemia esencial ³.

La LMC es una rara enfermedad con aproximadamente 4600 nuevos casos diagnosticados por año en los Estados Unidos de entre 33400 nuevos casos de leucemia. Por lo que la LMC representa el 14% del total de las leucemias y el 20% de las leucemias del adulto. La incidencia anual es de 1.6 casos cada 100000 adultos ⁴, con una leve preponderancia masculina (1.4:1). La mediana de edad al diagnóstico es de 65 años, es extremadamente rara en niños y su incidencia aumenta con la edad ⁵. No se conoce ningún tipo de asociación con factores hereditarios, familiares, geográficos, étnicos o económicos y la LMC; por lo que la enfermedad no es prevenible ni hereditaria. En la mayoría de los casos el factor responsable que induce al cromosoma Philadelphia no se conoce, aunque se ha observado un incremento de frecuencia en individuos expuestos a las bombas atómicas en Japón en 1945, en radiólogos, y en pacientes con espondilitis anquilosante tratados con terapia radiante ⁶.

Clásicamente, se reconocen 3 fases de progresión de enfermedad en la LMC: fase crónica, fase acelerada y crisis blástica (Tabla 1). Actualmente, casi el 90% de los pacientes con LMC son diagnosticados en fase crónica. Frecuentemente, el diagnóstico se realiza incidentalmente luego de un análisis de rutina de recuento completo de células en sangre por razones no relacionadas. Esto se debe a que los pacientes con LMC en fase crónica tienen un sistema inmune competente y pueden permanecer asintomáticos por períodos prolongados. Cuando los síntomas aparecen, están generalmente relacionados a la expansión de células de la LMC y consisten típicamente en fatiga, pérdida de

peso y malestar causado por la esplenomegalia ⁷. La leucocitosis es una característica común de la fase crónica, y el recuento de células blancas puede ser incluso tan elevado como de $1000 \times 10^9/L$, llevando en algunos casos raros a síntomas de hiperviscosidad, como hemorragia retiniana, priapismo, accidentes cerebrovasculares, confusión y estupor. Luego de una mediana de 3 a 5 años, los pacientes con LMC en fase crónica no tratados inevitablemente progresan a crisis blástica, una forma agresiva de leucemia aguda altamente refractaria a la quimioterapia y rápidamente fatal ⁸. El riesgo de transformación a crisis blástica se estima en 3 a 4% por año ^{8,9}.

Fase Crónica

- *Clínica*: Asintomático o Sintomático (fatiga, anorexia, pérdida de peso, plenitud gástrica, esplenomegalia, hepatomegalia).
- *Sangre periférica*: leucocitosis neutrofílica, con precursores mieloides (mielocitos y metamielocitos), blastos 1-3%, eosinofilia, basofilia.
Plaquetas normales o aumentadas ($>450.000 \times \text{mm}^3$).
Fosfatasa alcalina leucocitaria (FAL) ausente o disminuida, hiperuricemia, LDH aumentada.
- *Médula ósea*: hipercelularidad, disminución de tejido adiposo, hiperplasia de la serie leucopoyética, aumento de la relación mielo-eritroide M/E (6-15/1), escasos blastos ($<2\%$), predominio de mielocitos y metamielocitos.
Blastos + Promielocitos (PM) $<10\%$ de la celularidad total.
Leve aumento de fibras de reticulina en médula ósea.

Fase Crónica Temprana: Se considera fase crónica temprana (FCT) cuando han transcurrido menos de doce meses desde el diagnóstico y no ha recibido tratamiento con la excepción de Hidroxiurea.

Fase Acelerada

- *Clínica*: Fiebre, dolores óseos, sudores nocturnos.
Esplenomegalia progresiva resistente al tratamiento.
Aumento del score FAL.
- *Sangre periférica*: Anemia, trombocitopenia (<100.000) y leucocitosis resistente al tratamiento.
Trombocitosis/trombocitopenia independiente del tratamiento.
Basofilia $>20\%$.
Blastos 10% a 19%.
- *Médula Osea*: Hipercelular. Blastos 10% a 19%.

Crisis Blástica

- *Sangre periférica y/o Médula ósea*: Blastos mayor o igual a 20% en sangre periférica y/o médula ósea y/o proliferación de blastos extramedulares y/o clusters de blastos en médula ósea definido por biopsia.

Pueden tener distintos fenotipos:

Fenotipo blástico (prevalencia)

- | | |
|-------------------------------|--------|
| - Mieloide | 60% |
| - Linfoide (mejor pronóstico) | 25% |
| - Megacariocítico | 10-15% |
| - Eritroide | 1% |
| - Mixto | 5% |

Tabla 1. Definiciones (*World Health Organization–WHO*)

Debido a la diferencia en la agresividad clínica entre la fase crónica y las fases avanzadas de LMC, y a que el pronóstico puede variar significativamente incluso en pacientes en la misma fase de enfermedad, se han desarrollado numerosas estrategias de estratificación de riesgos en un intento de pronosticar y guiar el manejo del paciente. El sistema más extensamente utilizado es el *score* de Sokal¹⁰. Este es un sistema en el cual se utiliza una fórmula que tiene en cuenta la edad, el tamaño del bazo, el número de plaquetas y el número de blastos en sangre. El sistema establece 3 grupos pronósticos en donde las medianas de supervivencia son de aproximadamente 2.5, 3.5 y 4.5 años respectivamente. Es de notar que este *score* deriva de análisis en pacientes no tratados con las terapias que actualmente se utilizan, como ser la era del busulfán, quimioterapia intensiva o esplenectomía. Sin embargo numerosos estudios realizados en la década del 90' han demostrado la aplicabilidad de este sistema en series más modernas¹¹. Otros sistemas han demostrado también utilidad en la era de la terapia con Interferón, como ser el *score* Hasford¹², aunque parece ser menos predictivo en pacientes tratados con Imatinib.

La LMC fue la primera neoplasia asociada a una aberración cromosómica conocida como cromosoma Philadelphia (Phi), que es sobre el cual se realiza el diagnóstico concluyente de la enfermedad. El clon Phi se caracteriza por la translocación recíproca t(9;22)(q34;q11) que conlleva al gen de fusión bcr-abl. El resultado es un mRNA anormal de 8.5 kb que codifica para la proteína oncogénica p210^{bcr-abl} incrementando la actividad de tirosinaquinasa^{13,14} (Figura 1). El cromosoma Phi está presente en las células hematopoyéticas de pacientes con LMC, es adquirido y no heredado a partir de una célula germinal.

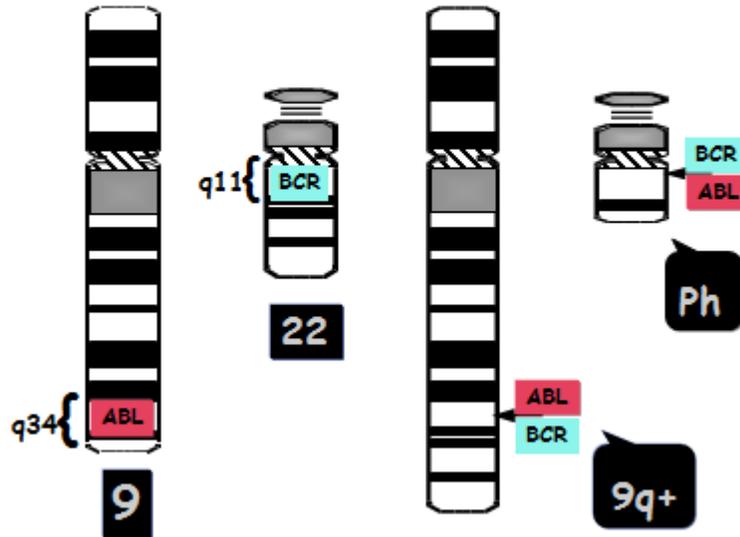


Figura 1. Descripción del Cromosoma Philadelphia y la conformación del gen de fusión bcr-abl.

Diversas vías de señales de transducción se activan al interactuar bcr-abl sobre distintos ligandos llevando a la falta de control de adhesión, proliferación y apoptosis. De esta manera, bcr-abl promueve la transformación celular hematopoyética a través principalmente de la activación de RAS, PI3K y STAT5, todos estos elementos han demostrado ser reguladores en más de la expresión de ciclina D1, induciendo progresión celular desde G1 a fase S ¹⁵ (Figuras 2 y 3).

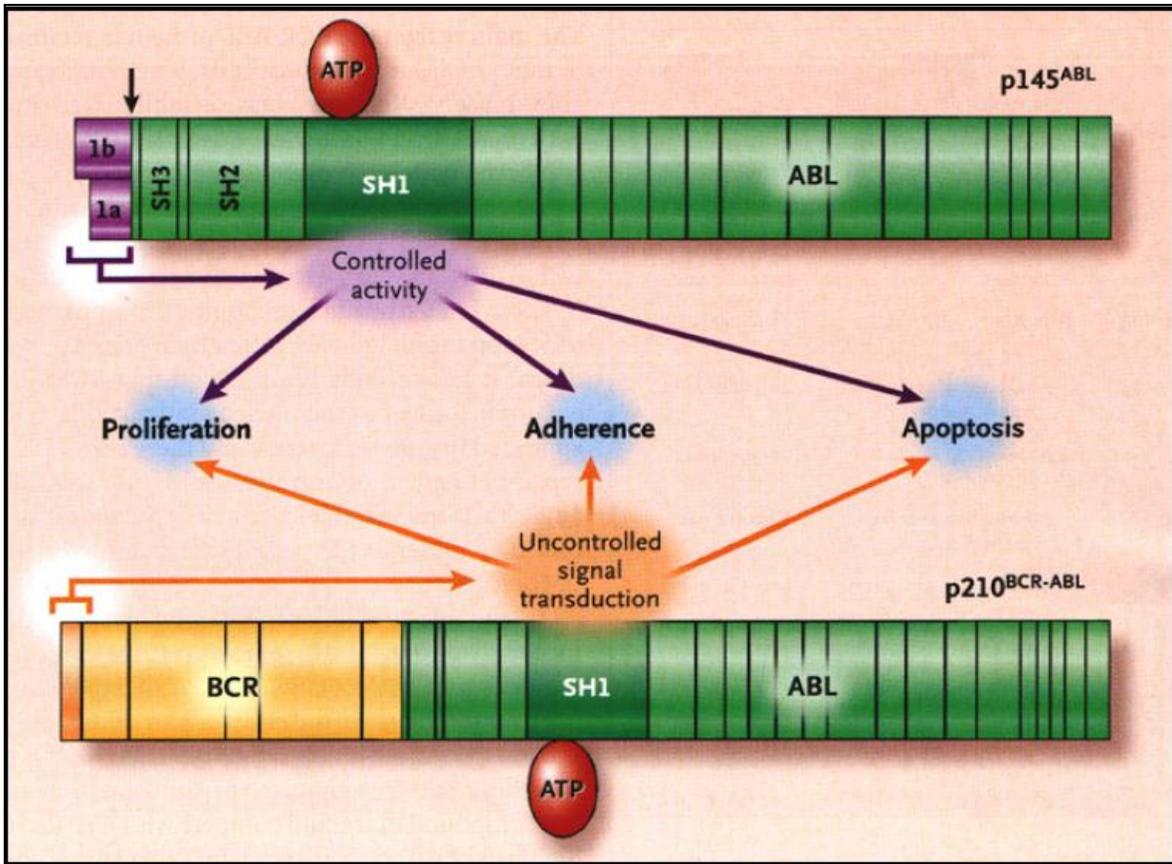


Figura 2. Consecuencia de la actividad del gen de fusión bcr-abl se descontrolan señales implicadas en la proliferación, adherencia y apoptosis celular hematopoyética.

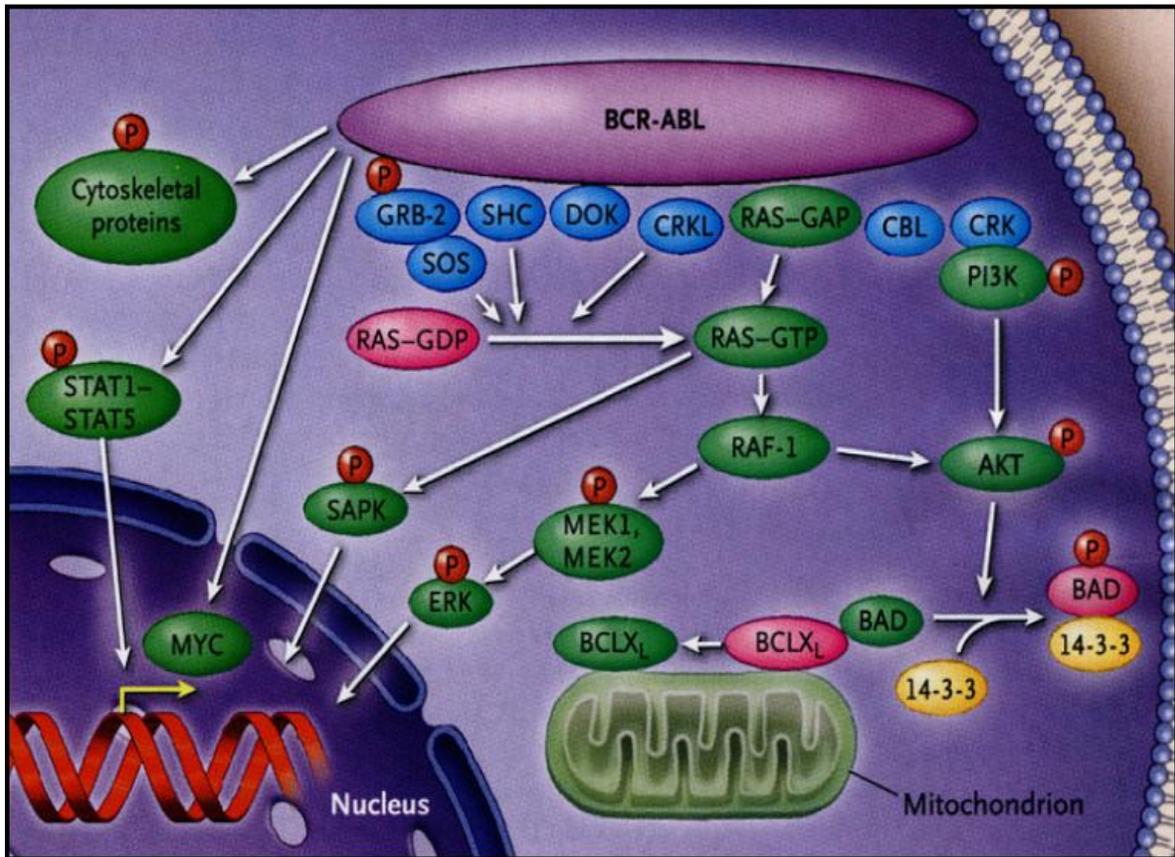


Figura 3. Ligandos y señales mediante las cuales actúa el transcrito bcr-abl.

La determinación de bcr-abl tiene valor diagnóstico, predictivo/pronóstico y es importante para la decisión terapéutica. Es especialmente útil en el seguimiento de la Enfermedad Residual Mínima (ERM) al constituir un marcador tumoral específico que demuestra la existencia de células neoplásicas no detectables por métodos poco sensibles como citogenética ¹⁴.

El tratamiento de la LMC ha experimentado un alto grado de refinamiento durante los recientes años como lo demuestra la Sobrevida de los pacientes con LMC en fase crónica temprana tratados en el Instituto M. D. Anderson en diferentes eras comparado con aquellos tratados con Imatinib (Figura 4)¹⁵. Hasta hace poco, el Interferón alfa y el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) eran las únicas opciones terapéuticas para esta enfermedad.

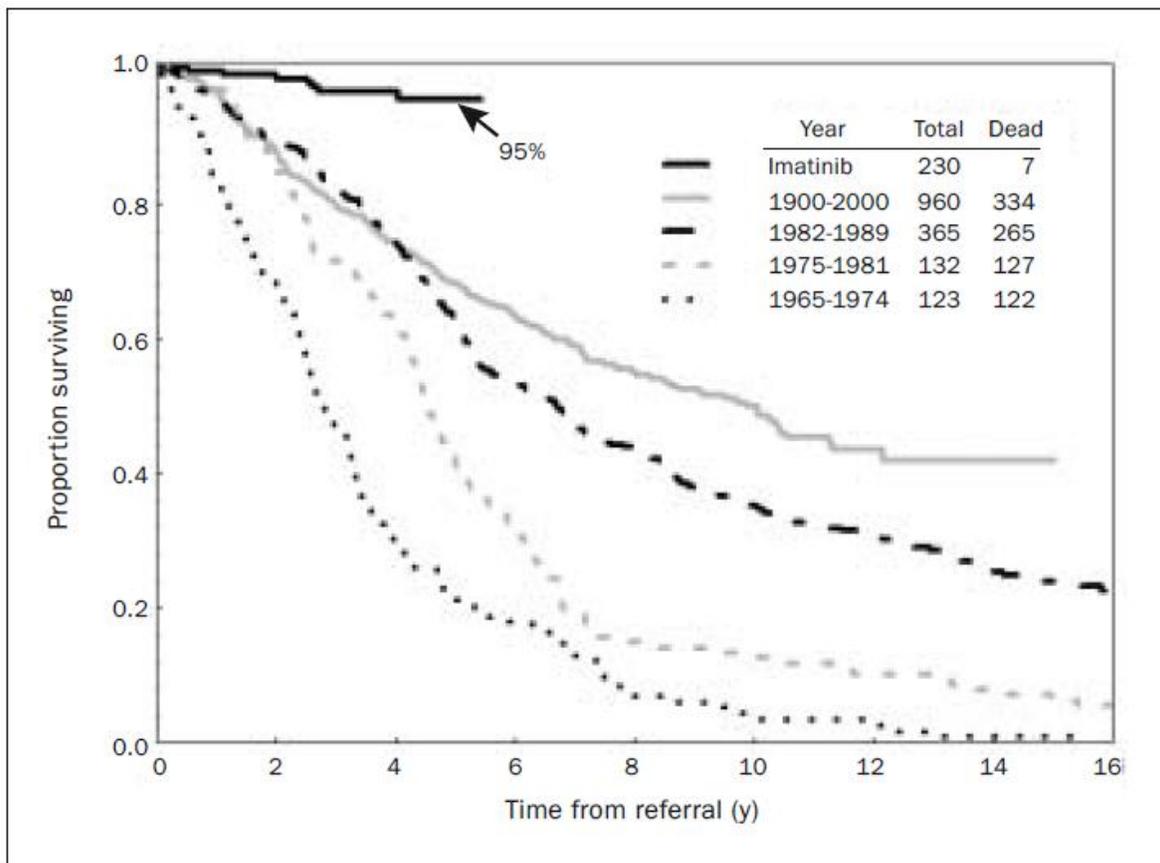


Figura 4. Evolución de la Sobrevida a lo largo de los años hasta la actualidad en la población de pacientes tratados por LMC.

El Interferón demostró respuestas citogenéticas mayores (<35% de células cromosoma Phi +) en hasta un 40% de los pacientes y respuesta citogenética completa (RCC) (0% de cromosoma Phi +) en hasta un 25% ¹⁶. Alcanzar una RCC se asoció con mejoría en la sobrevida, un 78% de los pacientes que alcanzaron una RCC se encuentran vivos a 10 años, estableciendo que la RCC era la meta terapéutica a lograr en la era del Interferón ¹⁷.

El TCPH permanece como una importante opción terapéutica para pacientes con LMC, particularmente en individuos jóvenes con donante histoiéntico. Datos del registro actual revelan que la mortalidad post TCPH en el primer año es de 10% a 20%, incluso en pacientes que son trasplantados en óptimas condiciones (donante histoiéntico emparentado, fase crónica a menos de 1 año del diagnóstico, edad menor a 40 años, etc). Sólo un tercio de los pacientes pueden contar con un donante histoiéntico emparentado (HLA-match), además de que otras condiciones como comorbilidades, edad, y demás pueden condicionar el uso del trasplante en una gran proporción de pacientes. Una estrategia para sortear la imposibilidad de la falta de donantes emparentados es el uso de donantes histoiénticos no relacionados (MUD) en el Banco Internacional de Médula Ósea ¹⁸. Desafortunadamente, la tasa de sobrevida de pacientes trasplantados con la modalidad MUD, es todavía inferior comparado con aquellos que reciben un trasplante HLA-match. La tasa de sobrevida libre de enfermedad luego de un trasplante MUD en pacientes jóvenes con fase crónica temprana de enfermedad es de 57% comparada con 67% en pacientes que reciben un injerto a partir de un donante HLA-match ¹⁹.

Inhibidores de tirosina quinasa:

El conocimiento de la patogénesis subyacente a la enfermedad llevó por primera vez al desarrollo de una terapia dirigida con los denominados inhibidores de tirosina quinasa (ITQs). Estos bloquean el inicio de la síntesis del bcr-abl aunque muchos ITQs tb afectan otras vías de señales. Dasatinib y Bosutinib inhiben tanto a bcr-abl y Src quinasas. Nilotinib inhibe bcr-abl, c-kit y al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Estas diferencias en las vía blanco pueden ser las responsables de los variados efectos clínicos.

El Imatinib mesilato ²⁰, inhibidor selectivo de la tirosinaquinasa p210^{bcr-abl}, ha revolucionado la terapéutica, pronóstico e historia natural de la LMC siendo el primer ITQ descubierto. Inhibe competitivamente la configuración inactiva de la proteína tirosina quinasa del bcr-abl bloqueando el sitio de unión del ATP y por lo tanto previene el cambio conformacional hacia la forma activa. Inhibe la proliferación celular y formación tumoral produciendo 95% de descenso en el crecimiento de las colonias formadoras de LMC. También inhibe el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el c-kit.

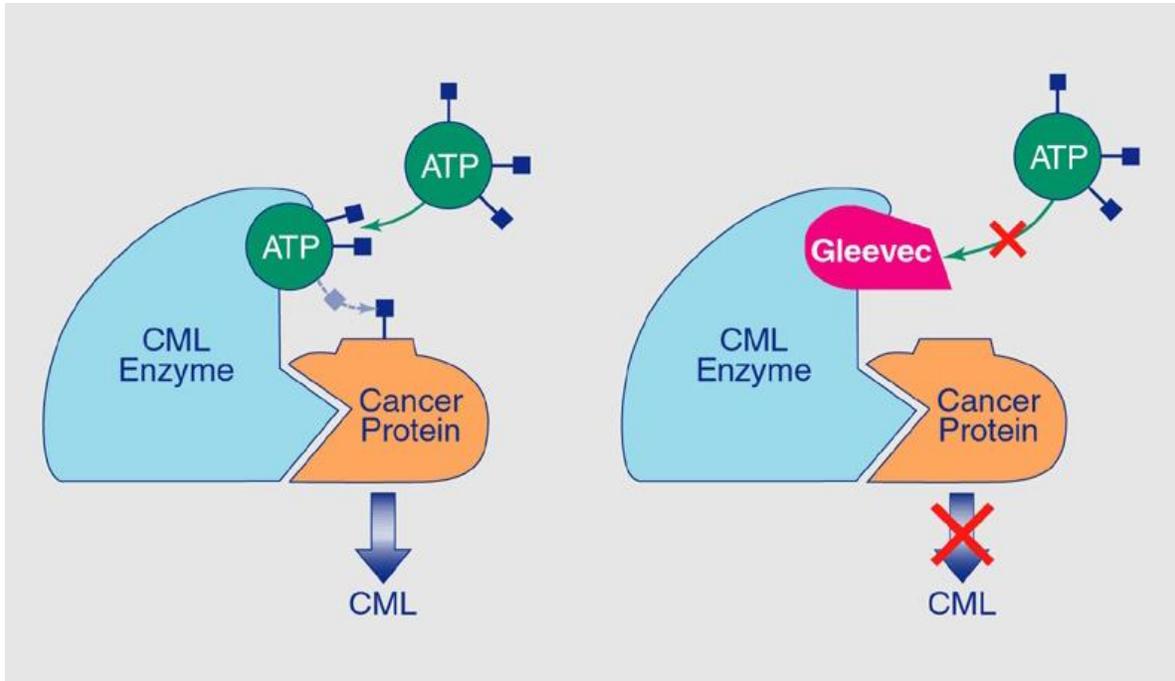


Figura 5. Mecanismo de acción del Imatinib.

Nilotinib tiene una más efectiva unión al sitio de conformación inactivo. Diseñado como un inhibidor específico del Bcr-Abl. Es 30 veces más potente que Imatinib, manteniendo la especificidad de sitio blanco. No presenta efectos significativos en otras quinasas (Src, FLT3, VEGFR, EGFR, InsR, RET, MET, IGFR, etc) ²¹.

Dasatinib se une a múltiples conformaciones de la quinasa Abl. Inhibe las quinasas: BCR-ABL, familia SRC (SRC, LCK, YES, FYN), c-KIT, EPHA2, y PDGFR β ²².

Los 3 agentes se consideran Categoría 1 basado en las guías y recomendaciones del NCCN como terapia de 1^a línea en Fase Crónica de LMC.

Actualmente el Imatinib sigue siendo recomendado como el tratamiento estándar para la fase crónica de la LMC, donde demuestra alcanzar una importante reducción en la carga leucémica, con supresión de la célula progenitora mieloide Phi (+). Aunque los ITQs de 2ª Generación (Dasatinib o Nilotinib) producen respuestas más rápidas y profundas que Imatinib. La mayoría de los pacientes con LMC en fase crónica tratados con Imatinib alcanzan una RCC como así también respuestas moleculares mayores (MaMR). Aunque de todas maneras, todo indica que tendrán una persistencia de células progenitoras leucémicas responsables de la enfermedad residual mínima. Este hecho conduce a la necesidad de un monitoreo molecular más sensible de las células residuales Phi (+) antes de poder demostrar una posible “curación” bajo el efecto de la terapia con Imatinib. Además de esto, la aparición de resistencia a Imatinib llevó al desarrollo de nuevas drogas que puedan vencer esa resistencia. La disponibilidad de nuevos y más potentes inhibidores de tirosinaquinasa (ITQ) como Nilotinib o Dasatinib, hacen necesario una mejor optimización del tratamiento basado en el monitoreo apropiado de la enfermedad. Más aún, como la mayoría de los pacientes alcanzan RCC con las nuevas terapias, existe la necesidad de también desarrollar métodos de monitoreo más sensibles para medir enfermedad residual. Esta mayor precisión de los niveles de detección sin dudas resultará en una mejor predicción de los resultados ²³⁻²⁷.

Resistencia a Imatinib:

En el tratamiento de la LMC en Fase Crónica luego de fallo a la terapia inicial con Imatinib, no hay estudios aleatorizados que comparen directamente la eficacia de los ITQs de 2ª generación. Algunas de las recomendaciones actuales son:

- Un estudio con otro ITQ.
- Dasatinib se prefiere en pacientes con pancreatitis, bilirubina elevada o hiperglicemia.
- Dasatinib cruza la barrera hematoencefálica y por lo tanto se preferiría en pacientes con compromiso de SNC.

- Nilotinib debería elegirse en pacientes con una historia de enfermedad o derrame pleural o pericárdico.
- Dasatinib y Nilotinib pueden producir prolongación del intervalo QT.

Resistencia puede definirse como primaria (falta de respuesta inicial aceptable) o secundaria (pérdida de una respuesta establecida):

- **Resistencia hematológica primaria** se refiere a una falla en alcanzar una Remisión Hematológica Completa (RHC) dentro de los 3-6 meses de inicio del Imatinib (~2-4 %).
- **Resistencia citogenética primaria** se define como:
 - Falta de cualquier respuesta citogenética a los 6 meses (~22% - Estudio IRIS).
 - Falta de RCMayor a los 12 meses (~15% - IRIS).
 - Falta de RCC a los 18 meses (~25% - IRIS).
- **Resistencia Secundaria** se refiere a progresión luego de una respuesta hematológica o citogenética establecida

Intolerancia se define como la incapacidad para tolerar al menos 400 mg de Imatinib diario a pesar de medidas de soporte (< 5% con toxicidades G3/G4; % de pacientes con toxicidades persistentes G2 que llevan a discontinuación de la droga)

Los **mecanismos de resistencia** clínica a Imatinib son:

Resistencia Primaria:

- Inhibición Insuficiente de BCR-ABL (Puede deberse a bajos niveles plasmáticos, actividad de bombas de efusión, etc)
- Variación individual en la reserva normal de médula ósea (bajos niveles de células hematopoyéticas normales en algunos pacientes)

Resistencia Secundaria:

- Sobrecrecimiento de uno o más clones que expresen mutaciones en el dominio quinasa BCR-ABL resistentes a Imatinib (más comúnmente).
- Sobreproducción de BCR-ABL (ej. via amplificación genómica)
- Mecanismos independientes de BCR-ABL (no bien entendidos).

Determinación de respuesta

La respuesta a la terapia tiene que ver con distintos momentos una vez iniciado el tratamiento con alguno de los ITQ. La primera respuesta que se observa es la hematológica para lo cual se debe hacer el recuento en sangre y se requiere una normalización del número y fórmula leucocitaria, así como también la ausencia de enfermedad extramedular. En una segunda instancia lo que se busca es la respuesta citogenética para lo cual se hace el análisis por Cariotipo para evaluar células en metafase en médula ósea en donde el objetivo es la respuesta completa, lo que implica la desaparición de células Phi+. Una alternativa que se incluye a esta técnica cuando no sea posible es la utilización del estudio por FISH (fluorescencia por hibridización in situ), en donde por intermedio de sondas marcadas específicas puede visualizarse la presencia o no del cromosoma Phi mediante una alteración en la señal emitida, en este caso indicando la fusión del gen (Figura 5). Posteriormente una vez lograda la respuesta citogenética completa se monitorea la ERM evaluando la presencia del mRNA que transcribe la proteína oncogénica p210 de manera cuantitativa mediante Real Time PCR ²⁸.

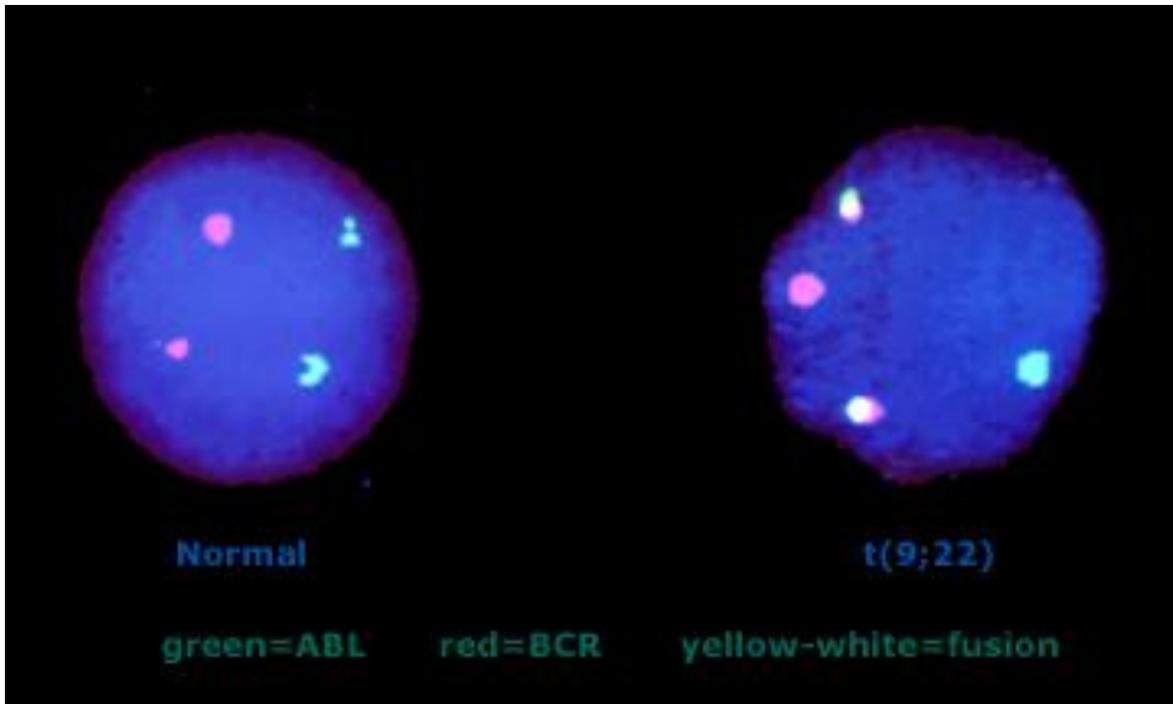


Figura 6. Ejemplo de la visualización por FISH del cromosoma Philadelphia.

La Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) es utilizada para el seguimiento y cuantificación del transcrito del gen de fusión durante la fase crónica o remisión citogenética de la LMC. Básicamente la RQ-PCR acopla a la amplificación del templado un sistema de detección por fluorescencia. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de moléculas blanco presentes en la muestra y puede ser producida por el intercalamiento de una sonda fluorescente (*Syber green*) en los productos de amplificación, la utilización de una sonda fluorescente (*TaqMan*) o dos sondas fluorescentes (*Light Cycler-FRET*), entre otros sistemas disponibles (Ver Metodología RQ-PCR).

La RQ-PCR²⁹⁻³¹ es la tecnología adoptada actualmente por la gran mayoría de los centros internacionales para el monitoreo de la ERM en LMC. Esto ha llevado a establecer guías comunes para el reporte de datos y análisis, así como también para la estandarización de protocolos y controles de calidad.

Las respuestas moleculares se clasifican en ^{32,33,34}

- Completa o CMR: %bcr-abl/c-abl <0.01 o no detectable
- Mayor o MaMR: %bcr-abl/c-abl <0.1
- Menor o MiMR: %bcr-abl/c-abl >0.1 - 1
- Mínima o MeMR: %bcr/c-abl 1 - 10
- Nula o NuMR: %bcr-abl/c-abl >10

La escala de reducción logarítmica de la expresión del gen de fusión se logra correlacionar con la respuesta molecular y el % bcr-abl/c-abl determinada por RQ-PCR:

- Red ≥ 4 , 4.5 o 5 log = CMR
- Red ≥ 3 log = MaMR
- Red ≥ 2 log = MeMR
- Red < 2 log = MiMR
- Red < 1 log = NuMR

Los estudios moleculares antes del tratamiento pueden identificar pacientes con LMC bcr-abl positivos Phi negativos y establecer una línea basal para el monitoreo posterior. Si no se alcanza respuesta citogenética, esto confiere un pronóstico pobre. No queda todavía claro si los resultados moleculares puedan definir a pacientes con RCC que estén destinados a recaer. Los resultados del estudio IRIS demuestran que aquellos pacientes que alcanzaron MaMR a los 12 meses tienen una pequeña, pero estadísticamente mejor probabilidad de sobrevida libre de transformación a fase acelerada o crisis blástica. La sobrevida libre de transformación a 5 años fue del 100% para aquellos pacientes que alcanzaron MaMR versus 95% si habían alcanzado RCC pero sin MaMR ($P = .01$) ^{35,36}.

Otros estudios no han podido demostrar una diferencia significativa en la sobrevida libre de progresión o sobrevida global en pacientes que alcanzan RCC a 12 meses según el nivel de respuesta molecular (mayor vs menos que mayor) ³⁷.

Otros resultados similares se obtuvieron utilizando los datos recolectados a 6, 18 y 24 meses.

¿Por qué se debe monitorear el nivel de transcritos en un paciente con RCC?

Diversos estudios demuestran que los aumentos de 2 a 5 veces en los niveles de transcritos están asociados con una mayor tasa de detección de mutaciones (presumiblemente un signo ominoso)^{38,39}. Estudios en el M. D. Anderson sugieren una mayor incidencia de recaída citogenética sólo en aquellos pacientes que nunca alcanzaron una MaMR y que tuvieron un incremento de 10 veces (1 log) del nivel de transcritos⁴⁰. La diferencia entre estos resultados podría estar en relación con diferentes metodologías o fluctuaciones en la medición por PCR. De todas maneras, ellos ponen de relieve el riesgo de sobredimensionar clínicamente estos resultados y la necesidad de interpretarlos en forma muy crítica en cada paciente en forma individual, incluso cuando son reportados por laboratorios académicos especializados.

La otra razón para avocarse al monitoreo molecular es que puede usarse en lugar de otros test para monitorear en forma seriada la respuesta o para evaluar la discordancia de resultados por FISH. Debido a la variabilidad de los resultados por PCR (de hasta 0.5 log incluso en laboratorios de alta calidad), las muestras deberían ser tomadas del mismo compartimento (generalmente sangre periférica antes que médula ósea), por el mismo laboratorio de alta calidad de confianza y utilizando alta calidad en procedimientos de recolección y envío de muestras³⁴. El incremento de 2 a 5 veces en el nivel de transcritos podría ser una indicación para realizar estudios mutacionales, pero el rendimiento en la detección en dichas circunstancias es bajo en muchos laboratorios comparándolo cuando la búsqueda se realiza en pacientes con evidencia de recaída clínica o citogenética.

En los recientes recomendaciones del panel de expertos de la *European Leukemia Net*, se define como respuesta óptima un nivel de transcritos bcr-abl $\leq 10\%$ a los 3 meses, $< 1\%$ a los 6 meses y $\leq 0,1\%$ desde los 12 meses en adelante. Mientras que un nivel de transcritos bcr-abl $> 10\%$ a los 6 meses o del $> 1\%$ desde los 12 meses en adelante definen fallo, lo que ordenaría un cambio en el tratamiento. Entre la respuesta óptima y fallo, existe una zona intermedia de alarma que requiere un monitoreo más frecuente ⁴¹.

En el presente estudio, nos planteamos analizar una muestra de 34 pacientes con diagnóstico de LMC que ingresaron en condición de RCC para analizar su respuesta molecular al inicio y en un monitoreo programado cada 6 meses por un total de 2 años. El objetivo principal fue determinar el grado de asociación entre la reducción de transcritos bcr/abl medido al inicio del estudio con la evolución de la enfermedad, teniendo en cuenta la recaída citogenética como criterio de progresión de enfermedad.

Hipótesis:

El grado de reducción del transcripto bcr/abl medido por RQ-PCR al ingreso al estudio se asocia con una mejor sobrevida libre de progresión de enfermedad.

Objetivo general:

- Desarrollo de monitoreo molecular para enfermedades oncohematológicas contribuyendo a optimizar la elección del tratamiento terapéutico, evaluación pronóstica y prevención de recaídas

Objetivos específicos:

- Desarrollo e implementación en Mendoza de la detección y cuantificación de la translocación t(9;22) presente en LMC por RT-PCR y PCR de tiempo real (RQ-PCR).
- Determinación de la respuesta molecular por RQ-PCR en 34 pacientes con LMC en fase crónica tratados con ITQ cada 6 meses por un período de 2 años.
- Evaluar el significado clínico de la medición por RQ-PCR del grado de reducción del transcripto bcr/abl con la sobrevida libre de progresión de enfermedad.

Metodología:

RQ-PCR:

La sensibilidad de esta técnica es de una célula por mil, lo que la hace útil en ERM ²⁹⁻³¹. Para evitar falsos resultados se incluyeron controles negativos (sin templado, sin polimerasa y, DNA o cDNA sin la secuencia blanco de la PCR) y controles positivos que proveyeron información sobre la eficiencia de la extracción de RNA y síntesis de cDNA en RT-PCR, así como células portadoras de la secuencia a amplificar. La adición de un fluorocromo de referencia interna como ROX permitió la normalización de la fluorescencia detectada, evitando diferencias por error de volumen, sistema óptico o características de los pocillos usados. Se respetaron los protocolos consensuados internacionalmente ²⁹⁻³¹.

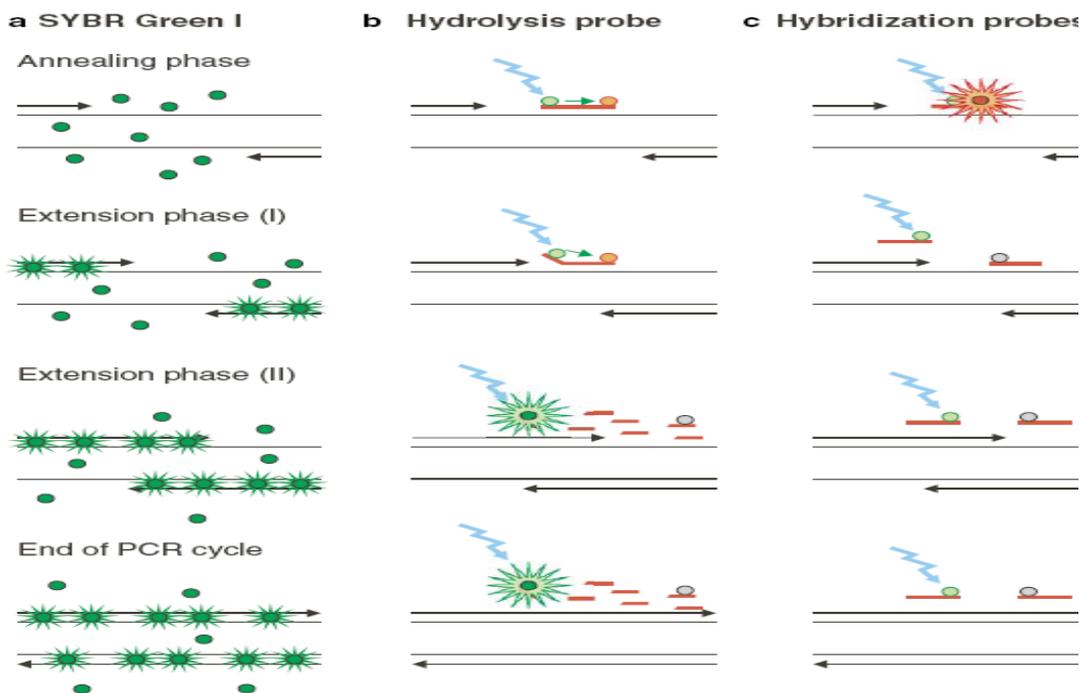


Figura 7. Ejemplo de la técnica RQ-PCR utilizada en el estudio (extraída de Leukemia 2003; 17:1013-1034) ²⁷.

- a) el SYBR Green I fluoresce al intercalarse en el DNA doble cadena generado durante la amplificación del templado en la PCR (detección inespecífica). Técnica utilizada en el estudio.

- b) la sonda Taq-man posee un fluorocromo reportero en 5' y un amortiguador de fluorescencia en 3'. Durante la amplificación de la secuencia target, la sonda (hibridizada en el camino de la polimerasa) es hidrolizada por la actividad 5' exonucleasa de la Taq, liberando la fluorescencia del reportero (detección específica).

- c) Se utilizan dos sondas complementarias al producto amplificado, una marcada en 3' con el fluorocromo donante que excita mediante FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), al fluoróforo aceptor de la otra sonda (detección específica).

La escala de reducción logarítmica de la expresión del gen de fusión correlaciona con la respuesta molecular y el % bcr-abl/c-abl determinada por RQ-PCR. Los resultados en el presente estudio fueron informados de la siguiente manera:

- Completa o CMR: %bcr-abl/c-abl <0.01. Red ≥ 4 log (≥ 10.000 copias del gen ABL para evitar falsos negativos).
- Mayor o MaMR: %bcr-abl/c-abl <0.1. Red ≥ 3 log.
- Menor o MiMR: %bcr-abl/c-abl >0.1 – 1. Red ≥ 2 log.
- Mínima o MeMR: %bcr/c-abl 1 – 10. Red < 2 log.
- Nula o NuMR: %bcr-abl/c-abl >10. Red < 1 log.

Diseño del estudio:

El presente estudio evaluó la presencia del gen de fusión bcr-abl en 34 pacientes con LMC en RCC tratados con los ITQ: Imatinib, Nilotinib o Dasatinib. La población incluyó pacientes de sexo masculino y femenino mayores de 18 años. Los pacientes bajo otro tipo de tratamientos fueron excluidos.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio BIOGEN situado en la Capital de Mendoza y los pacientes provinieron a partir de diferentes centros estatales y privados de Argentina.

Al ingreso al estudio se practicó un análisis citogenético convencional (no necesario para pacientes que lo hubieran hecho hasta 2 meses de la 1^{er} evaluación) para confirmar el estado citogenético basal. En pacientes con estudio citogenético no evaluable se realizó un estudio FISH en sangre periférica.

Se realizó una RQ-PCR a la entrada al estudio y luego cada 6 meses por un período de 2 años. A esto se le agregó el correspondiente seguimiento clínico y de laboratorio.

Período	1er Año				2do Año		
	Citog. Basal *	FISH Basal **	RQ- PCR1 Basal	RQ- PCR2 Mes 6	RQ- PCR4 Mes 12	RQ- PCR5 Mes 18	RQ- PCR6 Mes 24
Médula Ósea	X						
Sangre Periférica		X	X	X	X	X	X
Datos		X	X	X	X	X	X

*El estudio citogenético se practicó sólo si el paciente no lo hubiera hecho en los últimos 2 meses.

**El estudio FISH se practicó en aquellos pacientes en los que el estudio citogenético no pudiera ser confirmatorio.

Tabla 2. Cronograma del estudio.

Población y Muestra:

Enfermedad: Leucemia Mieloide Crónica

Criterios de Inclusión:

- Varones y mujeres mayores de 18 años
- LMC en 1a o 2a fase crónica en RCC bajo tratamiento con Imatinib
- LMC en 1a o 2a fase crónica en RCC bajo tratamiento con Nilotinib
- LMC en 1a o 2a fase crónica en RCC bajo tratamiento con Dasatinib

Criterios de Exclusión:

- Fase acelerada o crisis blástica de LMC
- Otros tratamientos antineoplásicos
- Embarazo y mujeres con capacidad reproductiva que no estuvieran recibiendo algún tipo de medida anticonceptiva

Consentimiento informado:

El investigador fue el responsable de obtener el consentimiento informado escrito con el paciente y un testigo, con firma y fecha de ingreso al estudio. El paciente obtuvo una copia del consentimiento informado.

Procesamiento y equipamiento

El procesamiento de las muestras de los pacientes en cuanto a los análisis citogenéticos, FISH y de biología molecular (PCR), fue realizado en el laboratorio BIOGEN, situado en la ciudad Capital de Mendoza.

Para el estudio RQ-PCR se contó con un aparato Rotor-Gene Q 5Plex HRM (ciclador para PCR en tiempo real e instrumento para HRM - fusión de alta resolución - con 5 canales). Los kits utilizados correspondieron a la marca *MolecularMD*®.

Las secuencias de primers bcr-abl p210 m-bcr utilizadas para la detección y cuantificación de los genes de fusión y gen control fueron según el Programa EAC³⁰.

GEN DE FUSION

ENF 501-T - TCCGCTGACCATCAATAAGGA

ENF 501-C - TCCGCTGACCATCAACAAGGA

ENR 561 - CACTCAGACCCTGAGGCTCAA

ENPr 541 - 6 FAM CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA TAMRA

GEN CONTROL

ENF1003 - TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGG

ENR 1063 - GATGTAGTTGCTTGGGACCCA

ENPr 1043 - VICCCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT TAMRA

BIOGEN presenta validación internacional del monitoreo molecular por RQ-PCR para la evaluación de respuesta del transcritto bcr/abl con el Departamento de Patología Molecular de la Universidad de Adelaida, Australia, dirigido por la Dra. Susan Branford.

Análisis estadístico

Los objetivos primarios del estudio fueron la evaluación de sobrevida libre de progresión (SLP) y sobrevida global (SG) utilizando el método de Kaplan-Meier. La SLP fue definida como el tiempo desde la entrada al estudio hasta la progresión de la enfermedad o muerte como resultado de cualquier causa. La definición de progresión de enfermedad fue la recaída citogenética (presencia de cromosoma Phi) en el análisis por citogenética convencional. La SG fue definida como el tiempo desde la entrada al estudio hasta la muerte por cualquier causa.

Resultados:

Se incluyeron 34 pacientes (ptes), Género: 16 Femenino/18 Masculino, mediana de 51 años (rango 24-69), riesgo según score Sokal: 14 (41,1%) Alto, 13 (38,2%) Intermedio y 7 (20,5%) Bajo. Ocho (8) ptes (23,5%) recibieron Interferón como primer tratamiento y los 34 (100%) Imatinib como 1ª línea de ITQ. Al ingreso al estudio 30 (88,2%) se encontraban en RCC1 y 4 (11,7%) en RCC2; 25 ptes (73,5%) en 1ª línea (todos con Imatinib) y 9 (26,4%) con 2ª (7 con Dasatinib y 1 con Nilotinib) o 3ª línea de ITQ (1 con Nilotinib), de los cuales 4 fueron por intolerancia y 5 por resistencia al tratamiento. La mediana de tiempo desde el diagnóstico hasta el ingreso al estudio fue de 36 meses (6-244). La mediana de tiempo desde el inicio de terapia con Imatinib hasta el ingreso al estudio fue también de 36 meses (6-103) (Tabla 2).

Número de pacientes	34
Mediana de edad, años (rango)	51 (24-69)
Mujeres/Varones	16/18
Score Sokal (%)	
Alto, Intermedio, Bajo	14 (41,1%), 13 (38,2%), 7 (20,5%)
Previo Tratamiento IFN (%)	8 (23,5%)
Fase Crónica 1/Fase Crónica 2	30 (88,2%)/4 (11,7%)
1ª Línea ITQ con I al ingreso al estudio	25 (73,5%)
2ª o 3ª Línea ITQ con D o N	9 (7D, 2N) (26,4%)
Tiempo desde Diagnóstico hasta Entrada al estudio (meses)	36 (6-244)
Tiempo desde Inicio de I hasta Entrada al estudio (meses)	36 (6-103)

IFN: Interferón, ITQ: Inhibidor de tirosina quinasa, I: Imatinib, D: Dasatinib, N: Nilotinib

Tabla 3. Características de los pacientes

Al mes 0 del estudio [n: 34, 100%], 24 ptes (70,5%) se encontraban en remisión molecular completa (CMR: red log ≥ 4) o remisión molecular mayor (MaMR: red log ≥ 3), 8 (23,5%) en remisión molecular menor (MeMR: red log ≥ 2) o mínima (MiMR: red log < 2) y 2 (5,8%) en remisión molecular nula (NuMR: red log < 1).

Durante el estudio 2 pacientes debieron salirse del protocolo de seguimiento debido a:

- Uno (1) por falta de provisión adecuada de la medicación.
- Uno (1) por cambio de lugar de monitoreo.

Cuatro (4) pacientes realizaron cambio a otro ITQ (todos por criterio del médico tratante) debido a:

- Dos (2) por recaída citogenética.
- Dos (2) por aumento en el nivel de transcritos de más de 2 logaritmos respecto al basal.

Todos ellos fueron tenidos en cuenta para los análisis de resultados.

Al mes 24 del estudio sobre los pacientes que completaron el seguimiento con la droga de inicio [n: 28]: 21 (75%) se encuentran en CMR/MaMR (18 mantuvieron y 3 disminuyeron su nivel de transcritos con respecto al basal) y 7 (25%) en MeMR/MiMR (3 mantuvieron, 4 aumentaron su nivel de transcritos con respecto al basal) (Tabla 3).

	Mes 0. n: 34 Pts (%)	Mes 24. n: 28 Pts (%)	Respuesta final
CMR: red log \geq 4/ MaMR: red log \geq 3	24 (70,5)	21 (75)	18 mantuvieron 3 disminuyeron
MeMR: red log \geq 2/ MiMR: red log $<$ 2	8 (23,5)	7 (25)	3 mantuvieron 4 aumentaron
NuMR: red log $<$ 1	2 (5,8)		

CMR: Respuesta molecular completa

MaMR: Respuesta molecular mayor

MeMR: Respuesta molecular menor

MiMR: Respuesta molecular mínima

NuMR: Respuesta molecular nula

Tabla 4. Respuesta Molecular

De los 32 ptes analizables que ingresaron en RCC, 2 (6,25%) perdieron su RCC y 7 (21,8%) nunca alcanzaron al menos una MaMR al final del estudio. Del grupo CMR/MaMR (23/32 ptes) hubo un (1) pte que aumentó en más de 2 logaritmos su nivel de transcritos respecto al basal. Mientras que del grupo con menor respuesta (9/32) con MeMR/MiMR/NuMR hubo dos (2) recaídas citogenéticas y un (1) aumento de más de dos logaritmos respecto al basal.

Los pacientes del grupo CMR/MaMR tuvieron una significativamente mejor sobrevida libre de recaída citogenética a 24 meses en comparación con el grupo de menor respuesta (100% vs 78,7 \pm 13,4%, p= 0,025), sin diferencias en cuanto a sobrevida global (Gráfico 3).

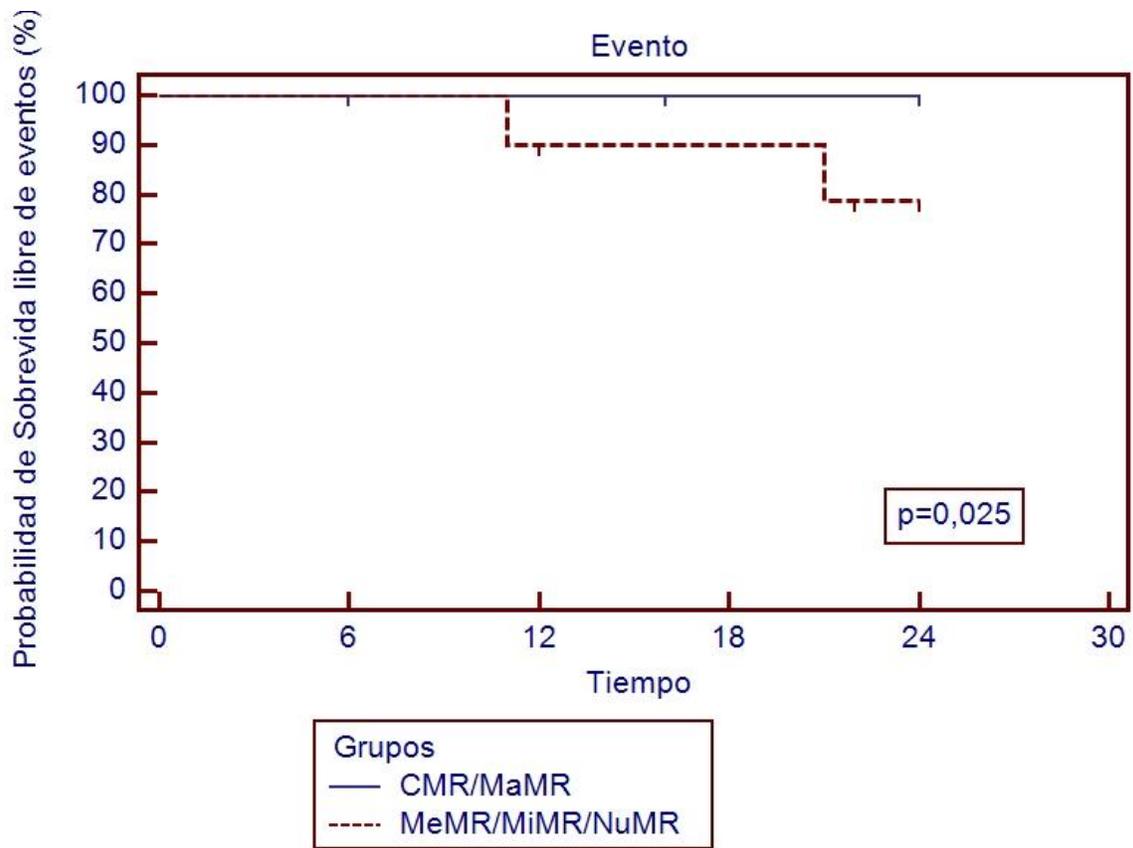


Figura 8. Evaluación de sobrevida libre de eventos en ambos grupos.

Discusión

Numerosos estudios indican que alcanzar una MaMR es predictivo de una remisión citogenética duradera y una baja tasa de progresión de enfermedad. Cortes y otros, reportaron significativamente una menor proporción de pacientes (5% con MaMR y 4% con CMR) quienes perdieron su RCC comparado con el 37% de quienes nunca alcanzaron estos niveles de respuesta molecular ⁴². En los 7 años de seguimiento del estudio IRIS, la probabilidad de pérdida de respuesta citogenética fue de 3% para los pacientes en MaMR a 18 meses comparado con el 26% de aquellos con RCC pero sin MaMR ³⁸. Otra cosa interesante en el seguimiento a 7 años del estudio IRIS fue que demostró que la progresión es muy rara en pacientes que alcanzaban la MaMR en cualquier momento durante el tratamiento con Imatinib ⁴³. Press y colaboradores también encontraron que la falla en alcanzar al menos 2-logaritmos de reducción del transcripto bcr/abl al momento de la RCC, o la de reducir 3-logaritmos en cualquier momento a partir ese punto, se asociaba con una significativa menor SLP ³⁹, y que un mínimo incremento como de medio-logaritmo del bcr/abl o la pérdida de la MaMR predice una menor sobrevida libre de recaída en pacientes que tenían RCC bajo Imatinib ⁴⁴.

Es importante destacar que hoy en día las drogas Dasatinib y Nilotinib, están siendo utilizadas en 1ª línea. En el estudio DASISION un porcentaje de transcriptos bcr/abl $\leq 10\%$ a 3 meses se asoció con una mayor probabilidad de alcanzar RCC a 12 meses (96 vs 27% para Dasatinib, 90 vs 45% para Imatinib), MaMR a 24 meses (76 vs 16% para Dasatinib, 66 vs 19% para Imatinib), una significativa mejor SLP a 3 años (93 vs 68% para Dasatinib, 96 vs 75% para Imatinib) y en la sobrevida global a 3 años (96 vs 86% para Dasatinib, 96 vs 88% para Imatinib) comparado con aquellos pacientes que no alcanzaron esta respuesta ^{45,46}.

Las guías de recomendaciones de la *European Leukemia Net* (ELN) del año 2009 consideraban que una respuesta subóptima a Imatinib en 1ª línea se definía como una falta de respuesta citogenética a 3 meses, menos que una respuesta citogenética parcial (RCP) a 6 meses, RCP a 12 meses, y menos que una MaMR a 18 meses ⁴⁷. Durante todos estos años de evaluación lo que se evidenció es que las implicancias pronósticas de esa respuesta subóptima pueden ser distintas según el momento en el cual es evaluada. Así, los resultados de los pacientes que tienen respuestas subóptimas a 6 y 12 meses, podrían ser más similares a la de aquellos que reúnen los criterios de falla al tratamiento, mientras que los resultados de los pacientes a 18 meses con respuesta subóptima pueden llegar a ser más cercanos a los pacientes con respuesta óptima ⁴⁸.

Al momento actual las guías recientes de la *European Leukemia Net* del año 2013, recomiendan el inicio del tratamiento con imatinib, nilotinib o dasatinib y que la respuesta sea evaluada por RQ-PCR y/o análisis citogenético a los 3, 6 y 12 meses. Se define como respuesta óptima un nivel de transcritos bcr-abl $\leq 10\%$ a los 3 meses, $< 1\%$ a los 6 meses y $\leq 0,1\%$ desde los 12 meses en adelante. Mientras que un nivel de transcritos bcr-abl $> 10\%$ a los 6 meses o del $> 1\%$ desde los 12 meses en adelante definen fallo, lo que ordenaría un cambio en el tratamiento. Asimismo, una RCP a 3 meses y RCC a 6 meses en adelante definen una respuesta óptima, mientras que una no respuesta Citogenética ($> 95\%$ Cromosoma Phi+) a los 3 meses, menos que una RCP a los 6 meses y menos que una RCC a los 12 meses en adelante definen fallo. Entre la respuesta óptima y fallo, existe una zona intermedia de alarma que requiere un monitoreo más frecuente. Se retira entonces el criterio de respuesta subóptima. Similares definiciones también son provistas para evaluar la respuesta a ITQ de 2a línea. Según estas nuevas recomendaciones la definición de respuesta tiene un importante valor operacional dado que es la base de continuar o cambiar el tratamiento ⁴¹.

Aunque nuestro estudio tuvo un tamaño limitado, encontramos que los pacientes que alcanzaron al menos una MaMR al inicio del estudio tuvieron una significativa mejor sobrevida libre de recaída citogenética a 24 meses en comparación con el grupo de menor respuesta (100% vs $78,7 \pm 13,4\%$, $p= 0,025$).

Además, es importante destacar que otros 2 pacientes tuvieron un aumento de ≥ 2 logaritmos en el nivel de transcritos bcr/abl, lo que conllevó, a criterio del médico tratante, a cambiar de ITQ. De esos 2 pacientes, uno pertenecía al grupo que no había alcanzado una MaMR al inicio (supuestamente de mayor riesgo), mientras que el otro paciente correspondió al grupo de mejor nivel de control. Esto resalta aún más la importancia de monitorear en forma continua a todos los pacientes independientemente del nivel de respuesta lograda.

Conclusiones

Nuestro estudio abarcó a pacientes en RCC en 1ª o 2ª fase crónica, por lo que si bien hubo un importante grupo de pacientes con Imatinib desde el inicio, otro grupo estaba recibiendo Dasatinib o Nilotinib como 2ª o 3ª línea de tratamiento (9 ptes), ya sea por intolerancia o resistencia a Imatinib. De igual modo, pudo establecerse una asociación en cuanto a ingresar al estudio con al menos una MaMR con una mejor SLP. Por lo tanto, según nuestros resultados, alcanzar al menos una MaMR en cualquier momento del monitoreo molecular en pacientes con LMC en RCC, es un importante predictor de sobrevida libre de progresión de enfermedad en cuanto a la recaída citogenética en comparación con aquellos que no la logran.

Nuevos Planteos y Desafíos

La búsqueda cada vez más precoz de pérdida de respuesta molecular e inicio temprano de nuevas terapias es una de las áreas de mayor desarrollo a partir de la mayor disponibilidad universal del monitoreo molecular, así como también de más y mejores ITQs ⁴¹.

Otra de las áreas de investigación tiene que ver con proyectos en marcha que plantean la posibilidad de suspensión de ITQs en pacientes con respuesta molecular completa sostenida. Estos mismo están dando resultados muy promisorios lo que podría traducirse en una remisión libre de tratamiento para un grupo importante de pacientes y para lo cual el monitoreo molecular aún fuera de tratamiento reviste una importancia capital ⁴⁹.

Referencias

- 1- Abramson S, Miller RG, Phillips RA. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med.* 1977;145:1567-1579.
- 2- Bennett J. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J.* 1845;64:413-423.
- 3- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood.* 1951;6:372-375.
- 4- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54:8-29.
- 5- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96:3343-3356.
- 6- Bizzozero OJ Jr, Johnson KG, Ciocco A, Kawasaki S, Toyoda S. Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-1964: II. *Ann Intern Med.* 1967;66:522-530.
- 7- Kantarjian HM, Smith TL, McCredie KB, et al. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood.* 1985;66:1326-1335.
- 8- Sokal JE, Baccarani M, Russo D, Tura S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol.* 1988;25:49-61.
- 9- Sokal JE, Baccarani M, Tura S, et al. Prognostic discrimination among younger patients with chronic granulocytic leukemia: relevance to bone marrow transplantation. *Blood.* 1985;66:1352-1357.
- 10- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood.* 1984;63:789-799.
- 11- Silver RT, Peterson BL, Szatrowski TP, et al. Treatment of the chronic phase of chronic myeloid leukemia with an intermittent schedule of recombinant interferon alfa-2b and cytarabine: results from CALGB study 9013. *Leuk Lymphoma.* 2003;44:39-48.
- 12- Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, et al, Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:850-858.
- 13- de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1982 Dec 23;300(5894):765-7.
- 14- Rowley JD. Molecular genetics in acute leukemia. *Leukemia.* 2000 Mar;14(3):513-7.
- 15- Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006 Jul;81(7):973-88.
- 16- Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M. The Leukemia Service. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med.* 1995; 122:254-261.

- 17- Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer*. 2003;97:1033-1041.
- 18- Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, et al. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338:962-968.
- 19- Weisdorf DJ, Anasetti C, Antin JH, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: comparative analysis of unrelated versus matched sibling donor transplantation. *Blood*. 2002;99:1971- 1977.
- 20- Goldman JM. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2828-37.
- 21- Weisberg E1, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005 Feb;7(2):129-41.
- 22- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Targeting ABL and SRC kinases in chronic myeloid leukemia: experience with dasatinib. *Future Oncol*. 2006 Dec;2(6):655-65.
- 23- Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1774-80. Epub 2007 Nov 30.
- 24- Sahay T, Schiffer CA. Monitoring minimal residual disease in patients with chronic myeloid leukemia after treatment with tyrosine kinase inhibitors. *Curr Opin Hematol*. 2008 Mar;15(2):134-9.
- 25- Martinelli G, Iacobucci I, Soverini S, et al. Monitoring minimal residual disease and controlling drug resistance in chronic myeloid leukaemia patients in treatment with imatinib as a guide to clinical management. *Hematol Oncol*. 2006 Dec;24(4):196-204.
- 26- Goldman J. Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Curr Opin Hematol*. 2005 Jan;12(1):33-9.
- 27- Martinelli G, Iacobucci I, Soverini S, et al. Monitoring minimal residual disease and controlling drug resistance in chronic myeloid leukaemia patients in treatment with imatinib as a guide to clinical management. *Hematol Oncol*. 2006 Dec;24(4):196-204.
- 28- Deininger M. Resistance to imatinib: mechanisms and management. *J Natl Compr Canc Netw*. 2005 Nov;3(6):757-68.
- 29- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- 30- van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003 Jun;17(6):1013-34.

- 31- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, 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 Dec;17(12):2318-57.
- 32- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007 Jul 28;370(9584):342-50.
- 33- Cross NC, White HE, Müller MC, et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012 Oct;26(10):2172-5.
- 34- 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.
- 35- Druker B, Guilhot F, O'Brien S, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-2417.
- 36- Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;349:1423-1432.
- 37- Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, et al. Survival benefit with imatinib mesylate versus interferon alpha-based regimens in newly diagnosed chronic phase chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2006;108:1835-1840.
- 38- Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, et al. Real-time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood*. 2004;104:2926-2932.
- 39- Press RD, Love Z, Tronnes AA, 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;107:4250-4256.
- 40- Wang L, Pearson K, Pilletteri 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.
- 41- Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872-84.
- 42- Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, et al. Molecular responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase treated with imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3425-32.
- 43- Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and ST1571 (IRIS). *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3758-65.
- 44- Press RD, Galderisi C, Yang R, et al. A half-log increase 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 Oct 15;13(20):6136-43.

- 45- Saglio G, Kantarjian H, Shah N, et al. Early Response (Molecular and Cytogenetic) and Long-Term Outcomes in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP): Exploratory Analysis of DASISION 3-Year Data. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012 120: Abstract 1675.
- 46- Hochhaus A, Saglio G, Chuah Ch, et al. Dasatinib and Imatinib-Induced Reductions in BCR-ABL Transcript Levels Below 10% At 3 Months Are Associated with Improved Responses in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP): Analysis of Molecular Response Kinetics in the DASISION Trial. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011 118: Abstract 2767.
- 47- Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):6041-51.
- 48- Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, et al. European LeukemiaNet criteria for failure or suboptimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4437-44.
- 49- Ross DM, Hughes TP. How I determine if and when to recommend stopping tyrosine kinase inhibitor treatment for chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2014 Jul;166(1):3-11.

Agradecimientos:

Colaboradores:

Estadística: Prof. Dr. Roberto Miatello

Citogenetista: Bioq. Verónica Chiaramello

Biólogo Molecular: Bioq. Gabriel Via

Médicos Hematólogos que colaboraron en la incorporación de pacientes:

Dra. Elvira Giannini,

Dr. Marcelo Mosso

Dra. Graciela Salinas

Dr. Emilio Sarkotic

Dra. María Laura Viudez

Dra. María Eugenia Fauque

Dra. Ana Aberastain