



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

**PARÁMETROS CLÍNICO-BIOLÓGICOS PREDICTIVOS DE
RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y DE RECAÍDA POST-DISCONTINUACIÓN
EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

Memoria de Tesis presentada por
Natalia Estrada Barreras

Para optar al Grado de
Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Investigación realizada
en el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras

Tesis realizada bajo la dirección
de la **Dra. Lurdes Zamora Plana**, la **Dra. Blanca Xicoy Cirici**
y la tutoría del **Dr. Simo Schwartz Navarro**

Natalia Estrada Barreras
La doctoranda

Lurdes Zamora Plana
La directora de tesis

Blanca Xicoy Cirici
La directora de tesis

Bellaterra, 2021

La Dra. Lurdes Zamora Plana, Responsable de la Unidad de Biología Molecular del Laboratorio de Hematología del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol e Investigadora Principal del Grupo de Neoplasias Mieloides del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras; y la Dra. Blanca Xicoy Cirici, adjunta de la Unidad de Hematología Clínica del ICO-Hospital Germans Trias i Pujol e investigadora Principal del Grupo de Neoplasias Mieloides del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras.

CERTIFICAN

Que la tesis doctoral titulada “Parámetros clínico-biológicos predictivos de respuesta al tratamiento y de recaída post-discontinuación en pacientes con leucemia mieloide crónica”, presentada por Natalia Estrada Barreras, para acceder al título de Doctora en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida delante del tribunal correspondiente.

El trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del ICO-Badalona y en el laboratorio del grupo de Neoplasias Mieloides del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras.

Badalona, 2021

Dra. Lurdes Zamora Plana

Dra. Blanca Xicoy Cirici

a mi abuela,
a mi tío.

mañana

AGRADECIMIENTOS

És el moment de mirar enrere, de repassar tots aquells moments que han fet d'aquest camí, una experiència inoblidable. I no hagués estat possible sense l'ajuda de moltíssimes persones. Totes elles han contribuït, d'una manera o altra, en què jo ara mateix pugui escriure aquestes línies.

Blanca i Lurdes, les meves directores de tesi. Només puc començar dient-vos gràcies! Gràcies per tot el que m'heu ensenyat, per tot el que heu confiat en mi. Per pensar en un projecte per la meua tesi doctoral, per començar-ho tot des de zero, demanant tantes i tantes beques. Gràcies per escoltar les meves idees i donar-me llibertat per dur-les a terme. Moltes gràcies pel vostre esforç constant per tirar endavant aquest projecte, que no ha estat gens fàcil, per les nostres llargues reunions (a vegades, fins i tot, filosòfiques!). Gràcies per donar-me l'oportunitat d'assistir a tants i tants congressos i cursos, tots ells han sigut una gran experiència. Moltes gràcies per preocupar-vos tant per mi, per intentar sempre el millor! He après moltíssim de vosaltres a nivell científic però també com a persona, tinc molta sort! **Blanca**, gràcies per oferir-me la possibilitat de començar amb els registres de mieloproliferatius, per ensenyar-me tant i tant sobre l'hematologia, per ser tan didàctica. Moltes gràcies per trobar sempre un forat per reunir-nos i dedicar-li tant de temps i carinyo a aquest projecte, per totes les teves idees. Gràcies per venir a veure'm a Aachen, em va encantar la visita! **Lurdes**, gràcies per ensenyar-me el gran món de la biologia molecular, per explicar-me tantes tècniques, sempre amb molta paciència i carinyo. Per seure al meu costat i mirar-nos una i una altra vegada els resultats (en alguns casos, no ha estat gens fàcil!!). Gràcies per fer-me sentir que sóc una més del vostre grup de molecular! A totes dues, gràcies per dedicar temps a totes les correccions, especialment durant aquests últims mesos, per ajudar-me a que tot surti endavant i de la millor manera possible. Gràcies!!!

Al meu tutor, el **Dr. Simo Schwartz**, per acollir-me al seu laboratori del CIBBIM durant les meves primeres pràctiques de la carrera. Pels seus consells i assessorament abans i durant la tesi.

El meu primer contacte amb l'hematologia va començar durant les pràctiques a l'últim any de la carrera; gràcies a l'**Albert Oriol** i la **Luz**, vaig iniciar-me en el món dels assajos clínics. Moltes gràcies a tots dos per oferir-me aquesta oportunitat!! Durant aquells mesos, a més a més d'aprendre moltíssim, vaig conèixer a la gran majoria de persones que, tot i no saber-ho en aquell moment, formarien una part molt important de tots aquests darrers anys. Poc després, vaig fer una petita estada a la Unitat de Citogenètica. Aquell va ser el meu primer contacte amb la part més experimental de l'hematologia. **Isabel, Javier, Neus, Adela, Marisol, Carmen** i **Nani**, moltíssimes gràcies per tot el que em vau ensenyar, sou un equip genial! A tu, Isabel, gràcies per

les converses tan interessants sobre música, sèries i pel·lícules...per més converses així esmorçant!

I amb el final de la carrera, va arribar la meva primera oportunitat laboral. Gràcies a la Blanca, vaig començar a treballar en la gestió de les bases de dades i dels registres nacionals de neoplàsies mieloproliferatives. Això va ser l'inici de tot el que vindria més tard. De les millors coses que m'emporto d'haver treballat a l'àtic és conèixer el meravellós equip d'hematologia clínica de l'ICO: **Dr. Ribera**, gràcies pels teus consells, per la teva naturalitat, per tot el que m'has ensenyat, pels teus "ànims petita!". Ha sigut un plaer tenir-te al costat i aprendre tant de tu!! A la **Christelle**, la **Susana**, l'**Anna Torrent**, la **Montse**, moltes gràcies per la vostra ajuda sempre que ho he necessitat! **Miriam**, por compartir conmigo todo lo que sabes sobre rutas de montaña, rutas por Islandia...por tus abrazos! **Juanma**, gracias por todo!!! Por estar dispuesto a ayudarme siempre que lo he necesitado, por el tiempo compartido en nuestro "despachito" (cómo lo echo de menos!!), por esos ratos hablando de música (Joe Crepúsculo, Javiera Mena, Tame Impala...). A tots els residents amb els que he anat coincidint aquests anys: la **Marta**, la **Clara**, la **Mónica**, l'**Eduarne**, la **Mireia**, l'**Eloi**, el **David**, l'**Andrea**... gràcies!!! Especial menció a la **Gigi**, que sempre, sempre, m'alegrava el dia!! Gràcies a tots els clínics per la vostra participació incloent pacients en els estudis d'aquesta tesi, pel vostre compromís amb tota la part de la discontinuació. Sense vosaltres, no hagués estat possible.

A **Mariajo**, por todos los momentos compartidos durante estos años, por los congresos nacionales juntas, por nuestras risas en las clases de inglés con la **Donna** (thank you very much, you are the best english teacher ever!). A la **Mireia**, per totes les estones compartides al despatx, per la teva ajuda amb l'estadística i pel pa del Juliette de Vilassar!!

Inma i **Olga**, no sé ni per on començar a agrair-vos tot el que heu fet i feu per mi. Sou molt més que unes companyes de feina, sou unes amigues excepcionals! Tinc molta sort d'haver-vos conegut! **Inma**, gràcies per tots aquests anys, per les converses i abraçades, per saber com estem només amb una mirada. Per tot el que m'has explicat, ets un llibre obert i cada dia aprenc alguna cosa de tu! **Olga**, la meva Olgui... Gràcies infinites, per tot!!! Per ser com ets, per ser una persona tan entregada, tan bona amiga. Per les nostres converses, per tot el teu suport durant aquests anys (en lo bueno y en lo malo). Trobo molt a faltar compartir "despatxet" amb tu!! Moltíssimes gràcies per tot el que m'has ajudat amb l'estadística, per totes les hores que li has dedicat, i sempre fent-ho amb tant d'amor i carinyo, com et caracteritza...Aquesta tesi no hagués estat possible sense tu!!!

A la resta de professionals de l'àtic, les infermeres, auxiliars, zeladors, les senyores de la neteja (sempre tan encantadores!!). A l'**Albert**, que quan el vaig conèixer feia les substitucions de l'Inma, gràcies per ensenyar-me tantes coses sobre fotografia!

Als meus companys de Biologia Molecular de l'ICO, amb els que comparteixo laboratori a l'Institut Josep Carreras des de 2018. Sou els millors!!! I tot i que a vegades us miri amb cara de "necessito silenci" (sobretot en aquests últims mesos), us he de dir que m'encanta l'ambient que hi ha al lab, sou els més divertits i l'enveja de tot l'edifici!! **Sílvia**, gràcies per tot el teu suport dintre i fora del laboratori, per iniciar-me en el món de la *digital* PCR, per fer-nos companyia a totes les reunions dels grups cooperatius. Gràcies per acceptar formar part de la meva comissió de seguiment del doctorat!! **Marta**, gràcies per la teva energia, per les teves frases plenes d'optimisme, per ser una gran profe ensenyant-me la tècnica de la NGS! Com a "pipiolo" del grup, continuaré posant-vos al dia de tota la música :) A **Diana**, per ser la alegría del laboratorio, por su buen humor, sus canciones y risas, que tanto nos alegran el día! Al **Lluís**, per ser l'altre "pipiolo" del laboratori (el més esportista!), per fer equip amb mi quan parlem dels no-joves (jejeje, és broma), per intentar que adopti no un, sinó dos gatets. Gràcies a tots dos per ser uns tècnics tant implicats i per estar disposats a ajudar-me sempre que ho he necessitat. **Itzi**, el laboratorio sin ti no sería lo mismo! Por esos cánticos de alegría, por la previsión meteorológica al minuto, por tu radar para el papel de plata, pero sobretodo por tu gran compañerismo! A **Pepe**, aiiii mi Pepe (jajaja), mi compi de escritorio, el que solo con mirarme sabe si estoy estresada o no, el que no se olvida de mí para bajar a desayunar (menos mal de las notas que ocupan toda la pantalla..!). Porqué te apuntas a un bombardeo y acompañas a Itzi en todos sus cánticos!! A tots vosaltres, gràcies! Lurdes, pots estar ben contenta de l'equipàs que formeu!!!

A la resta de companys del laboratori d'hematologia de l'ICO: al **Marc**, moltíssimes gràcies per la teva ajuda amb la citometria, les cèl·lules NK, les *Myeloid-derived*...i tots els altres mals de cap que segur t'he fet passar...jeje!! Ets un crack i és genial col·laborar amb tu en qualsevol projecte! A la **Minerva**, mi prima segunda favorita! Gracias también por toda la ayuda, no solo con las células NK, sino siempre que lo he necesitado. Gracias también a **Sara** por su colaboración en el proyecto de las NK! A **Elisa**, por estar siempre dispuesta a ayudar, y con una sonrisa! A **Fuensanta** y a **Tomàs**, por compartir vuestros conocimientos, por las sesiones de citología. Tomàs, gràcies per tota l'ajuda amb els tràmits de la SEHH. Al **Jordi Juncà**, a la **Inès**, per la seva ajuda quan ho he necessitat. A l'**Aleix** per les seves visites al lab d'hemato (puc punxar?). Al **Cristian**, de Bioquímica, moltíssimes gràcies per la teva ajuda aconseguint tots els controls sans per l'estudi de telòmers. És admirable la teva dedicació, les teves ganes d'ajudar.

Al **Dr. Feliu**, moltes gràcies per tota l'ajuda durant aquests anys, per tot el teu suport. Gràcies per dedicar tant d'esforç a impulsar la recerca, i fer-ho tot sempre amb un somriure!

A tots els meus companys i investigadors de l'Institut Josep Carreras. **Kiko**, gràcies per tot, per ser tan proper i estar sempre disposat a escoltar i ajudar. Al grup de SMD i Plataformes, sou un gran equip! **Laura**, gràcies per tota la teva ajuda, no només amb els polimorfismes, sinó sempre que ho he necessitat. Gràcies pels teus consells i per ajudar-me amb les beques. Pels cursos d'estadística amb R a la UAB! **Mar**, per les nostres converses al menjador i als passadissos intentant solucionar el món, per la teva implicació al comitè d'empresa. **Nuri**, gracias por tu alegría, por ser una super-organizadora de eventos, por estar siempre dispuesta a ayudar. **Rocío y Jessica**, muchísimas gracias por todo vuestro trabajo en el circuito de muestras, sin vosotras, la investigación no sería posible! **Jessi**, por tus consejos sobre rutas de montaña y furgo! **Paula**, tot i que ja no estiguis treballant amb nosaltres a l'Institut, et trobem molt a faltar! Ets una persona increïble i estic molt contenta d'haver-te conegut. Per més concerts juntes!!! **Pame**, por ser mi compi de la EHA, porque los congresos no serían lo mismo sin ti. Por tu ayuda y ánimos con el doctorado! **Francisco**, per les teves abraçades d'"emergència" quan ho he necessitat, pels cafès, per les nostres converses sobre música, sempre tan interessants!! **Ana**, aunque nos conozcamos poquito, puedo decir que eres una persona encantadora!

Al grup de citòmica funcional, per tot el que m'han ajudat amb el projecte de *Side Population* (SPop)!! **Jordi**, moltíssimes gràcies per la teva implicació amb la LMC, per ensenyar-me tant sobre la SPop, per totes les estones que m'has dedicat, especialment durant aquests últims mesos. **Laura**, moltes gràcies per ensenyar-me el protocol de detecció de la SPop, per les estones a cultius cel·lulars explicant-m'ho tot, per la teva paciència, per estar disposada a ajudar-me sempre amb un somriure! Simplement, a tots dos, gràcies!! A l'**Àngel** per ajudar-me sempre que ho he necessitat, sobretot amb els cultius, per la planteta d'aloè vera (ara ja està super gran!), i al **Jorge**, per la seva ajuda ("ja puc moure jo la SPop cada 15 minuts") i alegria al laboratori!!

A la resta de companys de l'IJC: al súper **Jordi Ribera**, per les converses als passadissos, pels teus bons consells, perquè sempre, sempre em fas riure. Per més concerts de Mastodon junts! A **Celia y Miriam**, por su buen humor, porque serán las siguientes doctoras y unas grandes investigadoras! A **Joao**, por sus buenos consejos, por animarme siempre a seguir adelante. I més investigadors, personal administratiu i de suport de l'IJC: al **Josep** (et trobem a faltar!), a l'**Eulàlia**, a **Marcus**, a **Roberto** (para cuándo un concierto de Za!?), a l'**Emili** (per tota la teva ajuda amb els cultius!!), a

Awilda, a **Palalais** (siempre con esa sonrisa y esas palabras que me alegran el día!). A l'**Albert** i l'**Alba** per fer possible que tot funcioni i puguem continuar amb la recerca dia a dia. A tots, gràcies!!!

A totes les persones que ens han enviat mostres i han participat en aquesta tesi, fent-la possible. Sobretot a la gent de l'ICO, l'**Anna Angona**, la **Conxa Boqué**, el **Rolo**, el **Miguel Sagüés**, gràcies per contestar a tots els meus mails, per omplir les bases de dades. Gracias a los investigadores del GELMC, que colaboran con nosotros. Gracias a **Paqui Ferrer**, del Hospital de Murcia, por enviarnos muestras, por completar los datos y estar siempre disponible para ayudarnos. Gracias a la SEHH por apostar por los investigadores jóvenes.

Thanks to everyone from the Uniklinik RWTH Aachen lab, especially to **Fabian Beier**, **Dr. Tim Brümmendorf** and **Monica Ferreira**, who took the time to teach me everything about telomeres and had helped me a lot with the manuscript. I learned a lot from you all and I have really good memories of those weeks in the beautiful Aachen! Danke schön!

Als protagonistes més importants, per fer possible aquesta tesi doctoral: moltíssimes gràcies a tots els pacients amb LMC que hi han participat!! Sense la vostra col·laboració desinteressada res d'això hagués estat possible.

Y no solo en el ámbito profesional, sino también en el personal, tengo muchísimo que agradecer.

A mis amigas de toda la vida, desde que teníamos solo tres años! **Ceci**, **Hasi**, **Miriam**, **Laia** (tot i que vas arribar una mica més tard, ets amiga de tota la vida!), muchas gracias por todos estos años juntas, por ser uno de mis pilares imprescindibles, por vuestro cariño, por preguntarme y preocuparos por la tesis. Sois las mejores!!! Tengo mucha suerte de teneros como amigas, por muchísimos más años de amistad! Y a mis dos amigos, también de toda la vida y por ello tan especiales, **Ferran** y **Álvaro**, gracias por ser como sois y estar siempre cuando os he necesitado. A la **Núria**, per ser la meva *partner in crime* científica, per poder compartir aquest món amb tu i que ens mirin com si fóssim frikis (una mica sí, eh?). A mis amigos "del 88"! **Miguel**, gracias por confiar siempre en mis argumentos científicos, por todo tu interés en la ciencia (y en muchísimas otras cosas!), por todo lo compartido. **Frank**, vas arribar al grup fa uns anys i ja ets del "nucli dur", gràcies per iniciar tots els debats possibles, pels teus articles del *Menéame*, per tot el que ens ensenyes sobre geologia. **Helen**, gràcies per ser la gran amiga que ets, tan atenta, tan divertida! Gràcies especialment per aquests últims mesos, per tot el suport que m'has donat, per fer-me costat quan

més ho he necessitat, per animar-me. Frank, Helen, teniu un nen preciós, petit Èric, això també és per tu! A mis amigos de Vic, **Edu** y **Mery**, a los que me gustaría ver mucho más!! Y a mis dos Dublineses/Dubliners preferidos, **David** y **Elisa**, por las visitas a Dublín (sois los mejores anfitriones!), por todos nuestros viajes y aventuras (qué ganas tengo de la próxima!!!), por nuestros conciertos de Joe Crepúsculo (Elisita, al escenarioooo!), gracias por vuestra amistad y apoyo!! A todos vosotros, gracias por escucharme hablar de la tesis, por preguntarme, por vuestro interés!

A les meves amigues de la uni, les biotec, **Marta**, **Ari** i **Berta**, gràcies per tots els anys compartits dintre de la UAB i fora, pels sopars, Apolos, etc...! La uni sense vosaltres no hauria estat el mateix, i estic molt contenta d'haver-vos conegut!

A toda mi familia, cada uno de ellos, por todo su amor y apoyo.

A mi tío **Santi**, por sus bromas, por su buen humor, por sus consejos para hablar en público que tanto me han ayudado! A l'**Angelina**, per enrecordar-se de mi i guardar-me tots els retalls dels diaris on parlen de científiques. A mi tío **Funi**, porque siempre ha creído que fuimos los biotecnólogos los que creamos a *Terminator*. A mi primo **Javi**, por animarme siempre con el doctorado y por demostrarme lo orgulloso que está de su prima pequeña (y yo de él!). A mi prima **Elena**, por su curiosidad en la ciencia, por todas nuestras conversaciones sobre biología, porque sé que lleva una gran científica dentro. Por su apoyo e interés en esta tesis. Por las fiestas y conciertos juntas!! A **María**, por ser una gran psicóloga y Dj!!

A mi tío **Paco**, esta tesis también es para ti. Por preguntarme durante todo el proceso, por creer en mí como científica, por tu apoyo incondicional. Gracias por ser un tito tan genial y especial, por todo lo que hemos compartido sobre música, películas, series. Por demostrar que has sido y serás siempre un ejemplo de valentía y lucha. Porque me hubiese encantado que ahora pudieses estar leyendo estas líneas. Te voy a echar muchísimo de menos. A mi tía **Angie**, por ser la maravillosa persona que es, una mujer luchadora, un ejemplo. Por todo el amor que transmite con sus abrazos. Por preocuparse por mí, por confiar en mí. Gracias a los dos!!!

A mis abuelos, **Papa Asensio** y **Mama Dolores**, por todo. Por cuidarme tanto desde pequeña. A mi abuelo por todos los paseos de ida y vuelta al colegio, por los ratos en el parque. A mi abuela, mama Dolores, porque si ahora estoy escribiendo esto es por ti, porqué me has guiado hasta aquí. Gracias por ser la mejor abuela del mundo, supongo que es por eso que te echo tanto de menos. Porque has sido y serás siempre mi referente.

A mi prima **Eva**, por ser como mi hermana mayor, otra referente y una gran amiga. Por estar conmigo desde pequeña y enseñarme tantas cosas. Gracias por todas tus preguntas sobre ciencia, porque invitan a pensar (a veces muchísimo: “si piso muy fuerte el suelo, ¿mato bacterias?”). Muchísimas gracias por el diseño y la maquetación de esta tesis, has hecho un gran trabajo, ha quedado preciosa!!! Eres la mejor, y no lo digo porque seas mi prima, lo digo porque es la verdad. Muchas gracias por toda tu ayuda y apoyo incondicional, en todo, y especialmente en estos últimos meses. A **Víctor**, porque siempre, siempre, está dispuesto a ayudar. Por hacer los mejores cócteles del mundo. Por tus recomendaciones literarias desde que era una adolescente. Por las conversaciones durante las cenas de nuestro “club del cocktail”. Por tu ayuda y apoyo con la tesis. A **Emma y Marcel**, por ser los niños más preciosos, inteligentes y simpáticos del mundo!!!

A **Mónica, Sergio, Martín y Gemma**, gracias por todo vuestro apoyo y ánimos! A la familia de Argentina, porque siempre os he sentido cerca.

A **Fede**, por compartir toda esta aventura juntos. Por ser mi mejor amigo. Por pensar que “hematopoyética” era un insulto. Gracias por escuchar con atención una y otra vez todas mis presentaciones, cuando te hablo de cosas del laboratorio o cosas de *little scientist*. Gracias por haber decidido hacer un doctorado en cerveza artesana conmigo. Por convertir nuestro piso en una microcervecería. Por nuestra actitud científica, midiendo todos los parámetros posibles de la cerveza. Gracias por estos últimos meses, que aún siendo muy complicados (y no solo por la tesis), has estado siempre a mi lado apoyándome. Es un placer hacer camino contigo.

A mis padres y a mi hermano, gracias por ser mi mayor apoyo, por todo lo que habéis confiado en mí desde siempre. Si hoy estoy aquí, es gracias a vosotros. **Mario**, el pequeño, estoy muy orgullosa de ti. Eres un gran enfermero y mejor persona! Me encanta que trabajemos en el mismo ámbito, que podamos compartir el mundo de la hematología. Estoy muy contenta de que hayas encontrado a **Alejandra**, tan buena persona y también una gran enfermera!! A ti, **Papa**, porque para mí eres el mejor ejemplo de esfuerzo y dedicación. Porque me has ayudado siempre que lo he necesitado, me has apoyado y animado en todo. Porque los viajes en furgó con vosotros son los mejores! Estoy muy orgullosa de ti, por todo, por tu esfuerzo con el *english* (ya estoy libre para ayudarte!). A ti, **Mama**, por ser mi ejemplo a seguir. Gracias por ser la gran persona que eres, es admirable tu amor y dedicación por todo. Por tu apoyo incondicional, por saber perfectamente cómo estoy en todo momento, por nuestras conversaciones. Por ser mi mejor amiga. Gracias por estos últimos meses, eres una parte fundamental de todo esto. A los dos, gracias por ser los mejores padres del mundo!!!

ÍNDICE

ÍNDICE

PÁG.

 ABREVIATURAS.....	18
 INTRODUCCIÓN	22
1. HEMATOPOYESIS	23
2. NEOPLASIAS MIELOIDES.....	25
3. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	27
3.1. Aspectos generales.....	27
3.2. Contexto histórico de la LMC.....	29
3.3. Epidemiología y etiología.....	30
3.4. Características clínicas y diagnóstico.....	30
3.5. Índices pronósticos al diagnóstico de la LMC	32
3.6. Enfoque clínico de la LMC	34
3.6.1. Tratamiento previo a la era de los inhibidores de la tirosina quinasa	34
3.6.2. Inhibidores de la tirosina quinasa para el tratamiento de la LMC.....	34
3.7. Respuesta a los inhibidores de la tirosina quinasa	40
3.7.1. Definición de la respuesta y técnicas indicadas para su determinación.....	40
3.7.2. Monitorización de la respuesta y recomendaciones de los expertos.....	44
3.8. Fallo de tratamiento a los inhibidores de tirosina quinasa	46
3.8.1. Mecanismos de resistencia a los inhibidores de tirosina quinasa	46
3.8.2. Toxicidad e intolerancia a los inhibidores de tirosina quinasa	50
3.9. Discontinuación del inhibidor de tirosina quinasa	52
3.9.1. Ensayos clínicos de discontinuación y recomendaciones de los expertos.....	52
3.9.2. Protocolo de discontinuación del Institut Català d'Oncologia	55
3.9.3. Pacientes candidatos a discontinuar el tratamiento.....	57
3.10. Factores clínicos predictores de remisión libre de tratamiento.....	59
3.11. Mecanismos biológicos de persistencia de la LMC tras discontinuación del tratamiento	61
3.11.1. La célula madre leucémica de la LMC.....	61
3.11.2. El papel del sistema inmunitario en la LMC	65
 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	70



MATERIAL Y MÉTODOS 74

TRABAJO I: Detección de SNPs en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos y relacionados con la respuesta a imatinib 75

1. Pacientes y diseño del estudio 75
2. Procesamiento general de las muestras 75
3. Extracción del ADN y cuantificación 76
4. Genotipado de SNPs presentes en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos 76
 - 4.1. Estudio piloto: DMET™ Plus Microarray 77
 - 4.2. Estudio principal: 96.96 Dynamic Array™ integrated fluidic circuit (IFC) with SNP Type Assays 78
5. Análisis de los datos obtenidos 79
 - 5.1. Estadísticos descriptivo e incidencias acumuladas 79
 - 5.2. Análisis de asociación mediante herramientas bioinformáticas 79

TRABAJO II: Influencia de la longitud de los telómeros al diagnóstico de la LMC en la obtención de la respuesta molecular profunda con imatinib 83

1. Pacientes y diseño del estudio 83
2. Procesamiento de las muestras, extracción del ADN y cuantificación 83
3. Determinación de la longitud de los telómeros mediante monochrome multiplex qPCR 84
4. Análisis estadístico de los datos 87

TRABAJO III: Parámetros clínicos y biológicos predictivos de recaída post-suspensión del ITQ 89

1. Pacientes y diseño del estudio 89
2. Metodología empleada en cada uno de los sub-estudios biológicos 90
 - 2.1. Determinación de los transcritos de BCR-ABL1 mediante PCR digital 90
 - 2.1.1. Extracción de ARN manual y síntesis de ADN complementario (ADNc) 91
 - 2.1.2. Protocolo de PCR digital 91
 - 2.2. Análisis y cuantificación de la Side Population mediante citómica funcional 95
 - 2.3. Análisis y cuantificación de las células Natural Killer mediante citometría de flujo 99
3. Análisis estadístico de los datos 101



RESULTADOS 102

TRABAJO I: Detección de SNPs en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos y relacionados con la respuesta a imatinib 103

1. Estudio piloto	104
1.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio piloto	104
1.2. Polimorfismos significativos en el análisis de asociación para la cohorte del estudio piloto	104
2. Estudio de extensión para el análisis de la asociación entre SNPs en genes ADME y la respuesta al tratamiento con imatinib	107
2.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio de extensión	107
2.2. Análisis de asociación de los polimorfismos con la respuesta a imatinib para toda la cohorte de pacientes del estudio de extensión	109
2.3. Análisis de asociación mediante validación cruzada	111
2.4. Análisis de asociación mediante test por permutaciones	113
2.5. Incidencias acumuladas de RMM para cada SNP estadísticamente significativo	114
2.6. Análisis e identificación de haplotipos	117
2.7. Análisis de las posibles interacciones entre los SNPs (epistasia)	119

TRABAJO II: Influencia de la longitud de los telómeros al diagnóstico de la LMC en la obtención de la respuesta molecular profunda con imatinib 120

1. Características clínicas y biológicas de los pacientes incluidos en el estudio	120
2. Correlación entre la delta-LT al diagnóstico y la obtención de una respuesta molecular profunda a imatinib	122
3. Correlación entre la delta-LT al diagnóstico, los índices pronósticos y la isoforma de p210	125
4. Análisis univariante y multivariante	126
5. Correlación entre la delta-LT y los hitos de respuesta molecular indicados en las recomendaciones de la ELN 2013	127

TRABAJO III: Parámetros clínicos y biológicos predictivos de recaída post-suspensión del ITQ 130

1. Características clínicas y biológicas de los pacientes incluidos en el Trabajo III 130
2. Análisis de posibles factores clínicos predictores de recaída molecular 134
3. Posibles factores biológicos predictores de recaída molecular 138
 - 3.1. Determinación de los transcritos de BCR-ABL1 mediante PCR digital 140
 - 3.1.1. Puesta a punto de la técnica 140
 - 3.1.2. Cuantificación absoluta de los transcritos de BCR-ABL1 mediante dPCR en pacientes que han discontinuado el tratamiento y comparación con los resultado obtenidos en la cuantificación relativa mediante qPCR 142
 - 3.2. Estudio de las células de la Side Population y del inmunofenotipo de las LSCs 146
 - 3.2.1. Estudio cuantitativo de la subpoblación de células SPop al diagnóstico y durante el tratamiento con el ITQ 148
 - 3.2.2. Análisis cuantitativo y caracterización inmonufenotípica de la subpoblación de células SPop en los pacientes que discontinuaron el tratamiento 150
 - 3.3. Análisis y cuantificación de las células Natural Killer 153
 - 3.4. Análisis caso a caso: descripción integrada de los diferentes parámetros biológicos estudiados en los pacientes que presentaron recaída molecular y comparación con pacientes que mantienen la RLT. 156
 - 3.4.1. Caso A: paciente nº8 (pérdida RMM) vs. paciente nº1 (RLT) 156
 - 3.4.2. Caso B: paciente nº11 (pérdida RMM) vs. paciente nº12 (RLT) 159
 - 3.4.3. Caso C: paciente nº15 (pérdida RMM) vs. paciente nº10 (RLT) 162
 - 3.4.4. Caso D: paciente nº17 (pérdida RMM) vs. paciente nº16 (RLT) 165

• DISCUSIÓN 168

1. Resistencia primaria a imatinib: el papel de la farmacogenética 171
 - 1.1. Polimorfismos en genes implicados en el transporte de imatinib hacia el interior y el exterior de las células 172
 - 1.2. Polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de imatinib 177
2. La respuesta molecular profunda como requisito para la suspensión segura del ITQ 182

3. La discontinuación del ITQ: un nuevo objetivo terapéutico y muchas dudas por resolver	187
3.1. Parámetros clínicos predictivos de una remisión libre de tratamiento exitosa	188
3.2. Biomarcadores predictivos de recaída tras discontinuación	191
3.2.1. El papel de la PCR digital como herramienta para el estudio de la enfermedad residual medible	192
3.2.2. Las células de la Side Population y su posible papel en la recaída tras la discontinuación	194
3.2.3. El papel de las células Natural Killer en el mantenimiento de la RLT ...	197

 CONCLUSIONES	202
---	-----

 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	206
---	-----

 BIBLIOGRAFÍA.....	208
--	-----

 ANEXOS.....	231
---	-----

ABREVIATURAS

- ACA:** alteraciones citogenéticas adicionales
- ADME:** absorción, distribución, metabolismo y eliminación
- ADNc:** ADN complementario
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- CMP:** *common myeloid progenitor* (progenitor común mieloide)
- CLP:** *common lymphoid progenitor* (progenitor común linfoide)
- Ct:** *cycle threshold*
- CTL:** *cytotoxic T lymphocyte* (linfocito T citotóxico)
- DC:** *dendritic cells* (célula dendrítica)
- DCV:** *Dye Cycle Violet*
- ddPCR:** *droplet digital PCR*
- dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfato
- dPCR:** PCR digital
- ELN:** European LeukemiaNet
- ELTS:** EUTOS *long term survival*
- ERM:** enfermedad residual medible
- FA:** fase acelerada
- FB:** fase blástica
- FC:** fase crónica
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- GELMC:** Grupo español de leucemia mieloide crónica
- HR:** *hazard ratio*
- HSC:** *hematopoietic stem cell* (célula madre hematopoyética)
- HT:** *halving time*
- HUGTiP:** Hospital Universitario Germans Trias i Pujol
- HWE:** *Hardy-Weinberg equilibrium* (equilibrio de Hardy-Weinberg)

- IC95%:** intervalo de confianza al 95%
- ICO:** Institut Català d'Oncologia
- INF- α :** interferón- α
- IS:** escala internacional o *international scale*
- ITQ:** inhibidor de tirosina quinasa
- ITQ-2G:** ITQ de segunda generación
- KIR:** *killer-cell immunoglobulin-like receptors*
- LD:** límite de detección
- LIC:** *leukemia-initiating cell* (célula iniciadora de la leucemia)
- LMC:** leucemia mieloide crónica
- LPC:** *leukemic progenitor cell* (célula progenitora leucémica)
- LSC:** *leukemic stem cell* (célula madre leucémica)
- LT:** longitud de los telómeros
- MDSC:** *myeloid-derived suppressor cell*
(célula supresora de origen mieloide)
- MM:** *Master mix*
- MM-qPCR:** *monochrome multiplex qPCR*
- MO:** médula ósea
- Mo-MDSC:** *monocytic myeloid-derived suppressor cell*
(célula supresora de origen mieloide monocítica)
- NGS:** *next generation sequencing* (secuenciación de nueva generación)
- NK:** células *natural killer* (célula asesina natural)
- NMP:** neoplasias mieloproliferativas
- NTC:** *non template control* (control negativo)
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- OR:** *odd ratios* (razón de probabilidades)

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*
(célula mononuclear de sangre periférica)

Ph: cromosoma Filadelfia

PMN-MDSC: *polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell*
(célula supresora de origen mieloide polimorfonucleada)

qPCR: *real-time quantitative polymerase chain reaction*
(reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

RMM: respuesta molecular mayor

RHC: respuesta hematológica completa

RCC: respuesta citogenética completa

RM: respuesta molecular

RMP: respuesta molecular profunda

RM4: respuesta molecular grado 4

RLT: remisión libre de tratamiento

RMT: respuesta molecular temprana

SNP: *single-nucleotide polymorphism*
(polimorfismos de un sólo nucleótido)

SLE: supervivencia libre de evento

SLP: supervivencia libre de progresión

SLR: supervivencia libre de recaída molecular

SP: sangre periférica

SPop: *Side Population*

Tm: *melting temperature* (temperatura de fusión)

TLE: tampón de lisis eritrocitaria

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

Treg: *regulatory T cell* (células T reguladoras)

INTRODUCCIÓN

1. HEMATOPOYESIS

La **hematopoyesis** es un proceso fisiológico constante y dinámico que da lugar a la formación y desarrollo del repertorio de células sanguíneas. En los organismos vertebrados, la hematopoyesis se inicia durante el desarrollo embrionario y la localización de este proceso pasa por diferentes etapas para acabar asentándose, en la edad adulta, en la médula ósea (MO) de los huesos planos, como el esternón, la pelvis, las vértebras y las costillas. Cada día, el sistema hematopoyético de un adulto sano produce alrededor de un trillón de células nuevas de la sangre con diferentes funciones. A pesar de que aún hay muchos aspectos desconocidos sobre la hematopoyesis, existe un amplio consenso en que es un proceso jerarquizado que se inicia a partir de una pequeña población de células madre hematopoyéticas (en inglés, *hematopoietic stem cell*, HSC). Estas células tienen la capacidad de autorrenovarse indefinidamente, y es por ello que en inglés son conocidas como *long-term repopulating HSC*. Además, son capaces de diferenciarse para dar lugar a las células de los distintos linajes hematopoyéticos [1] (Figura 1).

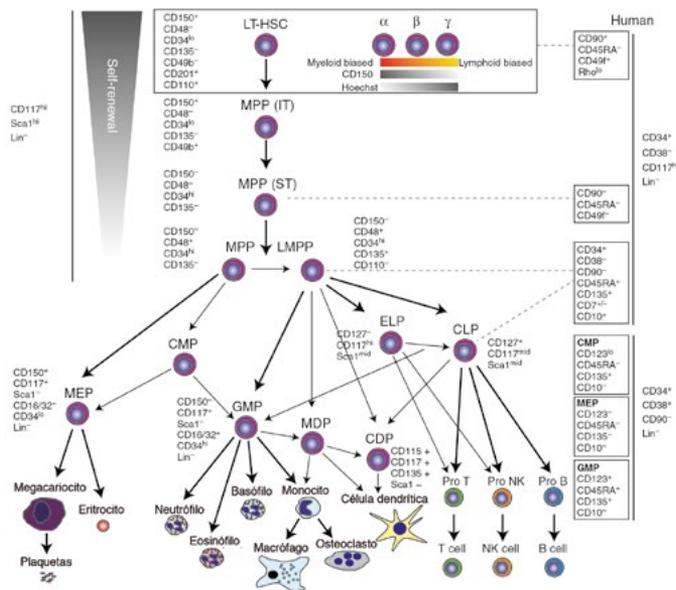


Figura 1. Jerarquía celular de la hematopoyesis humana. LT-HSC, *long-term hematopoietic stem cell* (célula madre hematopoyética a largo plazo); MPP, *multipotent progenitor* (progenitor multipotente); LMPP, *lymphoid-primed MPP* (MPP de pre-instrucción linfóide); ELP, *early lymphoid progenitor* (progenitor linfóide temprano); CLP, *common lymphoid progenitor* (progenitor común linfóide); CMP, *common myeloid progenitor* (progenitor común mieloide); MEP, *megakaryocyte-erythrocyte progenitor* (progenitor de megacariocitos y eritrocitos); GMP, *granulocyte-macrophage progenitor* (progenitor de granulocitos y macrófagos); MDP, *monocyte-dendritic cell progenitor* (progenitor de monocitos y células dendríticas); CDP, *common dendritic progenitor* (progenitor común dendrítico). Adaptada de Rieger y Schroeder, 2012 [1].

La mayoría de HSC se encuentran en un estado quiescente y cuando se activan, se inicia la diferenciación celular. Durante este proceso, la HSC pierde su capacidad de autorrenovación y da lugar a los progenitores multipotentes (en inglés, conocidos como *short-term repopulating multipotent progenitor*), que conservan todavía el potencial para dar lugar a los diferentes linajes hematopoyéticos. Estas células serán entonces capaces de diferenciarse en progenitores comunes mieloides (en inglés, *common myeloid progenitors*, CMPs) y progenitores comunes linfoides (en inglés, *common lymphoid progenitors*, CLPs), y ello dependerá de la expresión de factores de transcripción específicos de cada linaje. De los CMPs derivan las células del linaje mieloides: monocitos, granulocitos, eritrocitos y megacariocitos. De los CLPs derivan las células del linaje linfoides: linfocitos T, linfocitos B y células *Natural Killer* (NK). No obstante, la diferenciación hematopoyética es mucho más compleja y las mismas células de un linaje pueden originarse a través de diferentes progenitores y vías de diferenciación (Figura 1) [1]. La transición/diferenciación de una HSC hacia uno u otro linaje depende tanto de factores intrínsecos (factores de transcripción, reguladores epigenéticos, reguladores del ciclo celular y proteínas reguladoras de la división celular) como extrínsecos (derivados del micro-ambiente).

Posibles defectos en este complejo proceso de regulación y diferenciación, como por ejemplo la adquisición de mutaciones o cambios en las vías de señalización, pueden provocar la transformación de HSCs normales en células malignas, dando lugar a **neoplasias hematológicas** [2].

De todas las **alteraciones** producidas en el proceso de la **mielopoyesis** (mecanismo de generación y desarrollo de las células del linaje mieloides) se derivan las **neoplasias mieloides**. Por el contrario, si las alteraciones se dan en el proceso de la **linfopoyesis** (proceso de formación de las células del linaje linfoides), se derivan las **neoplasias linfoides**.

La introducción de esta tesis se focalizará en las **neoplasias mieloides** y, más concretamente, en la **leucemia mieloide crónica** (LMC), motivo de estudio de la presente Tesis Doctoral.

2. NEOPLASIAS MIELOIDES

Las neoplasias mieloides son un grupo heterogéneo de hemopatías que se caracterizan por una expansión anormal de células del linaje mieloide, alteraciones en la diferenciación celular o una mezcla de ambas. Su origen tiene lugar como consecuencia de un proceso complejo que incluye diversas etapas; la acumulación de lesiones genéticas y epigenéticas en las HSCs y los progenitores mieloides, lo cual lleva a la alteración de procesos clave como una autorrenovación defectuosa, el bloqueo de la diferenciación o una proliferación excesiva [3].

Las neoplasias mieloides se clasifican según los criterios de la Clasificación de Tumores Hematológicos y Tejidos Linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicada por primera vez en 2001 (OMS 2001) y actualizada posteriormente en 2008 (OMS 2008) y en 2017 (OMS 2017) [3–6]. Esta clasificación de las neoplasias hematológicas se basa en las características morfológicas, citoquímicas e inmunofenotípicas de cada enfermedad en la MO y la sangre periférica (SP), e incorpora cada vez más características genéticas específicas.

De acuerdo con la clasificación de la OMS 2017, utilizada en esta tesis, **las neoplasias mieloides se dividen en 6 categorías principales**, todas ellas descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las neoplasias mieloides según los criterios de la OMS 2017 [6]. Adaptada de Tefferi y Pardanani, 2015 [7].

NEOPLASIAS MIELOIDES					
Síndromes mielodisplásicos (SMD)	Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas	Neoplasias mieloproliferativas (NMP)	Neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia y reordenamiento de genes	Mastocitosis	Leucemia aguda mieloides (LAM)
<p>Rasgos característicos</p> <p>Citopenias, displasia en uno o más linajes mieloides</p> <p>Hematopoyesis inefectiva</p> <p>Anomalías genéticas recurrentes</p> <p>Riesgo elevado de desarrollar una leucemia mieloides aguda</p> <p>MO normo- o hiper celular que contribuye al desarrollo de citopenias</p>	<p>Rasgos clínicos y morfológicos característicos tanto de SMD como de NMP</p> <p>MO hiper celular</p> <p>Proliferación excesiva en algunos linajes e inefectiva en otros (dando lugar al aumento de células displásicas y a la vez citopenias)</p>	<p>Proliferación excesiva de uno o varios linajes mieloides</p> <p>MO hiper celular</p> <p>Esplenomegalia y hepatomegalia</p> <p>Eventual progresión de la enfermedad (fallo medular) y transformación a fase aguda</p> <p>Progresión precedida por alteraciones genéticas adicionales</p>	<p>Eosinofilia en la mayoría de casos como consecuencia del clon mieloides neoplásico o de la liberación de citoquinas por parte de linfocitos T clonales</p> <p>En algunos casos la célula de origen puede ser un progenitor multipotente común a la serie mieloides y linfoides</p>	<p>Proliferación y acumulación de mastocitos en uno o varios órganos</p> <p>Manifestaciones clínicas heterogéneas; predominan las lesiones cutáneas</p> <p>Posible progresión a neoplasias más agresivas asociadas con fallo multiorgánico y una baja supervivencia</p>	<p>Detección de >20% de blastos en sangre periférica o MO</p> <p>Si <20% pero asociado con translocaciones o inversiones</p> <p>t(8;21)(q22;q22.1), inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22) o la presencia del gen de fusión PML-RARA</p>
<p>Tipo de neoplasia maligna</p> <p>SMD con displasia unilineal</p> <p>SMD con sideroblastos en anillo</p> <p>SMD con displasia multilinea</p> <p>SMD con exceso de blastos</p> <p>SMD con del(5q) aislada</p> <p>SMD in clasificable</p> <p>SMD infantil</p>	<p>Leucemia mielomonocítica crónica</p> <p>LMC atípica, BCR-ABL1 -</p> <p>Leucemia mielomonocítica juvenil</p> <p>SMD/NMP con sideroblastos en anillo y trombocitosis</p> <p>SMD/NMP in clasificable</p>	<p>Leucemia mieloides crónica</p> <p>Leucemia neutrofílica crónica</p> <p>Policitemia vera</p> <p>Mielofibrosis primaria</p> <p>Trombocitemia esencial</p> <p>Leucemia eosinofílica crónica</p> <p>NMP in clasificable</p>	<p>Neoplasia mieloides/linfoides con reordenamiento de PDGFRα</p> <p>Neoplasia mieloides/linfoides con reordenamiento de PDGFRβ</p> <p>Neoplasia mieloides/linfoides con reordenamiento de FGFR1</p> <p>Neoplasia mieloides/linfoides con el gen de fusión PCMI-JAK2</p>	<p>Mastocitosis cutánea</p> <p>Mastocitosis sistémica</p> <p>Sarcoma de mastocitos</p>	<p>LAM con anomalías genéticas recurrentes</p> <p>LAM con cambios relacionados con la mielodisplasia</p> <p>Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia</p> <p>LAM no categorizable</p> <p>Sarcoma mieloides</p> <p>Proliferaciones mieloides asociadas con síndrome de Down</p>

3. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

3.1. Aspectos generales

La LMC es una neoplasia hematológica clonal que se incluye, desde la clasificación de la OMS de 2008, dentro del grupo de las **neoplasias mieloproliferativas** (NMP). A nivel clínico, se caracteriza por una expansión descontrolada de células de linaje mieloide en la MO, en la SP y en otros órganos como el bazo.

El origen molecular de la LMC tiene lugar en una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, denominada $t(9;22)(q34.1;q11.2)$, que da lugar a la formación del **cromosoma Filadelfia** (Ph) (Figura 2). Esta translocación tiene como resultado la fusión de 2 genes: el gen *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*), situado en el cromosoma 22 (región q11.2), y el gen *ABL1* (Abelson), en el cromosoma 9 (región q34.1). Esta fusión da lugar a la formación del oncogén BCR-ABL1 [8]. El producto de este oncogén es la proteína **tirosina quinasa BCR-ABL1**, que está constitutivamente activa.

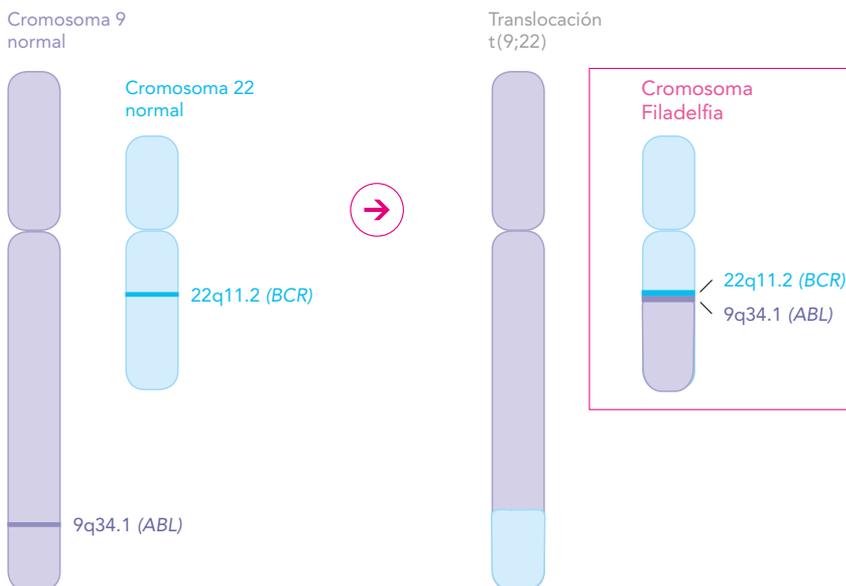


Figura 2. Esquema de la formación del cromosoma Filadelfia (Ph).

La tirosina quinasa BCR-ABL1 puede tener diferentes transcritos, que dan lugar a diferentes proteínas de fusión, dependiendo del punto de ruptura de los genes *BCR* y *ABL1* en el momento de la translocación. El punto de ruptura en el gen *ABL1* es constante y se da entre los exones 1b y 2. En cambio, el punto de ruptura en el gen *BCR* varía: en la mayoría de los pacientes con LMC (98%), se sitúa en la región mayor (*Major-breakpoint cluster*), una región de ~3 kb entre los exones 13 y 14. Si el punto de ruptura se da en el exón 13, el transcrito resultante será el **e13a2** (e13 por el gen *BCR* y a2 en referencia al gen *ABL1*). En cambio, si el punto de ruptura es en el exón 14, el transcrito resultante será el **e14a2**. Ambos transcritos se traducen en una proteína de 210 kDa (p210^{BCR-ABL1}). No obstante, el punto de ruptura en *BCR* también puede darse en la región menor (*minor-breakpoint cluster*), situada en el intrón 1, dando lugar al transcrito e1a2 que codifica para la proteína p190^{BCR-ABL1}. Por último, si el punto de ruptura en *BCR* se da en el exón 19 (región llamada μ -bcr), aparece el transcrito e19a2, que da lugar a la proteína p230^{BCR-ABL1} (Figura 3). La proteína p210 es la más frecuente en los pacientes con LMC, aunque también existe una baja proporción de pacientes con LMC (2%) que presentan la proteína p190 (suelen cursar con monocitosis) o p230 (en la que predomina la neutrofilia).

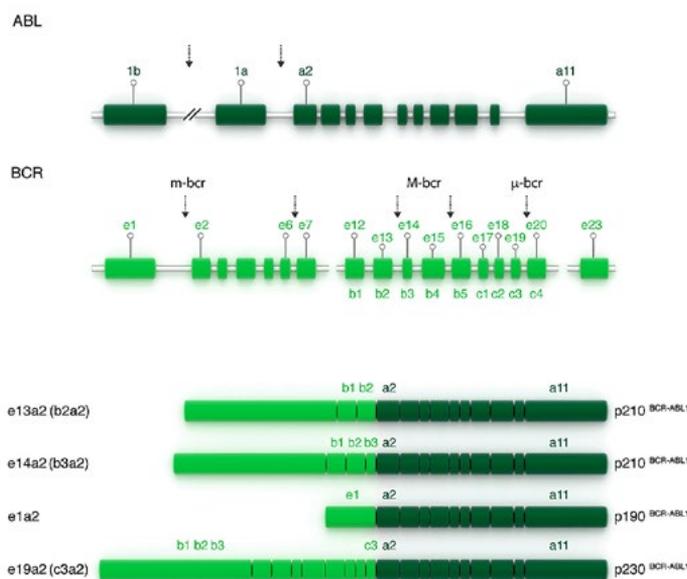


Figura 3. Esquema de los puntos de ruptura más frecuentes del reordenamiento BCR-ABL1. El gen *ABL1* contiene 2 exones 5' "alternativos" (llamados 1b y 1a), seguido de 10 exones "comunes" llamados a2-a11 (recuadros verdes oscuros). El gen *BCR* contiene un total de 23 exones, aunque en esta imagen únicamente se muestran los exones e1, e12-e16 y el e23. En el caso de la LMC, la ruptura en *BCR* normalmente se da entre los exones e13 (b2) y e14 (b3), o entre los exones e14 (b4) y e15 (b4). Pero en una minoría de pacientes, la ruptura de *BCR* se puede dar entre el exón 1 y exón 2 o entre el exón 19 y exón 20. m-bcr; *minor-breakpoint cluster*; M-bcr, *Major-breakpoint cluster*. Adaptada de Mughal et al, 2016 [9].

Se ha sugerido que la formación del cromosoma Ph tiene lugar en la HSC. Tras la adquisición del cromosoma Ph por parte de una HSC, en la MO co-existen dos tipos celulares: la HSC (no maligna) y la célula madre leucémica (en inglés, *leukemic stem cell*, LSC), que ha adquirido la translocación. Debido a la señal proveniente del oncogén BCR-ABL1 en las LSC, se produce una migración de células progenitoras leucémicas (en inglés, *leukemic progenitors cells*, LPC) de la MO hacia la SP, donde su supervivencia pasa a ser oncogén-dependiente. Esta supervivencia mediada por BCR-ABL1 pasa por la activación de vías de señalización como JAK/STAT, PI3K/AKT, PI3K/mTOR y RAS/MEK, entre otras [10]. Las LPCs expresan elevados niveles de transcritos BCR-ABL1 y de éstas derivan el resto de células malignas detectadas al diagnóstico de la LMC.

La transformación leucémica resultante conduce a una notable expansión de los progenitores eritroides, granulocíticos y megacariocíticos, con una disminución de la sensibilidad de éstos a la regulación del proceso de la hematopoyesis.

3.2. Contexto histórico de la LMC

A principios del siglo XIX, la LMC fue reconocida como entidad clínica caracterizada por esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo) y leucocitosis. Casi 100 años después, en 1960, los investigadores Nowell PC y Hungerford DA, describieron una anomalía en el grupo de cromosomas G (cromosomas 21, 22, Y) de las células de pacientes con LMC; esta anomalía fue llamada cromosoma Ph, ya que el descubrimiento tuvo lugar en el estado de Filadelfia, Estados Unidos [11]. Posteriormente, en 1973, Janet Rowley demostró mediante el método de citogenética por tinción de bandas G, que este cromosoma Ph era resultado de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 [12]. No obstante, no fue hasta 1980 que se identificó la oncoproteína resultante de esta translocación; la tirosina quinasa BCR-ABL1, responsable de la hemopatía [13–16]. Como consecuencia, esta oncoproteína fue reconocida como diana terapéutica y ello derivó en el desarrollo de los inhibidores de tirosina quinasa (ITQs), que cambiaron completamente el curso clínico y pronóstico de la LMC. Gracias a la introducción de los ITQs en la práctica clínica diaria, la LMC ha pasado de ser una hemopatía incurable (la supervivencia mediana era antiguamente de 5 a 7 años), a ser una hemopatía con una esperanza de vida similar a la de la población general, al menos en países occidentales [17]. En definitiva, la aparición de los ITQs ha mejorado sustancialmente el pronóstico de la LMC y ha aumentado significativamente su prevalencia (se espera que en el año 2050 la prevalencia sólo en Estados Unidos sea de 181.000 casos) [18].

3.3. Epidemiología y etiología

La LMC es una enfermedad rara con una incidencia de uno-dos casos por cada 100.000 habitantes/año. Afecta algo más a los varones y la media de edad al diagnóstico se sitúa alrededor de los 50-60 años, aunque puede darse a cualquier edad [19,20]. La incidencia anual aumenta con la edad, desde <0,1 casos por cada 100.000 en niños hasta $\geq 2,5$ casos por cada 100.000 en adultos. No se ha documentado ninguna variación significativa en la incidencia en cuanto a etnia o localización geográfica, aunque sí se ha observado una relación entre un diagnóstico a edades tempranas y un bajo nivel socioeconómico [6].

Los factores que predisponen al desarrollo de la LMC son desconocidos. Solo la exposición a elevada radiación ha sido relacionada con la aparición de esta neoplasia, sobre todo entre los supervivientes de bombas atómicas. Al contrario que otras NMPs, hay muy poca, o casi ninguna, predisposición hereditaria [6].

3.4. Características clínicas y diagnóstico

Alrededor del 50% de los pacientes diagnosticados de LMC están asintomáticos en el momento de la presentación de la enfermedad y, en muchos de los casos, la LMC es detectada casualmente en analíticas de control o exámenes físicos realizados por otros motivos.

Normalmente, el primer hallazgo que sugiere la existencia de una LMC se observa en el **hemograma**, que pone de manifiesto una hiperleucocitosis con presencia de granulocitos inmaduros, mielocitos, metamielocitos, blastos en algunos casos, una eosinofilia y basofilia características y una no infrecuente trombocitosis. En el examen físico, un 40-50% de los pacientes presenta esplenomegalia. Ante la sospecha de la existencia de una LMC, el elemento clave para su diagnóstico es la **detección del cromosoma Ph** mediante **técnicas de citogenética convencional**, junto con la presencia del **reordenamiento BCR-ABL1** en SP o MO, mediante técnicas de **biología molecular o de hibridación *in situ* fluorescente**.

El **aspirado de médula ósea** es esencial tanto para realizar los estudios citogenéticos como para la **evaluación morfológica** necesaria para confirmar la fase de la enfermedad. En esta última, se suele ver una MO hiper celular con marcada proliferación granulocítica, los megacariocitos son más pequeños de lo normal y con un núcleo hipobulbado. La cifra de blastos y basófilos y la presencia o no de enfermedad extramedular permite determinar en qué fase se encuentra la enfermedad al diagnóstico: fase crónica (FC), fase acelerada (FA) o fase blástica (FB).

Fase crónica

La LMC suele debutar en un 90%-95% de los casos en FC, fase en la que los síntomas pueden ser fácilmente controlables con los ITQs. Los pacientes suelen presentar anemia y esplenomegalia, así como astenia, sudoración nocturna, pérdida de peso y malestar generalizado. Otros síntomas menos frecuentes son las hemorragias por disfunción plaquetaria (hemorragias retinianas o úlceras a nivel gastrointestinal), trombosis (asociado a trombocitosis y/o leucocitosis), hepatomegalia (~10% de los casos) y priapismo.

El diagnóstico de la LMC en FC se establece por el hallazgo de leucocitosis en SP (media: $\sim 80 \times 10^9/L$), donde destaca sobretodo la proporción de neutrófilos y formas más inmaduras de la línea granulocítica. Es común también la presencia de basofilia y eosinofilia. El número de plaquetas puede ser normal o aumentado, incluso superior a $\geq 1000 \times 10^9/L$. En la FC, los blastos normalmente representan $<2\%$ del total de células de la SP y $<5\%$ de la MO.

Fase acelerada y fase blástica

Si los pacientes no son tratados o si el tratamiento no es suficientemente eficaz, la enfermedad puede progresar a una FB, siendo a veces precedida por una FA. Existen controversias en la definición de ambas fases por parte de las diferentes clasificaciones, como la de la OMS o la de la European LeukemiaNet (ELN). En cuanto al número de blastos en la FA la OMS indica que debe ser entre un 10-19% mientras que la ELN sube el porcentaje a 15-29%. Y en relación a la FB, la OMS establece el diagnóstico a partir de un 20% de blastos mientras que la ELN lo establece a partir del 30% [21].

Es importante destacar que la FB de la LMC es una de las hemopatías más agresivas y de peor pronóstico conocidas, siendo la mediana de supervivencia inferior al año si no se realiza un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico. Clínicamente, se produce un rápido deterioro del estado general del paciente por una invasión de células blásticas en la SP, la MO y ocasionalmente otros órganos.

Los blastos que aparecen en la FB suelen ser de origen mieloiide (llamada FB mieloiide) y un 25% de los casos expresan un fenotipo linfoide, generalmente de estirpe B (llamada FB linfoide). Además, en el 50-80% de los casos se describen alteraciones citogenéticas adicionales (ACA) como por ejemplo la adquisición de un cromosoma Ph adicional, la trisomía 8, la trisomía 19 y/o el isocromosoma 17q, entre las más comunes.

3.5. Índices pronósticos al diagnóstico de la LMC

Para estimar la supervivencia de los pacientes con diagnóstico reciente de LMC se han utilizado clásicamente tres índices pronóstico, el Sokal, el EURO (Hasford) y el EUTOS (*European Treatment and Outcome Study*). Todos ellos se basan en factores clínicos y hematológicos [22–24].

El índice **Sokal** fue descrito en 1984 en pacientes en fase no blástica y tratados, en su gran mayoría, con busulfán. Posteriormente, se ha validado su influencia pronóstica en pacientes tratados con ITQs. Este índice ha sido el más utilizado durante años. El índice **EURO (Hasford)**, fue descrito en pacientes tratados con interferón, pero posteriormente no ha sido validado en pacientes tratados con ITQs. Por otro lado, el índice **EUTOS** fue el primero en desarrollarse a partir de una cohorte de pacientes con LMC en FC y tratados con imatinib (primer ITQ disponible) y al ser diseñado tomando como objetivo la probabilidad de alcanzar una RCC a los 18 meses (a corto plazo), la edad del paciente no influye en su capacidad pronóstica.

Actualmente, y gracias a la eficacia de los ITQs, la mayoría de pacientes mueren por causas diferentes a la LMC. Es por ello que se ha establecido un nuevo índice para predecir la probabilidad de morir por LMC: el **EUTOS Long Term Survival (ELTS)**. Este índice, desarrollado con una serie de pacientes tratados con ITQs, usa los mismos parámetros que el Sokal (hematológicos, presencia o no de esplenomegalia y edad del paciente), pero reajustando el peso que se otorga tanto a las plaquetas como a la edad, de manera que con el índice ELTS son menos los pacientes incluidos en los grupos de riesgo intermedio y alto, en comparación con el índice Sokal [25].

En la Tabla 2 se detalla cómo se realiza el cálculo de todos estos índices pronóstico y la definición y puntuación de cada grupo de riesgo.

Hoy en día, los expertos recomiendan el uso del índice ELTS como predictor de supervivencia ya que la gran mayoría de pacientes con LMC son tratados con ITQs y suelen morir por causas diferentes a la LMC [26].

Tabla 2. Cálculo de los diferentes índices y definición de los grupos de riesgo.

ÍNDICE	CÁLCULO	DEFINICIÓN DE LOS GRUPOS DE RIESGO
Sokal	$\text{Exp } [0,0116 \times (\text{edad en años} - 43,4) + 0,0345 \times (\text{tamaño bazo en cm} - 7,51) + 0,1889 ([\text{recuento de plaquetas}/700]^2 - 0,563) + 0,0887 \times (\text{recuento de blastos en SP} - 2,10)]$	Riesgo bajo: <0,8
		Riesgo intermedio: 0,8-1,2
		Riesgo alto: >1,2
EURO (Hasford)	$0,666 \times (\text{edad en años, solamente si } >50) + 0,042 \times (\text{tamaño bazo en cm}) + 1,0956 \times (\text{plaquetas si } >1500) + 0,0584 \times (\text{recuento de blastos en SP}) + 0,20399 \times (\text{porcentaje basófilos si } >3\%) + 0,0413 \times (\text{porcentaje eosinófilos})$	Riesgo bajo: <780
		Riesgo intermedio: 781-1480
		Riesgo alto: >1480
EUTOS	$4 \times (\text{tamaño del bazo en cm}) + 7 \times (\text{porcentaje basófilos})$	Riesgo bajo: <87
		Riesgo alto: >87
ELTS	$0,0025 \times (\text{edad en años}/10)^3 + 0,0615 \times (\text{tamaño bazo en cm}) + 0,1052 \times (\text{recuento de blastos en SP}) + 0,4104 \times (\text{recuento de plaquetas}/1000)^{0,5}$	Riesgo bajo: <1,5680
		Riesgo intermedio: 1,5680-2,2185
		Riesgo alto: >2,2185

Exp: exponencial

SP: sangre periférica

3.6. Enfoque clínico de la LMC

3.6.1. Tratamiento previo a la era de los inhibidores de la tirosina quinasa

A principios del siglo XX, el objetivo terapéutico de la LMC era controlar la sintomatología, en lugar de influir en la biología de la enfermedad. Tratamientos como la irradiación del bazo y, posteriormente, los agentes citotóxicos como el **busulfán** (alquilante) o la **hidroxiurea** (inhibidor de la reductasa ribonucleótida), mejoraban en cierto grado las cifras hemoperiféricas así como la sintomatología, pero en ningún caso retrasaban o evitaban la progresión de la enfermedad a fases más avanzadas (habitualmente a los 4-5 años desde el diagnóstico). Con busulfán se observó una mayor proporción de FB debido a que tenía capacidad mutagénica.

Más tarde, en 1970, dos estrategias terapéuticas totalmente diferentes como el **interferón- α** (INF- α) y el TPH alogénico, demostraron no solo tener una influencia en la biología de la enfermedad (reducción del porcentaje de metafases Ph-positivas) sino también una mejora en la supervivencia de los pacientes [27].

El INF- α es capaz de inducir una remisión citogenética completa (es decir, 0% de cromosomas Ph en la MO) en un 10-15% de los pacientes. En comparación con el busulfán y la hidroxiurea, el INF- α aumentó la esperanza de vida de 12-18 meses a 6-7 años. No obstante, su administración subcutánea y los efectos secundarios de este tratamiento disminuían la calidad de vida de los pacientes, limitando su uso a largo plazo. El mecanismo de acción del INF- α no es del todo conocido, pero se sabe que tiene un efecto inmunomodulador. Hoy en día este efecto está siendo evaluado en combinación con los ITQs con el objetivo de optimizar la respuesta a los mismos.

El **TPH alogénico** ha sido hasta hace poco la única estrategia terapéutica curativa para la LMC. En los años 80 era el tratamiento de primera línea en pacientes con LMC en FC o FA candidatos y con donante disponible. Los pacientes en fases avanzadas recibían previamente quimioterapia intensiva con el objetivo de retornar a una FC antes de proceder con el TPH alogénico. No obstante, la gran eficacia de los ITQs en el tratamiento de la LMC ha hecho que hoy en día este procedimiento se reserve para aquellos pacientes que han fracasado a varios ITQs o que evolucionan a fases avanzadas.

3.6.2. Inhibidores de la tirosina quinasa para el tratamiento de la LMC

Existen distintos tipos de ITQs para el tratamiento de la LMC y la elección del mejor tratamiento en cada caso viene determinada por las características del paciente (edad y comorbilidades) y de los ITQs (eficacia, perfil de toxicidad temprana o tardía y coste económico).

Actualmente, hay cuatro ITQs aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* para el tratamiento de la LMC en primera o más líneas: imatinib, dasatinib, nilotinib y bosutinib.

Además, existen otros 2 ITQs, Ponatinib y Asciminib; ponatinib está aprobado para su uso en pacientes resistentes a ITQs de segunda generación (ITQ-2G) y cuando existe la mutación T315I. Asciminib está pendiente de aprobación en pacientes resistentes a varios ITQs.

A continuación, se describen estos ITQs en mayor detalle:

Imatinib

Imatinib (STI571, Gleevec/Glivec), desarrollado por la farmacéutica Novartis, fue el primer ITQ en recibir la aprobación de la FDA para el tratamiento de los pacientes con LMC en FC. Actúa a través de la inhibición competitiva del sitio de unión a ATP (dominio quinasa) en la conformación inactiva de la proteína ABL1 (Figura 4), lo que resulta en la inhibición de la fosforilación de proteínas implicadas en vías de transducción de señal y finalmente, en la muerte celular.



Figura 4. Molécula de imatinib (en rojo) unida a la proteína quinasa BCR-ABL1 (en verde).

El primer ensayo clínico llevado a cabo con imatinib fue el *International Randomized Study of Interferon and STI571* (IRIS), que comparó el efecto de imatinib frente a una combinación de INF- α y bajas dosis de citarabina. Este ensayo clínico supuso una gran revolución en la LMC, ya que imatinib demostró una tasa de supervivencia libre de evento (SLE) del 81% y una tasa de supervivencia libre de progresión (SLP) del 92%, además de mayores tasas de respuesta citogenética y molecular. Con imatinib, las tasas de respuesta molecular mayor (RMM), definida como una reducción de los transcritos de BCR-ABL1 por debajo del 0,1%, son entre el 18-58% durante el primer año de tratamiento [28].

La dosis estándar de imatinib es de 400 mg/día y hoy en día se prefiere un cambio de ITQ a administrar dosis más altas; en FC se podría plantear dar una dosis de 300 mg/día en caso de intolerancia leve, siempre y cuando la respuesta sea óptima.

No existen contraindicaciones para el tratamiento con imatinib, aunque aquellos pacientes que presentan una fracción de eyección reducida y un filtrado glomerular bajo deben seguir un control más estricto para evitar un empeoramiento de la función cardíaca y renal [28]. Las causas más frecuentes de intolerancia son debidas a problemas gastrointestinales, retención hídrica, dolores musculares, erupción cutánea y fatiga [29]. Las tasas de suspensión de imatinib debido a una respuesta subóptima o a posibles toxicidades en un período de 5 años varían entre un 37% y un 50%.

Imatinib es un fármaco metabolizado por el citocromo P450, principalmente por la isoenzima CYP3A4. Además puede inhibir de forma competitiva el metabolismo de fármacos que son sustratos de CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4, y es sustrato del transportador hOCT1 (*SLC22A1*), de ABCB1 (glicoproteína P) y de ABCG2 (*BCRP2*). Todo esto hace que sea susceptible de presentar interacciones farmacológicas cuando se administra concomitantemente con otros fármacos, especialmente cuando se administran potentes inhibidores o inductores enzimáticos, lo que puede comprometer la eficacia y seguridad del fármaco [30].

En 2018 apareció el genérico de imatinib, por lo que se ha convertido en el fármaco más coste-efectivo y accesible para tratar la LMC.

Dasatinib

La identificación de mutaciones en el dominio quinasa de BCR-ABL1 como causa más frecuente de resistencia a imatinib, promovió el desarrollo de ITQs más potentes con eficacia específica contra ciertas mutaciones.

Uno de ellos es Dasatinib (BMS-354825, Sprycel), desarrollado por la farmacéutica Bristol-Myers Squibb, un **ITQ-2G** más potente que imatinib [31]. Actúa de manera dual inhibiendo tanto la familia de tirosina quinasa Src como ABL1, por lo que inhibe otras vías de señalización que pueden ser críticas para la supervivencia de la célula. Además, es capaz de unirse tanto a la conformación inactiva como a la conformación activa del dominio quinasa de ABL1 [32]. Inicialmente fue usado en pacientes resistentes a imatinib pero el ensayo clínico fase III DASISION demostró que dasatinib presentaba una mayor eficacia en primera línea que imatinib, siendo capaz de inducir respuestas más rápidas y profundas. En concreto, a los tres meses, el 84% de los pacientes tratados con dasatinib consiguió una reducción de los transcritos de BCR-ABL1 igual o inferior al 10%, comparado con el 64% de los pacientes tratados

con imatinib [33,34]. No obstante, las tasas de SLE y SLP fueron similares a imatinib, así como el porcentaje de pacientes que cambiaron de tratamiento a los 5 años [35].

La dosis aprobada para el tratamiento de pacientes con LMC en FC es de 100 mg/día y de 70 mg/12 horas para pacientes en fases avanzadas. Una dosis de 50 mg/día parece ser igualmente efectiva, reduciendo los posibles efectos secundarios [36].

Dasatinib presenta toxicidad pulmonar (derrame pleural e hipertensión pulmonar), por lo que está contraindicado en pacientes con antecedentes de problemas respiratorios graves [34].

En cuanto a su farmacocinética, la vía de metabolización de dasatinib es hepática, especialmente a través de la isoenzima CYP3A4 y es sustrato del transportador ABCB1 y ABCG2. Tiene actividad inhibidora sobre las isoenzimas CYP2C8 y CYP3A4 [37].

Nilotinib

Otro **ITQ-2G** es Nilotinib (MN107, Tassigna), desarrollado también por Novartis. Nilotinib es un análogo estructural de imatinib de mayor potencia que, como dasatinib, fue usado inicialmente en pacientes resistentes a imatinib. Posteriormente, su gran eficacia en primera línea fue demostrada en el ensayo clínico ENESTnd, en el que se obtuvieron mayores tasas de respuesta citogenética y molecular que con imatinib [38]. Además, nilotinib demostró ser superior a imatinib en todas las categorías de riesgo del índice Sokal, reduciendo en mayor grado las tasas de transformación a FA o FB de los pacientes con riesgo intermedio o alto. No obstante, las tasas de SLE y SLP entre nilotinib e imatinib fueron similares [39]. No se disponen de datos de eficacia en pacientes con LMC en FB, por lo que es el único ITQ que no está indicado en esta fase de la enfermedad.

La dosis aprobada para el tratamiento con nilotinib en primera línea es de 300 mg/12 horas, y de 400 mg/12 horas como tratamiento de segunda línea.

Con nilotinib existe un mayor riesgo de eventos cardiovasculares comparado con imatinib (10-15% vs 2,5%, respectivamente) [40]. Por ello, nilotinib está contraindicado en pacientes con eventos vasculares previos y no se recomienda en pacientes con factores de riesgo cardiovascular.

Nilotinib es sustrato de la isoenzima CYP3A4 y de la proteína transportadora glicoproteína-P. Además, puede inhibir las isoenzimas CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C8, CYP1A2 y UGT1A1 así como el transportador ABCB1. Como consecuencia, nilotinib puede aumentar la concentración plasmática de los fármacos que sean metabolizados por estas isoenzimas y transportados por la glicoproteína-P. Mediante

estudios *in vitro* se ha comprobado que nilotinib puede también inducir la isoenzima CYP2B6 [41].

Bosutinib

Un tercer **ITQ-2G**, bosutinib (SKI-66, Bosulif), fue desarrollado por la farmacéutica Pfizer. Es un potente inhibidor dual de las tirosina quinasas Src y ABL1. Inicialmente fue aprobado para el tratamiento de pacientes con LMC que habían sido resistentes a imatinib, nilotinib y dasatinib. Posteriormente, los ensayos clínicos BELA [42] y BFORE [43], evaluaron la eficacia de este fármaco en primera línea, comparándolo con imatinib. Se observaron mayores tasas de respuesta citogenética y RMM a los 12 meses con bosutinib (47% con bosutinib vs 20-59% con imatinib). Por este motivo, en diciembre de 2017 recibió la aprobación como tratamiento de primera línea para la LMC en FC. Además, gracias a los estudios 200 y BYOND recibió la aprobación para sucesivas líneas de tratamiento [44,45]. La dosis aprobada en primera línea es de 400 mg/día y en segunda línea de 500 mg/día.

Aunque no han sido identificadas contraindicaciones relevantes, bosutinib tampoco está exento de toxicidades, siendo la diarrea y el incremento de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa las de mayor importancia.

Bosutinib es metabolizado principalmente por la isoenzima CYP3A4. Estudios *in vitro* sugieren que bosutinib no ejerce un efecto inductor o inhibidor sobre las principales isoenzimas del citocromo p450 y parece no depender de los transportadores ABCB1 y ABCG2 [46].

Ponatinib

Ponatinib (AP24534, Iclusig), desarrollado por la farmacéutica Takeda/Incyte, es un **ITQ de tercera generación**. Es el primer ITQ que presenta actividad contra células de la LMC que presentan la mutación T315I en el gen *ABL1* (BCR-ABL1^{T315I}). Es 500 veces más potente que imatinib inhibiendo BCR-ABL1. La aprobación para el uso de ponatinib a dosis de 45 mg/día en la LMC fue obtenida gracias al ensayo clínico fase II PACE [47]. Tiene indicación para el tratamiento de pacientes portadores de la mutación T315I del gen *ABL1* y también para pacientes resistentes a dos o más líneas de tratamiento con ITQs.

A pesar de los buenos resultados en pacientes resistentes a otros ITQs, existe un importante aumento del riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes tratados con ponatinib (30% de los pacientes). Es por este motivo que de momento ponatinib no ha conseguido la autorización como ITQ de primera línea. Las nuevas guías de la ELN para el tratamiento de la LMC recomiendan usar dosis de 30 mg/día o 15 mg/día en aquellos pacientes con un riesgo cardiovascular más elevado. La dosis de 45 mg/día se recomienda sólo en los pacientes con la mutación T315I de ABL1 o en pacientes que han progresado a FA o FB [26]. Ponatinib se metaboliza a través de la enzima CYP3A4 e, igual que bosutinib, no depende (o lo hace mínimamente), de los transportadores ABCB1 y ABCG2 [48].

Asciminib

Asciminib (ABL001) es un **nuevo ITQ en estudio**, desarrollado por Novartis, para el tratamiento de pacientes adultos con LMC en FC, FA o FB. Su mecanismo de acción difiere del resto de ITQs, ya que este inhibidor funciona sobre **el bolsillo alostérico de la proteína BCR-ABL1**, por unión al grupo miristoilo (Figura 5), modificando su activación de forma indirecta. Es un fármaco especialmente interesante porque, de todos, es el más específico contra el BCR-ABL1, tanto la forma nativa (*wild-type*) como la mutada (incluyendo la mutación T315I). Además, tiene un perfil de toxicidad muy favorable con apenas efectos secundarios a nivel cardiovascular. Tras los buenos resultados obtenidos en un estudio fase I [49], se inició un programa de acceso por uso compasivo de Novartis [50]. Recientemente han sido presentados los resultados preliminares del ensayo clínico ASCSEMBL, que compara asciminib frente a bosutinib en pacientes resistentes o intolerantes a dos o más ITQs, en el que se ha observado mayor eficacia y tolerancia de asciminib comparado con imatinib [51]. Las toxicidades más frecuentemente observadas en los ensayos clínicos son la elevación de la lipasa y las citopenias. Debido a su mecanismo de acción, es un fármaco interesante para su uso en combinación con otros ITQs [49,52].

Asciminib también se metaboliza en el hígado, principalmente por la acción de las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5, y en menor grado por la isoenzima CYP4F12. Ejerce un efecto inhibitor sobre los transportadores ABCB1 y ABCG2, y mínimamente sobre SLC22A1 [53].

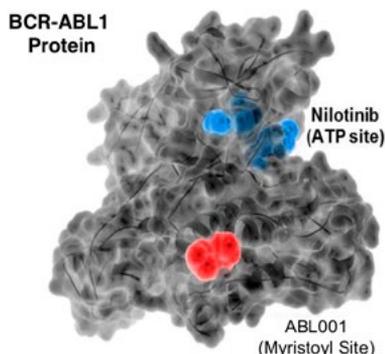


Figura 5. Representación gráfica del lugar de unión de los ITQ convencionales (por ejemplo nilotinib) y del lugar de unión de ABL001 en la proteína BCR-ABL1.

3.7. Respuesta a los inhibidores de tirosina quinasa

3.7.1. Definición de la respuesta y técnicas indicadas para su determinación

El primer objetivo del tratamiento de la LMC con los ITQs es la normalización de las cifras hemoperiféricas, lo que es conocido como **respuesta hematológica completa** (RHC). El segundo objetivo es conseguir que el número de células con el cromosoma Ph disminuya hasta negativizarse, conocido como **respuesta citogenética completa** (RCC). El último objetivo, pero no menos importante, es la **respuesta molecular** (RM).

A continuación se detallan los valores clínicos y moleculares que definen cada una de las diferentes respuestas al tratamiento con los ITQs, así como las **técnicas de laboratorio** usadas en cada uno de los casos:

Respuesta hematológica

Esta respuesta se establece a partir de la **hematimetría y la fórmula leucocitaria** por microscopía (cuantificación y evaluación de los distintos tipos celulares). La definición estricta de RHC se corresponde con los siguientes valores:

- Leucocitos $<10 \times 10^9/L$
- Basófilos $<5\%$
- Plaquetas $<450 \times 10^9/L$
- Ausencia de granulocitos inmaduros
- Esplenomegalia no palpable

Es necesario hacer un hemograma cada dos semanas desde el diagnóstico de la LMC hasta la obtención de la RHC.

Respuesta citogenética

Para su estudio se requiere una muestra de MO y se utilizan técnicas de **citogenética convencional**, que permiten estudiar los cromosomas. Estos se encuentran constituidos por un centrómero, que divide el cromosoma en un brazo corto (brazo p) y un brazo largo (brazo q). Además consta de unas estructuras llamadas telómeros, presentes en los extremos de cada uno de los brazos, formados por regiones de ADN no codificante, altamente repetitivas, cuya función principal es controlar la estabilidad estructural de los cromosomas en las células eucariotas, la división celular y el tiempo de vida de las estirpes celulares. El tamaño de los cromosomas va variando a lo largo del ciclo celular, pasando de estar muy poco compactados (interfase) a muy compactados (metafase). El mejor momento para estudiar los cromosomas es cuando están en metafase, ya que su nivel de compactación hace que sus bordes estén perfectamente definidos, observándose claramente los brazos p y q. El estudio de la estructura externa de los cromosomas culmina con la obtención del **cariotipo**, que consiste en la ordenación de los cromosomas según su tamaño y patrón de bandas. Existen varias técnicas de bandeo de cromosomas, siendo la **tinción de bandas G** (Giemsa) la más usada en las neoplasias hematológicas. Esta técnica produce un patrón de bandas claras (ricas en nucleótidos GC y con un gran contenido de genes) y bandas oscuras (ricas en nucleótidos AT y pobres en genes). En la **Figura 6** se puede observar un ejemplo del cariotipo de una LMC al diagnóstico.

Se recomienda analizar como mínimo 20 metafases y describir el cariotipo siguiendo la nomenclatura del sistema ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) [54]. En función del número de metafases positivas para el cromosoma Ph, existen diferentes niveles de respuesta citogenética:

- **Respuesta citogenética menor:** 36-95% de metafases con el cromosoma Ph.
- **Respuesta citogenética parcial:** 1-35% de metafase con el cromosoma Ph.
- **Respuesta citogenética completa:** 0% de metafases con el cromosoma Ph.

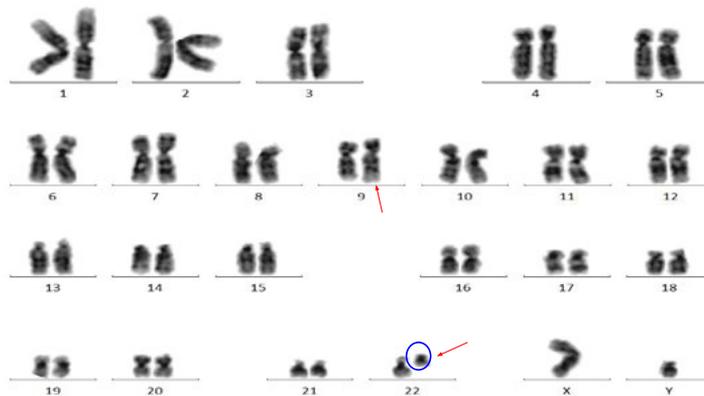


Figura 6. Ejemplo de un cariotipo característico de LMC. Las flechas rojas señalan los puntos donde se ha producido la translocación de un fragmento del brazo q del cromosoma 9 hacia el brazo q del cromosoma 22 y viceversa. Se denomina cromosoma Ph al cromosoma 22 implicado en dicha translocación (círculo azul).

Respuesta molecular

La RM es un parámetro crucial en el tratamiento de la LMC ya que, hoy en día, una vez conseguida la RCC, guiará en la toma de decisiones terapéuticas. Esta respuesta se estudia a partir de los tres meses de tratamiento y durante toda la evolución de la enfermedad.

Para la determinación de la RM se utiliza la técnica de la **reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*)**. Esta técnica permite amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación del ADN complementario (ADNc), obteniéndose unas curvas de fluorescencia. Dicho ADNc se obtiene por retrotranscripción del ARN. El número de ciclos de PCR que se requiere para que la señal de fluorescencia supere el umbral de detección es conocido como valor C_p o C_t (del inglés, *cycle threshold*). Este valor de C_t es inversamente proporcional a la cantidad de copias del ADNc diana (*target*) que contenga la muestra de partida. Para una correcta cuantificación del número de copias, es necesario una curva de estándares o recta patrón con diferentes puntos de concentración conocidos.

Para llevar a cabo la qPCR en tiempo real se emplea un molde de ADNc (muestra que contiene la región de interés que queremos estudiar), unos cebadores (*primers*) específicos para la secuencia diana, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable que será la encargada

de sintetizar las copias de la secuencia target a partir de todos los reactivos descritos. Para el estudio de pacientes con LMC se utilizan *primers* específicos para la secuencia del gen de fusión BCR-ABL1 y también *primers* específicos para un gen de referencia (como por ejemplo el gen *ABL1* o el gen *GUSB*). De este proceso se obtendrán el número de copias de la secuencia target y de la secuencia de referencia, mediante la conversión de los valores de Ct en número de copias, utilizando la recta patrón.

Para establecer el cociente (*ratio*) de BCR-ABL1 frente al gen de referencia (*ABL1* o *GUSB*), se utiliza la siguiente fórmula:

$$(n^{\circ} \text{ de copias de BCR-ABL1} / n^{\circ} \text{ de copia del gen de referencia}) \times 100$$

No obstante, hay que tener en cuenta que cuando una misma muestra es analizada por distintos laboratorios, el resultado de esta *ratio* puede variar entre ellos de forma significativa. Esto es debido al empleo en cada laboratorio de métodos diferentes en los distintos pasos experimentales (extracción del ARN, síntesis del ADNc, amplificación, gen control, etc.). Para evitar esta disparidad en los resultados es necesario que cada laboratorio realice la técnica según los estándares internacionales y disponga de un **factor de conversión**, o bien realice la qPCR mediante un método comercial que lo incorpore. Cuando aplicamos el factor de conversión estamos normalizando los resultados de la qPCR y estos serán comparables entre distintos laboratorios y estarán, por tanto, expresados de acuerdo con la normativa de la **escala internacional** (en inglés, *international scale*, IS) [55,56]. De este modo, la *ratio* de BCR-ABL1 en IS se obtendrá añadiendo a la fórmula anterior el producto del factor de conversión. Así, se considera que el 100% sería el valor teórico al diagnóstico y el 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% y 0,001% corresponden a una reducción de 2, 3, 4, 4.5 y 5 logaritmos respectivamente.

Debido a su alta sensibilidad, la qPCR se usa para la detección y monitorización de células malignas tanto de la LMC como de otras neoplasias hematológicas. No obstante, la sensibilidad de esta técnica, aún siendo muy alta, no permite detectar reducciones más allá de 5 o 5,5 logaritmos (siendo esto unos niveles muy bajos de enfermedad residual) y como resultado se obtiene lo que es conocido como respuesta molecular indetectable. En estos casos donde la respuesta no se puede detectar, las nuevas guías de la ELN 2020 recomiendan evitar el uso del término "respuesta molecular completa" y sustituirlo por el de "**leucemia molecularmente indetectable**", siempre indicando el número de copias del gen endógeno para conocer la

profundidad de estudio de la muestra [26]. Esto no necesariamente es indicativo de la completa ausencia de la leucemia, simplemente quiere decir que los niveles de enfermedad residual están por debajo de los límites de detección de la técnica.

En la Tabla 3 se muestran los diferentes tipos de RM y los requisitos para establecerla, teniendo en cuenta no solo los niveles de transcritos BCR-ABL1 sino también el mínimo número de copias del gen endógeno que se debe conseguir. Se utiliza el término de respuesta molecular profunda (RMP) para designar una respuesta molecular grado 4 (RM4) o superior.

Tabla 3. Número de copias del gen de referencia (gen control) y niveles del transcrito BCR-ABL1 para definir los diferentes niveles de respuesta molecular. Imagen adaptada de Hochhaus A et al., Leukemia, 2020 [26].

	RMM (o RM3)	RM4	RM4.5	RM5
Mínimo de copias del gen de referencia	10.000 ABL1 24.000 GUSB	10.000 ABL1 24.000 GUSB	32.000 ABL1 77.000 GUSB	100.000 ABL1 240.000 GUSB
Nivel de transcritos de BCR-ABL1(IS)	≤ 0,1%	≤ 0,01%	≤ 0,0032%	≤ 0,001%

RMM o RM3: respuesta molecular mayor o grado 3

RM4: respuesta molecular grado 4

RM4.5: respuesta molecular grado 4.5

RM5: respuesta molecular grado 5

3.7.2. Monitorización de la respuesta y recomendaciones de los expertos

La respuesta al tratamiento con ITQs es **monitorizada** desde el inicio mediante parámetros morfológicos, citogenéticos y moleculares.

Para establecer la respuesta hematológica, se debe realizar un hemograma cada dos semanas desde el diagnóstico hasta la obtención de una RHC. Posteriormente, es recomendable seguir realizando esta prueba cada tres meses para asegurarse que las cifras se mantienen dentro de los límites de normalidad establecidos. El cariotipo se realiza al diagnóstico y hasta que se obtiene una RCC, después se debe repetir en

el caso de que exista sospecha de progresión de la enfermedad, con el objetivo de analizar la posible aparición de ACAs. Finalmente, una vez obtenida la RCC, la RM es la que guiará las decisiones terapéuticas durante el transcurso de la enfermedad.

Para el correcto enfoque clínico de los pacientes, es importante tener en cuenta el tiempo que se tarda en conseguir unos hitos determinados. Estas metas vienen dictadas por recomendaciones de expertos, como por ejemplo las recomendaciones de la ELN, las recomendaciones de la OMS o también las recomendaciones de la *National Comprehensive Cancer Network*, esta última de mayor aceptación en Estados Unidos.

La presente Tesis Doctoral, se basa en las **recomendaciones de la ELN de 2013 para establecer la RM de cada paciente al ITQ**. La consecución o no de los hitos definidos en estas guías determinará si el paciente debe continuar con el tratamiento (**respuesta óptima**), si se debe hacer un seguimiento más estrecho (**criterios de alarma**), o si debe cambiar de ITQ por **fracaso/resistencia** (Tabla 4). Estas mismas recomendaciones son también válidas para el tratamiento en segunda línea con nilotinib y dasatinib cuando el cambio de ITQ se realiza por intolerancia. El hecho de conseguir una RMM asegura una supervivencia de alrededor del 100% [57].

Tabla 4. Definición de la respuesta a cualquier ITQ en primera línea, o segunda línea en caso de intolerancia, según las recomendaciones de la ELN del 2013. Aplica a todos los pacientes (FC, FA, FB). Adaptada de Baccarani M et al., Blood, 2013 [57].

Tiempo	Respuesta óptima	Alarma	Fracaso
Inicio (diagnóstico)	NA	Índice de riesgo alto ACA/Ph+ de alto riesgo	NA
3 meses	BCR-ABL(IS) ≤ 10% y/o Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL(IS) > 10% y/o Ph+ 36-95%	No RHC y/o Ph+ > 95%
6 meses	BCR-ABL(IS) < 1% y/o Ph+ 0%	BCR-ABL(IS) 1-10% y/o Ph+ 1-35%	BCR-ABL(IS) > 10% y/o Ph+ > 35%
12 meses	BCR-ABL(IS) ≤ 0,1%	BCR-ABL(IS) 0,1-1%	BCR-ABL(IS) > 1% y/o Ph+ > 0%
Después, en cualquier momento	BCR-ABL(IS) ≤ 0,1%	ACA/Ph+ (-7 o 7q-)	Pérdida RHC y/o RCC Pérdida RMM Mutaciones, ACA/Ph+

NA: no aplica; ACA/Ph+: anomalías cromosómicas adicionales de alto riesgo en células Ph+ (esto incluye: +8, +Ph, i(17q), +19, -7/7-, 11q23, 3q26.2); RHC: respuesta hematológica completa
RCC: respuesta citogenética completa; RMM: BCR-ABL(IS) ≤ 0,1%

En **marzo de 2020** se publicaron las **nuevas recomendaciones de la ELN**. La principal diferencia respecto a las del 2013 es que los hitos de respuesta se basan únicamente en la RM y que se incluye como fracaso de tratamiento el hecho de presentar una *ratio* BCR-ABL1 >10% a los tres meses, lo que se debe confirmar en un periodo de uno a tres meses [26].

3.8. Fracaso de tratamiento a los inhibidores de tirosina quinasa

A pesar del éxito del tratamiento de la LMC con los ITQs, existe un porcentaje elevado de pacientes que presenta fracaso al tratamiento. Con imatinib en primera línea esto ocurre en alrededor del 30% de los pacientes y se suele dar antes de los 5 años de tratamiento [58]. En pacientes tratados con ITQ-2G en primera línea, este porcentaje es de alrededor del 10-15% [34,40].

Este fracaso puede ser debido a intolerancia/toxicidad al ITQ o resistencia al mismo. De esta manera, será necesario el cambio de ITQ a una segunda o incluso más líneas de tratamiento. No obstante, hay que tener en cuenta que en algunos pacientes, el fracaso al ITQ puede ser debido a una mala adherencia al tratamiento, por lo que siempre es importante indagar sobre el cumplimiento del tratamiento [59].

En los siguientes apartados, se describen los mecanismos más relevantes que pueden dar lugar a la aparición de resistencia o intolerancia a los ITQs.

3.8.1. Mecanismos de resistencia a los inhibidores de tirosina quinasa

En la práctica clínica, la resistencia a los ITQs se ha agrupado en dos categorías: **resistencia primaria y resistencia adquirida**. La resistencia primaria se define como la ausencia de respuesta al tratamiento (fracaso en la obtención de RHC, RCC y RMM), mientras que la resistencia adquirida hace referencia a la pérdida de la respuesta previamente obtenida y a una posible progresión de la enfermedad. La resistencia adquirida aparece durante el tratamiento, lo que implica que las células han desarrollado un mecanismo que les permite evadir la inhibición de la oncoproteína BCR-ABL1 por parte del ITQ. Este tipo de resistencia es también conocida como **resistencia BCR-ABL1-dependiente**, y uno de los mecanismos más frecuentes y estudiados son las mutaciones puntuales en el dominio quinasa de ABL1 o la sobreexpresión del BCR-ABL1. Por otro lado, la resistencia primaria se suele relacionar con mecanismos de **resistencia BCR-ABL1-independientes**. No obstante, en los pacientes con LMC, el desarrollo de resistencias a los ITQs suele ser un fenómeno multifactorial y puede estar mediado por diferentes mecanismos, no exclusivos entre ellos. A continuación se listan y describen de manera abreviada los mecanismos mejor conocidos y de mayor relevancia en ambos tipos de resistencia:

Mecanismos de resistencia BCR-ABL1-dependientes

A) Mutaciones puntuales en el dominio quinasa de ABL1

La aparición de mutaciones en el dominio quinasa de ABL1 es la causa mejor conocida de resistencia al tratamiento y suele darse en un tercio de los pacientes resistentes en FC y en dos tercios de los pacientes resistentes en FA o FB. Este tipo de mutaciones tienen como resultado una disminución de la afinidad de unión de imatinib en el sitio ATP de la tirosina quinasa. Ejemplos de mutaciones que tienen lugar justo en el punto de unión entre el ITQ y la quinasa ABL1 son la mutación **T315I** y la **F317L** del gen ABL1. Otras mutaciones en el gen ABL1 que afectan a la conformación de la quinasa son las mutaciones en el loop P (**M244V**, **Y253F/H**, **E255K/V**, etc), en la unidad catalítica (**M351T** o **F359V/C/I**) o las mutaciones en el dominio activador (loop A) como la **H396R/P**. La identificación de estas mutaciones es crítica para la selección correcta del ITQ; la mutación T315I es resistente a todos los ITQ excepto ponatinib, mientras que la mutación F317L es resistente a imatinib y dasatinib pero responde a nilotinib, y las mutaciones E255K/V y F359V/C/I son resistentes a imatinib y nilotinib pero responden a dasatinib [52,60]. Estas mutaciones pueden ser detectadas mediante secuenciación Sanger, con un 20% de sensibilidad, o por *Next Generation Sequencing* (NGS), con alrededor del 2% de sensibilidad.

B) Sobreexpresión de BCR-ABL1

Se da por la amplificación del oncogén BCR-ABL1, por la duplicación del cromosoma Ph o bien por una regulación diferencial de la transcripción de BCR-ABL1. La relación entre este fenómeno y la resistencia al tratamiento no es tan clara como la observada con las mutaciones en el dominio quinasa de ABL1. La sobreexpresión del oncogén se suele dar sobre todo en pacientes que han progresado a FA o FB, a veces precediendo a la adquisición de mutaciones [61].

Mecanismos BCR-ABL1-independientes

A) Alteración en la farmacocinética y biodisponibilidad de los ITQs

Varios estudios han demostrado que la expresión del **transportador hOCT1** (*human organic cation transporter 1*, también conocido como *solute carrier family 22 member 1*, SLC22A1) regula la entrada de los ITQs al interior de la célula, sobretodo de imatinib. Por lo tanto, cuando la expresión de dicho transportador se reduce, el ITQ entra en la célula en menor cantidad y la respuesta al tratamiento es inferior [62]. Algo similar ocurre con el gen que codifica para la **glucoproteína-P-1** (en inglés,

conocida como *multidrug resistance protein 1*, MDR1, o también como **ATP-binding cassette sub-family B member 1, ABCB1**); esta proteína es una de las encargadas de efluir el fármaco de dentro de la célula al exterior y, cuando ésta se sobreexpresa, los niveles intracelulares de los inhibidores se reducen, haciendo que las células se vuelvan menos sensibles a los ITQs [63]. Es importante destacar también el papel de los **citocromos CYP3A4 y CYP3A5**, ya que representan el primer mecanismo de metabolización de todos los ITQs a través del hígado. Existen fármacos que pueden aumentar la actividad de CYP3A4 (como la dexametasona, la rifampicina, el fenobarbital, entre otros) y si estos se usan de manera concomitante con el ITQ pueden provocar que los niveles plasmáticos del ITQ no sean los adecuados para que el tratamiento sea efectivo [64].

Muchas de las variabilidades interindividuales observadas en la respuesta a los ITQ son debidas a **polimorfismos en los genes que codifican estas enzimas y proteínas relacionadas con el metabolismo y transporte de fármacos** (ADME: absorción, distribución, metabolismo y eliminación), es decir, involucradas en la farmacocinética y farmacodinamia.

Un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN en los cromosomas (locus) entre los individuos de una población, donde la variante menos común está presente en al menos el 1% de la población analizada, adquiriendo cierta frecuencia tras múltiples generaciones. Los polimorfismos más comunes son cambios de una única base. A éstos se les llama **polimorfismos de un sólo nucleótido** o **SNP** (por sus siglas en inglés, *single nucleotide polymorphism*), como por ejemplo la sustitución de una A (adenina) por una C (citosina). Otros polimorfismos son repeticiones, en un número variable de veces, de una secuencia corta (*variable number tandem repeat*). En otras ocasiones, los polimorfismos se deben a deleciones o inserciones de secuencias cortas de nucleótidos.

Los SNPs pueden darse tanto en regiones codificantes del genoma como regiones no-codificantes así como regiones intergénicas, y pueden conllevar consecuencias funcionales. Los SNPs presentes en zonas codificantes pueden influir en la función de un gen cambiando el aminoácido para el que codifican (variante no-sinónima). Cuando los SNPs se dan en zonas no-codificantes, a pesar de que no existe un cambio de aminoácido, la variante en sí puede provocar un cambio en la actividad de un promotor, en la unión de un microARN, en la estabilidad del ARN mensajero (ARNm), así como en la localización subcelular del ARNm, entre otros.

Existen evidencias del papel que ejercen ciertos polimorfismos en genes ADME en la respuesta a los ITQs: en un metanálisis realizado por Cargnin y cols. [65], se analizaron todos los estudios de asociación entre polimorfismos en los genes *SLC22A1*

y *CYP3A5* y la respuesta a imatinib. En este metanálisis se observó que los polimorfismos rs628031 y rs683369 del gen *SLC22A1* se correlacionaban con la obtención de la RMM a imatinib. Además, un polimorfismo en el gen *CYP3A5*, el rs776746, se asoció con la probabilidad de obtención de RCC. En otro estudio llevado a cabo por Giannoudis y cols. [66], se observó que los pacientes portadores del polimorfismo rs35191146 en el gen *SLC11A1* presentaban una mayor probabilidad de fracaso al tratamiento con imatinib. Hay también diversos estudios en los que se muestra una relación entre ciertos polimorfismos en el gen que codifica para el transportador ABCB1 y la respuesta a imatinib [67, y revisado en 68].

A pesar de que el estudio de la farmacogenética de los ITQs resulta prometedor para predecir la respuesta a estos fármacos, aún existen muchos resultados contradictorios que limitan su uso como biomarcador en la práctica clínica. Además, la mayoría de estudios se centran en analizar un número limitado de variantes en genes que codifican para las enzimas y los transportadores más característicos, pero hay pocos estudios que hayan hecho un análisis de múltiples genes involucrados en el proceso ADME.

B) Alteraciones citogenéticas adicionales (ACA)

La aparición de ACAs en la población celular Ph+, también conocido como evolución clonal, suelen indicar una progresión a fases avanzadas de la enfermedad, y están presentes en el 80% de los pacientes en FB [69]. Las ACAs se asocian con una baja tasa de respuesta citogenética a imatinib, un aumento de la pérdida de respuesta hematológica [70], así como la consiguiente reducción en la supervivencia global, sobre todo en aquellos pacientes que adquieren los reordenamientos $i(17)(q10)$, $-7/del7q$, y $3q26.2$ [71]. Se cree que podrían reflejar la inestabilidad genética de los progenitores de la LMC con alta capacidad proliferativa.

C) Sobreexpresión en la vía de señalización de la familia de quinasas SRC

Las quinasas SRC forman una familia de 9 tirosinas quinasas intracelulares (SRC, FYN, YES, BLK, YRK, FGR, HCK, LCK y LYN) que tienen un papel clave en el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células. Múltiples dominios de la oncoproteína BCR-ABL1 interactúan con HCK y LYN, dando lugar a su activación, que es totalmente independiente de la función del dominio quinasa de ABL1. La sobreexpresión de la familia de quinasas SRC ha sido relacionada con la resistencia a imatinib [72]. Dasatinib y bosutinib son inhibidores duales tanto de ABL1 como de SRC, por lo que presentarían una ventaja frente a este mecanismo de resistencia [43,73].

D) Mutaciones somáticas en genes previamente relacionados con cáncer

Los avances en las tecnologías de secuenciación masiva, como la NGS, han dado lugar a múltiples estudios que evidencian el papel de las mutaciones somáticas en la progresión y resistencia al tratamiento en las neoplasias hematológicas. En la LMC, cada vez son más los estudios que demuestran el papel de mutaciones en ciertos genes como *ASXL1*, *TET2*, *KMT2D* en la resistencia al ITQ y la progresión a fases avanzadas de la LMC [74,75]. En un estudio publicado recientemente por Nteliopoulos y cols. [76], se observó que determinadas mutaciones en genes que codifican para modificadores epigenéticos, como son *ASXL1*, *DNMT3A* o *CREBBP*, podrían tener una implicación directa con la respuesta a imatinib pero no con la respuesta a ITQs-2G. La detección de estas mutaciones al diagnóstico podría servir para predecir la resistencia al ITQ. No obstante, esta evidencia es preliminar y debe ser confirmada en futuros estudios.

3.8.2. Toxicidad e intolerancia a los inhibidores de tirosina quinasa

Prácticamente todos los ITQs tienen un espectro similar de efectos adversos, pero existen ciertas diferencias entre ellos que vienen determinadas en gran parte por la capacidad que tiene cada uno de inhibir otras vías de señalización y otras quinastas que no son la propia diana de la LMC. Por lo general, el porcentaje de suspensión del ITQ de primera línea al año de tratamiento por toxicidad suele ser bajo, en torno al 5%, mientras que en segunda línea, es algo mayor y puede alcanzar el 20% a largo plazo. Los efectos adversos más comunes entre los ITQs en pacientes con LMC son las citopenias, las náuseas, la diarrea, la fatiga, la erupción cutánea y la hepatotoxicidad; estos suelen ser fácilmente manejables con una reducción de la dosis o interrupción temporal del ITQ. No obstante, pueden persistir toxicidades de bajo grado (grado 1 o 2) a largo plazo, comprometiendo la calidad de vida de los pacientes. En presencia de toxicidades de grado 3 o 4 (graves), se cambia a un ITQ alternativo. En los últimos años, se han descrito efectos adversos relevantes en los ITQs de segunda y tercera generación, especialmente cardiovasculares con nilotinib y ponatinib, siendo muy importante su prevención en pacientes con factores de riesgo cardiovascular [77]. La Tabla 5 resume las intolerancias/toxicidades más frecuentes descritas con los ITQs. La cronicidad del tratamiento en los pacientes con LMC hace especialmente importante el manejo de los efectos adversos de los ITQs, que están directamente relacionados con la calidad de vida del paciente y la adherencia. Esto es crítico para asegurar el éxito del tratamiento.

Tabla 5. Efectos adversos de los ITOs reportados con mayor frecuencia. Adaptada de Apperley JF et al, The Lancet, 2015 [27].

	Imatinib		Dasatinib		Nilotinib		Bosutinib		Ponatinib	
	Todos los grados	Grado 3/4								
Fatiga	+++	+	+++	+	+++	-	NR	NR	+++	++
Erupción cutánea	+++	++	+++	+	+++	-	+++	++	+++	++
Cefalea	+++	-	+++	-	+++	-	+++	++	+++	++
Mialgia	+++	-	+++	-	NR	NR	++	-	+++	++
Dolor óseo	+++	++	NR	NR	NR	NR	++	-	NR	NR
Diarrea	+++	++	+	+	+++	+	+++	+++	NR	NR
Náuseas	+++	-	-	-	+++	+	+++	++	+++	+
Vómitos	+++	-	-	-	++	-	+++	++	NR	NR
Dolor abdominal	++	-	NR	NR	NR	NR	+++	++	+++	++
Pancreatitis	+	+	NR	NR	++	++	NR	NR	+++	+++
Edema	+++	++	+++	++	+++	+	+++	++	NR	NR
Derrame pleural	++	+	+++	++	++	+	NR	NR	NR	NR
Elevación lipasa	+++	+++	NG	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Hepatotoxicidad	+++	++	NG	+	+++	+++	+++	+++	+++	++
Anemia	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Trombocitopenia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Neutropenia	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
EAP	-	-	NR	NR	++	++	NR	NR	+++	+++

Datos derivados de estudios sobre el uso de los ITOs en primera línea, excepto ponatinib (hasta ahora, solamente utilizado como segunda línea o subsecuente)
 +: <1% de los pacientes; ++: 1-5% de los pacientes; +++: 5-10% de los pacientes; ++++: 10-50% de los pacientes; +++++: 50-100% de los pacientes
 EAP: enfermedad arterial periférica; NR: no reportado; NG: dato no proporcionado

3.9. Discontinuación del inhibidor de tirosina quinasa

Gracias a la introducción de imatinib y, posteriormente, de los ITQs-2G, el pronóstico de la LMC ha mejorado sustancialmente. El mal pronóstico de antaño (a menos que se pudiese realizar un TPH alogénico con éxito), ha desaparecido y hoy en día es una neoplasia fácilmente controlable con el tratamiento y con una supervivencia mediana muy similar a la de la población general. Por ello, una de las mayores prioridades del tratamiento de la LMC hoy en día es mejorar la calidad de vida del paciente, tratando de evitar al máximo los efectos secundarios de los ITQs. Hasta hace relativamente poco, el tratamiento de la LMC era considerado un tratamiento crónico, con posibilidad de efectos secundarios a corto y largo plazo y con un coste económico importante para el sistema sanitario.

En el año 2010, el grupo francés de LMC presentó los resultados de un novedoso estudio de suspensión (o discontinuación) del tratamiento en 100 pacientes con LMC que presentaban una RMP mantenida durante al menos 2 años [78]. Alrededor del 40% de los pacientes consiguió mantener la RM, sin recaer (pérdida de la RMM), lo que se conoce como fase de **remisión libre de tratamiento (RLT)**. La mayoría de los pacientes que sí recayeron, lo hicieron durante los 6 primeros meses y todos los pacientes consiguieron de nuevo la RM previa una vez reintroducido el ITQ que tomaban [78].

Este estudio fue la base para el diseño de los futuros ensayos clínicos de discontinuación.

3.9.1. Ensayos clínicos de discontinuación y recomendaciones de los expertos

Tras conocerse los datos favorables del estudio STIM del grupo francés [78], y teniendo en cuenta el gran beneficio que podría aportar a los pacientes con LMC, múltiples ensayos clínicos (algunos con un número mayor de pacientes) han reforzado y confirmado este hecho; aproximadamente la mitad de los pacientes que alcanza una RMP estable y suspende el ITQ mantiene la RM (se mantiene en RLT). Aquellos pacientes que pierden la RMM lo suelen hacer dentro de los 6 primeros meses después de la suspensión, y son pocos los casos que presentan recaídas tardías. En la Tabla 6 se describen los principales hallazgos de los ensayos clínicos de discontinuación más relevantes reportados hasta la actualidad.

Tabla 6 (página siguiente). Resultados de los estudios de discontinuación de ITQ de primera y segunda generación de mayor relevancia. Adaptado de Harrington P et al. Exp Rev Hematol. 2020 [79].

ESTUDIO [REF.]	N	REQUISITOS INCLUSIÓN		PACIENTES EN RLT (%)	RESPUESTAS DESPUÉS DE LA REINTRODUCCIÓN DEL ITQ
		DURACIÓN ITQ	RESPUESTA MOLECULAR		
STIM [80]	100	IM > 36 meses	RM4.5 > 24 meses	39% a los 77 meses	El 96% consiguió una ratio indetectable a los 4 meses de mediana
A-STIM [81]	80	IM > 36 meses	RM4.5 > 24 meses	61% a los 26 meses	El 100% consiguió RMM y el 73% RMP. 1 paciente progresó a CB linfóide
STIM2 [82]	218	IM > 36 meses	RM4.5 > 24 meses	50% a los 24 meses	El 100% consiguió recuperar la respuesta. La mediana de tiempo hasta RMP fue de 4 meses
TWISTER [83]	40	IM > 36 meses	RM4.5 > 24 meses	47% a los 24 meses	El 100% consiguió recuperar la respuesta. La mediana de tiempo hasta RMP fue de 3 meses
KIDS [84]	90	IM > 36 meses	RM4.5 > 24 meses	41% a los 12 meses	El 100% consiguió RMM a los 4 meses de mediana
JALSG-STIM213 [85]	68	IM > 36 meses	RM4 > 24 meses y RM4.5 previo STOP	68% a los 12 meses	El 100% consiguió RMM a los 6 meses de mediana
ISAV [86]	108	IM > 24 meses	RM4 > 18 meses	48% a los 36 meses	Mediana de tiempo hasta RMM de 2,1 meses. Ningún caso de resistencia a imatinib
EUROSKI [87]	755	IM, DAS, NIL > 36 meses	RM4 > 12 meses	50% a los 24 meses	El 86% consiguió RMM a los 2,8 meses de mediana. El 81% consiguió RM4 a los 3,7 meses
DESTINY [88]	174	IM, DAS, NIL > 36 meses	RMM o RM4 (+ 1/2 dosis) > 12 meses	72% (grupo RM4) y 36% (grupo RMM) a los 36 meses	El 100% consiguió RMM a los 5 meses de mediana
STOP-2G-TKI [89]	100	DAS, NIL > 36 meses	RM4.5 > 24 meses	63% a los 12 meses	El 100% consiguió RM4.5 a los 3 meses de mediana
LAST [90]	172	IM, DAS, NIL, BOS > 36 meses	RM4 > 24 meses	62% a los 24 meses	Dato no recogido
DADI [91]	63	DAS 2ª línea > 12 meses	RM4 > 12 meses	48% a los 20 meses	El 100% consiguió RM4 a los 6 meses de mediana
D-STOP [92]	54	DAS > 24 meses	RM4 > 24 meses	63% a los 16 meses	El 100% consiguió RMM a los 6 meses. El 81% consiguió RM4 a los 12 meses
DASFREE [93]	84	DAS > 24 meses	RM4.5 > 12 meses	49% a los 12 meses	El 98% consiguió RMM a los 2 meses de mediana
TRAD [94]	67	DAS > 36 meses	RM4.5 > 24 meses	65% a los 6 meses	El 100% consiguió RM4.5 a los 3 meses
ENEST-freedom [95]	190	NIL > 24 meses	RM4.5 > 36 meses	49% a los 24 meses	El 98,8% consiguió RMM y el 88,4% RM4.5 a los 10 meses
ENESTop [96]	126	IM+ 2ª línea NIL > 30 meses	RM4.5 > 36 meses	48% a los 36 meses	El 97,1 consiguió RMM y el 91,2% RM4.5
STAT2 [97]	78	IM + NIL > 24 meses	RM4.5 > 24 meses fase consolidación	68% a los 12 meses	El 86% recuperó RM4.5
ENESTGoal [98]	59	NIL > 12 meses	RM4.5 > 24 meses	41% (tiempo no registrado)	El 33% consiguió RM4.5 a los 2,8 meses de mediana
NILSt [99]	112	NIL > 12 meses	RM4.5 > 24 meses	61% a los 3 años	El 100% consiguió RM4.5 a los 2,8 meses

REF: Referencia; N: número de pacientes incluidos en el estudio; ITQ: inhibidor tirosina quinasa; RLT: remisión libre de tratamiento; IM: imatinib; NIL: nilotinib; DAS: dasatinib; BOS: bosutinib; RMM: respuesta molecular mayor (o grado 3), BCR-ABL(IS) ≤ 0.1%; RM4: respuesta molecular grado 4, BCR-ABL(IS) ≤ 0.01%; RM4.5: respuesta molecular grado 4.5, BCR-ABL(IS) ≤ 0.0032%; RMP: respuesta molecular profunda (RM4 o superior); CB: crisis blástica.

Pese a diferencias en el diseño, la mayoría de los estudios de discontinuación presentan unos criterios de inclusión muy parecidos (una duración mínima del ITQ de tres años y una RMP mantenida durante como mínimo un año). Además, la gran mayoría considera como recaída la pérdida de la RMM, con excepciones como el ensayo STIM, donde se consideró como recaída la detección de positividad para transcritos BCR-ABL1 por qPCR.

Los resultados obtenidos también presentan similitudes; las recaídas moleculares ocurren en el 50% de los pacientes y el 80% de éstas se dan en los primeros 6-8 meses después de la suspensión. Entre el 90-95% de los pacientes que recaen vuelven a recuperar el mismo nivel de RM que tenían justo antes de suspender el tratamiento en pocos meses. Son escasos los pacientes que han presentado una progresión tras la suspensión del ITQ. Aún así, no se descarta que este tipo de eventos puedan aumentar a medida que pasen los años de seguimiento de los estudios.

Con todas estas evidencias, el grupo de expertos de la ELN ha elaborado recientemente las recomendaciones que se deberían seguir para la discontinuación del ITQ [26], resumidas en la Tabla 7.

Tabla 7. Requisitos para la discontinuación del ITQ según los criterios de la ELN 2020 [26].

CRITERIOS DE LA ELN 2020		
Obligatorio	Requisitos mínimos	Requisitos óptimos
<p>Fase crónica de la enfermedad</p> <p>Pacientes motivados y que comprendan bien las instrucciones</p> <p>Acceso a una qPCR de alta calidad, usando la Escala Internacional, con una comunicación rápida de los resultados</p> <p>Acceptación del paciente a una monitorización más frecuente al parar el tratamiento (una vez al mes durante los 6 primeros meses, cada 2 meses entre los 6 y 12 meses, y cada 3 meses a partir del año)</p>	<p>Tratamiento de 1ª línea (o 2ª línea en caso de intolerancia)</p> <p>Isoformas e13a2 y e14a2 de los transcritos de BCR-ABL1</p> <p>Duración de la terapia > 5 años (> 4 años si ITQ de 2ª generación)</p> <p>Duración de la RMP (RM4 o superior) > 2 años</p> <p>Ningún fallo a ITQ previo</p>	<p>Duración de la terapia > 5 años</p> <p>Duración de la RMP > 3 años si RM4</p> <p>Duración de la RMP > 2 años si RM4.5</p>

ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa; RMP: respuesta molecular profunda; RM4: BCR-ABL(IS) \leq 0,01%; RM4.5: BCR-ABL(IS) \leq 0,0032%

Es muy importante monitorizar estrictamente los niveles de transcritos BCR-ABL1 (IS) en aquellos pacientes que suspenden el tratamiento. Se recomienda que la monitorización se lleve a cabo cada mes durante los 6 primeros meses de suspensión, y después, cada 6 semanas hasta el año. Pasado este tiempo, se deben monitorizar los transcritos de BCR-ABL1 al menos una vez cada tres meses, ya que existe la posibilidad de presentar una recaída tardía [26,100,101].

3.9.2. Protocolo de discontinuación del Institut Català d'Oncologia (ICO)

Hoy en día, la suspensión del ITQ fuera de ensayo clínico ya es una realidad gracias a los resultados obtenidos en los numerosos ensayos clínicos realizados, y se ha convertido en un nuevo objetivo terapéutico para un porcentaje importante de pacientes con LMC.

Se dispone de la evidencia aportada por los estudios de discontinuación con nilotinib ENESTfreedom i ENESTop [95,102,103] que ha permitido incluir la discontinuación en la ficha técnica de este fármaco.

Existen evidencias suficientes sobre la viabilidad y seguridad de la suspensión de imatinib en pacientes con LMC, pero al contrario que nilotinib, la discontinuación no está indicada en la ficha técnica de imatinib. En Cataluña, debido a los criterios establecidos por el *Programa de Armonización farmacoterapéutica del CatSalut*, la mayoría de los pacientes reciben imatinib en primera línea. Por este motivo, desde el Institut Català d'Oncologia (ICO), y liderado por nuestro grupo, se elaboró un protocolo de suspensión del ITQ que se basa en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos de mayor relevancia (EUROSKI, DESTINY, ENESTfreedom y ENESTop).

La primera versión del protocolo fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP) en marzo del 2018 y en ésta solamente se incluyeron los pacientes que habían sido tratados con imatinib en primera línea o con otro ITQ en segunda línea en caso de intolerancia/toxicidad inicial a imatinib. Un año después, en mayo de 2019, se aprobó una enmienda del protocolo con el objetivo de incluir también a los pacientes tratados con otros ITQs en primera línea. En este protocolo se incluyen diferentes estrategias de suspensión del ITQ agrupadas en dos bloques (Figura 7):

A) El **primer bloque** incluye solamente aquellos pacientes que han sido tratados con nilotinib, tanto en primera línea como segunda línea, durante un mínimo de tres años y que presentan una RM4.5 estable durante como mínimo un año. Este primer bloque está contemplado en la **ficha técnica de nilotinib**.

B) El **segundo bloque** incluye las siguientes estrategias:

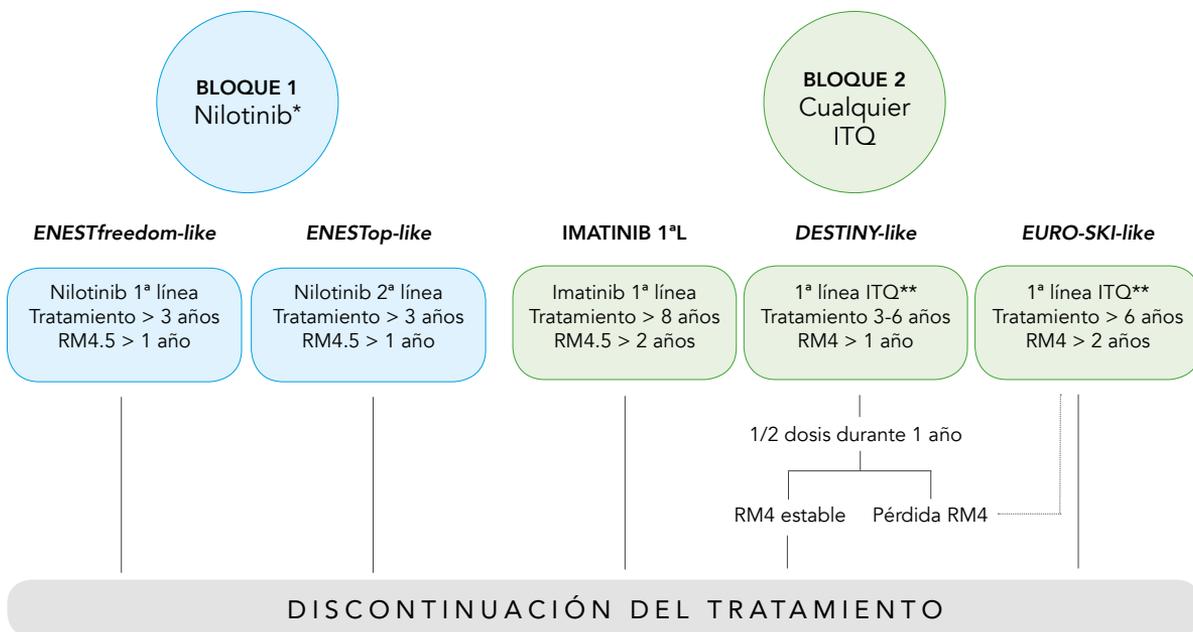
- **IMATINIB** en primera línea: se incluyen todos los pacientes tratados con imatinib en primera línea durante un mínimo de 8 años y con una RM4.5 mantenida durante al menos dos años. Esta estrategia corresponde al primer protocolo de discontinuación (aprobado en marzo de 2018).
- **DESTINY-like**: se basa en el ensayo clínico llevado a cabo por Clark y cols. [88] y consiste en reducir la dosis del tratamiento a la mitad en aquellos pacientes que han sido tratados con ITQ entre tres y seis años, y que presenten una RM4 mantenida durante como mínimo un año. El ITQ a mitad de dosis se mantiene durante un año y, si no se pierde la RM4, el paciente puede suspender el tratamiento. Este enfoque es mucho más conservador y los resultados del único ensayo clínico realizado con esta estrategia son superiores en términos de RLT (menos recaídas y más tardías) a los ensayos clínicos en los que se suspende el tratamiento sin una previa disminución de dosis. En el protocolo ICO, aquellos pacientes que pierden la RM4 durante la reducción de dosis, vuelven a tomar la dosis inicial y esperan hasta un total de 6 años de tratamiento y dos años de RM4 mantenida para poder discontinuar el tratamiento (siguiendo los criterios del *EURO-SKI-like*).
- **EURO-SKI-like**: en esta estrategia se incluyen todos los pacientes que hayan sido tratados con cualquier ITQ en primera línea (u otras líneas por intolerancia) durante más de 6 años y que presenten una RM4 mantenida durante como mínimo dos años.

Los principales **criterios de exclusión** de este protocolo son haber presentado **resistencia o pérdida de respuesta** al ITQ durante la fase de tratamiento y tener un **Sokal alto** al diagnóstico.

La **monitorización** de los niveles de **transcritos BCR-ABL1 (IS)** en los pacientes discontinuados se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Cada 4 semanas durante los primeros 6 meses post-discontinuación
- Cada 6 semanas a partir del mes 6
- Cada 12 semanas (3 meses) a partir del año

Se considera como **recaída la pérdida de RMM**. La confirmación de esta pérdida de RMM en una segunda determinación no sería necesaria ya que puede retrasar la reintroducción del ITQ [26].



* Las estrategias de este bloque se incluyen en la ficha técnica de Nilotinib

** U otras líneas por intolerancia

Figura 7. Esquema del protocolo de discontinuación del ICO.

3.9.3. Pacientes candidatos a discontinuar el tratamiento

La posibilidad de suspender el tratamiento con ITQ en una proporción de pacientes con LMC supone un gran avance. No obstante, en los resultados de los ensayos clínicos se evidencia que solamente es seguro hacerlo en aquellos pacientes que han conseguido un RMP mantenida durante al menos dos años. Dependiendo del ITQ, la probabilidad de conseguir dicha respuesta varía. En el caso de imatinib, los datos de seguimiento de uno de los ensayos clínicos llevados a cabo (IRIS) demostraron que solamente el 38% de los pacientes consiguieron una RM4.5 a los 5 años [28]. En cambio, se han observado respuestas más rápidas y profundas con los ITQ-2G [34,40]. De igual forma, el ensayo clínico ENESTfreedom sugiere que el tiempo de exposición al ITQ-2G necesario para la discontinuación sería inferior al que se necesita con imatinib [95].

Dado que conseguir una RMP es el principal requisito para poder suspender el tratamiento, resulta de gran interés la identificación de factores asociados con la posibilidad de obtener una RMP estable, así como aquellos que predigan la posibilidad de mantener una RLT una vez suspendido el ITQ.

Los índices pronóstico como el Sokal, el EUTOS, el Hasford y el ELTS (apartado 3.5. “Índices pronósticos al diagnóstico de la LMC”) estiman la supervivencia de los pacientes diagnosticados de LMC en FC. Una vez iniciado el tratamiento, se mantiene

el mismo ITQ o se cambia de tratamiento en función de la respuesta en los diferentes hitos establecidos (Tabla 4, apartado 3.7.2.). Además, es de especial interés la llamada "respuesta molecular temprana" (RMT), definida como una ratio de BCR-ABL1(IS) <10% a los tres meses, que se ha asociado a una mayor supervivencia en algunos estudios, pero no en otros [104,105].

Otro factor interesante es el *halving time* (HT), que evalúa la cinética de reducción de los transcritos de BCR-ABL1 durante los primeros tres meses de tratamiento con el ITQ, de manera que aquellos pacientes que no logran reducir a la mitad el nivel de transcritos basal (al diagnóstico) durante los tres primeros meses, tienen mayor riesgo de fracaso al tratamiento y/o progresión [106].

No obstante, sigue siendo controvertido el valor predictivo de obtención de RMP de estos indicadores, por lo que es necesario buscar posibles marcadores con mayor relevancia clínica en este aspecto.

En un estudio llevado a cabo por Sasaki y cols. [107], se propuso un modelo en el que se establecían unos valores óptimos de respuestas citogenéticas y moleculares a los 3, 6, 9 y 12 meses que determinaban la probabilidad de que un paciente consiguiera o no la RMP. En este estudio, la consecución de una RCC durante el primer año era predictivo de obtención de la RMP.

Por otro lado, más allá de los valores de las respuestas citogenéticas y moleculares, se han propuesto nuevos marcadores moleculares como predictores de la RMP; es el caso del estudio publicado por D'Adda y cols. [108], donde reportaron que los pacientes con la isoforma e13a2 de BCR-ABL1 tenían una menor probabilidad de conseguir la RMP mantenida que aquellos con la isoforma e14a2. Otro biomarcador propuesto recientemente por Park y cols. [109] es el gen *HMGCLL1* (que codifica para una enzima catalizadora); ciertos polimorfismos de este gen podrían ser usados para identificar antes del inicio del tratamiento qué pacientes tienen mayor probabilidad de conseguir una RMP con imatinib.

También se ha sugerido que la longitud de los telómeros (LT) tiene un papel en la biología de la LMC. Los **telómeros** son secuencias repetitivas de ADN no codificante (TTAGGG) que se encuentran en los extremos de los cromosomas. En las células somáticas, los telómeros se acortan con cada división celular, reflejando la historia replicativa de la célula. La disminución progresiva de los telómeros acaba generando inestabilidad genética y finalmente senescencia celular.

La excesiva proliferación celular que se da en la LMC a partir de la aparición del oncogén BCR-ABL1 en el clon maligno, se traduce en una reducción significativa de la LT en las células mieloides de la SP [110]. En estudios retrospectivos, la reducción

acelerada de los telómeros en pacientes con LMC se ha relacionado con la fase de la enfermedad, la respuesta citogenética al tratamiento, la progresión a FA o FB, así como la clasificación dentro de los índices pronóstico [111,112 y revisado en 113]. No obstante, solamente un estudio ha analizado y descrito la asociación entre la LT al diagnóstico de la LMC y la RMM con nilotinib [114]. Hasta la fecha, ningún estudio ha observado una asociación entre la LT y la obtención de la RMP con los ITQs en pacientes con LMC.

3.10. Factores clínicos predictores de remisión libre de tratamiento

La identificación de pacientes con una elevada probabilidad de suspender el ITQ con éxito es, hoy en día, uno de los mayores retos en la investigación de la LMC.

Se debe evitar crear falsas expectativas al paciente, así como una monitorización frecuente e innecesaria en un paciente con altas probabilidades de recaer. Los factores relacionados con la probabilidad de mantener la RLT son controvertidos, aunque los más importantes parecen ser la duración del tratamiento con ITQ y la duración de la RMP. Tal y como se ha explicado en el apartado 3.9.1. “Ensayos clínicos de discontinuación y recomendaciones de los expertos”, el grupo de expertos de la ELN ha recogido los datos de todos los estudios disponibles hasta hoy y, teniendo en cuenta los factores pronóstico más consolidados, ha elaborado unas recomendaciones.

A continuación se describen los factores clínicos de mayor relevancia que se han observado en los diferentes estudios de suspensión del ITQ:

El índice Sokal al diagnóstico

El índice de riesgo Sokal, calculado al diagnóstico de la LMC, ha sido identificado como factor pronóstico en varios de los estudios de suspensión del ITQ [78,83,115]. En el grupo de pacientes de Sokal bajo, el 50-60% de estos son capaces de mantener la RLT, mientras que en el de Sokal alto, solo mantiene la RLT el 10-20%. Esto sugiere que el ITQs no contrarresta el hecho de tener una enfermedad de mayor riesgo al diagnóstico, aunque con el tratamiento se consiga la RMP.

Duración del tratamiento con ITQ

En el estudio STIM se observó que aquellos pacientes que habían sido tratados con imatinib durante más de 50 meses presentaban menos recaídas moleculares que aquellos que habían sido tratados durante menos tiempo [80]. También en el estudio llevado a cabo por el Grupo Español de Leucemia Mieloide Crónica (GELMC), Hernández-Boluda y cols. [116] observaron que los pacientes que habían sido tratados con cualquier ITQ durante menos de 5 años tenían una mayor probabilidad de recaí-

da molecular una vez suspendido el tratamiento que los que habían sido tratados menos de 5 años. Por otro lado, los estudios DADI (imatinib + un año de consolidación con dasatinib) y TWISTER (imatinib) no encontraron ninguna asociación significativa entre la duración del tratamiento y una mayor o menor tasa de RLT. Tampoco encontraron ninguna correlación con la dosis administrada y la probabilidad de mantener la RLT [83,91]. Por lo tanto, es aún controvertida la duración óptima del tratamiento previa a la suspensión del mismo y varía en función del ITQ administrado, ya que con los ITQ-2G, al ser más potentes, se obtiene la RMP en menos tiempo y aumenta la probabilidad de mantener la RLT.

Duración de la respuesta molecular profunda

Se ha sugerido que este factor podría tener mayor peso que la duración del tratamiento. Esto ha sido demostrado en varios estudios como el EURO-SKI, donde observaron que a mayor duración de la RMP, mayor probabilidad de permanecer en RLT [87]. Takashi y cols. [117] también reforzaron este argumento, porque en este estudio, los pacientes con una duración de la RMP menor a 24 meses tenían una tasa de RLT del 15% comparado con los pacientes con una RMP mantenida durante más de 24 meses (tasa de RLT del 78%). En el estudio llevado a cabo por el GELMC [116], se observó que aquellos pacientes con una RM4.5 mantenida durante más de 4 años antes de suspender el tratamiento presentaban un 25% de incidencia acumulada de recaída a los tres años respecto a un 46% en aquellos pacientes con una duración de la RM4.5 inferior a 4 años.

Profundidad de la respuesta molecular

Existen ciertas controversias a la hora de definir el nivel de RM más adecuado para suspender el tratamiento con el ITQ. En el estudio DESTINY llevado a cabo por el grupo británico [88], se incluyeron, además de pacientes en RMP (\geq RM4), pacientes en RMM, y se realizó una reducción previa de dosis del ITQ a la mitad durante 12 meses previo a la discontinuación. Los resultados fueron significativamente peores en la cohorte de RMM (menor RLT), quedando claro que intentar suspender el tratamiento en pacientes que aún no han conseguido la RMP no es una buena estrategia. No obstante, esto no es tan obvio cuando se comparan los resultados de pacientes que han suspendido el ITQ con diferentes niveles de RMP; el estudio EURO-SKI no encontró ninguna diferencia en términos de RLT entre pacientes con el mismo nivel de respuesta (RM4) pero con transcritos BCR-ABL1 detectables e indetectables [87]. En cambio, en el estudio de Takashi y cols. sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con RM4.5 y transcritos detectables y los pacientes con RM4.5 y transcritos indetectables [117].

Es importante recordar las limitaciones en términos de sensibilidad que tiene la qPCR (técnica estándar utilizada para determinación de los transcritos BCR-ABL1 (apartado 3.7.1. “Definición de la respuesta y metodología para su detección”), y hay que tener en cuenta que no todos los laboratorios son capaces de conseguir detectar los mismos niveles de profundidad de la RM. Hoy en día, sigue siendo una incógnita si el hecho de conseguir detectar niveles más profundos de enfermedad residual podría ayudar a diferenciar mejor los pacientes que mantendrán la RLT y los que no. En este sentido, la técnica de la **PCR digital (dPCR)** fue diseñada como una metodología alternativa a la qPCR para, entre otros objetivos, identificar de manera más fiable los pacientes candidatos a discontinuar el tratamiento. La dPCR fue descrita por primera vez por Vogelstein and Kinzler en 1999 [118] y es una técnica que permite realizar una **cuantificación absoluta** de ácidos nucleicos sin necesidad de rectas patrón, así como la detección de mutaciones raras o poco frecuentes. El principio básico de la técnica consiste en dividir la muestra en miles de pocillos o gotas (dependiendo de la plataforma usada), donde se realiza una reacción de PCR a punto final independiente en cada una de ellas. La principal ventaja de la dPCR frente a la qPCR es, además del hecho de poder prescindir de una recta patrón, que la sensibilidad y la precisión no es tan dependiente de la amplificación en cada reacción.

3.11. Mecanismos biológicos de persistencia de la LMC tras discontinuación del tratamiento

En las últimas décadas, se ha introducido el concepto de “cura operacional” en una proporción de pacientes que responden correctamente al tratamiento y que consiguen suspenderlo sin presentar una recaída molecular posterior.

A día de hoy, los mecanismos biológicos que determinan que un paciente pueda o no discontinuar con éxito el tratamiento con el ITQ siguen siendo desconocidos. Una de las hipótesis que tiene mayor peso es el hecho de poder o no eliminar totalmente la LSC. Otra hipótesis es el posible control que el sistema inmune pueda ejercer sobre la enfermedad residual medible (ERM).

En los siguientes apartados, se comentarán algunos de los mecanismos previamente relacionados con la persistencia de la LMC y que han sido objeto de investigación en la presente Tesis Doctoral.

3.11.1. La célula madre leucémica de la LMC

Se sabe que las LSCs de la LMC son resistentes a los ITQs y persisten durante todo el tratamiento, pudiendo ser causa de resistencia al fármaco, de recaída tras la discontinuación del mismo o de progresión de la enfermedad. En cualquiera de las situaciones estas células impedirían conseguir una curación total de la LMC.

En cultivos *in vitro* se observa que no todas las LSCs son eliminadas por el ITQ y que una subpoblación de progenitores CD34+ de la LMC tienen la capacidad de permanecer quiescentes e iniciar la enfermedad cuando son trasplantadas a ratones inmunodeprimidos [119–122]. Esto es lo que probablemente ocurre en los pacientes con LMC; el ITQ es capaz de eliminar los clones de la LMC derivados de la LSC que adquiere la translocación, pero no puede eliminar la propia LSC, quedando en un estado de ERM. Esto podría explicar porqué en la mayoría de pacientes que están en fase de RLT, se siguen observando células BCR-ABL1+ [123,124]. No obstante, que ello influya o no en la recaída tras la discontinuación sigue generando controversia. Además, la cinética de la recaída post-discontinuación varía, observándose recaídas tanto tempranas (antes de los 6 meses) como tardías (más allá del año). Esta discrepancia podría reflejar cierta heterogeneidad de la LMC a nivel de la célula madre. Una de las hipótesis actuales es que el tratamiento con los ITQs ejercería una presión selectiva, aumentando la frecuencia de los clones LSCs con un crecimiento y una diferenciación más lenta [125]. Del mismo modo, los ITQs podrían interferir tanto en la habilidad de las LSCs para generar poblaciones más diferenciadas como en la tasa de división de células leucémicas progenitoras y diferenciadas. El efecto de estos fármacos sobre las células iniciadoras de la leucemia (*leukemia-initiating cells*, LICs) puede variar entre los pacientes, y estas diferencias podrían explicar los diferentes escenarios observados en los pacientes con RMP que discontinúan el tratamiento (Figura 8) [126].

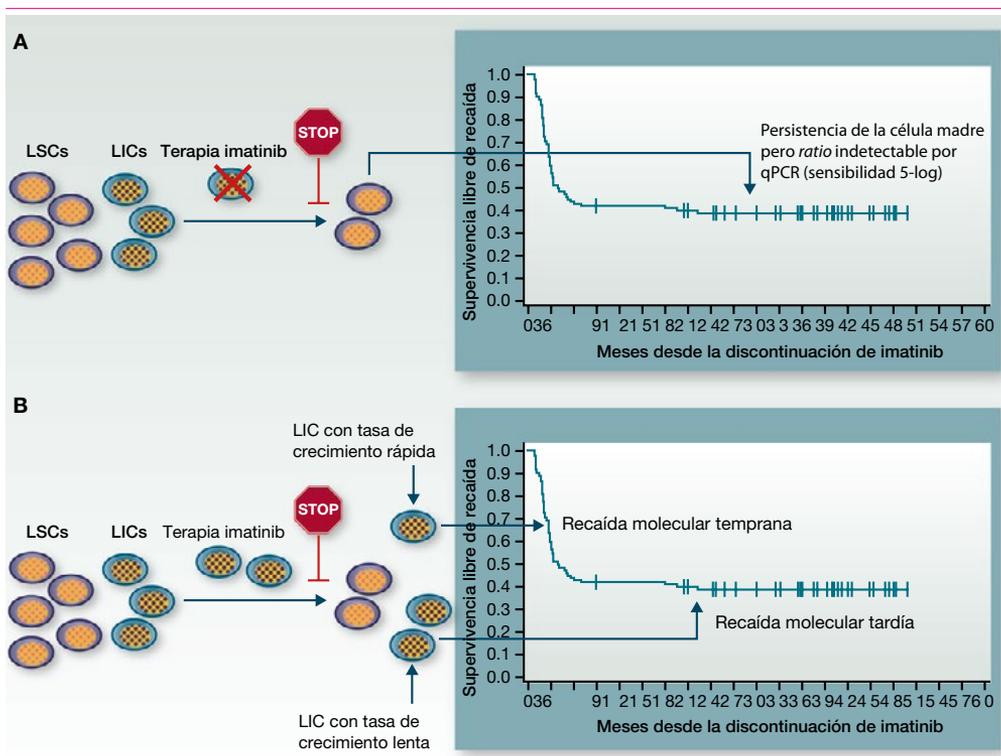


Figura 8. (Página anterior) Hipótesis sobre la duración de la RMP en los pacientes que discontinúan el tratamiento. (A) En algunos pacientes, el tratamiento con imatinib (y probablemente, otros ITQs) conseguiría erradicar todas las LIC, dejando únicamente una población de LSCs quiescentes, indetectables por técnicas convencionales como la qPCR. Esto daría lugar a tiempos de RLT prolongados, con ausencia de recaída. (B) En otros pacientes, los ITQs no serían capaces de eliminar estas LIC, que presentan variabilidad en la cinética de crecimiento. Al suspender el tratamiento, los pacientes con persistencia de LICs de crecimiento más rápido experimentarían una recaída temprana, mientras que los pacientes con persistencia también de LIC, pero de crecimiento más lento, presentarían una recaída tardía (más allá del año post-discontinuación). LIC: *leukemia-initiating cell*. LSC: *leukemic stem cell*. Imagen adaptada de Mahon FX et al, *Clinical Cancer Research*, 2012 [126].

Uno de los mayores retos a la hora de estudiar las LSCs es la identificación de **antígenos de superficie específicos y únicos** para estas células. Se sabe que las LSCs de la LMC son CD34-positivas y CD38-negativas, pero esto también corresponde con el fenotipo de las HSCs normales. Por lo tanto, es necesario identificar otros marcadores de superficie específicos de las LSCs de la LMC que permitan diferenciarlas de las HSCs y también de células leucémicas más diferenciadas.

Se han descrito antígenos de superficie que estarían diferencialmente expresados en las LSCs de la LMC y por lo tanto podrían ser útiles para su identificación y posible tratamiento dirigido. Uno de ellos es el **CD25** (*interleukin-2 receptor alpha chain*, IL2R α), que está regulado por la actividad de STAT5. Varios estudios han demostrado una sobreexpresión aberrante de este marcador en la superficie de las LSCs y una relación positiva de su expresión con la progresión de la LMC [127]. La unión de este receptor de IL-2 con otro marcador descrito para la LSC de la LMC, el **IL-1RAP** (*interleukin-1-receptor accessory protein*), activa las vías de señalización NF- κ B y AKT, incrementando la proliferación de las LSCs. Esta proliferación viene mediada por IL-1, y el bloqueo mediante anticuerpo de co-receptor IL-1RAP revierte la activación y proliferación de las LSCs [128].

Otro posible marcador específico de la LMC es el **CD26** (enzima *dipeptidyl peptidase IV*, DPPIV). Herrmann y cols. [129], detectaron este marcador solamente en la LSC de la LMC y no en otras neoplasias mieloides, mientras que los marcadores CD25 e IL-1RAP también fueron detectados en las LSCs de otras neoplasias mieloides como la leucemia mieloide aguda. La función principal de la enzima CD26-DPPIV es promover la disrupción de las interacciones entre la LSC y el estroma medular, mediante la degradación de SDF-1 (*stroma-derived factor 1*). Por lo tanto, CD26 tendría un papel directo en la liberación de las LSCs propias de la LMC desde la MO a la SP. De hecho, Bocchia y cols. [130] demostraron la presencia de células LSC CD26-positivas en SP de pacientes con LMC tanto al diagnóstico, como durante el tratamiento con ITQ e incluso una vez suspendido éste. Otro estudio publicado por Culen y cols.

[131] refuerza la hipótesis de que la tinción con CD26 permite la discriminación (mediante citometría de flujo) entre las LSCs de la LMC y las HSC normales. No obstante, la relación entre la proporción de LSCs CD26-positivas con la progresión de la LMC así como con la recaída una vez suspendido el ITQ es incierta.

Por último, recientemente se ha descrito la expresión del receptor transmembrana **CD93** (también conocido como receptor C1q) en LSCs quiescentes de la LMC, que persisten una vez suspendido el ITQ [132]. Mediante estudios de xenotransplante en modelos murinos, células LSC CD93+ (definidas como Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+CD93+) extraídas de pacientes con LMC son capaces de injertar en ratones y provocar la aparición de la LMC. Además, las LSCs de la LMC presentarían una sobreexpresión de CD93 comparado con las HSC normales y, parece que el CD93 permitiría diferenciar entre las LSCs muy primitivas y con capacidad de autorrenovación y las células más maduras (más diferenciadas), dentro del mismo compartimento de células madre.

A pesar de los avances realizados en los últimos años en la detección de la LSC específica de la LMC mediante marcadores de superficie, los resultados de los estudios difieren y por ello este tema sigue siendo motivo de discusión.

Un método interesante para la identificación y estudio de las células madre es el ensayo de la **Side Population (SPop)**. Este ensayo se basa en la capacidad inherente de estas células para expulsar de su interior sustratos fluorescentes como el *Hoechst 33342* o el *Dye Cycle Violet (DCV)*, debido a la sobreexpresión del transportador multidroga ABCG2 (*ATP-binding cassette super family G member 2*). Este método fue originalmente desarrollado por Goodell y cols. [133], quienes descubrieron que incubando células normales de la MO con H33342 se podía detectar, mediante citometría de flujo, una pequeña subpoblación de células que no acumulaban el sustrato fluorescente. Los autores observaron que estas células estaban muy enriquecidas en células hematopoyéticas y progenitoras. Posteriormente, esta fracción de células SPop han sido detectadas tanto en neoplasias hematológicas como tumores sólidos [134]. Las células SPop representan normalmente menos del 0,1% del total de células de la MO y están enriquecidas dentro de la fracción de células hematopoyéticas resistentes a los fármacos. De hecho, la sobreexpresión del transportador ABCG2 en las células SPop ha sido relacionado con la refractariedad a la quimioterapia [135,136]. Varios estudios sugieren que la capacidad de expulsión del sustrato fluorescente mediante el transportador ABCG2 estaría correlacionado con el grado de madurez de estas células, siendo las más primitivas (*stem/progenitor cells*) las que presentan una mayor capacidad para expulsar el sustrato de su interior. Por lo tanto, se han asociado varias características de las células madre a la fracción SPop,

entre ellas, una elevada capacidad de autorrenovación y diferenciación, así como el arresto en fase G0/G1 del ciclo celular [137]. Por ello, podría ser de interés combinar la detección de marcadores de superficie con el ensayo funcional de la SPop para identificar mejor el compartimento de las LSCs que puedan ser responsables de la resistencia al tratamiento y/o de la recaída tras la discontinuación del mismo [138].

3.11.2. El papel del sistema inmunitario en la LMC

El sistema inmunitario tiene un papel fundamental en la protección contra enfermedades infecciosas. También es capaz de identificar células potencialmente malignas que expresan antígenos de forma aberrante en la superficie de éstas.

Cuando el sistema inmunitario detecta una célula maligna, se activan células antitumorales para controlar la neoplasia. No obstante, la mayoría de células malignas desarrollan estrategias que facilitan su supervivencia y progresión, mediante la liberación de factores inhibidores como citoquinas inflamatorias e inmunosupresoras, así como la activación de células supresoras del sistema inmunitario, revirtiendo los efectos antitumorales de éste.

Como se ha comentado anteriormente, la MO es el nicho donde residen las células madre y progenitoras de la LMC, y aunque su estructura celular y molecular específica sigue siendo en parte desconocida, cada vez hay más evidencias de que el sistema inmunitario tiene una influencia sobre ellas [139,140].

A continuación se explica de manera resumida los principales componentes del sistema inmunitario y su papel en la patogénesis y control de la LMC:

Células efectoras del sistema inmunitario

Las principales células efectoras antitumorales del sistema inmunitario, las células NK, las células dendríticas (*dendritic cells*, DC) y los linfocitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL), juegan un papel en el control de las hemopatías malignas, entre ellas la LMC.

Las **células NK** son un tipo de linfocitos citotóxicos de la inmunidad innata, siendo la primera línea de defensa frente a células tumorales y patógenos como los virus. La población de células NK es fenotípica y funcionalmente heterogénea; la fracción de **células NK CD56bright** (elevada densidad del marcador CD56 en la superficie celular) es capaz de producir grandes cantidades de citoquinas, como el interferón (INF)- γ y/o el factor de necrosis tumoral TNF- α , en pocos minutos, pero no puede eliminar de manera espontánea las células tumorales. Son las células **NK CD56dimCD16+**, de mayor grado de madurez, las encargadas de lisar las células

potencialmente malignas. Dentro de la fracción de células **NK CD56dimCD16+**, existe una subpoblación que expresa el marcador CD57; esta subpoblación de células **NK CD56dimCD16+CD57+** fue definida, por López-Vergès y cols. [141] como células NK que se encuentran en el estadio definitivo de maduración, con una baja capacidad de proliferación y una elevada actividad citotóxica.

A diferencia de los CTL, que para su activación requieren de la participación de células presentadoras de antígeno como las DC, las células NK utilizan un conjunto de **receptores activadores e inhibidores** para el reconocimiento de las células malignas [142]. Unos de estos receptores de mayor importancia son los llamados **killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR)**; una familia de glicoproteínas transmembrana tipo I expresados en la membrana plasmática de las células NK. Los KIR son capaces de distinguir entre las diferentes variantes alélicas de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que permite detectar células infectadas por agentes externos o células transformadas (células malignas). La actividad de las células NK vendrá determinada por el balance entre la cantidad de KIR activadores e inhibidores expresados en sus membranas [143]. Tradicionalmente, se han descrito dos conjuntos de haplotipos en base al contenido de genes de cada uno de ellos, designados como haplotipos A y B. El haplotipo B se caracteriza por tener uno o más de los siguientes genes: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* y *KIR3DS1*. De manera contraria, el haplotipo A se caracteriza por la ausencia de todos estos genes. Como consecuencia de esto, el haplotipo B contiene más genes que codifican para KIR activadores que el haplotipo A.

En pacientes con diagnóstico reciente de LMC en FC, se ha observado que las células NK están en baja proporción respecto a los linfocitos totales y además éstas son disfuncionales. Esta situación empeora a medida que la enfermedad progresa a fases más avanzadas como la FA o FB [139].

Respecto a las DC, con un papel muy importante como células presentadoras de antígeno para la activación de células T *naive*, se ha observado que en pacientes con LMC, estas células tienen defectos cuantitativos y funcionales importantes, incluyendo una presentación de antígeno ineficiente [144].

Células supresoras del sistema inmunitario

Con el objetivo de evadir el sistema inmunitario innato y adaptativo, las células neoplásicas pueden alterar determinadas vías de señalización que provocan una supresión de las respuestas antitumorales. Este mecanismo de supresión viene mediado principalmente por la expansión de **células supresoras de origen mieloide** (en inglés, *myeloid-derived suppressor cells*, **MDSCs**), una población celular que parte

de un CMP, que también da lugar a DC normales, monocitos, macrófagos y granulocitos. Existen dos grupos de MDSCs, las **granulocíticas** o polimorfonucleares (en inglés, *polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells*, **PMN-MDSCs**), que son morfológica y fenotípicamente similares a los neutrófilos; y las **monocíticas** (en inglés, *monocytic myeloid-derived suppressor cells*, **MO-MDSCs**), morfológica y fenotípicamente similares a los monocitos.

Las MDSCs se expanden durante el desarrollo de las neoplasias, procesos inflamatorios e infecciosos y se caracterizan por su capacidad de suprimir la función citotóxica de los linfocitos T, incluyendo tanto los CTL como las células NK [145]. En presencia de neoplasia, es el propio microambiente inflamatorio del tumor el que facilita la expansión y la actividad supresiva de las MDSCs, liberando múltiples factores pro-inflamatorios como GM-CSF y VEGF. Posteriormente, la actividad de las MDSCs viene mediada por un conjunto de mecanismos tales como el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, y la sobreexpresión de arginasa-1, esta última actuando mediante la inhibición de la proliferación de las células NK y la secreción de INF- γ . En algunos casos, las MDSCs son capaces de modular la respuesta inmunitaria mediante la expresión del ligando *programmed-death ligand 1* (PD-L1), que se une a su receptor PD-1 en los CTL e induce su apoptosis.

Las MDSCs también median el reclutamiento y expansión de **células T reguladoras** (en inglés, *regulatory T cells*, **Treg**) inmunosupresoras. Estas células son un tipo especializado de células T CD4+ que expresan el factor de transcripción *forkhead box P3* (FoxP3) y son capaces de comprometer la función antitumoral de las células T CD4+/CD8+ y la actividad de las células presentadoras de antígeno, facilitando la evasión inmune de la célula tumoral [145,146].

En el contexto de la LMC en FC al diagnóstico, se ha visto que los pacientes presentan elevados niveles de PMN-MDSCs y MO-MDSCs en comparación con controles sanos y que estas MDSCs expresan BCR-ABL1 y son parte del clon leucémico [147].

También el porcentaje de células Treg está significativamente incrementado en pacientes con diagnóstico reciente de LMC comparado con controles sanos, y el número de células Treg aumenta a medida que la enfermedad progresa [148].

Además, las células BCR-ABL1+ de la LMC son capaces de evadir el sistema inmunitario mediante la sobreexpresión del *immune checkpoint* PD-1 en los CTL, que es reconocido por su ligando PD-L1, expresado de manera aberrante en la superficie de las células de la LMC. PD-1 se expresa temporalmente en las células efectoras activadas del sistema inmunitario en condiciones normales; no obstante, una expresión constitutiva de PD-1 da lugar a una reducción en la función efectora de las células T

además de una expansión de células Treg con incremento de su función supresora [149]. Este escenario promueve la supresión del sistema inmunitario efector y la progresión de la enfermedad, en los que están implicadas tanto las MDSC como las células Treg (Figura 9) [147].

A día de hoy, se desconocen los mecanismos que conducen a este escenario de inmunodepresión observado en la LMC. Algunos estudios sugieren que las células BCR-ABL1+ de la LMC podrían segregar vesículas extracelulares que serían captadas por las células Treg y que esta interacción sería la que provocaría la sobreexpresión de FoxP3 en estas células. Esto produciría un aumento de la actividad supresora de las células Treg, que principalmente afectaría a las células T CD8+, uno de los principales componentes de defensa contra las células malignas [150].

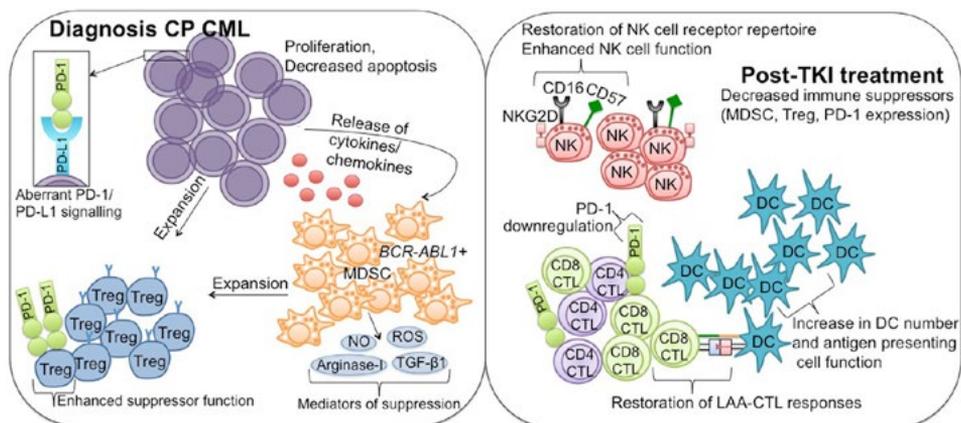


Figura 9. Restablecimiento del sistema inmunitario efector en los pacientes con LMC que consiguen una RMP con la terapia ITQ. Al diagnóstico: la supresión inmunológica está mediada en parte por las HSCs, que adquieren ventajas proliferativas y de supervivencia (evasión de la apoptosis). Estas células segregan citoquinas y quimiocinas que promueven la expansión de las MDSCs y las células Treg, facilitando la disregulación de la inmunidad efectora. El ligando PD-L1 está sobreexpresado en la superficie de las células de la LMC, que interactúa con su receptor inhibitorio, PD-1, y contribuye a la protección de las células malignas frente a la destrucción por parte del sistema inmunitario. Las MDSCs son BCR-ABL1+ ya que se originan a partir del clon maligno, y su actividad supresora está mediada vía la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y arginasa-1, entre otras. Las MDSCs pueden inducir la expansión de las células Treg, que también expresan PD-1. Durante el tratamiento con ITQ: el ITQ ejerce efectos inmunomoduladores, especialmente sobre las poblaciones MDSC y Treg, reactivando y restableciendo la vigilancia del sistema inmunitario efector. CML, leucemia mieloide crónica; TKI, inhibidor de la tirosina quinasa; CP, fase crónica; MDSCs, células supresoras de origen mieloide; Treg, células T reguladoras; PD-L1, *programmed death ligand-1*; PD-1, *programmed death-1*; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas del oxígeno; TGF-β1, *transforming growth factor-β1*; NK, *natural killer*; LAA, antígeno asociado a leucemia; CTL, linfocito T citotóxico; DC, célula dendrítica. Imagen adaptada de Hughes A et al., *Frontiers Immunology*, 2017 [139].

Factores inmunitarios que podrían contribuir a la RLT

Es conocido que los ITQs ejercen efectos inmunomoduladores, reactivando la vigilancia del sistema inmunitario efector. De manera específica, el tratamiento con ITQ lleva a la restauración del repertorio de KIRs y otros receptores de las células NK, así como el aumento de la actividad de estas células. También implica la restauración de las respuestas mediadas por CTL, reduciendo los niveles de expresión de PD-1, y el aumento en número de DC y su función como células presentadoras de antígenos (Figura 9: Hughes A et al, 2017 [139]). Además, se ha observado que el restablecimiento del sistema inmunitario está estrechamente relacionado con los niveles de RM al tratamiento, siendo la RMP el nivel donde, teóricamente, se consigue la máxima reactivación del sistema efector antitumoral. No obstante, el mecanismo por el que estos dos fenómenos están relacionados aún está por determinar.

El hecho de que la mitad de los pacientes que paran el tratamiento no presenten una pérdida de la RM, a pesar de tener una ERM persistente, ha sido atribuido al control inmunitario de la LMC. Un subestudio del ensayo clínico STIM realizado en 51 pacientes que suspendieron el tratamiento (*InmunoSTIM*), se observó que tener un número elevado de células NK en el momento de la discontinuación se asociaba con el mantenimiento de la RLT [151]. Posteriormente, el análisis realizado a un subgrupo de pacientes del ensayo clínico EURO-SKI confirmó este hecho y, además, el mantenimiento de la RLT se asoció con tener una mayor proporción de células NK más maduras (CD57+) y citotóxicas (CD16+ y CD57+) [152]. Además, en un subestudio de este mismo ensayo clínico se observó que una proporción elevada de DC CD86+ y unos niveles de expresión bajos para PD-1 en CTLs CD8+, se asociaba a mayor riesgo de recaída, lo que sugiere que el agotamiento del sistema inmune efector juega un importante papel en este evento [153].

A pesar de toda la evidencia disponible, los resultados de los estudios inmunológicos realizados en pacientes con LMC que discontinúan el ITQ siguen siendo controvertidos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El pronóstico de la LMC ha mejorado sustancialmente con los ITQs, de manera que la supervivencia global de los pacientes diagnosticados de LMC en FC es hoy en día similar a la de la población general. De esta manera, el primer objetivo terapéutico con los ITQs es la obtención de la RMM, que evita la progresión de la enfermedad a fases avanzadas, seguido de la obtención de una RMP mantenida, requisito indispensable para la suspensión del ITQ tras varios años de tratamiento. Finalmente, el último objetivo terapéutico es el mantenimiento de la RLT tras la discontinuación del ITQ.

Imatinib sigue siendo el tratamiento estándar en primera línea para la mayoría de pacientes diagnosticados de LMC debido a que muchos de ellos se diagnostican en FC, con índice de Sokal bajo y muchos tienen comorbilidades asociadas. Sin embargo, alrededor del 30% de los pacientes presentará resistencia a este tratamiento y, de los que responden, solo el 35%-40% conseguirá la RMP. Los ITQs-2G (como nilotinib, dasatinib y bosutinib) son más eficaces que imatinib, especialmente en la obtención de una RMP de manera más rápida y estable, pero los efectos secundarios a corto y largo plazo suelen ser superiores a los observados con imatinib.

Pese a la disponibilidad de múltiples ITQs para tratar la LMC, se han descrito muy pocos predictores biológicos que identifican, en el momento del diagnóstico, a aquellos pacientes con menor probabilidad de alcanzar la RMM o RMP con imatinib y que, por lo tanto, puedan beneficiarse de un tratamiento con un ITQ-2G desde un inicio.

La **hipótesis global** de la esta Tesis Doctoral es que determinados biomarcadores presentes al diagnóstico de la LMC se asocian con la obtención de la RMM y la RMP en pacientes tratados con imatinib en primera línea y que su identificación podría ayudar en la toma de decisiones terapéuticas aplicando una medicina más personalizada desde el diagnóstico hasta la eventual discontinuación del tratamiento a largo plazo. Además, el análisis de variables clínicas y biológicas en pacientes que discontinúan el ITQ puede ayudar a entender mejor los mecanismos que subyacen a la pérdida de la RMM en algunos pacientes y al mantenimiento de la RLT en otros.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los **objetivos** de esta Tesis Doctoral son:

1.

Estudiar la asociación entre polimorfismos presentes en genes relacionados con el metabolismo y transporte de fármacos y la obtención de la RMM en pacientes tratados con imatinib en primera línea.

1.1. Genotipar múltiples polimorfismos (SNPs) en genes ADME mediante un *array* de farmacogenética en una cohorte piloto de pacientes tratados con imatinib y analizar la asociación entre estos SNPs y la probabilidad de conseguir la RMM con imatinib en primera línea.

1.2. Genotipar los SNPs estadísticamente significativos obtenidos en el apartado 1.1. en una cohorte independiente de mayor extensión y validar su asociación con la obtención de la RMM con imatinib en primera línea.

2.

Estudiar el papel de la LT (corregida por la edad) al diagnóstico de la LMC en la respuesta al tratamiento con imatinib en primera línea.

2.1. Analizar la asociación entre la LT al diagnóstico y la obtención de la RMP con imatinib en primera línea.

2.2. Analizar la asociación entre la LT y la obtención de la RMM con imatinib, las isoformas de la proteína p210 y los diferentes índices pronóstico de esta enfermedad.

3.

Analizar las características clínico-biológicas de los pacientes que mantienen la RLT y los pacientes que presentan una recaída post-suspensión del ITQ, especialmente con imatinib, incluidos en el Protocolo ICO de Discontinuación.

3.1. Analizar la asociación entre determinadas variables clínicas y la incidencia acumulada de RLT en todos los pacientes incluidos en el protocolo.

3.2. Determinar la utilidad de la técnica de dPCR en pacientes en RMP por qPCR estándar durante los dos años previos a la discontinuación del ITQ, para predecir la probabilidad de recaída tras ésta.

3.3. Cuantificar y caracterizar la fracción de células de la SPop y establecer su posible papel en la recaída post-discontinuación.

3.4. Estudiar la frecuencia de diferentes subtipos de células NK y analizar su asociación con la recaída post-discontinuación.

MATERIAL Y MÉTODOS

TRABAJO I

Detección de SNPs en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos y relacionados con la respuesta a imatinib

1. Pacientes y diseño del estudio

El Trabajo I es un **estudio retrospectivo** que se realizó en dos fases: un estudio piloto inicial y un estudio de extensión con un mayor número de pacientes.

En el **estudio piloto** se incluyeron un total de **45 pacientes** diagnosticados de LMC, según los criterios de la OMS 2008 [5], procedentes del ICO-Badalona, el ICO-Hospitalet (Hospital Duran i Reynals) y el ICO-Girona (Hospital Josep Trueta).

Para el **estudio de extensión** se incluyeron de forma **retrospectiva**, un total de **137 pacientes** procedentes de 6 hospitales: ICO-Badalona, ICO-Hospitalet, ICO-Girona, ICO-Tarragona (Hospital Joan XXIII), Hospital General de Granollers (Granollers) y del Hospital General Universitario Morales Meseguer (Murcia).

El principal criterio de inclusión fue el tratamiento con **imatinib en primera línea** durante un mínimo de 6 meses. Se excluyeron los pacientes que habían presentado resistencia al tratamiento debido a mutaciones en el dominio quinasa de *ABL1*, o que presentaran otras alteraciones genéticas como por ejemplo ACAs.

Se obtuvo el consentimiento informado debidamente firmado de todos los pacientes incluidos en el estudio. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con los protocolos internos del laboratorio y autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica del HGTiP (Badalona).

2. Procesamiento general de las muestras

Para ambas fases del Trabajo I fue necesaria la utilización de **ADN** procedente de muestras de SP total (o en su defecto MO), en cualquier momento del transcurso de la enfermedad.

Previo a la obtención del ADN, se llevó a cabo una lisis eritrocitaria de las muestras de SP o MO empleando una solución tampón a base de cloruro de amonio (TLE, tampón de lisis eritrocitaria: NH_4CL - EDTA - HEPES). Para ello, la muestra de SP o

MO se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma del resto de componentes de la sangre. Una vez descartado el plasma, se lisa las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente utilizando 10 mL de TLE. Posteriormente, las muestras se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el pellet leucocitario con 1-2 mL de TLE y se transfiere a un eppendorf de 2 mL. Se centrifuga de nuevo la muestra a 2000 rpm durante 5 minutos y se retira el sobrenadante. Finalmente, se resuspende el pellet con 150 µl de RA (solución estabilizadora de ácidos nucleicos a base de isotiocianato de guanidina).

3. Extracción del ADN y cuantificación

La extracción del ADN de muestras de SP o MO se realizó de manera automática mediante el robot QIAcube® (Qiagen, cat. no. 9002864) usando el QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat. no. 51106). La concentración del ADN y su calidad fueron determinadas mediante el espectrofotómetro QIAexpert (Qiagen, cat. no. 9002340). El ADN genómico se conservó a -20°C y fue usado posteriormente para el genotipado de los SNPs.

4. Genotipado de SNPs presentes en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos

Los SNP son las variaciones genéticas más comunes que se encuentran en el genoma de cualquier organismo. A pesar de que los SNPs son de especial interés para entender ciertas características de las enfermedades así como el metabolismo de determinados fármacos, el genotipado de SNPs a gran escala (estudios con elevado número de individuos) ha supuesto un gran reto para la ciencia, debido al elevado coste económico y de recursos asociado a las técnicas de genotipado convencionales. Es por ello que se han creado diferentes plataformas de genotipado de SNPs que permiten multiplexar el procedimiento, reduciendo el coste y tiempo empleado en la técnica.

En trabajo se utilizaron **2 metodologías diferentes para el genotipado de SNP**, una para la parte del estudio piloto y otra para el estudio de extensión.

A continuación se describen ambas:

4.1. Estudio piloto: DMET™ Plus Microarray (Affimetrix, Applied Biosystems, cat. no. 901268)

Esta tecnología permite la identificación simultánea de 1936 SNPs presentes en 231 genes ADME. Estos SNPs fueron seleccionados en base a la evidencia disponible y revisados por el consorcio de expertos PharmaADME (www.pharmaadme.org). Este consorcio fue creado con el objetivo de desarrollar un listado de genes y biomarcadores genéticos que permitiera su inclusión en las plataformas de genotipado actuales (de donde derivó el Microarray DMET™) para su uso en estudios de variabilidad farmacogenómica.

Los genes incluidos en el microarray DMET™ se clasifican en 4 categorías: a) genes que codifican para enzimas de fase I (n=45), involucradas en procesos de modificación de grupos funcionales mediante oxidación, reducción e hidrólisis, b) genes que codifican para enzimas de fase II (n=74), que son responsables de la conjugación con la fracción endógena de ciertas moléculas con el objetivo de obtener sustancias fáciles de excretar por orina o bilis, c) genes que codifican para transportadores (n=51), responsables de la absorción y excreción de los fármacos dentro y fuera de las células y, por último, d) genes que codifican para proteínas modificadoras (n=24), que pueden alterar la expresión de otros genes ADME o incluso la bioquímica de las enzimas codificadas por estos genes. Posteriormente, se incorporaron 37 genes adicionales (llegando a un total de 231 genes), la mayoría implicados en la regulación intracelular de procesos que facilitan el metabolismo y transporte de los fármacos (el listado de todos los genes aparece en el apartado 1 de la sección de Anexo I - Metodología suplementaria).

Su metodología se basa en la utilización de *molecular inversion probes* (MIP), moléculas de ADN de única cadena, que contienen dos regiones complementarias a las regiones de ADN que flanquean el SNP, lo que permite una amplificación precisa de la región de interés. La detección del alelo se realiza mediante oligonucleótidos alelo-específicos y la lectura de la fluorescencia se puede hacer tanto en el GeneChip™ Scanner 3000 como el GeneChip™ Scanner 3000Dx v.2 (Affimetrix). Debido a que en nuestro laboratorio no disponíamos de ninguno de estos dos equipos, el estudio piloto se llevó a cabo mediante la colaboración del grupo "Unidad de Expresión Tecnología Affymetrix" del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Allí se realizó toda la parte experimental (siguiendo el protocolo descrito por el fabricante [154]). Posteriormente, en nuestro laboratorio se analizaron los datos crudos del genotipado (asignación de alelos) mediante el programa *DMET Console Analysis Software*.

4.2. Estudio de extensión: 96.96 *Dynamic Array*[™] *integrated fluidic circuit* (IFC) with SNP Type Assays (Fluidigm, cat. no. PN BMK-M-96.96GT)

Los SNPs significativamente relacionados con la respuesta a imatinib obtenidos en el estudio piloto, se analizaron mediante la tecnología de los *SNPtype Assays* de Fluidigm en un mayor número de pacientes; esta tecnología permite la detección de SNPs de manera relativamente rápida, reduciendo el coste económico y la cantidad de muestra necesaria, así como aumentando su reproducibilidad. Las sondas (*assays*) *SNPtype* se basan en la química de detección por PCR a punto final alelo-específica, y constan de 3 *primers* diferentes: a) *allele-specific primer 1* (ASP1), marcado con FAM, b) *allele-specific primer 2* (ASP2), marcado con HEX y c) *locus-specific primer* (LSP). En cada reacción se utiliza una sonda universal, lo que produce una fluorescencia uniforme a la vez que permite reducir los costes del procedimiento (para la descripción gráfica de la tecnología *SNPtype Assays*, ver apartado 2, Anexos I - Metodología suplementaria).

Uno de los chips disponibles en esta plataforma permite analizar 96 SNPs diferentes en 96 muestras de ADN (96.96 *Dynamic Array*[™] IFC), realizando un total de 9.216 reacciones de manera simultánea. Este formato de chip ha sido usado en la presente Tesis Doctoral.

El proceso se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (*SNP Genotyping analysis user guide*, Fluidigm, PN 68000098 Q1), con la colaboración de la unidad de Plataformas del Institut Josep Carreras. En el **Módulo 1** (página 81) se resume el protocolo utilizado para este estudio, así como los reactivos necesarios en cada uno de los pasos.

Según instrucciones del fabricante y para obtener mejores resultados, todas las muestras de ADN se pre-amplificaron previamente usando los *specific target amplification* (STA) *primers*. La concentración mínima de partida fue de 10ng/μL. Todas las muestras pre-amplificadas fueron analizadas por triplicado, con el objetivo de verificar la reproducibilidad de la técnica y obtener unos resultados más precisos.

Finalmente, el análisis de la lectura de los chips se llevó a cabo utilizando el *Genotyping Analysis Software* de Fluidigm.

5. Análisis de los datos obtenidos

5.1. Estadísticos descriptivos e incidencias acumuladas

Las características clínicas y biológicas de los pacientes fueron descritas como frecuencias y porcentajes para las variables categóricas y como mediana y extremos para las variables cuantitativas. La comparación de variables continuas entre diferentes grupos se llevó a cabo mediante los tests de Mann Whitney U o Kruskal-Wallis, mientras que la comparación de variables categóricas se hizo mediante el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher, en caso necesario. Se calcularon las incidencias acumuladas de RMM para los SNPs significativos en el estudio de extensión y se representaron gráficamente mediante curvas Kaplan-Meier. Se utilizó el software SPSS versión 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y el software R para estos análisis.

5.2. Análisis de asociación mediante herramientas bioinformáticas

El análisis bioinformático de los datos obtenidos tanto en el estudio piloto como en el estudio de extensión se llevó a cabo mediante el software libre R, utilizando el paquete *SNPassoc* [155].

Se realizó un **análisis de asociación caso-control** para los dos estudios (estudio piloto y estudio de extensión), con el objetivo de encontrar una posible correlación entre los SNPs analizados y la respuesta al tratamiento con imatinib. No obstante, previo al análisis de asociación, los datos genéticos obtenidos en el genotipado fueron sometidos a un procedimiento de **control de calidad estándar**; primero, se calcularon las frecuencias genotípicas para cada SNPs y el % de valores nulos (*missing*) para cada genotipo. Se descartaron los SNPs monomórficos (un único genotipo en toda la población de estudio) y se seleccionaron únicamente aquellos con una tasa de genotipado del 95% (es decir, que el 95% de los pacientes tuviesen información de genotipo para cada SNP). Posteriormente, se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (*Hardy-Weinberg equilibrium*, HWE). El HWE en la población valora, para cada SNP, la diferencia entre la distribución observada de genotipos y su distribución esperada en función de las frecuencias génicas. Dicha diferencia se evalúa mediante un test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher. Dado que un SNP dentro de una población puede no estar en equilibrio por diferentes motivos (como consecuencia de la propia enfermedad, entre otros), en este trabajo, las variantes con p-valor HWE <0,05 (esto es, que no están en equilibrio) y que resultaron estadísticamente significativas en el estudio de asociación se tuvieron en cuenta para la posterior interpretación de los resultados.

Para el **análisis de asociación** se evaluaron, en cada uno de los SNPs, las diferencias en frecuencia de genotipos entre casos y controles, mediante un test de regresión

lineal donde se obtuvieron las razones de probabilidades (*odd ratios*, OR). A pesar de que este tipo de análisis podría verse afectado negativamente por el hecho de que el número de marcadores genéticos a analizar es mucho mayor que el de individuos (como es el caso de este trabajo y de la mayoría de estudios genéticos de este tipo), el paquete SNPassoc permite el análisis de un solo marcador cada vez, evitando así un posible error estadístico. Para testar la asociación alélica de cada SNP con la variable de interés (respuesta a imatinib), se construye una tabla de contingencia para las frecuencias alélicas, donde cada celda es el número de veces que aparece un determinado alelo en los casos o en los controles. Todos los análisis fueron realizados asumiendo diferentes modelos genéticos, ya que el modelo de herencia era desconocido. Para la selección del mejor modelo de herencia se utilizó la prueba de razón de verosimilitud (*likelihood ratio test*) o el test exacto de Fisher, complementado con el criterio de información de Akaike (AIC).

Para añadir mayor potencia estadística, **en el estudio de extensión** se realizaron un conjunto de análisis adicionales: por un lado, se utilizó la metodología estadística llamada "**validación cruzada**". En este caso, la cohorte total se dividió en 5 grupos iguales de manera aleatoria y el análisis de asociación entre los polimorfismos y la respuesta a imatinib se realizó 5 veces (análisis A, B, C, D y E), siempre dejando fuera uno de los grupos.

Además, se realizó un **análisis de asociación por permutaciones**. En este tipo de análisis, se emplea una asignación aleatoria de los sujetos (población de estudio) bien en el grupo de casos, o bien en el grupo de controles. Por ello, todos los pacientes son tratados de la misma manera (no hay casos y controles asignados previamente), ya que la asignación del carácter distintivo se hace de manera aleatoria en cada una de las iteraciones del test de permutaciones. En este estudio, el análisis se realizó para la cohorte entera, sin dividir por grupos, y se aplicaron un total de 10.000 iteraciones.

Finalmente, se analizaron los posibles **haplotipos**¹ mediante la herramienta Haploview [156] y se estudió la asociación con la respuesta a imatinib.

Para todos los análisis se consideró significación estadística si p-valor <0,05.

(1) Haplotipo: conjunto de variaciones en el ADN (polimorfismos como SNPs o inserciones/delecciones), adyacentes entre ellos en el mismo locus y con tendencia a heredarse de manera conjunta.

MÓDULO 1

Protocolo de genotipado de SNP mediante la tecnología de Fluidigm (SNPtype)

1. Pre-amplificación de todas las muestras (*specific target amplification, STA*)

Primero se prepara la mezcla de los *primers* STA y LSP para cada ensayo (**10X STA Primer Pool**) en una placa de 96 pocillos:

Reactivo	Fabricante (cat. no.)	Volumen total (µl)
100 µM SNPtype Assay STA primer	Fluidigm (ASY-GT)	2 (x 96 = 192 total)
100 µM SNPtype Assay LSP primer	Fluidigm (ASY-GT)	2 (x 96 = 192 total)
DNA suspension buffer (10mM Tris, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)	TEKnova (T02211)	16

10X STA
Primer Pool

Preparación de la mezcla de pre-amplificación:

Reactivo	Fabricante (cat. no.)	Volumen / muestra (µl)
Qiagen 2X Multiplex PCR MM	Qiagen (206143)	2,5
PCR-certified water	NA	0,75
10X SNPtype STA Primer Pool	NA	0,5
ADN muestra	NA	1,25
	TOTAL	5

Protocolo de termociclador:

95°C	15 min.	14 ciclos
95°C	15 seg.	
60°C	4 min.	

2. Preparación de las mezclas de los ensayos (*Assay Mix Solution*)

En una placa de 96 pocillos se mezclan los *primers* ASP1/ASP2 + LSP y el buffer (**SNPtype assay mix**)

Reactivo	Fabricante (cat. no.)	Volumen (µl)
100 µM SNPtype Assay ASP1/ASP2 (1 para cada SNP analizado)	Fluidigm (ASY-GT)	3
100 µM SNPtype Assay LSP primer (1 para cada SNP analizado)	Fluidigm (ASY-GT)	8
DNA suspension buffer (10mM Tris, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)	TEKnova (T02211)	29

Se prepara la pre-mix (**Assay pre-mix**) y se añaden 4µl de ésta en cada uno de los pocillos. Posteriormente se añade 1µl de la **SNPtype assay mix** preparada anteriormente.

Reactivo	Fabricante (cat. no.)	Volumen/muestra (µl)
2X Assay Loading Reagent	Fluidigm (85000736)	2,5
PCR-certified water	NA	1,5
SNPtype Assay Mix	NA	1
	TOTAL	5

SNPtype
Assay Mix

Assay
pre-mix

3. Preparación de las muestras (*Sample Mix Solution*)

Se prepara la pre-mix para las muestras (*sample pre-mix*) y se añaden 3,5µl en cada uno de los pocillos de una placa de 96. Posteriormente, se añaden 2,5µl del **ADN pre-amplificado** en el paso 1.

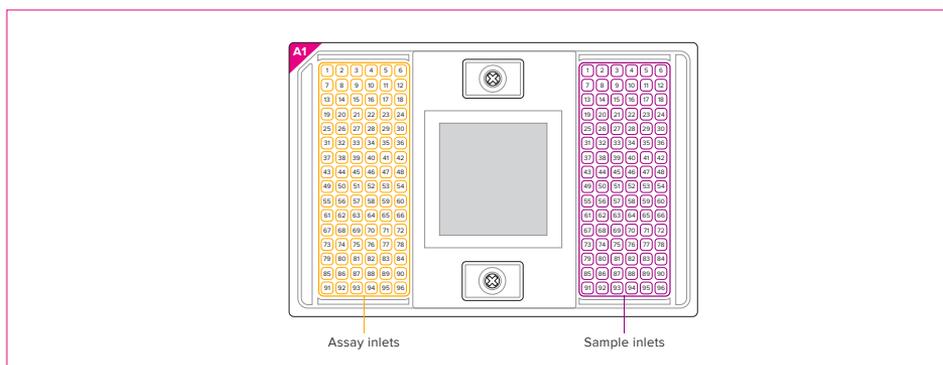
Reactivo	Fabricante (cat. no.)	Volumen / muestra (µl)
Biotium 2X Fast Probe Master	Biotium (31005)	3
20X SNPtype Sample Loading Reagent	Fluidigm (100-3425)	0,3
60X SNPtype Reagent	Fluidigm (100-3402)	0,1
ROX	Life Tech. (12223-012)	0,036
PCR-certified water	NA	0,064
ADN pre-amplificado (STA)	NA	2,5
	TOTAL	6

*Sample
pre-mix*

4. Preparación de los 96.96 Dynamic Array™ IFC

Previo a su uso, el chip IFC debe ser preparado para la posterior transferencia de las muestras y ensayos (*priming step*). Para ello se añade el líquido de control y se introduce en el IFC Controller MX. Este proceso dura 20 minutos.

A continuación, se procede a pipetear **4µl** de la *Assay Mix Solution* y **5µl** de la *Sample Mix Solution* en los pocillos correspondientes (a cada lado del chip) según la siguiente imagen:



Una vez cargadas las muestras y los ensayos, se vuelve a introducir el chip en el IFC Controller MX, donde ambos se mezclan dentro del sistema de nanofluídica presente en el centro del chip.

5. Protocolo de PCR en BioMark™ HD System y visualización de los datos en el *Genotyping analysis software*

TRABAJO II

La influencia de la longitud de los telómeros al diagnóstico en la obtención de la respuesta molecular profunda con imatinib

1. Pacientes y diseño del estudio

El Trabajo II es un **estudio retrospectivo** en el que se incluyeron un total de **96 pacientes** diagnosticados de LMC en FC entre los años 2004 y 2016, del ICO-Badalona, ICO-Hospitalet e ICO-Girona.

Todos los pacientes fueron tratados con **imatinib en primera línea**. Se excluyeron los pacientes con intolerancia/toxicidad a imatinib así como los pacientes con mutaciones en el dominio quinasa de *ABL1* o ACAs. Para este trabajo fue necesaria la obtención de **muestras de ADN** provenientes de muestras de SP o MO en el **momento del diagnóstico**.

Se incluyeron, además, **107 muestras de SP de donantes sanos** para la corrección de la LT por la edad. Las muestras anonimizadas se obtuvieron del Laboratorio de análisis clínicos (core) del HUGTiP y el ADN se obtuvo de sangre total. En cada placa de PCR se incluyeron **2 muestras de ADN de cordón umbilical** del *Banc de Sang i Teixits* que se usaron como **controles de telómeros largos**, y **2 muestras de ADN** de pacientes con **anemia de Fanconi**, usadas como **controles de telómeros cortos**. Finalmente, se utilizó una muestra de ADN de SP de un donante sano para generar la recta patrón de la técnica de cuantificación por PCR (explicado en detalle más adelante).

Se obtuvo el consentimiento informado debidamente firmado de todos los pacientes incluidos en el estudio. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con los protocolos internos del laboratorio y autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUGTiP.

2. Procesamiento de las muestras, extracción del ADN y cuantificación

El procesamiento inicial de las muestras y la extracción del ADN se llevó a cabo de la misma manera en que se ha descrito anteriormente en el Trabajo I (Apartados 2 y 3). Brevemente, primero se realizó la lisis eritrocitaria de las muestras de SP o MO mediante el tampón TLE y una vez obtenido el pellet leucocitario, se realizó la ex-

tracción del ADN mediante el robot QIAcube® (Qiagen, cat. no. 9002864) usando el QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, cat. no. 51106). En este caso, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher, cat. no. ND-2000) para cuantificar el ADN obtenido.

3. Determinación de la longitud de los telómeros mediante *monochrome multiplex qPCR*

El análisis de la LT de las muestras de pacientes con LMC, las muestras de donantes sanos y los controles de telómeros largos y cortos se realizó mediante la técnica de ***monochrome multiplex qPCR (MM-qPCR)***, descrita por Cawthon et al. en 2009 [157]. La peculiaridad de la MM-qPCR es que, a diferencia de la PCR convencional, permite la detección del número de copias relativas de 2 secuencias de ADN diferentes en una única reacción de PCR y utilizando un único marcador de fluorescencia (en este caso, se ha utilizado *SYBR Green*, un compuesto fluorescente que se une a la molécula de ADN). Esto es posible gracias al diseño de los pares de *primers* para cada una de las secuencias diana; éstos están diseñados para producir amplicones pequeños, pero añadiendo una cola de -GC- en ambos lados del segundo amplicón (el menos abundante), lo que permite aumentar considerablemente su temperatura de fusión (en inglés, *melting temperature*, T_m). De esta manera, la señal de fluorescencia proveniente del primer amplicón se detecta en los primeros ciclos de PCR, antes de que la señal del segundo amplicón (que tiene una T_m superior) sea detectada. En el momento de detección del segundo amplicón, la temperatura es suficientemente alta y el primer amplicón no puede interferir en la señal de fluorescencia (Figura 10).

La MM-qPCR es especialmente interesante en los casos en que se tiene una secuencia diana abundante (elevado número de copias) y otra secuencia diana con menor número de copias (por ejemplo, un gen de única copia). En la Tabla 8 se muestra el diseño de los pares de *primers* usados en el Trabajo II para la amplificación de la región telomérica y para la región que codifica el gen de la beta-globina (gen de única copia usado en este trabajo).

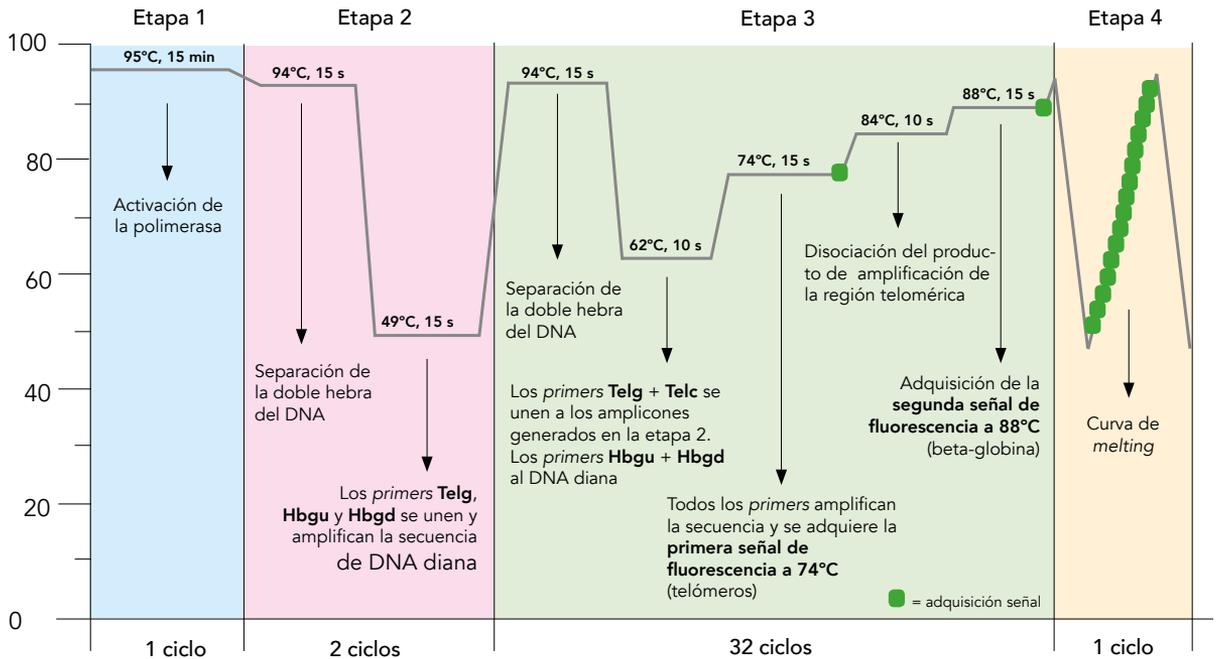


Figura 10. Esquema del perfil de ciclos de la MM-qPCR, donde se describen cada una de las etapas. Los círculos verdes representan el momento en el que se adquiere la señal de fluorescencia. Imagen adaptada de Hsieh AYY et al. 2016 [158].

Tabla 8. Secuencia de los *primers* usados para la determinación de la LT mediante MM-qPCR.

Región telómeros		
Primer	Secuencia	Tamaño
Tel g	5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3'	79 bp
Tel c	5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAAC-3'	
Región gen de única copia (beta-globina)		
Primer	Secuencia	Tamaño
Hbg u	5'- cgggcgggcgggcgggcgggctggggcg CTTCATCCACGTTACCTTG-3'	106 bp
Hbg d	5'- gcccggcccgcgcccgtcccgcg GAGGAGAAGTCTGCCGTT-3'	

La región en negrita de los *primers* de la beta-globina representa la cola de GC no complementaria, la cual permiten aumentar la temperatura de fusión de este amplicón

El Módulo 2 (página 88) describe el protocolo de laboratorio paso a paso y los reactivos utilizados para la determinación de la LT en los pacientes con LMC, los donantes sanos y los controles positivos (tanto de telómeros cortos como largos) incluidos en el Trabajo II. Todas las muestras de ADN fueron analizadas por triplicado y se usó el valor medio para todos los análisis. El protocolo de termociclador y la detección de la fluorescencia en los tiempos y temperaturas indicados (Módulo 2) se llevó a cabo en el equipo CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, cat. no. 1855485). Se usó el CFX Manager™ software (Bio-Rad) para analizar los datos crudos obtenidos en el protocolo de termociclador y para generar las dos rectas patrón (una para la señal de los telómeros adquirida a 74°C y la otra para la señal de la beta-globina adquirida a 88°C). La LT se calculó como la *ratio* entre el número de copias de la secuencia de los telómeros (T) dividido por el número de copias de la secuencia correspondiente al gen de única copia, en este caso el gen de la beta-globina humana (S). Esta *ratio* fue **ajustada por la edad** usando los datos obtenidos de las muestras de los 107 donantes sanos. El valor obtenido se denominó como **delta-LT** y se refiere a la diferencia entre la LT calculada para cada paciente mediante la MM-qPCR (observada) y la LT que le correspondería a cada paciente por su edad (esperada, calculada a partir del conjunto de donantes sanos). **Cuanto mayor sea el valor de delta-LT**, mayor diferencia habrá entre la LT observada y la esperada por edad y por lo tanto, **más cortos serán los telómeros** en el momento del análisis (en este caso, al diagnóstico de la LMC). Todos los análisis estadísticos posteriores se llevaron a cabo usando el valor de delta-LT para cada paciente.

4. Análisis estadístico de los datos

Las características clínicas y biológicas de la serie se describieron como frecuencias y porcentajes para las variables categóricas y como mediana y extremos para las variables cuantitativas. La comparación de variables continuas entre grupos se llevó a cabo mediante el test de la mediana, mientras que para la comparación de variables categóricas entre grupos se utilizó el test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher.

Al tratarse de un estudio retrospectivo llevado a cabo en la práctica clínica asistencial, con un periodo de seguimiento amplio y con diferentes hitos de respuesta durante este periodo, de la misma manera que en otros estudios publicados previamente [159–161], consideramos apropiado realizar el análisis estadístico de los datos considerando una situación con riesgos competitivos. Por lo tanto, se realizaron todos los análisis de asociación entre la respuesta (estudiada como variable tiempo-dependiente) y la delta-LT de cada paciente mediante análisis por riesgos competitivos. Se consideró como evento principal conseguir la RM (RMM o RMP, dependiendo del análisis) y el tiempo desde el inicio de imatinib hasta dicha RM. Los pacientes que cambiaron de ITQ o no cambiaron pero murieron sin conseguir la RM establecida fueron considerados como eventos competitivos; se consideró el tiempo bajo tratamiento con imatinib al comprendido entre el inicio del tratamiento y el cambio de ITQ o la fecha de la muerte, respectivamente. Los pacientes vivos que no cambiaron de ITQ y que tampoco consiguieron la RM establecida fueron considerados como censuras, y se estableció el tiempo bajo tratamiento con imatinib al comprendido entre el inicio del tratamiento y la fecha de último control. Se representaron gráficamente las estimaciones de las incidencias acumuladas de las RM y se realizó un análisis multivariado para la RM utilizando el modelo de Fine & Gray [162].

Se consideró significación estadística si p -valor $<0,05$. Se utilizó el software SPSS versión 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y el software R para todos los análisis. Para la elaboración de gráficos y figuras se utilizó el software GraphPad Prism 5.

MÓDULO 2

Protocolo de cuantificación relativa de la longitud de los telómeros mediante MM-qPCR

1. Leer la concentración de cada muestra de ADN.
2. Ajustar la concentración del ADN a 0,8333 ng/μl (5 ng de ADN en 6 μl de volumen total).
3. Preparación de la Master Mix (MM):

Reactivo	Cat. no.	Concentración de trabajo	Volumen [μl/muestra]
H2O	Sigma W4502		2,32
MgCl	Applied Biosystems 4311806 (kit)	25mM	3,00
10 x Buffer	Applied Biosystems 4311806 (kit)	10x	2,5
Betain	Sigma B0300	5M	5,00
dNTP mix	bioline BIO-39028	1 mM	5,00
Primer Tel g	Invitrogen Custom DNA oligos	100pmol/μl	0,15
Primer Tel c	Invitrogen Custom DNA oligos	100pmol/μl	0,15
Primer Hbg d	Invitrogen Custom DNA oligos	100pmol/μl	0,15
Primer Hbg u	Invitrogen Custom DNA oligos	100pmol/μl	0,15
DTT	Sigma 43816	0,1M	0,25
Sybr Green	Lumiprobe 51010		0,19
Gold Taq	Applied Biosystems 4311806 (kit)		0,14

4. Repartir 19 μl de la MM en cada uno de los pocillos de una placa de 96.
5. Añadir 6 μl/pocillo del ADN de cada muestra, previamente diluido.
6. Introducir la placa en el equipo de qPCR a tiempo real y realizar el programa de termociclador descrito a continuación:

95°C	15 min.	
94°C	15 seg.	2 ciclos
49°C	15 seg.	
94°C	15 seg.	32 ciclos
62°C	10 seg.	
74°C	15 seg.	
84°C	10 seg.	
88°C	15 seg.	

TRABAJO III

Parámetros clínicos y biológicos predictivos de recaída post-discontinuación del ITQ

1. Pacientes y diseño del estudio

En el Trabajo III se incluyeron un total de **56 pacientes** procedentes de 3 centros (ICO-Badalona, ICO-Girona e ICO-Hospitalet). Tal y como se ha mencionado en la sección de la Introducción (apartado 3.9.2), nuestro grupo lideró la elaboración del protocolo clínico-biológico de suspensión del ITQ dentro del ICO y hospitales comarcales asociados. El primer protocolo elaborado y aprobado (marzo 2018) tenía como principal criterio de inclusión el haber recibido imatinib durante un mínimo de 8 años y presentar una RM4.5 mantenida durante mínimo 2 años previo a la suspensión del ITQ. En mayo de 2019 se realizó una enmienda para incorporar también a los pacientes tratados con ITQs-2G (Figura 7, Introducción, apartado 3.9.2). De los 56 pacientes incluidos en este trabajo, 37 iniciaron la suspensión del tratamiento de forma prospectiva una vez aprobado el primer protocolo. Los 19 pacientes restantes suspendieron el tratamiento antes de la aprobación del protocolo y por lo tanto fueron tratados como pacientes retrospectivos.

El Trabajo III, además de incluir el análisis de variables clínicas implicadas en la recaída post-discontinuación, también incluye **3 subestudios biológicos**: 1) el análisis de los transcritos BCR-ABL1 mediante PCR digital, 2) el estudio de la subpoblación de células madre *Side Population* y 3) el análisis del perfil inmunológico de las células *Natural Killer*.

El criterio principal de **clasificación** de los pacientes en el Trabajo III fue la **pérdida de RMM post-discontinuación**.

Se obtuvo el consentimiento informado debidamente firmado de todos los pacientes incluidos en el estudio (y un consentimiento específico para la realización del aspirado de MO, prueba considerada no asistencial). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos internos del laboratorio y autorizados por el Comité Ético de Investigación Clínica del HUGTiP.

2. Metodología empleada en cada uno de los subestudios biológicos

2.1. Determinación de los transcritos de BCR-ABL1 mediante PCR digital

Para este subestudio del Trabajo III fue necesaria la utilización de **muestras tanto retrospectivas como prospectivas**. La Figura 11 muestra los tiempos en los que se analizaron las muestras; en los pacientes que mantuvieron la RLT se analizaron hasta un total de 7 muestras (4 previas a la discontinuación, 1 en el momento de la discontinuación y 2 post-discontinuación). En los pacientes que perdieron la RMM (recaída) se siguió el mismo protocolo hasta el momento de la discontinuación y se analizaron todas las muestras post-suspensión disponibles previas al momento de la recaída.

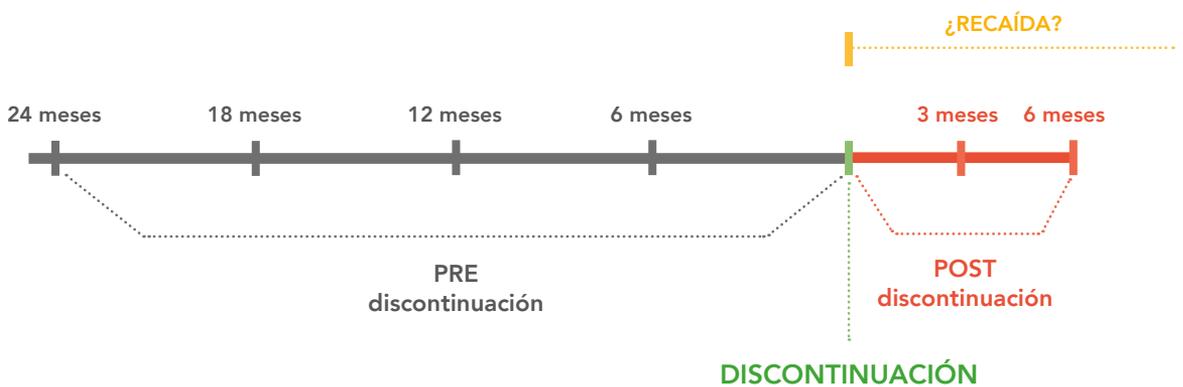


Figura 11. Esquema de los tiempos de análisis de las muestras en la parte retrospectiva (en gris) y prospectiva (verde y rojo). En cuatro pacientes no fue posible el análisis en todos los tiempos retrospectivos porque no se disponía de la muestra. En aquellos pacientes que presentaron recaída (en amarillo, n=8) se analizaron todas las muestras post-suspensión y previas a la recaída disponibles.

2.1.1. Extracción de ARN manual y síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para este estudio, fue necesaria la obtención de **ARN de muestras de SP total**. Primero se llevó a cabo la lisis eritrocitaria de las muestras de SP tal y como se ha descrito anteriormente en los Trabajos I y II. En este caso, una vez obtenido el pellet leucocitario, se resuspendió en 1mL TRIzol® (ThermoFisher, cat. no. 15596018) y se guardó en el congelador a -20°C hasta su posterior uso.

El proceso de extracción del ARN se realizó de manera manual y se resume de manera abreviada a continuación: 1) añadir 200µL de cloroformo (ITW Reagens, cat. no. 131252.1611) por cada 1 mL de TRIzol®. 2) Agitar durante 15 segundos e incubar en hielo durante 5 minutos. 3) Centrifugar durante 10 minutos a 11400 rpm a 4°C, donde aparecen dos fases. 4) Recoger la fase superior, que es la que contiene el ARN (la inferior contiene ADN y proteínas), y transferirlo a un nuevo eppendorf de 1,5 mL. 5) Añadir 500µL de isopropanol (ITW Reagens, cat. no. 211090.1211) por cada 1mL de TRIzol®. 6) Mezclar e incubar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente centrifugar a 11400 rpm y a 4°C durante 10 minutos. 7) Descartar sobrenadante y hacer dos lavados con 1 mL etanol al 75% (Sigma-Aldrich, cat. no. 1.00983). 8) Centrifugar a 8900 rpm y a 4°C durante 5 minutos. 9) Dejar secar las muestras durante 10-30 minutos sin dejar que se deshidraten y finalmente resuspender el pellet con 30µL de H₂O *Nuclease-Free* (Sigma-Aldrich, cat.no. W4502).

Una vez obtenido el ARN, se procedió a la síntesis de ADNc mediante la retrotranscripción de 1µg de ARN, utilizando la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, cat. no. 28025013), *random hexamer primers* (Invitrogen, cat no 48190018) y siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen Doc. Part No. 28025.PPS). Brevemente, se mezclan 2µL de *random hexamer primers*, 2µL de dNTP, 1 µg de RNA, se ajusta el volumen a 12µL con H₂O *Nuclease-Free* (Sigma-Aldrich, cat.no. W4502) y se calienta a 65°C durante 5 minutos. A esta mezcla se añaden 4µL de Buffer 5X, 2µL de DTT (Sigma, cat. no. 43816) y 1µL de RNase OUT (40U/µL). Se mezcla todo bien y se calienta a 37°C durante 2 minutos. Finalmente, se añade 1µL de M-MLV y se calienta primero a 25°C 10 minutos, después a 37°C durante 50 minutos y finalmente a 70°C durante 15 minutos. Con este protocolo, el volumen final de elución fue de 20µL para obtener una concentración de ADNc de 50ng/µL.

2.1.2. Protocolo de PCR digital

El mecanismo principal de la dPCR consiste en dividir la muestra de ADN, ADNc o ARN en miles de pocillos, de tal manera que idealmente sólo caigan una o dos moléculas de ADN/ADNc/ARN en cada pocillo; en ellos, se da la reacción de PCR de forma individualizada, de una manera similar a la PCR convencional, y se realiza

una detección a punto final. Se utilizan sondas con química TaqMan, marcadas con un fluorocromo, que son específicas para la secuencia diana. Algunos de los pocillos pueden contener la molécula diana mientras que otros no. Solo cuando la molécula diana está presente en la reacción, se emite una señal fluorescente (señal positiva). Posteriormente, en el análisis de la dPCR, la fracción de reacciones negativas (pocillos sin la molécula diana) se utiliza para obtener un valor absoluto del número de moléculas/secuencias diana total presentes en la muestra, sin la necesidad de generar una recta patrón ni de utilizar controles endógenos.

En este trabajo se ha utilizado la tecnología de dPCR basada en los chips de nanofluídica **QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K chip** (ThermoFisher, cat. no. A26316), que poseen un total de 20.000 pocillos o reacciones donde se divide la muestra de ADN, ADNc o ARN (Figura 12).

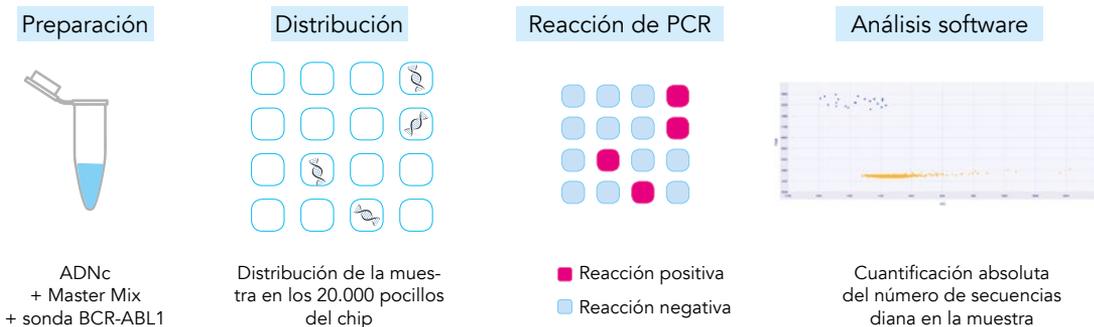


Figura 12. Esquema del procedimiento general de la QuantStudio™ 3D digital PCR.

Debido a que la tecnología de la dPCR es relativamente nueva, no existe ningún protocolo estandarizado para la detección de los transcritos de BCR-ABL1 en la LMC. Por este motivo, una parte fundamental de este trabajo fue la puesta a punto de la técnica, con el objetivo de obtener la mayor sensibilidad y reproducibilidad posibles para las muestras analizadas. Después de varias pruebas siguiendo diferentes diseños experimentales, se optó por utilizar un protocolo similar al recientemente publicado por la Dra. Bernardi y cols. [163]. De esta manera, el protocolo final utilizado para todas las muestras fue el descrito en el **Módulo 3** (página 94).

Todas las muestras del mismo paciente se analizaron por duplicado (dos chips para cada muestra) y en el mismo protocolo de termociclador, usando la misma *Master Mix* (MM) e incluyendo siempre un control negativo (*no template control*, NTC) y un control positivo (muestra de un paciente con ratio BCR-ABL1/ABL1(IS) próxima a 0,2% analizado por qPCR). Además, para la puesta a punto de la técnica, se utilizaron muestras de 11 controles sanos con el objetivo de determinar el límite de detección (LD) de la técnica.

Una vez finalizado el protocolo de termociclador, se determinó la fluorescencia de los chips mediante el QuantStudio 3D dPCR Instrument (ThermoFisher, cat. no. 4489084), del que se obtiene el archivo necesario para luego analizarlo con el software QuantStudio 3D *AnalysisSuite Cloud*. Del análisis con este programa se obtiene el número total de pocillos viables en los que ha caído muestra, las **copias de BCR-ABL1/μL** en cada uno de los chips (usando el factor de corrección del modelo de *Poisson* para aquellos pocillos con >1 copia de la secuencia diana) y el intervalo de confianza para cada caso. También se puede ajustar manualmente el umbral de positividad y eliminar todos los *outliers*.

Una vez obtenido el número de copias de BCR-ABL1/μL mediante dPCR, **se comparó con los valores de la ratio de BCR-ABL1/ABL1 obtenidos mediante qPCR** (este protocolo se describe en el apartado 3, Anexos I - Metodología suplementaria, y es el utilizado de manera asistencial para todos los pacientes de LMC incluidos en la presente Tesis Doctoral).

MÓDULO 3

Protocolo de determinación de los transcritos BCR-ABL1 mediante dPCR

1. Preparación de la Master Mix (MM):

Reactivo	Fabricante (cat. no.)	Volumen [μl/muestra]
QuantStudio™ 3D dPCR Master Mix v2	ThermoFisher A26358	8
Sonda BCR-ABL1 (20X)	IDT 10417980	0,8
Nuclease-free H2O	Sigma W4502	6,1

2. Repartir 14,9μl de la MM en tantos eppendorfs como muestras queramos analizar.

3. Añadir 1,1μl del ADNc (concentración: 50ng/μl) de cada muestra en el eppendorf con la MM correspondiente. Para el control negativo (NTC), añadir 1,1μl de Nuclease-free H2O adicionales.

4. Con la ayuda del QuantStudio™ 3D dPCR Chip Loader (ThermoFisher, cat. no.4482592), repartir 14,5μl del ADNc+MM en el chip de dPCR, añadir líquido de inmersión hasta cubrirlo todo y sellar. Guardar el chip protegido de la luz mientras cargamos el resto de chips.

5. Una vez tenemos todos los chips listos (1 chip = 1 muestra), se introducen en el termociclador GeneAmp 9700 (ThermoFisher, cat. no.4339386) y se utiliza una base especial para este termociclador (ThermoFisher, cat. no. 4486414) que permite inclinar el equipo y evitar que cualquier posible burbuja de líquido de inmersión dentro del chip interfiera en la reacción de PCR.

6. Realizar el siguiente programa de termociclador:

95°C	8 seg.	45 ciclos
95°C	15 seg.	
60°C	1 min.	
60°C	2 min.	
23°C		

7. Una vez finalizado el programa de termociclador, leer la fluorescencia de los chips con el QuantStudio 3D dPCR Instrument (ThermoFisher, cat. no. 4489084) y analizar los datos con el software QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud.

2.2. Análisis y cuantificación de la *Side Population* mediante citómica funcional

El análisis de las células SPop en los pacientes con LMC que discontinuaron el tratamiento es un **subestudio prospectivo** que se llevó a cabo en el momento de la discontinuación y a los 6 meses post-discontinuación (en el caso de los pacientes en RLT) o en el momento de la recaída (en los pacientes que perdieron la RMM). Para este estudio fue necesaria la obtención de **muestras de MO en contenedores de 3 mL con el anticoagulante heparina-litio**. Además, en todos los pacientes y para ambos momentos del estudio, **se criopreservó una muestra de MO para futuros estudios**.

El análisis de la SPop se realizó siguiendo el protocolo descrito por Petriz en el año 2013 [164], y consiste en un estudio funcional mediante citometría de flujo multiparamétrica que permite la detección de células altamente resistentes a la quimioterapia. Este ensayo se basa en la capacidad que tienen determinadas células de expulsar de su interior sustratos fluorescentes (como el marcador de ácidos nucleicos DCV o Hoechst 33342) o fármacos antineoplásicos, debido a la elevada expresión del transportador multidroga ABCG2. Esto permite detectarlas mediante citometría de flujo dado el patrón característico en el que aparecen (Figura 13-A). Este patrón se debe a una diferencia de concentraciones intracelulares de dicho marcador, como se puede ver en la Figura 13-B. Las células que aparecen en la región inferior de la zona correspondiente a la SPop presentan una elevada expresión de ABCG2 por lo que expulsan el marcador DCV de manera constante y la concentración de éste en el interior celular es muy baja. Estas células SPop son células poco diferenciadas y muy quiescentes. En cambio, a medida que subimos por la región marcada, se observan células con disminución gradual en la expresión de ABCG2 (a pesar de ser ésta mucho más elevada que la del resto de tipos celulares) por lo que el marcador DCV se retiene en el interior celular en mayor concentración y es por esto que la emisión de fluorescencia para DCV-azul y DCV-rojo aumenta.

Para este tipo de análisis funcionales, es indispensable **preservar la muestra** en condiciones lo más similares posibles a las fisiológicas. De este modo, el tiempo de obtención y análisis debe ser el mínimo posible. En el caso concreto del análisis de la SPop, **no pueden transcurrir más de 3 horas desde la extracción** de la muestra hasta su análisis. Esto complica la logística de este tipo de estudios y es por ello que en el caso concreto de este subestudio, no se pudieron analizar todos los pacientes incluidos en el Protocolo ICO de Discontinuación, sino únicamente las muestras procedentes de nuestro centro (ICO-Badalona).

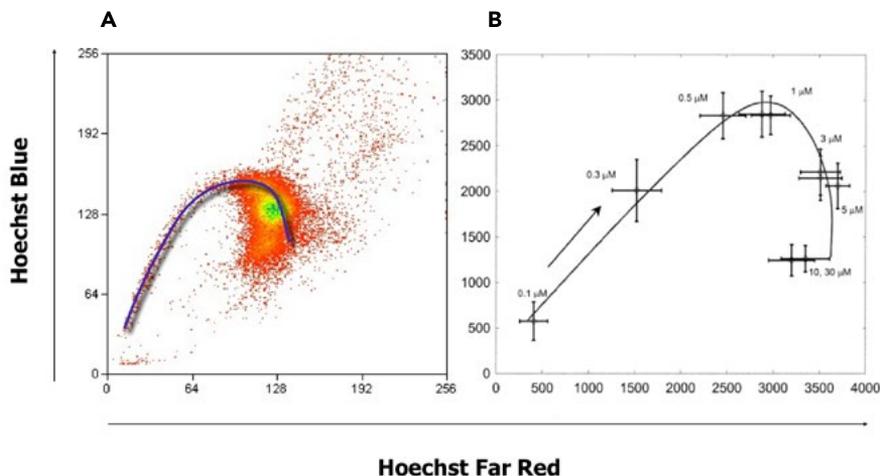


Figura 13. Ejemplo representativo de la imagen obtenida mediante citometría de flujo en el estudio de la SPop. La línea azul corresponde a las células de la SPop (A). Representación esquemática de las diferentes concentraciones intracelulares del compuesto Hoechst 33342 a lo largo de la región de la SPop (B).

Para este proyecto se utilizó el **citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT**: Invitrogen™ Attune™ NxT (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A24858). Además de cuantificar la SPop, se analizó también el inmunofenotipo de estas células utilizando anticuerpos anti-CD34, anti-CD38 y anti-CD26. Para el protocolo detallado de detección de la SPop y análisis de inmunofenotipo, ver el Módulo 4 (página siguiente).

Todos los archivos obtenidos a partir de la adquisición de muestras en el citómetro de flujo se analizaron utilizando el *software* FlowJo versión 10.5.3 (Tree Star, Inc.). Este programa permite determinar el número de eventos adquiridos, el porcentaje de eventos, la concentración de eventos por microlitro de muestra adquirida, intensidad de fluorescencia y desviación estándar robusta de la mediana de la intensidad de la fluorescencia. También permiten realizar las compensaciones electrónicas de los espectros de emisión necesarias pre- y post-adquisición. Se analizaron los archivos seleccionando las células de interés mediante la creación de las regiones apropiadas con la ayuda de los *contour plots*, y una vez delimitadas estas regiones, se pudieron obtener los parámetros mencionados anteriormente.

MÓDULO 4

Protocolo de detección de células de la *Side Population* y análisis del inmunofenotipo mediante citometría de flujo

LISTA DE REACTIVOS utilizados para la detección de la *Side Population*:

Medio cultivo *Side Population*:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose WITH L-Glutamine / WITHOUT Sodium Pyruvate (Cat. n: L0102-500), suplementado con:
2% suero bovino fetal; Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, cat. no. S181B-500)
1 mM Hepes; Hepes 99,5% (Sigma-Aldrich® cat. no. H3375)

Buffer *Side Population*:

Hanks' Balanced Salt Solution (1x) (HBSS), w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific GmbH, cat no. HBSS-2A), suplementado con:
2% suero bovino fetal; Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest, cat. no. S181B-500)
1 mM Hepes; Hepes 99,5% (Sigma-Aldrich® cat. no. H3375)

Solución de lisis con cloruro de amonio (10x):

Agua destilada
1,5 M NH₄Cl; Ammonium Chloride (Sigma-Aldrich® cat. no. A9434)
100 mM NaHCO₃; Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich® cat. no. S5761)
1 mM C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈; EDTA, disodium salt (Calbiochem cat. no. 324503)
Preparada a pH=7,4 (ajustado con 1 N HCl y 1 N NaOH)

Marcadores de ácidos nucleicos:

Vybrant™ DyeCycle™ Violet (DCV) Stain (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat no. V35003)
7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Invitrogen™ Molecular Probes™, cat. no. A1310)

Anticuerpos monoclonales:

Anti-Human PE-CD34, clon 581 (Invitrogen™, cat. no. CD34-581-04)
Anti-Human PE-Cy-5-CD38, clon HIT2 (eBioscience™, cat. no. 15-0389-42)
Anti-Human APC-CD26, clon BA5b (Invitrogen™, cat. no. MA1-10158)

PROCEDIMIENTO

LISIS Y RECUENTO CELULAR:

1. Lisis eritrocitaria: añadir 9 mL de **solución de lisis con cloruro de amonio** por cada 1 mL de la muestra de médula ósea (obtenida en contenedores con heparina-litio).
2. Incubar durante 10 minutos a T^a ambiente.
3. Centrifugar durante 10 minutos a 1500 rpm.
4. Descartar sobrenadante (SN) y resuspender el pellet en 1 mL de HBSS. Microcentrífuga 10 segundos y de nuevo descartar SN.
5. Resuspender el pellet con 1 mL de medio de cultivo *Side Population*.
6. Recuento celular en el citómetro mediante marcaje con 7-AAD.

MARCAJE ESPECÍFICO PARA LA *SIDE POPULATION*:

7. En un falcon de 50 mL, añadir un total de 10×10^6 células en un volumen final de 10 mL de medio de cultivo *Side Population*.
8. Añadir 20 μ l de Vybrant™ DyeCycle™ Violet (DCV) Stain.
9. Incubar la muestra a 37°C en baño húmedo durante 2 horas y bien protegido de la luz. Mover el falcon por inversión 8-10 veces, cada 15 minutos.

ANÁLISIS DE LA *SIDE POPULATION* MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO:

***NOTA IMPORTANTE:** a partir de aquí, se debe trabajar lo más rápido posible, siempre protegiendo la muestra de la luz y evitando que la temperatura sea superior a los 4-5°C.

10. Después de la incubación, centrifugar la muestra durante 10 minutos a 1500 rpm.
11. Descartar el SN y añadir 2 mL de buffer *Side Population*. Mantener en la nevera si no se procede al análisis de inmediato.
12. Analizar 1 mL de la muestra por citometría de flujo.

MARCAJE CON ANTICUERPOS (INMUNOFENOTIPO):

13. En un nuevo eppendorf, añadir 200 μ l de la muestra restante (10^6 células).
14. Añadir 5 μ l de cada uno de los anticuerpos anti-CD34, anti-CD38 y anti-CD26.
15. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.
16. Después de la incubación, añadir 800 μ l de buffer *Side Population* y analizar por citometría de flujo.

2.3. Análisis y cuantificación de las células *Natural Killer* mediante citometría de flujo

El análisis del inmunofenotipo correspondiente a las células NK es un **subestudio prospectivo** que se realizó en el momento de la discontinuación y en el momento de la recaída o tras 6 meses si el paciente mantuvo la RLT (n=15). En aquellos pacientes que redujeron la dosis del ITQ previamente a la discontinuación (estrategia *DESTINY-like*, n=3), este análisis se realizó, además, en el momento de la reducción de dosis. Para este estudio, se incluyeron un total de 10 muestras de SP procedentes de donantes sanos, como controles.

Se utilizó muestra de SP total tanto de los pacientes como de los controles sanos. La muestra se analizó dentro de las 6 primeras horas post-extracción, mediante citometría de flujo multiparamétrica. El protocolo de laboratorio, así como la batería de anticuerpos utilizados, está resumido en el Módulo 5 (página siguiente). La adquisición de los eventos se llevó a cabo en el citómetro de flujo Navios EX (Beckman Coulter, cat. no. B83535) y para el posterior análisis se utilizó el programa *Kaluza analysis software* (Beckman Coulter, cat. no. A84175).

MÓDULO 5

Protocolo de análisis del inmunofenotipo de las células *Natural Killer*

1. En un tubo de polipropileno, se añaden 5µl de cada uno de los anticuerpos monoclonales de superficie (ver Tabla Módulo 5).
2. Añadir 50µl de sangre periférica total a una concentración aproximada de 1000 células/µl.
3. Mezclar todo utilizando vórtex.
4. Incubar la muestra durante 15-20 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.
5. Añadir 250µl de solución de lisis Optilyse C (Beckman Coulter, cat. no. 11894) y agitar con vórtex.
6. Incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.
7. Centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos.
8. Decantar el sobrenadante (SN) y resuspender con 3mL de PBS FACSFLOW (Becton Dickinson, cat. no. BD342003).
9. Centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos.
10. Decantar el sobrenadante (SN) y resuspender con 500µl de PBS FACSFLOW (Becton Dickinson, cat. no. BD342003).
11. Agitar con vórtex y adquirir muestra en el citómetro de flujo (adquisición mínima de 20.000 eventos).

Tabla Módulo 5. Anticuerpos utilizados para el análisis de las células NK.

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Isotipo	Fabricante	Nº catálogo
CD57	FITC	NC1	IgM Ratón	Beckman Coulter	B49188
CD56	PE	N901	IgG1 Ratón	Beckman Coulter	A07788
CD3	ECD	UCHT1	IgG1 Ratón	Beckman Coulter	IM2705U
CD16	PC7	3G8	IgG1 Ratón	Beckman Coulter	6607118
CD2	APC	39C1.5	IgG2a Rata	Beckman Coulter	A07743
CD45	KrO	J33	IgG1 Ratón	Beckman Coulter	B36294

3. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de las **variables clínicas** relacionadas con la RLT se utilizó una metodología similar a la descrita en el Trabajo II. En el análisis descriptivo, las características clínicas y biológicas de la serie se describieron como frecuencias y porcentajes para las variables categóricas y como medianas y extremos para las variables cuantitativas.

La estimación de la RLT se llevó a cabo mediante el método Kaplan-Meier y se definió como el tiempo desde la discontinuación del ITQ hasta la fecha de reintroducción del tratamiento por pérdida de RMM o la fecha de última visita en caso de que el paciente no presentase pérdida de RMM y continuase sin tratamiento. La incidencia de la recaída post-discontinuación se calculó mediante la función de incidencias acumuladas considerando la variable recaída como tiempo-dependiente en una situación con riesgos competitivos. Se consideró como evento principal la pérdida de RMM post-discontinuación y el tiempo desde la suspensión del tratamiento hasta la fecha de la recaída. La muerte estando en como mínimo RMM fue considerada como un evento competitivo; se consideró el tiempo desde la suspensión del tratamiento hasta la fecha de la muerte. El resto de pacientes vivos que no reiniciaron el ITQ en ningún momento fueron considerados como censuras, y el tiempo de estudio fue el tiempo desde la suspensión del ITQ hasta el último control.

El análisis univariado de los factores predictores de recaída molecular post-discontinuación se llevó a cabo mediante el modelo de Fine & Gray para riesgos competitivos.

Se consideró significación estadística si p -valor $< 0,05$. Se utilizó el *software* SPSS versión 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y el *software* R para todos los análisis. Para la elaboración de gráficos y figuras se utilizó el *software* GraphPad Prism 5.

El análisis de los resultados obtenidos en los **subestudios biológicos** se llevó a cabo mediante el test no paramétrico Wilcoxon (en el caso de muestras pareadas), el test Mann-Whitney (para muestras independientes) o el test one-way ANOVA y el método Tukey para comparaciones múltiples entre las variables continuas de los diferentes grupos.

RESULTADOS

TRABAJO I

Detección de SNPs en genes implicados en el metabolismo y transporte de fármacos y relacionados con la respuesta a imatinib

Diseño del estudio

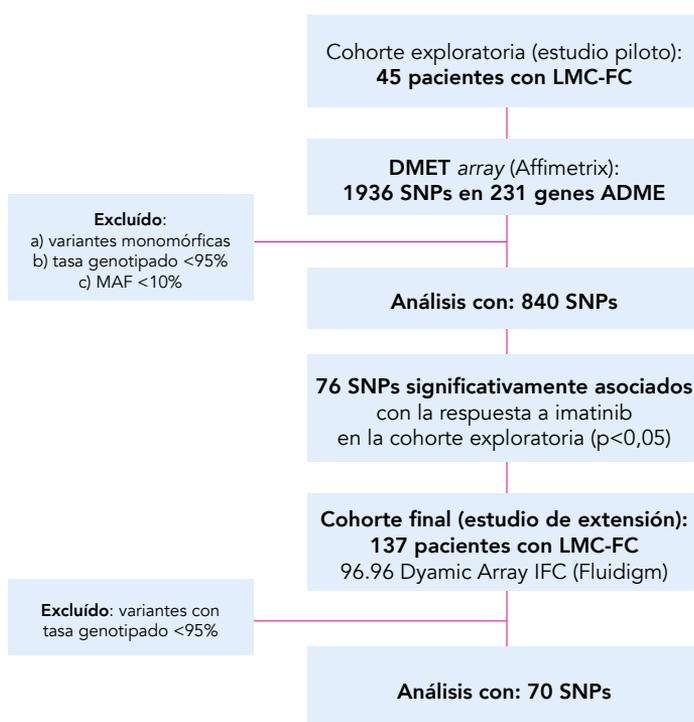


Figura 14. Diagrama de flujo que describe el criterio de selección de los marcadores genéticos. LMC-FC: leucemia mieloide crónica en fase crónica. ADME: absorción, distribución, metabolización y eliminación. MAF: *minor allele frequency*.

1. Estudio piloto

1.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio piloto

En esta primera parte del Trabajo I se seleccionó una cohorte inicial de **45 pacientes** de raza caucásica diagnosticados de LMC entre los años 2005 y 2009, en 3 hospitales catalanes (ICO-Badalona, ICO-Hospitalet, ICO-Girona). La mediana de edad de los pacientes al diagnóstico fue de 52 años (extremos 19-73 años). De los 45 pacientes, 21 (46,7%) eran mujeres y 24 (53,3%) hombres. Todos los pacientes recibieron imatinib en primera línea a dosis de 400 mg/día. Ningún paciente presentó mutaciones en el gen *ABL1* ni ACAs.

La respuesta a imatinib fue evaluada a los 3, 6, y 12 meses, siguiendo las recomendaciones de la ELN 2013.

La clasificación de los pacientes para el estudio de asociación caso-control, se llevó a cabo de la siguiente manera:

- **Casos (no-respondedores)** = pacientes que no obtuvieron la RMM con imatinib a los 12 meses
- **Controles (respondedores)** = pacientes que sí obtuvieron la RMM con imatinib a los 12 meses

Del total de pacientes incluidos en la cohorte inicial, 17 (38%) consiguieron la RMM a los 12 meses de tratamiento (controles), mientras que 28 (62%) no lo lograron (casos).

1.2. Polimorfismos significativos en el análisis de asociación para la cohorte del estudio piloto

En la cohorte exploratoria del estudio piloto (n=45), se estudiaron un total de 1936 SNPs presentes en 231 genes ADME. De los 1936 SNPs genotipados, 840 SNPs pasaron el control de calidad estándar y fueron incluidos en el análisis de asociación caso-control. Del total de SNPs analizados, se seleccionaron únicamente aquellos con un p-valor <0,05. Finalmente, 76 SNPs en 51 genes diferentes fueron seleccionados para su posterior validación en una cohorte independiente con mayor número de pacientes (Tabla 9).

Tabla 9. Polimorfismos significativos del análisis de asociación con la respuesta a imatinib obtenidos en el estudio piloto (cohorte exploratoria) e incluidos en el estudio de extensión.

ID dbSNP	Gen (símbolo)	Gen (nombre)	Clasificación ADME	Consecuencia
rs1134095	CYP11B1	Cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1	Enzima de fase I	Variante 3'UTR
rs11770903	PON3	Paraoxonase 3	Otros	Variante <i>upstream</i>
rs13959	ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1	Enzima de fase II	Variante sinónima
rs2501870	NR1I3	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3	Otros	Variante sinónima
rs3787537	SLCO4A1	Solute carrier organic anion transporter family member 4A1	Transportador	Variante intrónica
rs492338	ABCG1	ATP binding cassette subfamily G member 1	Transportador	Variante intrónica
rs6783962	CHST13	Carbohydrate sulfotransferase 13	Enzima de fase II	Variante intrónica
rs7662029	UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	Enzima de fase II	Variante <i>upstream</i>
rs1062033	CYP19A1	Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1	Enzima de fase I	Variante intrónica
rs10509681	CYP2C8	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8	Enzima de fase I	Variante <i>missense</i>
rs1135840	CYP2D6	Cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6	Enzima de fase I	Variante <i>missense</i>
rs11807	GSTM5	Glutathione S-transferase mu 5	Enzima de fase II	Variante 3'UTR
rs1402467	SULT1C4	Sulfotransferase family 1C member 4	Enzima de fase II	Variante <i>missense</i>
rs2762934	CYP24A1	Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1	Enzima de fase I	Variante 3'UTR
rs4148304	UGT2A1	UDP glucuronosyltransferase family 2 member A2	Enzima de fase II	Variante <i>missense</i>
rs7003319	CYP11B1	Cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1	Enzima de fase I	Variante 3'UTR
rs4925	GSTO1	Glutathione S-transferase omega 1	Enzima de fase II	Variante <i>missense</i>
rs7668258	UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	Enzima de fase II	Variante <i>upstream</i>
rs2274405	ABCC4	ATP binding cassette subfamily C member 4	Transportador	Variante sinónima
rs1138541	SLCO5A1	Solute carrier organic transporter family member 5A1	Transportador	Variante 3'UTR
rs1202283	ABCB4	ATP binding cassette subfamily B member 4	Transportador	Variante sinónima
rs1530031	CHST10	Carbohydrate sulfotransferase 10	Enzima de fase II	Variante 3'UTR
rs2274406	ABCC4	ATP binding cassette subfamily C member 4	Transportador	Variante <i>missense</i>
rs28360521	CYP2D6	Cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6	Enzima de fase I	Variante intrónica
rs4543	CYP11B2	Cytochrome P450 family 11 subfamily B member 2	Enzima de fase I	Variante sinónima
rs4934027	MAT1A	Methionine adenosyltransferase 1A	Otros	Variante intrónica
rs700519	CYP19A1	Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1	Enzima de fase I	Variante <i>missense</i>
rs8050894	VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	Otros	Variante intrónica
rs1065852	CYP2D6	Cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6	Enzima de fase I	Variante <i>missense</i>
rs11568591	ABCC3	ATP binding cassette subfamily C member 3	Transportador	Variante <i>missense</i>
rs1229984	ADH1B	Alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	Enzima de fase II	Variante <i>missense</i>
rs1604741	SULT1B1	Sulfotransferase family 1B member 1	Enzima de fase II	Variante intrónica
rs2276299	SLC22A8	Solute carrier family 22 member 8	Transportador	Variante sinónima
rs2884737	VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	Otros	Variante intrónica
rs495714	ABCB11	ATP binding cassette subfamily B member 11	Transportador	Variante intrónica
rs2242046	SLC28A1	Solute carrier family 28 member 1	Transportador	Variante <i>missense</i>
rs1395	SLC5A6	Solute carrier family 5 member 6	Transportador	Variante <i>missense</i>
rs11764079	PON3	Paraoxonase 3	Otros	Variante <i>upstream</i>

Tabla 9 (continuación). Polimorfismos significativos del análisis de asociación con la respuesta a imatinib obtenidos en el estudio piloto (cohorte exploratoria) e incluidos en el estudio de extensión.

ID dbSNP	Gen (símbolo)	Gen (nombre)	Clasificación ADME	Consecuencia
rs743616	ARSA	Arylsulfatase A	Otros	Variante intrónica
rs742350	FMO1	Flavin containing dimethylaniline monooxygenase 1	Enzima de fase II	Variante sinónima
rs8192879	CYP7A1	Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1	Enzima de fase I	Variante 3'UTR
rs3100	UGT2B15	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B15	Enzima de fase II	Variante 3'UTR
rs2292334	SLC22A3	Solute carrier family 22 member 3	Transportador	Variante sinónima
rs17685	POR	Cytochrome p450 oxidoreductase	Otros	Variante 3'UTR
rs12960	SPG7	SPG7 matrix AAA peptidase subunit, paraplegin	Otros	Variante <i>missense</i>
rs11572080	CYP2C8	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8	Enzima de fase I	Variante <i>missense</i>
rs1080983	CYP2D6	Cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6	Enzima de fase I	Variante <i>upstream</i>
rs628031	SLC22A1	Solute carrier family 22 member 1	Transportador	Variante <i>missense</i>
rs496550	ABCB11	ATP binding cassette subfamily B member 11	Transportador	Variante 3'UTR
rs895729	CHST1	Carbohydrate sulfotransferase 1	Enzima de fase II	Variante intrónica
rs4646	CYP19A1	Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1	Enzima de fase I	Variante 3'UTR
rs316019	SLC22A2	Solute carrier family 22 member 2	Transportador	Variante <i>missense</i>
rs2297322	SLC15A1	Solute carrier family 15 member 1	Transportador	Variante <i>missense</i>
rs1801246	ATP7B	ATPase copper transporting beta	Transportador	Variante sinónima
rs1296954	GSTM5	Glutathione S-transferase mu 5	Enzima de fase II	Variante 5'UTR
rs11584174	NR1I3	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3	Otros	Variante sinónima
rs1080985	CYP2D6	Cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6	Enzima de fase I	Variante <i>upstream</i>
rs13226149	PON3	Paraoxonase 3	Otros	Variante sinónima
rs9934438	VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	Otros	Variante intrónica
rs7438284	UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	Enzima de fase II	Variante sinónima
rs497692	ABCB11	ATP binding cassette subfamily B member 11	Transportador	Variante sinónima
rs4679028	SLC22A14	Solute carrier family 22 member 14	Transportador	Variante intrónica
rs324420	FAAH	Fatty acid amide hydrolase	Otros	Variante <i>missense</i>
rs2359612	VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	Otros	Variante intrónica
rs212090	ABCC1	ATP binding cassette subfamily C member 1	Transportador	Variante 3'UTR
rs11731028	SULT1B1	Sulfotransferase family 1B member 1	Enzima de fase II	Variante intrónica
rs1109407	SLCO2B1	Solute carrier organic transporter family member 2B1	Transportador	Variante sinónima
rs2242416	SLC22A7	Solute carrier family 22 member 7	Transportador	Variante <i>downstream</i>
rs7439366	UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7	Enzima de fase II	Variante <i>missense</i>
rs5303	CYP11B1	Cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1	Enzima de fase I	Variante 3'UTR
rs4683739	CHST2	Carbohydrate sulfotransferase 2	Enzima de fase II	Variante <i>upstream</i>
rs3775770	SULT1E1	Sulfotransferase family 1E member 1	Enzima de fase II	Variante intrónica
rs2479390	GSTM5	Glutathione S-transferase mu 5	Enzima de fase II	Variante intrónica
rs1126692	FMO1	Flavin containing dimethylaniline monooxygenase 1	Enzima de fase II	Variante sinónima
rs750398	CHST1	Carbohydrate sulfotransferase 1	Enzima de fase II	Variante sinónima
rs4736312	CYP11B1	Cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1	Enzima de fase I	Variante 3'UTR

2. Estudio de extensión para el análisis de la asociación entre SNPs en genes ADME y la respuesta al tratamiento con imatinib

2.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio de extensión

Los SNPs significativamente asociados con la respuesta a imatinib en el estudio piloto se estudiaron en un total de **137 pacientes** de raza caucásica, procedentes de 6 hospitales (ICO-Badalona, ICO-Hospitalet, ICO-Girona, ICO-Tarragona, Hospital de Granollers y Hospital Morales Meseguer de Murcia), diagnosticados entre los años 2000 y 2015.

Los principales **criterios de inclusión** fueron: 1) duración del tratamiento igual o superior a los 6 meses, para poder evaluar la respuesta, 2) ausencia de disminución de dosis por toxicidad, 3) buena adherencia al tratamiento y 4) ausencia de mutaciones en el gen *ABL1* y/o ausencia de ACA.

Las principales características demográficas, clínicas y parámetros hematológicos están resumidos en la Tabla 10. La mediana de edad de los pacientes al diagnóstico fue de 52 años (extremos 23-86 años). De los 137 pacientes, 57 (42%) eran mujeres y 80 (58%) hombres. Todos los pacientes fueron diagnosticados en FC de la enfermedad y recibieron imatinib en primera línea a dosis de 400 mg/día, durante una mediana de 78 meses (extremos 6-208 meses). La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 9,5 años (extremos 1,2 - 18,8 años). El 48% de los pacientes con Sokal evaluable eran de bajo riesgo, el 37% de riesgo intermedio y el 15% de riesgo alto. Respecto al índice ELTS, de los pacientes evaluables, el 63% fueron de bajo riesgo, el 27% de riesgo intermedio y el 10% de riesgo alto. Quince pacientes (11%) fallecieron durante el periodo de seguimiento.

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio de extensión.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	Serie Total
	n=137
Mediana de edad al diagnóstico, años (extremos)	52 (23-86)
Sexo	
Femenino, n (%)	57 (42)
Masculino, n (%)	80 (58)
Sokal, n (%)	
Bajo	61/127 (48)
Intermedio	47/127 (37)
Alto	19/127 (15)
ELTS, n (%)	
Bajo	53/84 (63)
Intermedio	23/84 (27)
Alto	8/84 (10)
Duración tratamiento imatinib, meses (extremos)	78 (6-208)
Mediana de seguimiento, años (extremos)	9,5 (1,2-18,8)
Exitus, n (%)	15 (11)

La **clasificación** de los pacientes en casos y controles, se realizó aplicando los siguientes criterios:

- **Casos (no-respondedores):** pacientes que presentaron **fracaso al tratamiento con imatinib** teniendo en cuenta las recomendaciones de la ELN del 2013 (ver la definición de fracaso en el recuadro **rojo** de la Tabla 4, apartado Introducción, página 45) y que motivó **un cambio de ITQ o a un aumento de dosis**.
- **Controles (respondedores):** pacientes con **respuesta óptima** (ver recuadro **verde** de la Tabla 4, apartado Introducción, página 45) a imatinib. Los pacientes con criterios de alarma (misma tabla, recuadro **amarillo**) fueron incluidos en el grupo de respondedores si el clínico no realizó **ningún cambio de ITQ ni un aumento de dosis de imatinib**. Todos los pacientes incluidos en este grupo **consiguieron la RMM**.

Un total de 37 (27%) pacientes fueron considerados como casos (no-respondedores) mientras que 100 (73%) pacientes fueron considerados como controles (respondedores).

2.2. Análisis de asociación de los polimorfismos con la respuesta a imatinib para toda la cohorte de pacientes del estudio principal

Previo al análisis de asociación, se realizó el control de calidad estándar de los 76 SNPs genotipados. Seis de los SNPs (rs743616, rs11770903, rs2884737, rs17685, rs12960, rs13226149) fueron eliminados del análisis por tener una tasa de genotipado inferior al 95%. Finalmente, el análisis de asociación se llevó a cabo con 70 SNPs, mediante el paquete *SNPassoc* del *software* R, donde se evaluó la influencia de los 70 SNPs seleccionados en la respuesta a imatinib.

Tabla 11. SNPs estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en el análisis de asociación caso-control para toda la cohorte de pacientes del estudio de extensión. Para cada SNP, se muestra el mejor modelo de herencia, los genotipos asociados y las frecuencias genotípicas para cada grupo de pacientes (casos vs. controles).

Gen	dbSNP ID	Mejor modelo de herencia ^a	Genotipo	N casos ^b (%) / N controles ^c (%)	OR (IC95%)	p
ABCG1	rs492338	Log-aditivo	0: T/T 1: C/T 2: C/C	16 (39) / 25 (61) 16 (27) / 43 (73) 5 (15) / 28 (85)	0,54 (0,31 - 0,92)	0,021
ABCB11	rs496550	Log-aditivo	0: G/G 1: A/G 2: A/A	15 (38) / 24 (62) 19 (26) / 55 (74) 3 (13) / 20 (87)	0,51 (0,28 - 0,94)	0,027
ABCB11	rs497692	Log-aditivo	0: G/G 1: A/G 2: A/A	15 (38) / 25 (62) 18 (25) / 53 (75) 3 (13) / 21 (87)	0,51 (0,28 - 0,94)	0,027
CYP2D6	rs1135840 ^d	Log-aditivo	0: C/C 1: C/G 2: G/G	12 (22) / 43 (78) 12 (24) / 39 (76) 13 (46) / 15 (54)	1,70 (1,03 - 2,82)	0,037
CYP11B1	rs7003319	Dominante	C/C A/C - A/A	11 (19) / 48 (81) 26 (34) / 51 (66)	2,32 (1,02 - 5,25)	0,038
MAT1A	rs4934027	Dominante	C/C C/T - T/T	31 (36) / 55(64) 6 (12) / 43 (88)	0,25 (0,1 - 0,65)	0,002
SLC22A1	rs628031	Recesivo	G/G - A/G A/A	30 (24) / 94 (76) 7 (58) / 5 (42)	4,52 (1,33 - 15,43)	0,015

a: según el criterio de información de Akaike (AIC)

b: no-respondedores a imatinib

c: respondedores a imatinib

d: este SNP no cumple el HWE ($p < 0,05$) pero resulta relevante en el contexto de la LMC

En la Tabla 11 se muestran los polimorfismos estadísticamente significativos ($p < 0,05$) obtenidos en el análisis de asociación con la respuesta a imatinib.

Para el polimorfismo rs492338 localizado en el gen del transportador ABCG1, se encontró una correlación estadísticamente significativa con la respuesta a imatinib bajo el modelo de herencia aditivo: el 73% y el 85% de los pacientes con genotipos C/T y C/C, respectivamente, obtuvieron la RMM frente al 61% de los pacientes con genotipo T/T (OR [IC95%]: 0,54 [0,31 - 0,92], $p = 0,021$).

Dos polimorfismos en otro miembro de la familia de genes del transportador ABC, el gen *ABCB11*, mostraron una asociación con la obtención de la RMM con imatinib bajo el modelo de herencia aditivo: el hecho de ser portador de 1 o 2 copias del alelo A (el de menor frecuencia) para los SNPs rs496550 y rs497692, parece predisponer a una mayor tasa de obtención de la RMM, ya que del total de pacientes con genotipo A/A para ambos SNPs, el 87% logró la RMM. Se observaron datos similares en los pacientes con genotipo heterocigoto (A/G), ya que el 74-75% de estos consiguieron la RMM, mientras que únicamente el 62% de los pacientes con genotipo G/G lograron esta respuesta (OR [IC95%]: 0,51 [0,28 - 0,94], $p=0,027$). Para ambos SNPs, se observó que las frecuencias genotípicas entre casos y controles fueron prácticamente iguales, lo que nos llevó a sospechar una posible herencia conjunta (estudiado con detalle en el apartado 2.6, página 117).

Dos polimorfismos en distintos genes de la familia del citocromo P450 se asociaron significativamente con la respuesta a imatinib: por un lado, para el polimorfismo rs1135840, ubicado en el gen *CYP2D6*, se observó que el 46% de los pacientes portadores de 2 copias del alelo G presentó fracaso a imatinib (OR [IC95%]: 1,7 [1,03 - 2,82], $p=0,037$, modelo de herencia aditivo). Este SNP no cumplió el HWE en nuestra cohorte de pacientes pero se incluyó en los resultados finales por su posible relevancia en la LMC. Este hecho se discute con mayor detalle en el apartado de Discusión (página 171). Por otro lado, para el polimorfismo rs7003319 del gen *CYP11B1*, los pacientes portadores de los genotipos A/C y A/A presentaron menores tasas de respuesta que los pacientes con genotipo C/C (66% vs. 81%, respectivamente; OR [IC95%]: 2,32 [1,02 - 5,25], $p=0,038$, modelo de herencia dominante).

Para el polimorfismo rs4934027, ubicado en el gen *MAT1A*, se observó una asociación con la respuesta a imatinib bajo el modelo de herencia dominante, ya que el 88% de los pacientes portadores de los genotipos C/T y T/T obtuvieron la RMM frente al 64% de los pacientes con genotipo C/C (OR [IC95%]: 0,25 [0,1 - 0,65], $p=0,002$).

Finalmente, para el polimorfismo rs628031 localizado en el gen del transportador *SLC22A1*, pacientes con ambas copias del alelo A presentaron un mayor riesgo de fracaso al tratamiento con imatinib, ya que únicamente el 42% de los pacientes con el genotipo A/A consiguieron la RMM, a diferencia del 76% de los pacientes con genotipos G/G y A/G, que sí la consiguieron (OR [IC95%]: 4,52 [1,33 - 15,43], $p=0,015$, modelo recesivo).

2.3. Análisis de asociación mediante validación cruzada

Con el objetivo de añadir mayor potencia estadística al estudio, se realizó un análisis mediante validación cruzada. En este análisis, el estudio de la asociación entre los polimorfismos y la respuesta a imatinib se realizó un total de 5 veces (análisis A, B, C, D y E), dividiendo la cohorte de manera aleatoria en 5 grupos de igual tamaño (27-28 pacientes por grupo), y siempre dejando fuera un grupo diferente en cada análisis. De esta manera, los 5 análisis se realizaron con un total de 110-111 pacientes con LMC, de los cuales 29-30 (26-27%) fueron considerados como no-respondedores (casos).

La Tabla 12 muestra los SNPs significativos ($p < 0,05$) y relacionados con la respuesta a imatinib obtenidos en cada uno de los 5 análisis de asociación (A, B, C, D y E).

Todos los SNPs estadísticamente significativos que se obtuvieron en el análisis de la cohorte conjunta (apartado 2.2) fueron también significativos en alguno de los grupos establecidos de manera aleatoria en el análisis mediante validación cruzada. El polimorfismo rs4934027 del gen *MAT1A* fue el único significativo en todos los grupos del análisis de validación. El modelo de herencia de mayor relevancia en todos los grupos fue el dominante, igual que lo observado en el análisis con la cohorte total. De este modo, los pacientes portadores de los genotipos C/T y T/T presentaron una mayor tasa de RMM con imatinib.

En 3 de los 5 grupos de análisis se obtuvieron SNPs significativos dentro de los genes de la familia de la enzima citocromo P450: el rs7003319 del gen *CYP11B1* (grupo B) y el rs1135840 del gen *CYP2D6* (grupos C y D). Ambos polimorfismos se asociaron con un mayor riesgo de fracaso al tratamiento con imatinib, de la misma manera que en el estudio de asociación de la cohorte total (apartado 2.2).

Cuatro SNPs en dos genes diferentes de la familia de transportadores ABC fueron significativos; el rs492338, en el gen *ABCG1*, fue significativo en 3 de los 5 grupos, observándose una mayor tasa de RMM en aquellos pacientes portadores de una o dos copias del alelo recesivo C (modelo aditivo). También los polimorfismos rs496550 y rs497692 del gen *ABCB11*, significativos en 2 de los 5 grupos, favorecían la obtención de la RMM en el modelo aditivo. Por último, el rs495714 del mismo gen *ABCB11* fue significativo en uno de los grupos, a pesar de que no fue significativo en el estudio de asociación de toda la cohorte (apartado 2.2).

Finalmente, el polimorfismo rs628031 del gen *SLC22A1* fue significativo en dos de los 5 grupos, por el que los portadores de una o dos copias del alelo A obtuvieron menores tasas de RMM.

Tabla 12. Resultados del análisis de validación cruzada para la asociación de SNPs relacionados con genes ADME y la respuesta al tratamiento con imatinib.

Grupo ^a	Gen	dbSNP ID	Mejor modelo de herencia ^b	Genotipo	N casos ^c (%) / N controles ^d (%)	OR (IC95%)	p
A	MAT1A	rs4934027	Dominante	C/C C/T - T/T	26 (36) / 46 (64) 3 (8) / 34 (92)	0,16 (0,04 - 0,56)	0,001
B	CYP11B1	rs7003319	Dominante	C/C C/A - A/A	6 (13) / 39 (87) 24 (36) / 42 (64)	3,71 (1,37 - 10)	0,006
B	MAT1A	rs4934027	Dominante	C/C C/T - T/T	24 (36) / 43 (64) 6 (14) / 37 (86)	0,29 (0,11 - 0,79)	0,009
C	ABCG1	rs492338	Log-aditivo	0: T/T 1: C/T 2: C/C	13 (38) / 21 (62) 12 (27) / 33 (73) 4 (15) / 23 (85)	0,54 (0,3 - 0,99)	0,039
C	CYP2D6	rs1135840	Log-aditivo	0: C/C 1: C/G 2: G/G	8 (19) / 33 (81) 9 (21) / 33 (79) 12 (52) / 11 (48)	2,11 (1,18 - 3,79)	0,010
C	MAT1A	rs4934027	Dominante	C/C C/T - T/T	26 (35) / 48 (65) 3 (9) / 30 (91)	0,18 (0,05 - 0,66)	0,003
C	ABCB11	rs495714	Log-aditivo	0: A/A 1: A/G 2: G/G	13 (43) / 17 (57) 14 (24) / 45 (76) 2 (10) / 19 (90)	0,38 (0,19 - 0,77)	0,005
C	SLC22A1	rs628031	Log-aditivo	0: G/G 1: A/G 2: A/A	9 (21) / 34 (79) 14 (25) / 42 (75) 6 (67) / 3 (33)	2,14 (1,05 - 4,35)	0,032
C	ABCB11	rs496550	Log-aditivo	0: G/G 1: G/A 2: A/A	13 (43) / 17 (57) 15 (25) / 46 (75) 1 (6) / 16 (94)	0,35 (0,17 - 0,74)	0,004
C	ABCB11	rs497692	Log-aditivo	0:G/G 1: G/A 2: A/A	13 (42) / 18 (58) 15 (25) / 44 (75) 1 (6) / 17 (94)	0,37 (0,18 - 0,76)	0,004
D	ABCG1	rs492338	Log-aditivo	0: T/T 1: C/T 2: C/C	13 (38) / 21 (62) 14 (29) / 35 (71) 3 (13) / 20 (87)	0,53 (0,28 - 0,98)	0,038
D	CYP2D6	rs1135840 ^e	Log-aditivo	0: C/C 1: C/G 2: G/G	10 (21) / 37 (79) 9 (23) / 30 (77) 11 (50) / 11 (50)	1,86 (1,07 - 3,25)	0,026
D	MAT1A	rs4934027	Dominante	C/C C/T - T/T	24 (37) / 40 (63) 6 (14) / 37 (86)	0,27 (0,1 - 0,73)	0,006
D	ABCB11	rs496550	Log-aditivo	0: G/G 1: A/G 2: A/A	12 (38) / 20 (62) 16 (28) / 41 (72) 2 (11) / 17 (89)	0,51 (0,26 - 0,99)	0,04
D	ABCB11	rs497692	Log-aditivo	0: G/G 1: A/G 2: A/A	12 (36) / 21 (64) 15 (28) / 39 (72) 2 (10) / 18 (90)	0,51 (0,26 - 0,99)	0,04
E	ABCG1	rs492338	Log-aditivo	0: T/T 1: C/T 2: C/C	14 (48) / 15 (52) 13 (27) / 36 (73) 3 (11) / 24 (89)	0,37 (0,19 - 0,71)	0,002
E	MAT1A	rs4934027	Dominant	C/C C/T - T/T	24 (36) / 43 (64) 6 (15) / 34 (85)	0,32 (0,12 - 0,86)	0,017
E	SLC22A1	rs628031	Log-aditivo	0: G/G 1: A/G 2: A/A	8 (18) / 37 (82) 16 (30) / 37 (70) 6 (60) / 4 (40)	2,44 (1,22 - 4,88)	0,009

a: grupo asignado aleatoriamente para el análisis de validación cruzada

b: según el criterio de información de Akaike (AIC)

c: no-respondedores (ausencia de RMM)

d: respondedores (presencia de RMM)

e: para el grupo D, el SNP rs1135840 no cumple el HWE ($p < 0,05$) pero resulta relevante en el contexto de la LMC

2.4. Análisis de asociación mediante test por permutaciones

En estudios de asociación caso-control en los que se incluyen diversos marcadores genéticos, como es el caso del presente trabajo, es importante tener en cuenta los problemas derivados de las comparaciones múltiples y los errores (error Tipo I o también llamado tasa de falsos positivos) que se arrastran a lo largo del proceso metodológico. Por este motivo, es de gran relevancia incluir un test que permita determinar de manera precisa la significancia de los resultados obtenidos. Existen varios enfoques para ello, como sería el test de Bonferroni o el test de Sidak. Aunque estos dos tests son una manera sencilla para contrastar el problema de las comparaciones múltiples, existe otra metodología considerada como *gold-standard*: el test por permutaciones [165]. Éste consiste en asignar de manera aleatoria las categorías "casos" y "controles" a los diferentes individuos (pacientes) en cada una de las iteraciones. De esta manera, dependiendo del número de iteraciones establecido, se realizarán tantos test de asociación como combinaciones posibles. La limitación principal de este tipo de test es que requiere de una elevada capacidad computacional, sobretodo si se realizan estudios del genoma completo. En nuestro caso, dado el número de SNPs y el tamaño de la muestra, el test por permutaciones fue el escogido finalmente para contrastar el problema de comparaciones múltiples.

La Tabla 13 muestra un total de 9 SNPs estadísticamente significativos en este test junto con el modelo de herencia de mayor relevancia. El test de permutación se realizó con un total de 10.000 iteraciones. Todos los SNPs obtenidos coincidieron con los observados en los dos análisis anteriores (apartado 2.2 y 2.3) excepto dos nuevos SNPs, el rs4148304 del gen *UGT2A1* y el rs1065852 del gen *CYP2D6*.

Tabla 13. Resultado del análisis de asociación por permutaciones (10.000 iteraciones) en el estudio de la respuesta a imatinib. Se indican los modelos de herencia con p-valor significativo en el análisis ($p < 0,05$).

Gen	dbSNP ID	Modelo de herencia	p-valor
ABCG1	rs492338	Log-aditivo	0,023
CYP2D6	rs1135840	Log-aditivo Recesivo	0,032 0,016
UGT2A1	rs4148304	Recesivo	0,012
CYP11B1	rs7003319	Dominante	0,047
MAT1A	rs4934027	Log-aditivo Dominante	0,003 0,002
CYP2D6	rs1065852	Recesivo	0,003
SLC22A1	rs628031	Recesivo	0,017
ABCB11	rs496550	Log-aditivo	0,027
ABCB11	rs497692	Log-aditivo	0,027

2.5. Incidencias acumuladas de RMM para los SNPs estadísticamente significativos

A pesar de no ser el objetivo principal de este estudio, se evaluó cómo se comportan los SNP estadísticamente significativos obtenidos en los apartados anteriores cuando se estudia la variable RMM como tiempo-dependiente. Para ello, se realizó un análisis de las incidencias acumuladas de RMM. En este análisis, 6 pacientes fueron excluidos por no disponer de la fecha de obtención de la RMM. En la Tabla 14 se muestran los intervalos de confianza (IC95%) de las incidencias acumuladas de RMM para cada uno de los SNPs y el p-valor correspondiente. Por otro lado, la Figura 15 muestra las curvas de incidencia únicamente para los SNPs que mostraron una asociación estadísticamente significativa al estudiar la RMM incluyendo la variable tiempo. En aquellos casos en los que el modelo de herencia significativo es el dominante o el recesivo, se muestran las curvas y IC95% tanto para los tres genotipos del SNP como para los genotipos reagrupados.

Tabla 14. Incidencias acumuladas (mediana) e intervalo de confianza (IC95%) para la obtención de RMM en cada uno de los SNPs. Se indica el p-valor para cada caso.

Gen	dbSNP ID	Genotipo	Indicencia acumulada (mediana [IC95%])	p-valor
ABCG1	rs492338	T/T C/T C/C	58% [42% - 71%] 73% [62% - 81%] 83% [65% - 93%]	0,046
ABCB11	rs496550	G/G A/G A/A	62% [47% - 74%] 73% [61% - 81%] 86% [73% - 94%]	0,338
ABCB11	rs497692	G/G A/G A/A	62% [47% - 74%] 73% [61% - 81%] 86% [86% - 86%]	0,362
ABCB11	rs495714	G/G A/G A/A	81% [67% - 89%] 74% [63% - 83%] 62% [47% - 74%]	0,344
CYP2D6	rs1135840	C/C C/G G/G	77% [65% - 85%] 75% [61% - 85%] 52% [34% - 67%]	0,148
CYP11B1	rs7003319	C/C A/C A/A	81% [69% - 88%] 66% [54% - 76%] 60% [42% - 74%]	0,179
CYP11B1	rs7003319 (dominante)	C/C A/C + A/A	81% [69% - 88%] 64% [54% - 73%]	0,069
MAT1A	rs4934027	C/C C/T T/T	62% [52% - 70%] 86% [72% - 93%] 100% [100% - 100%]	0,011
MAT1A	rs4934027 (dominante)	C/C C/T + T/T	62% [52% - 70%] 88% [75% - 94%]	0,011
SLC22A1	rs628031	G/G A/G A/A	76% [64% - 85%] 73% [61% - 82%] 36% [11% - 63%]	0,119
SLC22A1	rs628031 (recesivo)	G/G + A/G A/A	75% [67% - 81%] 36% [11% - 63%]	0,043
CYP2D6	rs1065852	C/C C/T T/T	69% [59% - 77%] 68% [52% - 80%] 100% [100% - 100%]	0,047
CYP2D6	rs1065852 (recesivo)	C/C + C/T T/T	69% [60% - 76%] 100% [100% - 100%]	0,014
UGT2A1	rs4148304	G/G A/G A/A	72% [62% - 79%] 80% [69% - 88%] 20% [20% - 20%]	0,209
UGT2A1	rs4148304 (recesivo)	G/G + A/G A/A	74% [66% - 80%] 20% [20% - 20%]	0,124

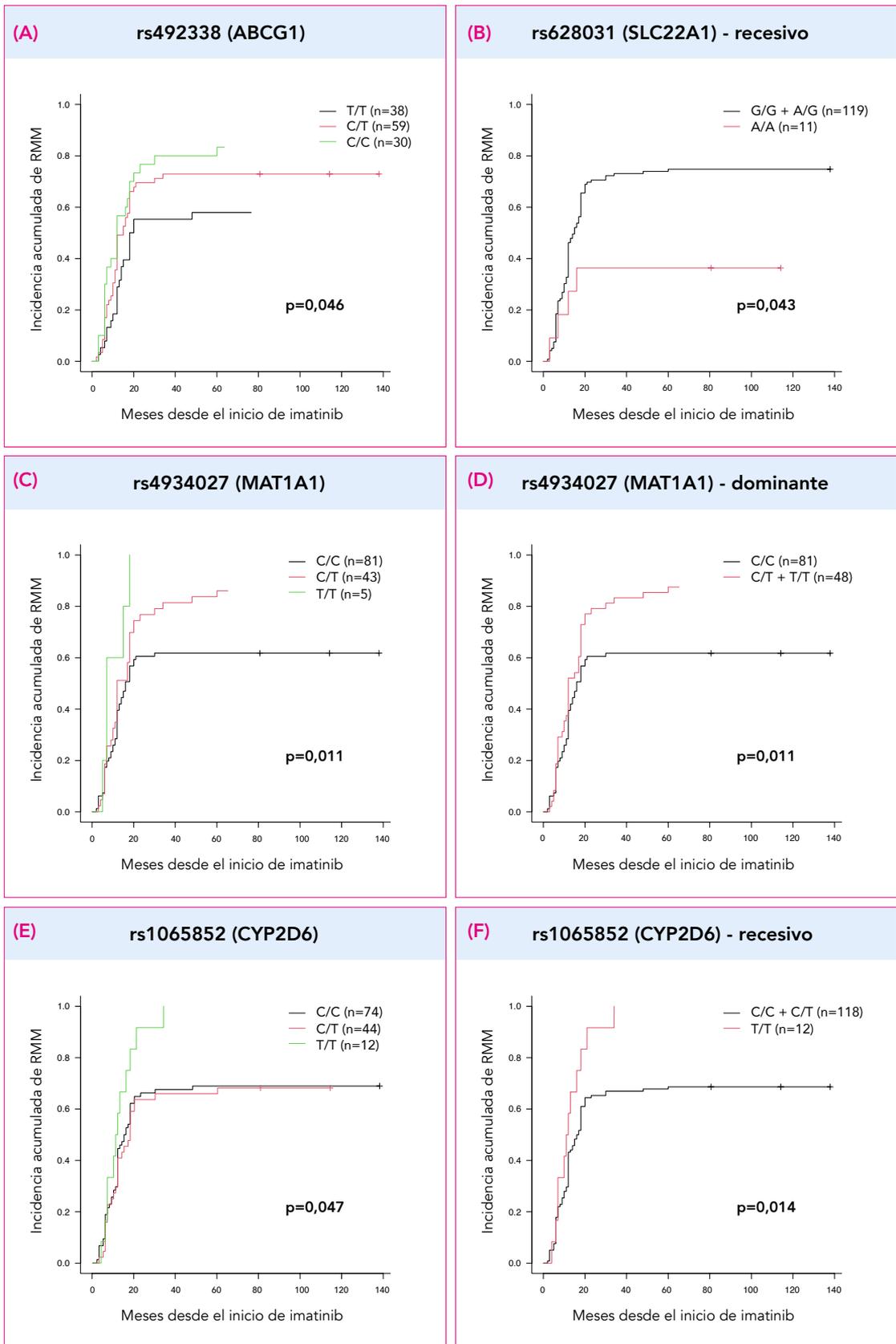


Figura 15. Representación gráfica (curvas Kaplan-Meier) de las incidencias acumuladas de RMM para los SNPs con p-valor significativo.

El SNP rs492338 del gen *ABCG1* presentó una asociación estadísticamente significativa con la incidencia acumulada de RMM al añadir la variable tiempo, ya que la mediana de incidencia de RMM en los pacientes portadores del genotipo T/T fue del 58% frente al 73% y 83% en los pacientes con genotipos C/T y C/C, respectivamente (Figura 15-A).

El SNP rs628031 del gen *SLC22A1* únicamente mostró una asociación significativa con la incidencia acumulada de RMM bajo el modelo de herencia recesivo (Figura 15-B). Es importante destacar que el IC95% para el genotipo A/A es bastante amplio (11%-63%) y en este grupo únicamente se incluyen 11 pacientes. Aún así, las curvas evidencian una clara ventaja de los genotipos G/G y A/G a la hora de conseguir la RMM con imatinib.

En el caso del SNP rs4934027 del gen *MAT1A*, las incidencias acumuladas de RMM mostraron significación estadística tanto para el modelo dominante, como para los tres genotipos analizados por separado (Figura 15-C y D). Esto es así porque el grupo de pacientes con genotipo T/T tuvo una incidencia acumulada de RMM del 100%. Cabe destacar, no obstante, que solamente 5 pacientes presentaban este genotipo. Los grupos quedaron mejor equilibrados al estudiar este SNP bajo el modelo de herencia dominante.

Finalmente, el SNP rs1065852 del gen *CYP2D6* mostró una asociación significativa tanto para el modelo de herencia recesivo como para los tres genotipos analizados por separado, igual que en el caso anterior (Figura 15-E y F). Se observa una clara ventaja en la obtención de la RMM para los pacientes portadores del genotipo T/T, ya que todos consiguieron la RMM.

2.6. Análisis e identificación de haplotipos

Un haplotipo se define como un conjunto de variaciones en el ADN (como los SNPs) que son adyacentes entre ellas y que se suelen heredar de manera conjunta. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento, que suele deberse a que los dos *loci* implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria con la separación de los cromosomas en anafase.

El análisis de haplotipos resulta de gran interés en estudios de asociación para enfermedades. Mediante la herramienta Haploview [156] se identificaron un total de diez bloques de haplotipos (Figura 16).



Figura 16. Gráfico de disequilibrio de ligamiento. Se muestran los 10 bloques de haplotipos identificados en el conjunto de los SNPs analizados mediante la herramienta Haploview. El orden de los SNPs se define de acuerdo con su localización cromosómica.

Posteriormente, se utilizó la librería *haplo.stats* implementada dentro del paquete *SNPassoc*, para la realización del análisis de asociación de todos los bloques de haplotipos con la respuesta a imatinib, mediante regresión logística. Únicamente el bloque 9 (Figura 16-D), localizado en el cromosoma 2, se asoció de manera significativa con la obtención de la RMM con imatinib. Este bloque está formado por los polimorfismos rs496550, rs495714, rs497692 del gen *ABCB11*. Concretamente, los portadores del haplotipo *ABCB11*-AGA, presente en el 45% de la población de estudio, tenían un menor riesgo de fracaso en la obtención de la RMM con imatinib (OR [IC95%]: 0,51 [0,28-0,93], $p=0,027$).

2.7. Resumen de los principales hallazgos

A modo de resumen, en la Tabla 15 se muestran los SNPs estadísticamente significativos en los diferentes análisis realizados en este trabajo. Se especifica la función del gen así como el tipo de análisis para el que se ha encontrado significación.

Tabla 15. Listado de los SNPs estadísticamente significativos en los diferentes análisis realizados.

Gen	dbSNP ID	Clasificación ADME	Análisis asociación cohorte total	Cross-analysis	Test Permutaciones	Haplotipos
<i>ABCG1</i>	rs492338	Transportador	X	X	X	
<i>ABCB11</i>	rs496550	Transportador	X	X	X	X
<i>ABCB11</i>	rs497692	Transportador	X	X	X	X
<i>ABCB11</i>	rs495714	Transportador		X		X
<i>CYP2D6</i>	rs1135840	Enzima Fase I	X	X	X	
<i>CYP2D6</i>	rs1065852	Enzima Fase I			X	
<i>CYP11B1</i>	rs7003319	Enzima Fase I	X	X	X	
<i>MAT1A</i>	rs4934027	Otros	X	X	X	
<i>SLC22A1</i>	rs628031	Transportador	X	X	X	
<i>UGT2A1</i>	rs4148304	Enzima Fase II			X	

ADME: absorción, distribución, metabolismo y eliminación.

TRABAJO II

Influencia de la longitud de los telómeros al diagnóstico de la LMC en la obtención de la respuesta molecular profunda con imatinib

1. Característica clínicas y biológicas de los pacientes incluidos en el estudio

En este estudio se incluyeron un total de **96 pacientes**. Todos los pacientes fueron diagnosticados de LMC en FC entre los años 2004 y 2016 en el ICO-Badalona, el ICO-Hospitalet y el ICO-Girona. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 16.

La mediana de edad de los pacientes en el momento del diagnóstico fue de 49 años (extremos 24-80 años). De los 96 pacientes, 56 (58%) eran hombres y 40 (42%) eran mujeres. Según el índice Sokal, 46 (50%) pacientes fueron de bajo riesgo, 30 (32%) de riesgo intermedio y 17 (18%) de riesgo alto. Respecto al índice de riesgo EUTOS, 77 (88%) y 11 (12%) de los pacientes fueron de bajo y alto riesgo, respectivamente. Finalmente, de acuerdo con el índice ELTS, 50 (59%) pacientes fueron de bajo riesgo, 24 (29%) de riesgo intermedio y 10 (12%) de alto riesgo.

El 39% de los pacientes presentaba la isoforma e13a2 del transcrito p210 de BCR-ABL1 mientras que el 61% restante presentaba la isoforma e14a2.

La mediana de seguimiento de los pacientes vivos fue de 7,3 años (extremos 1,3 - 14,6 años) y la mediana de duración del tratamiento con imatinib fue de 3,4 años (extremos 0,3 - 14,4 años). Un total de 10 pacientes (10,4%) fallecieron.

En primer lugar, se analizó la tendencia de la LT de la cohorte de pacientes con LMC y de la cohorte de donantes sanos. Como era esperable, los donantes sanos presentaron una disminución de la LT a medida que aumentaba la edad de los individuos ($R^2=0,1693$), una característica que no cumplían los pacientes con LMC ($R^2=0,0046$) (Figura 17). Además, la mediana de la LT de los pacientes con LMC fue significativamente menor que la de los donantes sanos (0,5784 vs. 1,003; $p < 0,001$).

Tabla 16. Características clínicas y biológicas de los pacientes con LMC incluidos en el estudio. Se muestran las medianas de cada una de las variables para la serie total y las medianas de los dos grupos derivados de la categorización de la delta-LT por la mediana (descrito en el siguiente apartado).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS	Total	Delta-LT <0,4	Delta-LT ≥0,4	p
	n=96	n=47	n=49	
Mediana de edad al diagnóstico, años (extremos)	49 (24-80)	59 (30-80)	43 (24-77)	***
Sexo				
Femenino, n (%)	40 (42)	20 (43)	29 (59)	ns
Masculino, n (%)	56 (58)	27 (57)	20 (41)	
Sokal, n (%)				
Bajo	46 (50)	22 (50)	24 (49)	ns
Intermedio	30 (32)	16 (36)	14 (29)	
Alto	17 (18)	6 (14)	11 (22)	
EUTOS, n (%)				
Bajo	77 (88)	40 (95)	37 (80)	*
Alto	11 (12)	2 (5)	9 (20)	
ELTS, n (%)				
Bajo	50 (59)	26 (63)	24 (56)	ns
Intermedio	24 (29)	11 (27)	13 (30)	
Alto	10 (12)	4 (10)	6 (14)	
Isoforma p210, n (%)				
e13a2	31 (39)	14 (36)	17 (42)	ns
e14a2	49 (61)	25 (64)	24 (58)	
Años tratamiento imatinib, mediana (extremos)	3,4 (0,3-14,4)	3,2 (0,3-14,4)	3,8 (0,3-14)	ns
Mediana de seguimiento en años (extremos)	7,3 (1,3-14,6)	6,7 (1,5-14,4)	7,1 (1,3-14,6)	ns
Exitus, n (%)	10 (10,4)	4 (8,5)	6 (12,2)	ns

LT= longitud de los telómeros

ns= estadísticamente no significativo

*= p < 0,05; ***= p < 0,001

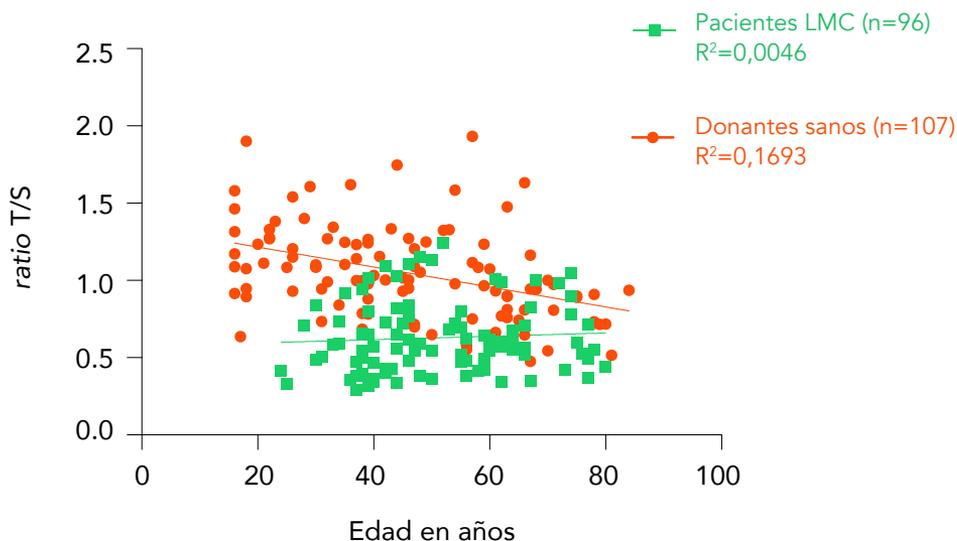


Figura 17. Distribución de la LT de los pacientes con LMC y los donantes sanos en función de la edad. Se observa la disminución esperada de la LT en los donantes sanos (círculos naranjas, n=107) a medida que aumenta la edad, mientras que esta característica no se cumple en los pacientes con LMC (cuadrados verdes, n=96). Esto es indicativo de que la LT de las células provenientes del clon maligno de la LMC presentan un patrón de replicación que ya no es regulado únicamente por el factor edad.

2. Correlación entre la delta-LT al diagnóstico y la obtención de la respuesta molecular profunda a imatinib

Tal y como se ha comentado en la sección de Materiales y Métodos (Trabajo II, apartado 3, página 84), el valor de delta-LT se define como la diferencia entre la LT calculada experimentalmente para cada paciente (la observada) y la LT que le correspondería a cada paciente por su edad (la esperada, calculada a partir del conjunto de donantes sanos). Cuanto mayor es el valor de delta-LT, mayor es la diferencia que hay entre la LT observada y la esperada por la edad y, por lo tanto, más cortos son los telómeros en el momento del análisis (en este caso, al diagnóstico de la LMC).

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la correlación entre el valor de la delta-LT al diagnóstico y la incidencia acumulada de obtención de la RM4 y la RM4.5 en cualquier momento. En primer lugar, se analizó la correlación con la obtención de RM4 y RM4.5 considerando la variable delta-LT como variable continua, donde observamos una asociación entre tener una delta-LT menor al diagnóstico y una mayor probabilidad de conseguir tanto la RM4 como la RM4.5 (*Hazard ratio*, HR [IC95%]: 0,3 (0,1- 0,9), $p=0,035$ y HR [IC95%]: 0,22 (0,1 - 0,66), $p=0,007$, respectivamente). Posteriormente, se categorizó la delta-LT en cuartiles (Q): Q1 = $0,06 \pm 0,15$; Q2 = $0,34 \pm 0,03$; Q3 = $0,48 \pm 0,05$; Q4 = $0,67 \pm 0,08$. En el Q1 se incluyeron aquellos

pacientes con los telómeros más largos al diagnóstico (es decir, con un valor de delta-LT bajo), mientras que en el Q4 se incluyeron los pacientes con los telómeros más cortos de toda la cohorte (es decir, con un valor de delta-LT elevado).

La Figura 18 muestra la incidencia acumulada de RM4 para los 4 grupos de cuartiles. Se puede observar una clara diferencia entre las incidencias acumuladas de los pacientes incluidos en los dos primeros cuartiles (Q1 y Q2) y los pacientes incluidos en los dos últimos cuartiles (Q3 y Q4). Por este motivo, se decidió utilizar como punto de corte de delta-LT el valor de la mediana (delta-LT = 0,4), quedando la cohorte de pacientes dividida en las siguientes categorías: delta-LT <0,4 (n=47) y delta-LT ≥0,4 (n=49). Estas dos categorías se utilizaron para los posteriores análisis estadísticos.

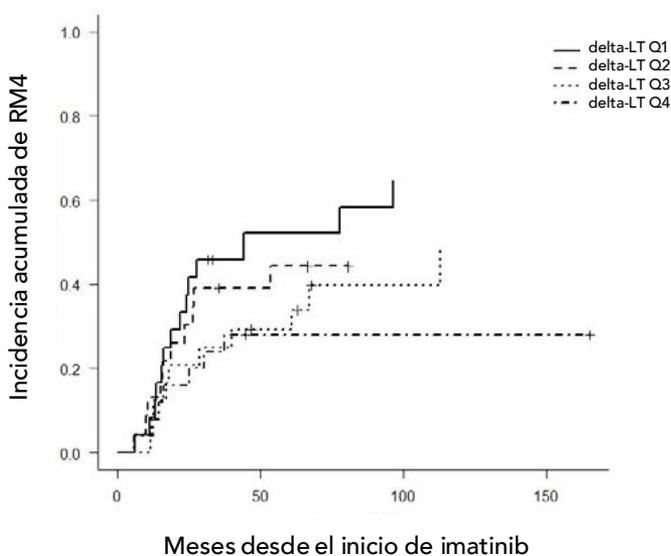


Figura 18. Incidencia acumulada (IC95%) de RM4 en función de los cuartiles de delta-LT. Q1: delta-LT 0,06 ± 0,15; Q2: delta-LT 0,34 ± 0,03; Q3: delta-LT 0,48 ± 0,05; Q4: delta-LT 0,67 ± 0,08.

Se estudió la incidencia acumulada (IC95%) de RM4 en ambos grupos, siendo del 63% (45% - 76%) para el grupo de delta-LT <0,4 y de 46% (31% - 60%) para el grupo de delta-LT ≥0,4 (p=0,047). El tiempo hasta conseguir la mediana de incidencia

acumulada (es decir, que el 50% de los pacientes obtengan la RM4) fue de 27 meses para el grupo delta-LT $<0,4$, mientras que este punto no fue alcanzado por el grupo delta-LT $\geq 0,4$, ya que menos del 50% de los pacientes lograron obtener la RM4 (Figura 19-A).

La incidencia acumulada (IC95%) de RM4.5 fue del 59% (36% - 76%) para los pacientes del grupo delta-LT $<0,4$ y del 37% (22% - 52%) para los del grupo delta-LT $\geq 0,4$ ($p=0,045$). En este caso, el tiempo hasta obtener una incidencia acumulada del 50% fue de 77 meses para el grupo delta-LT $<0,4$ (el grupo-LT $\geq 0,4$ no alcanzó este hito) (Figura 19-B).

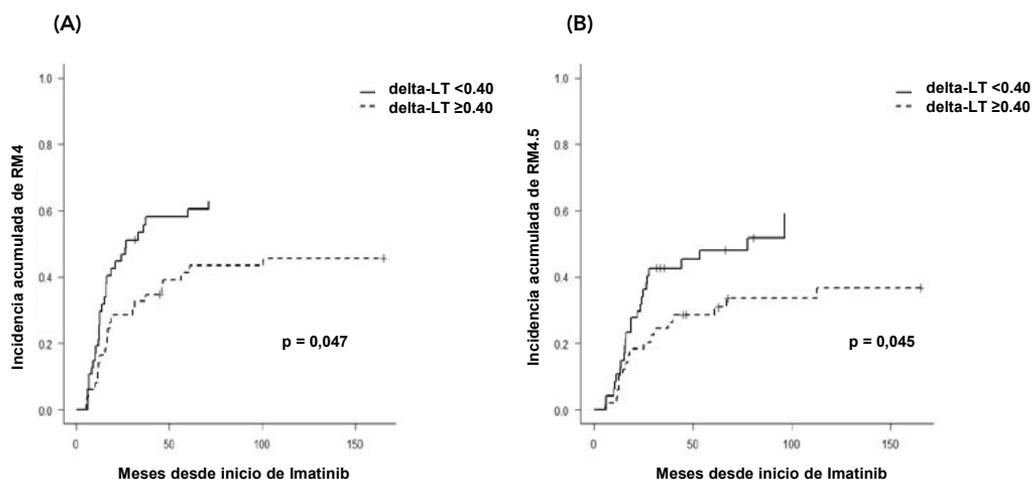


Figura 19. Incidencia acumulada (IC95%) de RM4 (A) y de RM4.5 (B) en función de los grupos delta-LT $<0,4$ y delta-LT $\geq 0,4$.

Se analizaron, además, las diferencias en la incidencia acumulada de RM4 entre los pacientes que habían logrado la RMM y que posteriormente consiguieron la RM4 y aquellos pacientes que, estando en RMM, no consiguieron la RM4. En el análisis de esta subpoblación de pacientes ($n=64$), se observó que aquellos incluidos en el grupo delta-LT $<0,4$ consiguieron alcanzar la RM4 antes que los del grupo delta-LT $\geq 0,4$, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (mediana de tiempo hasta la obtención de la RM4 en meses [IC95%]: 16,3 (12,4 - 33.4) en el grupo delta-LT $<0,4$ vs. 31,8 (16,2 - 100,7) en el grupo delta-LT $\geq 0,4$; $p=0,144$).

En esta subpoblación, las incidencias acumuladas (IC95%) de RM4 fueron del 84% (65% - 94%) para el grupo delta-LT <0,4 y del 75% (54% - 87%) para el grupo delta-LT \geq 0,4 (Figura 20).

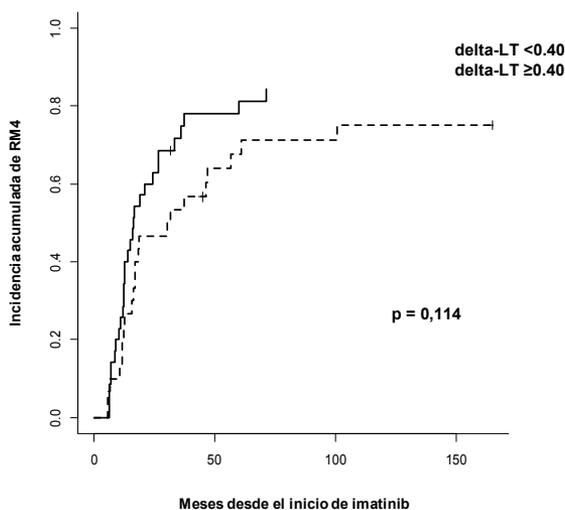


Figura 20. Incidencia acumulada (IC95%) de RM4 en la subpoblación de pacientes que consiguieron la RMM (n=64), de acuerdo con los grupos delta-LT <0,4 (n=35) y delta-LT \geq 0,4 (n=29).

3. Correlación entre la delta-LT al diagnóstico, los índices pronóstico y la isoforma de p210

Se analizaron las asociaciones entre la delta-LT y las principales variables pronósticas de relevancia clínica (Sokal, EUTOS, ELTS y la isoforma p210), con el objetivo de identificar una posible correlación con la LT al diagnóstico.

Estudiando la variable delta-LT como variable continua, no se observó ninguna asociación con los diferentes índices pronóstico al diagnóstico (Sokal, EUTOS y ELTS). Tampoco se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la delta-LT y las dos isoformas de p210 estudiadas.

Posteriormente, se analizó esta asociación con la variable delta-LT categorizada por la mediana. En este caso, solo se observó una correlación estadísticamente significativa con el índice de riesgo EUTOS ($p=0,036$), ya que el 20% de los pacientes con

delta-LT $\geq 0,4$ fue clasificado dentro del grupo de alto riesgo, a diferencia del grupo de pacientes con delta-LT $< 0,4$, en el que únicamente el 5% de ellos fue clasificado de alto riesgo (Tabla 16).

4. Análisis univariado y multivariado

Se realizó un análisis multivariado para determinar el papel de delta-LT como variable independiente predictora de RM4. Primero se seleccionaron las variables estadísticamente significativas en el análisis univariado; únicamente la delta-LT y el índice pronóstico ELTS mostraron diferencias estadísticamente significativas en la obtención de la RM4 entre sus categorías, alcanzando la mayor incidencia de RM4 en el grupo con delta-LT $< 0,4$ y ELTS de bajo riesgo (incidencia acumulada de RM4 [IC95%] 63% [45% - 76%] para delta-LT $< 0,4$ vs. 46% [31% - 60%] para delta-LT $\geq 0,4$, $p=0,047$; 58% [42% - 71%] para ELTS de bajo riesgo vs. 38% [21% - 55%] para ELTS de riesgo intermedio-alto, $p=0,041$).

No obstante, en el análisis multivariado, la delta-LT, aún presentando una clara tendencia, no fue estadísticamente significativa (HR [95% CI]: 1,7 (0,92 - 3,22), $p=0,089$), mientras que el índice ELTS mantuvo su significación estadística como predictor independiente de RM4 (HR [95% CI]: 1,9 (1,02 - 3,73), $p=0,045$) (Tabla 17).

Tabla 17. Análisis univariado y multivariado para la RM4.

ANÁLISIS UNIVARIADO			
Variable		Incidencia acumulada de RM4 (IC95%)	p-valor
delta-LT	< 0,40 (n=47)	63% (45% - 76%)	0,047
	≥ 0,40 (n=49)	46% (31% - 60%)	
Sokal	Bajo (n=46)	50% (37% - 61%)	0,312
	Int-Alto (n=47)	26% (14% - 39%)	
EUTOS	Bajo (n=77)	56% (43% - 66%)	0,414
	Alto (n=11)	36% (8% - 66%)	
ELTS	Bajo (n=50)	58% (42% - 71%)	0,041
	Int-Alto (n=34)	38% (21% - 55%)	
Isoforma p210	e13a2 (n=31)	42% (23%, 60%)	0,151
	e14a2 (n=49)	55% (40%, 68%)	
ANÁLISIS MULTIVARIADO			
Variable	Categoría de referencia	HR (IC95%)	p-valor
delta-LT	≥ 0,40	1,7 (0,92 - 3,22)	0,089
ELTS	Int-Alto	1,9 (1,02 - 3,73)	0,045

LT= longitud de los telómeros

RM4= respuesta molecular grado 4

HR= *hazard ratio*

5. Correlación entre la delta-LT y los hitos de respuesta molecular indicados en las recomendaciones de la ELN 2013

Por último, se estudió la asociación entre la delta-LT y la RM a los 3, 6, 12 y 18 meses de tratamiento con imatinib, de acuerdo con las recomendaciones de la ELN 2013 [57].

Cuando se analizó la delta-LT como variable continua, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en ninguno de los hitos de tiempo marcados por la ELN 2013. No obstante, sí que se observó una tendencia a una mayor probabilidad de conseguir la RMM a los 18 meses a medida que la delta-LT disminuía

(p=0,075). Esta asociación se confirmó cuando la delta-LT se estudió categorizada por la mediana; el 78% de los pacientes con delta-LT <0,4 consiguieron la RMM a los 18 meses, mientras que únicamente el 56% de los pacientes con delta-LT ≥0,4 consiguieron esta respuesta (p=0,049) (Tabla 18).

Tabla 18. Comparación de la delta-LT con la respuesta molecular en diferentes momentos teniendo en cuenta las recomendaciones de la ELN 2013. Se muestran la mediana y los p-valores para delta-LT como variable continua, y los porcentajes y p-valores para la variable delta-LT categorizada por la mediana.

Momento de estudio (número pacientes)	Ratio BCR-ABL1 (IS)*	Delta-LT variable continua		Delta-LT variable categórica		
		Delta-LT (mediana[IC95%])	P	Delta-LT <0,4 (n=47)	Delta-LT ≥0,4 (n=49)	P
3 meses (n=78)	> 10%	0,43 (0,34, 0,52)	0,112	14/39 (36%)	18/39 (46%)	0,357
	≤ 10%	0,34 (0,26, 0,41)		25/39 (64%)	21/39 (54%)	
6 meses (n=79)	> 1%	0,38 (0,28, 0,48)	0,680	14/42 (33%)	18/37 (49%)	0,166
	≤ 1%	0,36 (0,29, 0,43)		28/42 (67%)	19/37 (51%)	
12 meses (n=77)	> 0,1%	0,42 (0,33, 0,50)	0,229	15/39 (39%)	23/38 (60%)	0,053
	≤ 0,1%	0,35 (0,28, 0,43)		24/39 (62%)	15/38 (40%)	
18 meses RMM (n=69)	> 0,1%	0,44 (0,32, 0,55)	0,075	8/37 (22%)	14/32 (44%)	0,049
	≤ 0,1%	0,33 (0,27, 0,40)		29/37 (78%)	18/32 (56%)	
18 meses RM4 (n=69)	> 0,01%	0,39 (0,31, 0,46)	0,618	20/37 (54%)	19/32 (60%)	0,657
	z ≤ 0,01%	0,34 (0,24, 0,44)		17/37 (46%)	13/32 (40%)	

*: valores recomendados por la ELN 2013

LT= longitud de los telómeros

IC95%: intervalo de confianza del 95%

RMM: respuesta molecular mayor

RM4: respuesta molecular grado 4

Finalmente, se realizó un análisis de incidencia acumulada de RMM durante los 24 primeros meses desde el inicio de imatinib. Los resultados de este análisis confirmaron lo observado anteriormente, dado que el 68% (IC95%: 55% - 78%) de los pacientes incluidos en el grupo delta-LT <0,4 consiguieron la RMM, mientras que únicamente el 43% (IC95%: 30% - 56%) de los pacientes del grupo delta-LT \geq 0,4 consiguieron esta respuesta ($p=0,012$). Además, esta diferencia fue evidente a partir del mes 6 de tratamiento (Figura 21).

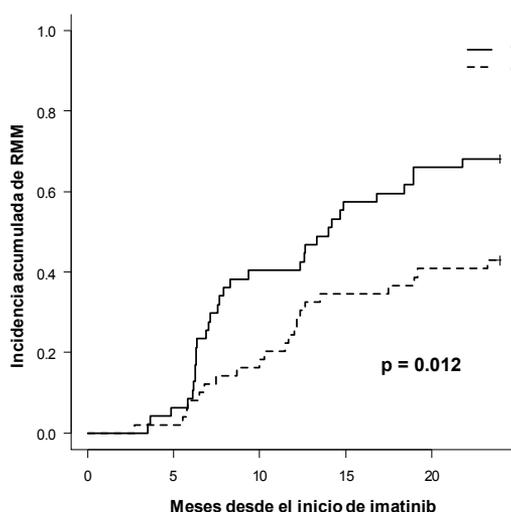


Figura 21. Incidencia acumulada (IC95%) de RMM durante los 24 primeros meses de tratamiento con imatinib, de acuerdo con los grupos delta-LT <0,4 y delta-LT \geq 0,4.

TRABAJO III

Parámetros clínicos y biológicos predictivos de recaída post-suspensión del ITQ

1. Características clínicas y biológicas de los pacientes incluidos en el Trabajo III

En este trabajo se incluyeron un total de **56 pacientes** diagnosticados entre los años 1995 y 2016, procedentes de tres centros: ICO-Badalona (n=18), ICO-Girona (n=11) e ICO-Hospitalet (n=27). Todos estos pacientes fueron incluidos en el **análisis de las variables clínicas** y su asociación con la RLT y recaída tras la suspensión del ITQ.

Dado que algunos pacientes suspendieron el tratamiento previo a la aprobación del Protocolo ICO de Discontinuación (apartado 3.9.2, Introducción), no todos los pacientes pudieron ser incluidos en los **estudios biológicos asociados**. Además, excepto para el estudio de la dPCR, en los otros dos estudios (SPop y células NK) fue necesaria la obtención de muestra fresca (MO y SP, respectivamente) así como el análisis de éstas a las pocas horas post-extracción, por lo que únicamente se pudieron incluir pacientes procedentes de nuestro centro (ICO-Badalona).

Teniendo en cuenta las diferentes estrategias del Protocolo ICO de Discontinuación (Figura 7, Introducción), se incluyeron 31 pacientes en el brazo de Imatinib en 1ª línea, 17 pacientes en la estrategia *EURO-SKI-like*, 3 en la *DESTINY-like*, 2 en la de *ENESTop-like* y 2 en la de *ENESTfreedom-like*. Un paciente suspendió el tratamiento fuera de protocolo.

La Tabla 19 recoge todas las variables demográficas y clínicas estudiadas en nuestra serie de pacientes, tanto en la serie global como en los pacientes que mantuvieron la RLT y los pacientes que presentaron una recaída molecular (pérdida de RMM).

Tabla 19. Variables demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

PARÁMETROS		Global	RLT	Recaída
Nº pacientes		56	46 (82%)	10 (18%)
Sexo, n (%)	Mujeres	27 (48%)	22 (48%)	5 (50%)
	Hombres	29 (52%)	24 (52%)	5 (50%)
Edad (mediana y extremos)	Diagnóstico	50 (24-81)	51 (24-81)	47 (27-69)
	Discontinuación	61 (28-87)	62 (28-87)	55 (38-75)
Índice Sokal, n (%)	Bajo riesgo	26/40 (65%)	21/32 (66%)	5/8 (63%)
	Riesgo Intermedio	14/40 (35%)	11/32 (34%)	3/8 (37%)
Índie ELTS, n (%)	Bajo riesgo	19/30 (63%)	16/24 (67%)	3/6 (50%)
	Riesgo Intermedio	11/30 (37%)	8/24 (33%)	3/6 (50%)
Isoforma p210, n (%)	e13a2	13/47 (28%)	11/37 (30%)	2/10 (20%)
	e14a2	32/47 (68%)	24/37 (65%)	8/10 (80%)
	e13a2 + e14a2	2/47 (4%)	2/37 (5%)	0
Tto. previo con INF- α	Sí	7 (12%)	7 (15%)	0
	No	49 (88%)	39 (85%)	10 (100%)
ITQ 1ª línea	Imatinib	49 (88%)	41 (89%)	8 (80%)
	Nilotinib	4 (7%)	3 (7%)	1 (10%)
	Dasatinib	2 (3%)	1 (2%)	1 (10%)
	Bosutinib	1 (2%)	1 (2%)	0
ITQ 1ª línea (agrupado)	Imatinib	49 (88%)	41 (89%)	8 (80%)
	ITQ-2G	7 (12%)	5 (11%)	2 (20%)
Nº líneas ITQ	1	45 (80%)	38 (83%)	7 (70%)
	2	5 (9%)	3 (6%)	2 (20%)
	3	4 (7%)	3 (6%)	1 (10%)
	4	2 (4%)	2 (5%)	0
Ratio 3 meses ITQ	<10%	36/42 (86%)	28/32 (88%)	8/10 (80%)
	>10%	6/42 (14%)	4/32 (12%)	2/10 (20%)
Halving-time, días (mediana y extremos)		16 (6,8-65)	15,7 (6,8-65)	21,9 (7,9-28,5)
Respuesta ITQ durante 3-12 primeros meses (ELN 2020)	Óptima	31/49 (63%)	28/39 (72%)	3/10 (30%)
	1 warning	9/49 (19%)	7/39 (18%)	2/10 (20%)
	2 warning	6/49 (12%)	4/39 (10%)	2/10 (20%)
	3 warning	3/49 (6%)	0	3/10 (30%)
Respuesta 3-12m (ELN 2020) categorizado, n (%)	Óptima	31/49 (63%)	28/39 (72%)	3/10 (30%)
	≥ 1 warning	18/49 (37%)	11/39 (28%)	7/10 (70%)
Ratio 12 meses ITQ	$\leq 0,01\%$	19/48 (40%)	18/38 (47%)	1/10 (10%)
	$> 0,01\%$	28/48 (60%)	20/38 (53%)	9/10 (90%)
ITQ previo discontinuación, n (%)	Imatinib	39 (70%)	33 (72%)	6 (60%)
	ITQ-2G	17 (30%)	13 (28%)	4 (40%)

PARÁMETROS		Global	RLT	Recaída
Tiempo exposición ITQ, años (mediana y extremos)		10 (3,6-17,6)	10,7 (3,6-17,6)	9,6 (7,1-12,1)
Tiempo hasta RM4, meses (mediana y extremos)		20 (2-113)	17 (2-113)	40 (16-69)
Tiempo hasta RM4 categorizado por la mediana, n (%)	≤ 20 meses	28 (50%)	26 (57%)	2 (20%)
	> 20 meses	28 (50%)	20 (43%)	8 (80%)
Duración RM4, meses (mediana y extremos)		81 (24-146)	85 (24-146)	74 (29-116)
Tiempo hasta RM4.5, meses (mediana y extremos)		36 (2-116)	28 (2-116)	46 (30-84)
Tiempo hasta RM4.5 categorizado por la mediana, n (%)	≤ 36 meses	28/55 (51%)	27/46 (59%)	1/9 (11%)
	> 36 meses	27/55 (49%)	19/46 (41%)	8/9 (89%)
Duración RM4.5, meses (mediana y extremos)		65 (0,5-146)	67 (7, 146)	48 (0,5-101)
Toxicidad previa ITQ, n (%)	No	43 (77%)	35 (76%)	8 (80%)
	Sí	13 (23%)	11 (24%)	2 (20%)
Dosis ITQ previo discontinuación, n (%)	Estándar	30/55 (54%)	24/45 (53%)	6/10 (60%)
	Inferior	25/55 (46%)	21/45 (47%)	4/10 (40%)
Grado RM discontinuación, n (%)	4	9 (16%)	7 (15%)	2 (20%)
	4.5	18 (32%)	14 (30%)	4 (40%)
	5	26 (46%)	23 (50%)	3 (30%)
	5.5	3 (6%)	2 (5%)	1 (10%)
Motivo suspensión ITQ, n (%)	Programado	47 (84%)	37 (80%)	10 (100%)
	Toxicidad/Intolerancia	7 (12%)	7 (15%)	0
	Comorbilidades	2 (4%)	2 (5%)	0
Síndrome retirada, n (%)	No	48 (86%)	38 (83%)	10 (100%)
	Sí	8 (14%)	8 (17%)	0
RMM mantenida, meses (mediana, extremos)		NA	32,5 (3-92)	4 (1-7)
Mediana de seguimiento desde el diagnóstico, años (extremos)		12,9 (4,6-25,1)	-	-
Mediana de seguimiento desde la discontinuación, meses (extremos)		31,2 (3,6-92,4)	-	-

ELN 2020: recomendaciones *European LeukemiaNet* del 2020 [26]

ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa

RM: respuesta molecular

RMM: respuesta molecular mayor

RM4: respuesta molecular grado 4

RM4.5: respuesta molecular grado 4.5

Los pacientes incluidos en este estudio discontinuaron el tratamiento entre los años 2014 y 2020. La mediana de edad en el momento de la discontinuación fue de 61 años (extremos: 28-87 años) y el 48% de los pacientes eran mujeres. El índice Sokal fue bajo en un 65% de los pacientes e intermedio en un 35%. En el índice ELTS los porcentajes fueron muy similares (bajo riesgo 63%, riesgo intermedio 37%). Ningún paciente con Sokal o ELTS alto suspendió el tratamiento. Todos los pacientes presentaban las isoformas p210 típicas (e13a2 = 28%, e14a2 = 68%, ambas = 4%). Únicamente siete pacientes (12%) recibieron INF- α previo al inicio del ITQ. En total, 49 (88%) pacientes recibieron imatinib y 7 (12%) un ITQ-2G en primera línea. Cinco pacientes (9%) fueron tratados con dos líneas de ITQ, cuatro (7%) con tres líneas y únicamente dos pacientes (4%) con cuatro líneas. Todos los pacientes que recibieron dos o más líneas de tratamiento habían recibido imatinib en primera línea, excepto un paciente que recibió nilotinib. Todos ellos cambiaron de ITQ por toxicidad/intolerancia y ninguno presentó resistencia al tratamiento. Dos pacientes presentaron toxicidad, pero ello no fue motivo de cambio del ITQ. En relación a la variable de RMT, el 86% de los pacientes tenían una *ratio* BCR-ABL1(IS) <10% a los 3 meses de tratamiento (dato no disponible en 14 pacientes). Se pudo estudiar la respuesta al tratamiento durante los 12 primeros meses en 49 pacientes; el 63% de los pacientes tenía una respuesta óptima a los 3, 6 y 12 meses, mientras que un 37% de estos tuvo criterio de alarma en al menos una de estas determinaciones. En relación al HT, la mediana de la serie estudiada fue de 16 días (extremos 6,8-65 días).

En el momento de la suspensión del tratamiento, la mayoría de los pacientes (70%) estaban recibiendo imatinib y el 30% restante un ITQ-2G. Los pacientes de nuestra serie fueron tratados con un ITQ durante una mediana de 10 años (extremos 3,6-17,6 años). El 54% de los pacientes que suspendieron el ITQ estaba recibiendo la dosis estándar mientras que el 46% estaba recibiendo una dosis inferior. Todos los pacientes estaban en RMP en el momento de la suspensión del ITQ y el motivo principal de la suspensión, en ausencia de toxicidad relevante al tratamiento, fue el deseo de conseguir la RLT (n=47). En siete pacientes (12%) se suspendió el tratamiento por toxicidad/intolerancia y en dos pacientes (4%) por la presencia de comorbilidades. La mediana de duración de la RM4 en nuestra serie fue de 81 meses (extremos 24-146 meses) y la de la RM4.5 fue de 65 meses (extremos 0,5-146 meses). Únicamente ocho pacientes (14%) presentaron el síndrome de retirada del ITQ y en ninguno de ellos fue necesario reiniciar el tratamiento por este motivo, ya que se controló con analgesia convencional.

En el momento de cierre de este estudio (20 de marzo de 2021), la mediana de seguimiento desde el momento de la discontinuación fue de 31,2 meses (extremos 3,6-92,4 meses). Solo un paciente falleció estando en RMP, por causas ajenas a la LMC (insuficiencia respiratoria aguda por metástasis pulmonar de neoplasia de mama). Diez pacientes (18%) presentaron una recaída molecular (pérdida de la RMM). Todos ellos reiniciaron el tratamiento con ITQ y recuperaron la RMP en una mediana de 4,3 meses (extremos 2-11 meses). Nueve de las 10 recaídas (90%) tuvieron lugar durante los 6 primeros meses post-suspensión y el paciente restante recayó a los siete meses. En otros tres pacientes (5,4%) se observó una pérdida de RMP (sin llegar a perder la RMM) que posteriormente recuperaron de manera espontánea sin la reintroducción del tratamiento. La incidencia acumulada de RLT fue del 82% (IC95%: 72% - 92%) (Figura 22).

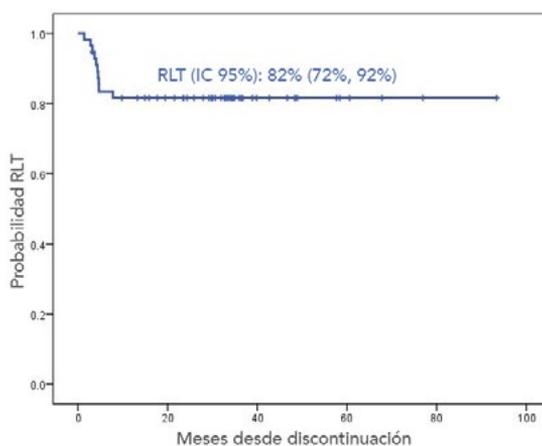


Figura 22. Remisión libre de tratamiento (IC95%) tras la discontinuación del ITQ.

2. Análisis de posibles factores clínicos predictivos de recaída molecular

Las variables estudiadas como posibles factores predictivos de recaída molecular se describen en la Tabla 20.

Tabla 20. Modelo univariado para el análisis de las variables clínicas pronósticas de recaída molecular. Se muestran los *Hazard ratio*, IC95% y el p-valor para cada una de ellas.

PARÁMETROS	<i>Hazard ratio</i>	IC95%	p-valor
Sexo	1,151	0,341 - 3,885	0,82
Edad diagnóstico (continua)	0,993	0,95 - 1,039	0,76
Edad discontinuación (continua)	0,985	0,947 - 1,026	0,47
Sokal	1,143	0,273 - 4,784	0,85
ELTS	1,702	0,364 - 7,956	0,5
p210	1,189	0,46 - 3,072	0,72
ITQ 1ª línea (Imatinib vs 2G)	2,148	0,462 - 9,996	0,33
Nº líneas (1 vs. >1)	0,521	0,134 - 2,025	0,35
ITQ previo discontinuación (Imatinib vs 2G)	1,717	0,489 - 6,026	0,4
Ratio 3 meses ITQ (<10% vs. >10%)	1,459	0,342 - 6,231	0,61
<i>Halving time</i> (continua)	1,014	0,975 - 1,055	0,49
<i>Halving time</i> (dividido por la mediana)	2,642	0,707 - 9,877	0,15
Respuesta ITQ 3-12 meses (óptima vs. ≥ 1 warning)	4,264	1,106 - 16,44	0,035
Tiempo exposición ITQ (continua)	0,951	0,844 - 1,072	0,41
Ratio 12 meses ITQ (<0,01% vs. >0,01%)	6,381	0,798 - 51,05	0,081
Tiempo hasta RM4, meses (continua)	1,016	0,1 - 1,033	0,061
Tiempo hasta RM4, meses (dividido por la mediana)	4,125	0,876 - 19,42	0,073
Duración RM4, meses (continua)	0,985	0,97 - 1	0,058
Tiempo hasta RM4.5, meses (continua)	1,013	1 - 1,026	0,05
Tiempo hasta RM4.5, meses (dividido por la mediana)	8,758	1,076 - 71,29	0,043
Duración RM4.5, meses (continua)	0,985	0,97 - 1,002	0,082
Toxicidad previa ITQ	0,881	0,186 - 4,166	0,87
Dosis ITQ previo discontinuación	0,824	0,238 - 2,85	0,76

ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa

2G: inhibidor de la tirosina quinasa de segunda generación

RM4: respuesta molecular grado 4

RM4.5: respuesta molecular grado 4.5

Como se puede observar en los resultados del análisis univariado, los únicos dos parámetros que mostraron una significación estadística fueron el tener una RM óptima durante los 3-12 primeros meses de tratamiento según las guías de la ELN de 2020 [26] ($p=0,035$), así como el tiempo necesario hasta la obtención de la RM4.5 ($p=0,05$, categorizado por la mediana $p=0,043$). Tanto el tiempo hasta la obtención de RM4 como la duración de la RM4 mostraron una tendencia en nuestro estudio ($p=0,061$ y $p=0,058$, respectivamente).

Respecto al tipo de respuesta durante los 3-12 primeros meses de tratamiento, el 70% de los pacientes que presentaron una recaída molecular había tenido uno o más criterios de alarma (*warning*) en alguna de las tres determinaciones (3, 6 o 12 meses), según las recomendaciones de la ELN de 2020 [26]. Únicamente tres (30%) de los pacientes con recaída molecular habían presentado una respuesta óptima en todas las determinaciones durante el primer año, mientras que en los pacientes con RLT mantenida estos porcentajes fueron inversos; así, el 72% de los pacientes presentaron una respuesta óptima en todas las determinaciones, mientras que únicamente un 28% presentaron algún criterio de alarma durante los 3-12 primeros meses de tratamiento (18% un criterio de alarma y 10% dos criterios de alarma). Cabe destacar que de los pacientes que presentaron uno o más criterios de alarma (18 de 49 pacientes), el 89% de ellos (n=16) habían sido tratados con imatinib en primera línea y únicamente 2 pacientes (11%) con un ITQ-2G (ambos con nilotinib). Por lo tanto, según nuestra serie de pacientes, la respuesta estable al ITQ durante el primer año, especialmente con imatinib, parece tener un papel relevante en el mantenimiento de la RLT (Figura 23-A).

Se analizó, además, si alcanzar una RMP a los 12 meses de tratamiento ($ratio \leq 0,01\%$), indicativo de una respuesta óptima y rápida al ITQ, podía ser un parámetro predictivo de mantenimiento de la RLT; aunque las diferencias no fueron significativas, aquellos pacientes con una $ratio$ BCR-ABL1 $\leq 0,01\%$ a los 12 meses mostraron una tendencia a presentar mayor tasa de RLT ($p=0,082$). Al estudiar las probabilidades de la incidencia acumulada de recaída post-suspensión mediante curvas de Kaplan-Meier, este parámetro fue estadísticamente significativo ($p=0,042$) (Figura 23-B).

En lo relativo al tiempo necesario hasta la obtención de la RMP, se observaron diferencias (tendencia) en la variable tiempo hasta conseguir la RM4; los pacientes que tardaron 20 meses o más en conseguirla, tenían una mayor probabilidad de recaída molecular una vez suspendido el tratamiento (Figura 24-A). Esta tendencia fue estadísticamente significativa al estudiar el tiempo hasta conseguir la RM4.5; de este modo, aquellos pacientes que tardaron 36 meses o más (mediana de nuestra serie) en conseguir la RM4.5 presentaron más recaídas moleculares (Figura 24-B).

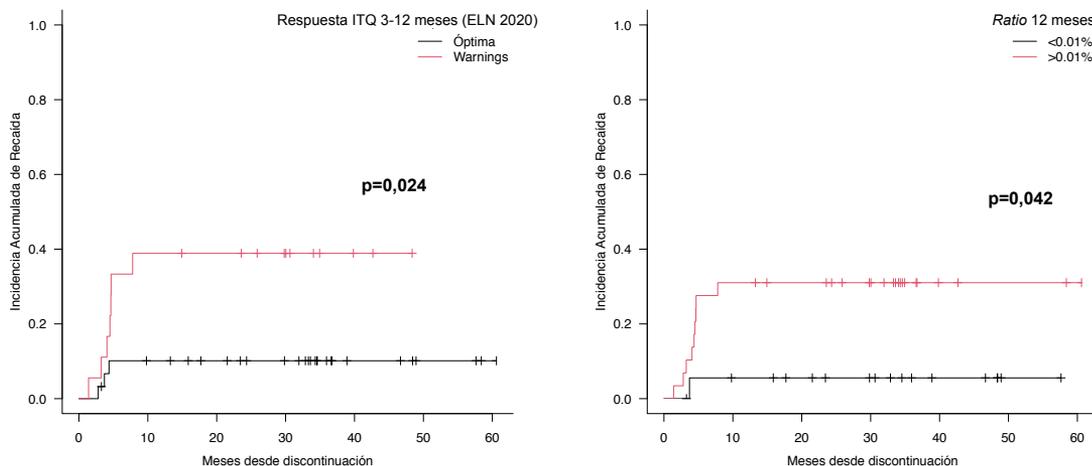


Figura 23. Incidencia acumulada de recaída molecular tras la discontinuación en (A) los pacientes con respuesta óptima vs. los pacientes con algún *warning* durante los 12 primeros meses de tratamiento con el ITQ y (B) los pacientes con *ratio* inferior o superior a 0,01% a los 12 meses de tratamiento.

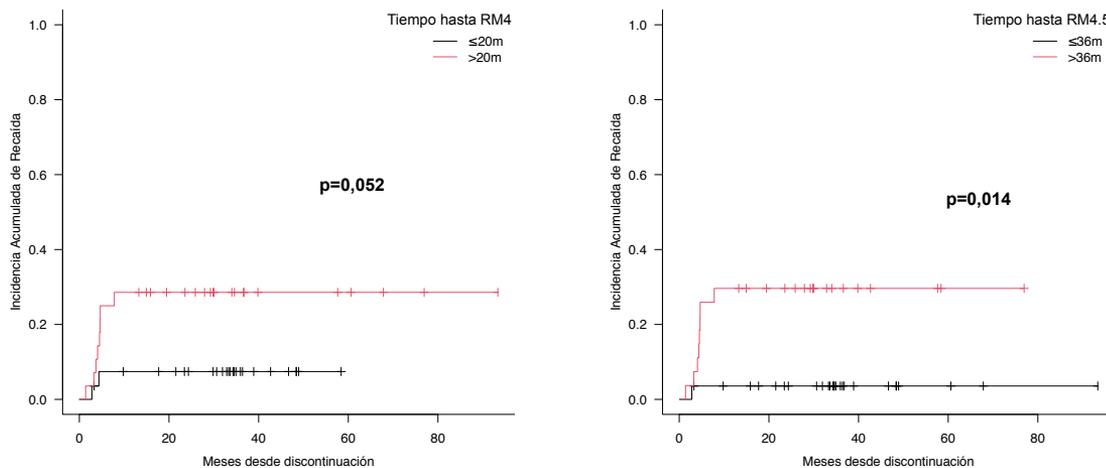


Figura 24. Incidencia acumulada de recaída molecular tras la discontinuación en función de (A) el tiempo hasta conseguir la RM4 (categorizado por la mediana) y (B) el tiempo hasta conseguir la RM4.5 (categorizado por la mediana).

Tanto la variable duración de la RM4 como la variable duración de la RM4.5 mostraron una tendencia (diferencias no significativas) en nuestra serie de pacientes ($p=0,058$ y $p=0,082$, respectivamente). Cabe destacar que un paciente suspendió el tratamiento sin haber conseguido la RM4.5 y que posteriormente presentó una recaída molecular.

3. Posibles factores biológicos predictivos de recaída molecular

En un subgrupo de pacientes incluidos en este trabajo, se realizaron una serie de estudios biológicos con el objetivo de analizar en profundidad ciertos parámetros predictivos de una posible recaída tras la suspensión del tratamiento. En la Tabla 21 se describen las principales características de los pacientes incluidos en esta parte del trabajo.

Tabla 21 (página siguiente). Principales características clínicas de los pacientes incluidos en los subestudios biológicos. En las últimas tres columnas se especifica en qué subestudio ha participado cada paciente.

n° pte	Sexo	Estrategia Protocolo ICO ^a	Edad DX	Edad DISCO.	ITQ 1 ^a L	Total líneas ITQ	ITQ previo DISCO.	Total años ITQ	RM4 (años)	RM4.5 (años)	Tox. previa	Dosis ITQ previa	Recaída post DISCO?	Meses en RLT	dPCR	SPop	NK
Pt-1	H	Imatinib 1L	28	37	Imatinib	1	Imatinib	8,5	5,6	5,51	No	Estándar	No	36	X	X	X
Pt-2	M	Imatinib 1L	55	69	Imatinib	1	Imatinib	13,8	12,2	12,2	No	Estándar	No	35	X	X	X
Pt-3	H	Imatinib 1L	74	83	Imatinib	1	Imatinib	9,0	6,9	5,0	No	Estándar	No	33	X	X	X
Pt-4	H	Imatinib 1L	38	49	Imatinib	1	Imatinib	10,9	9,6	9,6	No	Estándar	No	33	X	X	X
Pt-5	M	Imatinib 1L	38	49	Imatinib	1	Imatinib	11,2	10,1	2,5	No	Estándar	No	32	X	X	X
Pt-6	H	ENESTop	35	39	Imatinib	2	Nilotinib	4,1	3,1	1,8	Sí	Estándar	No	31	X	X	X
Pt-7	H	Imatinib 1L	51	63	Imatinib	1	Imatinib	12,8	12,0	4,1	No	Estándar	No	29	X	X	X
Pt-8	M	Imatinib 1L	44	52	Imatinib	1	Imatinib	8,0	6,7	5,4	No	Estándar	Sí	2	X	X	X
Pt-9	H	EUROSKI	43	55	Imatinib	3	Nilotinib	11,7	6,8	5,8	Sí	Inferior	No	23	X	X	X
Pt-10	H	FP	24	28	Imatinib	4	Bosutinib	3,6	2,9	2,4	Sí	Inferior	No	23	X	X	X
Pt-11	M	EUROSKI	69	75	Imatinib	2	Nilotinib	7,8	4,0	4,0	Sí	Estándar	Sí	4	X	X	X
Pt-12	H	EUROSKI	56	64	Imatinib	4	Dasatinib	7,6	5,6	4,6	Sí	Inferior	No	15	X	X	X
Pt-13	H	EUROSKI	33	42	Nilotinib	1	Nilotinib	8,9	4,2	4,2	No	Estándar	No	14	X	X	X
Pt-14	M	EUROSKI	55	62	Imatinib	1	Imatinib	7,2	4,9	2,5	No	Estándar	No	13	X	X	X
Pt-15	M	EUROSKI	66	73	Imatinib	1	Imatinib	7,1	2,4	0,1	No	Estándar	Sí	1	X	X	X
Pt-16	M	DESTINY	45	51	Bosutinib	1	Bosutinib	5,9	5,2	4,3	No	Inferior	No	3		X	X
Pt-17	M	DESTINY	50	58	Imatinib	2	Nilotinib	8,3	5,3	1,7	Sí	Inferior	Sí	3		X	X
Pt-18	H	DESTINY	70	75	Imatinib	1	Imatinib	4,3	3,3	2,5	Sí	Inferior	No	3		X	X
Pt-19	M	Imatinib 1L	27	38	Imatinib	1	Imatinib	12,1	9,7	8,4	No	Estándar	Sí	4	X		
Pt-20	H	Imatinib 1L	52	63	Imatinib	1	Imatinib	11,2	8,0	8,0	No	Inferior	Sí	4	X		
Pt-21	H	EUROSKI	35	44	Dasatinib	1	Dasatinib	9,5	7,9	2,5	No	Inferior	Sí	4	X		
Pt-22	H	Imatinib 1L	60	70	Imatinib	1	Imatinib	9,7	6,1	2,7	No	Inferior	Sí	4	X		
Pt-23	H	Imatinib 1L	40	51	Imatinib	1	Imatinib	10,2	6,3	6,3	No	Estándar	Sí	7	X		

a: ver Figura 7, apartado Introducción
H: hombre; M: mujer; 1L: primera línea; FP: fuera de protocolo; DX: diagnóstico; DISCO.: discontinuación; ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa; RM4: respuesta molecular grado 4; RM4.5.: respuesta molecular grado 4.5; RLT: remisión libre de tratamiento; dPCR: PCR digital; SPop: side population; NK: células NK

3.1. Determinación de los transcritos de BCR-ABL1 mediante PCR digital

3.1.1. Puesta a punto de la técnica

Tal y como se ha descrito en el apartado de Metodología (página 91), la dPCR es una técnica que nos permite realizar una cuantificación absoluta de una secuencia diana de ácidos nucleicos. Es una técnica relativamente nueva por lo que aún no está estandarizada para su aplicación en la práctica clínica. Es por ello que el primer punto importante de este estudio fue la puesta a punto de la técnica.

Inicialmente, se estudió la posibilidad de analizar en un mismo chip de dPCR el número de copias del oncogen BCR-ABL1 así como el número de copias del gen de referencia *ABL1*, con el objetivo de poder obtener una *ratio* similar a la obtenida en la qPCR estándar. Para ello se utilizaron 2 ensayos, uno para BCR-ABL1 marcado con el fluorocromo FAM (Hs03024541_ft) y otro para *ABL1* marcado con VIC (Hs01104728_m1). No obstante, las nubes de puntos positivos y puntos negativos quedaban poco separadas entre ellas por lo que era muy difícil establecer el umbral de positividad (Figura 25). Además, los umbrales no eran comparables entre los controles positivos (muestras con *ratio* BCR-ABL1/*ABL1*(IS) próxima a 0,2% analizado por qPCR) y las muestras con *ratios* bajas o indetectables por qPCR. Se probaron varios protocolos de termociclador para la optimización de los ensayos pero ninguno de ellos mostró una mejoría significativa.

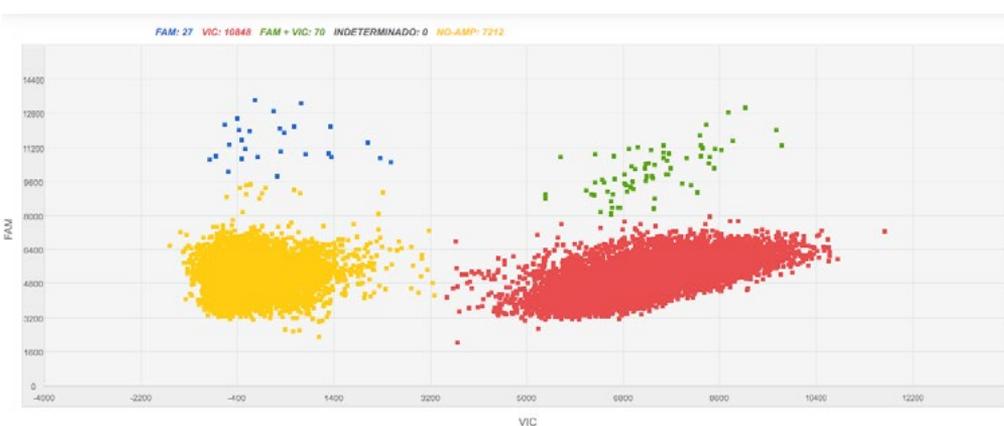


Figura 25. Ejemplo de los resultados obtenidos al usar los dos ensayos (Hs03024541_ft y Hs01104728_m1). Los puntos amarillos indican que no ha habido amplificación en esos pocillos del chip, los rojos indican positividad para *ABL1*, los azules positividad para BCR-ABL1 y los verdes son pocillos positivos tanto para BCR-ABL1 como para *ABL1*.

A raíz de la publicación del estudio llevado a cabo por la Dra. Bernardi y cols. [163], en el que únicamente usaban un ensayo para BCR-ABL1, decidimos aplicar esta metodología. Con este nuevo protocolo, junto con un cambio del ensayo para BCR-ABL1 (IDT 10417980) conseguimos optimizar las condiciones que nos permitían diferenciar claramente los pocillos positivos de los negativos (Figura 26).

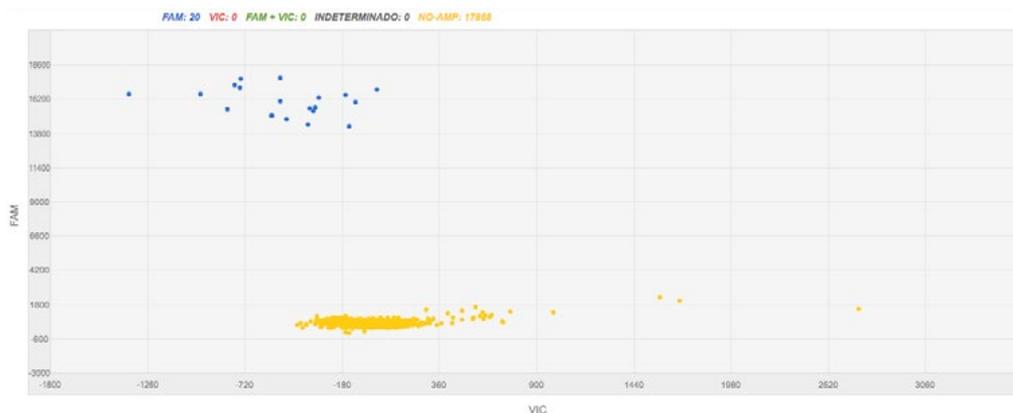


Figura 26. Ejemplo de los resultados obtenidos al usar únicamente el ensayo IDT 10417980 para BCR-ABL1. Las nubes de puntos quedan mucho más separadas y es más fácil establecer el umbral de positividad. Los puntos azules indican pocillos positivos para BCR-ABL1 y los amarillos pocillos sin amplificación.

Una vez establecidas las condiciones de termociclador y concentración de la muestra, se evaluó la precisión de nuestro ensayo, utilizando muestras seriadas de los plásmidos incluidos en el *ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit* (Qiagen, Ref. 670723) con diferentes concentraciones de transcritos BCR-ABL1. Las concentraciones de plásmido así como el equivalente en copias/ μ L en la dPCR fueron las siguientes:

- ST 1 = 5 copias BCR-ABL1 / 2,5 μ L = 0,076 copias/ μ L (dPCR)
- ST 2 = 50 copias BCR-ABL1 / 2,5 μ L = 1,507 copias/ μ L (dPCR)
- ST 3 = 500 copias BCR-ABL1 / 2,5 μ L = 13,56 copias/ μ L (dPCR)
- ST 4 = 5.000 copias BCR-ABL1 / 2,5 μ L = 1330,7 copias/ μ L (dPCR)

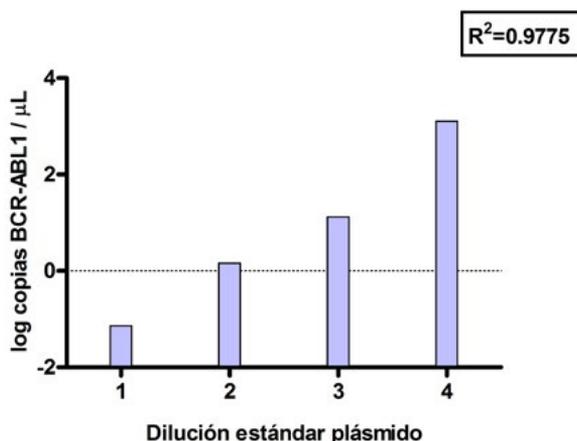


Figura 27. Determinación del número de copias BCR-ABL1/ μL para diferentes concentraciones del plásmido del *ipsogen BCR-ABL1 Mbc r IS-MMR Kit*. Se muestran los resultados en escala logarítmica.

Como se puede observar en la Figura 27, los rangos de copias de BCR-ABL1/ μL para la dPCR mostraron una tendencia lineal en relación con las copias usadas en cada dilución del plásmido ($R^2=0,9775$).

Se usaron muestras de **11 controles sanos** para el cálculo del **LD** de la técnica; en ninguna de estas muestras se obtuvo pocillos positivos para BCR-ABL1. Por lo tanto, para nuestro ensayo, se pudo considerar como positiva para BCR-ABL1 cualquier muestra con ≥ 1 pocillo positivo (en azul, FAM).

3.1.2. Cuantificación absoluta de los transcritos de BCR-ABL1 mediante dPCR en pacientes que han discontinuado el tratamiento y comparación con los resultados obtenidos en la cuantificación relativa mediante qPCR

En este sub-estudio del Trabajo III se incluyeron un total de **129 muestras procedentes de 20 pacientes** que habían discontinuado el tratamiento, de los cuales 12 están en RLT y 8 presentaron una recaída molecular post-discontinuación (Tabla 21). Todas las muestras se analizaron por duplicado (2 chips de dPCR para cada muestra) y se utilizó el valor promedio de las copias de BCR-ABL1/ μL en cada caso. Solamente fueron incluidos los chips con más de 17.000 pocillos viables (es decir, detección de muestra en 17.000 particiones o más).

Primero se compararon los resultados obtenidos por qPCR (en función de los diferentes niveles de RM) y los resultados de la dPCR (en función de las copias de BCR-ABL1/ μL) para las 129 muestras incluidas. Como se puede observar en la Figura 28,

los números de copias de BCR-ABL1/ μL (eje de las Y) para cada grupo de RM (eje de las X) presentaban mucha dispersión. Sorprendentemente, el grupo de RM4.5 tenía una mediana de copias de BCR-ABL1/ μL incluso superior a la del grupo de muestras clasificadas como RM4. Las diferencias de copias/ μL entre los diferentes grupos de RM no fueron estadísticamente significativas. Destacar que en varios casos donde la muestra era indetectable por qPCR, fue positiva por dPCR. No obstante, también observamos lo contrario; muestras con transcritos cuantificables por qPCR fueron negativas por dPCR.

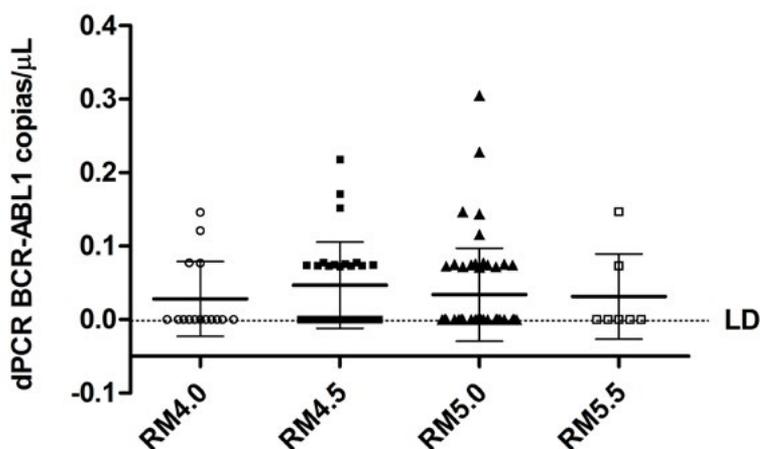


Figura 28. Niveles de transcritos BCR-ABL1 analizados por dPCR (eje de las Y) de acuerdo con los diferentes grupos de RM calculados por qPCR (eje de las X). Cada punto corresponde a una muestra y las barras representan la media \pm desviación estándar (SD). LD: límite de detección para la dPCR.

Posteriormente, se estudió de manera gráfica la variabilidad en los resultados de qPCR y dPCR en función de la presencia o ausencia de recaída post-discontinuación (Figura 29). En cuanto a la variabilidad en la *ratio* BCR-ABL1/ABL1(IS) por qPCR, las muestras previas a la discontinuación y pertenecientes a los pacientes que presentaron recaída molecular (Figura 29-C) presentaron algo más de variabilidad que las muestras pertenecientes a los pacientes en RLT (Figura 29-A). Sin embargo, en el caso de las copias de BCR-ABL1/ μL estudiadas por dPCR, la variabilidad fue similar entre ambos grupos, e incluso mostró algo más de estabilidad en el grupo de pacientes con recaída molecular (Figura 29-B y Figura 29-D).

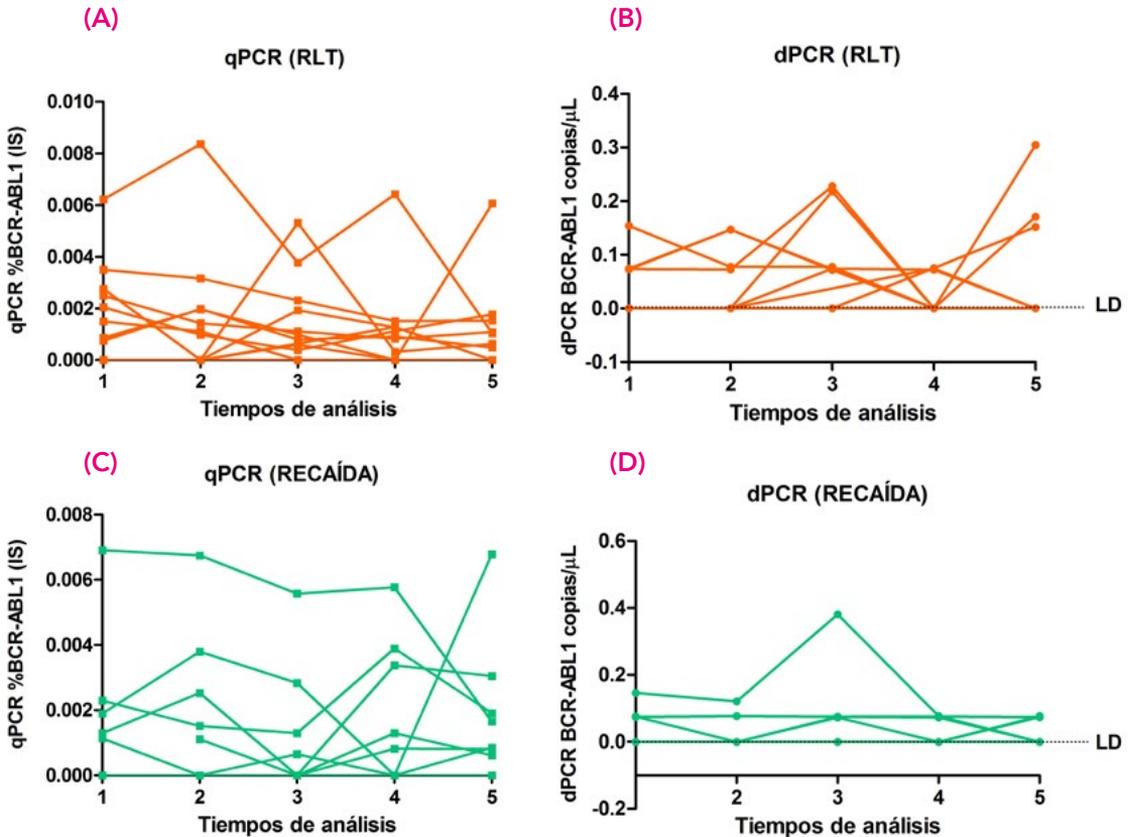


Figura 29. Resultados de la *ratio* BCR-ABL1/ABL1 (IS) por qPCR y las copias BCR-ABL1/ μ L por dPCR en los pacientes que mantienen la RLT (A y B) y los pacientes que presentaron una recaída molecular (C y D). Únicamente se representan los valores correspondientes a las muestras previas a la discontinuación. LD; límite de detección para la dPCR. RLT; remisión libre de tratamiento.

Finalmente, se analizó la presencia de muestras positivas y negativas por dPCR en cada grupo de pacientes (RLT vs. recaída molecular) y para cada tiempo de análisis (Figura 30). Prácticamente no se observaron diferencias en el porcentaje de pacientes con dPCR positiva o negativa entre ambos grupos para la mayoría de tiempos de análisis, excepto 6 meses antes de la discontinuación y en el momento de la discontinuación, donde se observó un porcentaje superior de pacientes con dPCR positiva en el grupo de las recaídas respecto al grupo que mantuvo la RLT (37% vs. 15%, respectivamente). Cabe destacar el aumento en la positividad de las muestras post-discontinuación tanto para el grupo RLT como el grupo de las recaídas (muestras previas a la pérdida de RMM), siendo más pronunciado en este último grupo (58% vs. 71%, respectivamente). Durante todo el seguimiento, los pacientes que recayeron presentaron un promedio de 0,048 copias BCR-ABL1/ μ L (rango 0 - 0,381) mientras que el promedio en los pacientes en RLT fue de 0,035 copias BCR-ABL1/ μ L (rango 0 - 0,305). Sin embargo, aun mostrando una tendencia, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,098$).

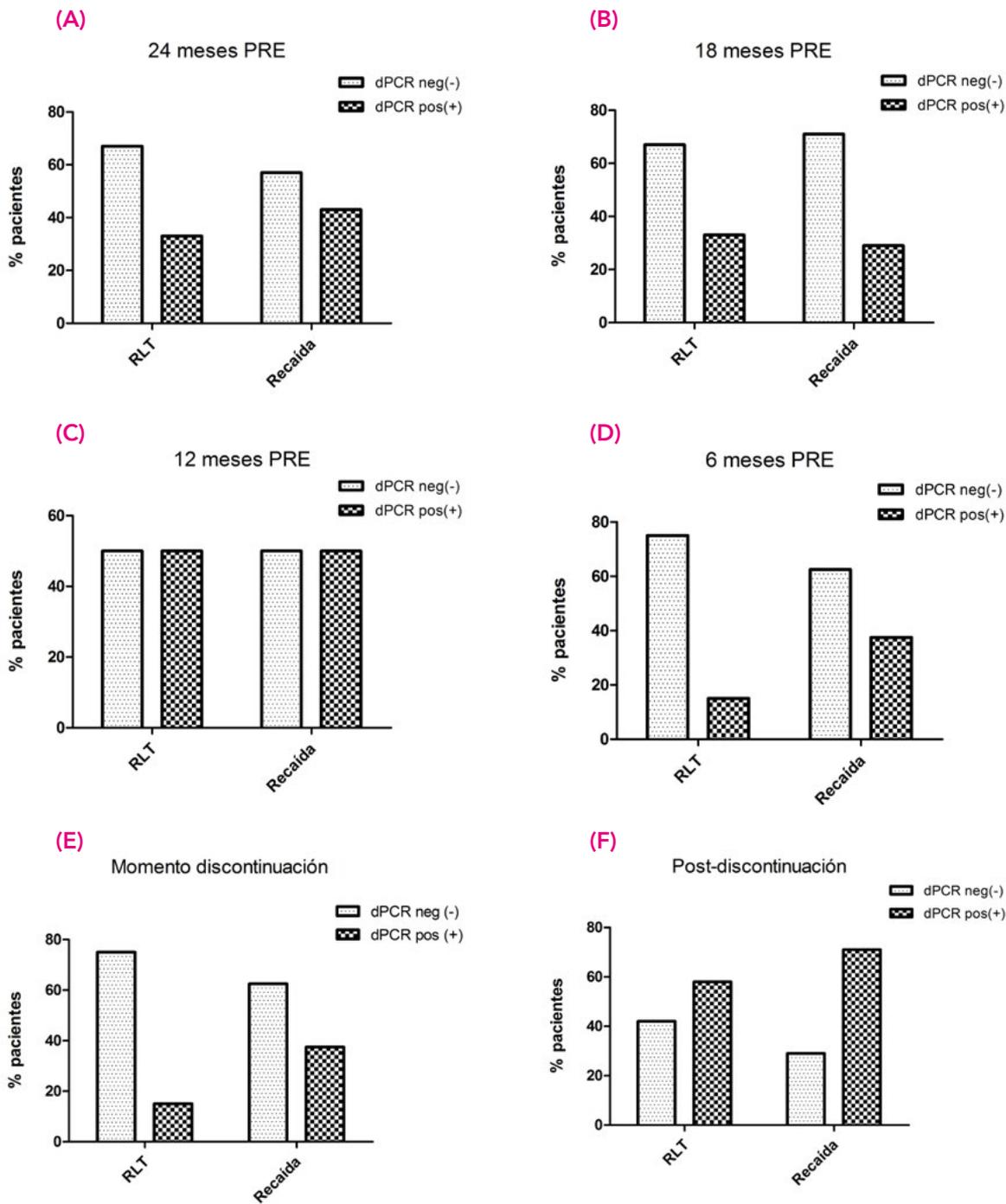


Figura 30. Diferencias entre el % de pacientes con dPCR positiva y dPCR negativa para los dos grupos de pacientes (RLT vs. recaída). Se muestran los resultados correspondientes a los puntos previos a la suspensión del ITQ (A: 24 meses, B: 18 meses, C: 12 meses, D: 6 meses) y en el momento de la discontinuación (E). El gráfico F representa todas las muestras analizadas post-discontinuación y, en el caso del grupo de recaídas, siempre previas a la pérdida de la RMM. RLT; remisión libre de tratamiento.

3.2. Estudio de las células de la *Side Population* y del inmunofenotipo

El análisis de la SPop se llevó a cabo en un total de **18 pacientes que discontinuaron el tratamiento** (Pt-01 a Pt-18, Tabla 21). Tal y como se ha mencionado en el apartado de Material y Métodos (página 95), para este estudio fue necesaria la obtención de muestra de MO y su posterior análisis en el menor tiempo posible (antes de las 3 horas post-extracción). En todos los pacientes se analizó la muestra de MO justo en el momento de la suspensión del ITQ y a los 6 meses post-suspensión (en caso de no presentar recaída) o en el momento de la recaída (siempre antes de re-introducir el ITQ), excepto en dos pacientes en los que no fue posible analizar la muestra a los 6 meses post-suspensión (Pt-14, Tabla 21) y en el momento de la recaída (Pt-15, Tabla 21). Dos pacientes (Pt-16 y Pt-18, Tabla 21) presentaban, en el momento de escritura de esta tesis, un período de seguimiento post-discontinuación inferior a los 6 meses. Se incluyeron, además, muestras seriadas de 10 pacientes diferentes en el momento del diagnóstico de la LMC así como a los 3 meses y 6 meses de tratamiento con el ITQ.

El objetivo de este estudio fue analizar y cuantificar el número de células correspondientes a la fracción de SPop para cada uno de los pacientes en los diferentes tiempos mencionados así como analizar la expresión de los marcadores CD34, CD38 y CD26, tanto para el total de células viables en la muestra como dentro de la población SPop. En la Figura 31 se puede ver un ejemplo del análisis llevado a cabo para la cuantificación de la SPop y de los diferentes marcadores de superficie estudiados (CD34, CD38 y CD26).

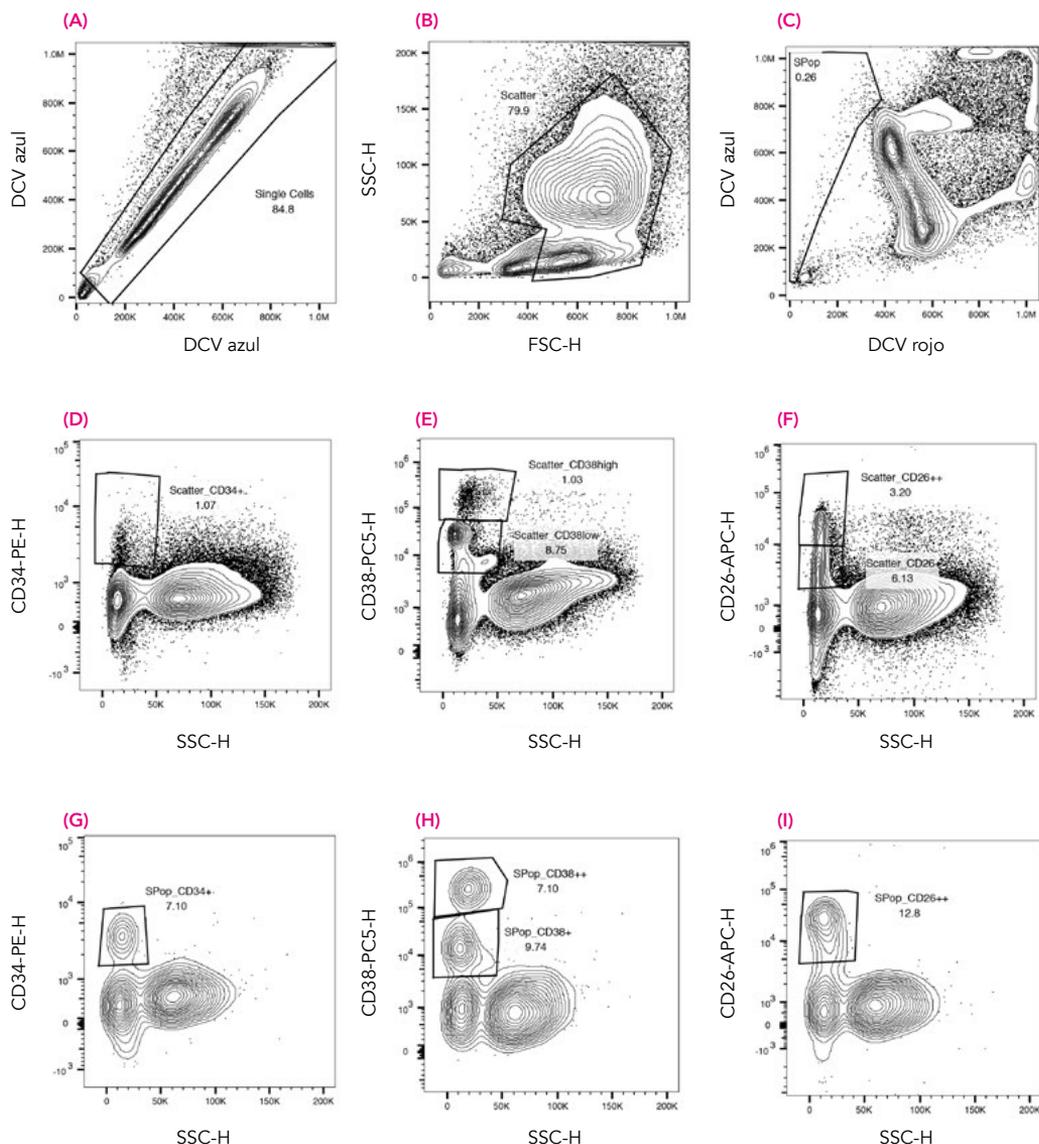


Figura 31. Ejemplo representativo del análisis de la SPop y del inmunofenotipo mediante el software FlowJo. La imagen corresponde al paciente 8 (Tabla 21) en el momento de la recaída molecular. Se utilizaron los *contour plots* para definir la región de interés. (A) La región marcada permite discriminar los dobletes y seleccionar los eventos de única célula. (B) La región marcada corresponde a las células viables y nucleadas (linfocitos, monocitos y granulocitos) y permite eliminar células apoptóticas y ruido de fondo. (C) Selección de las células de la SPop mediante la fluorescencia emitida por DCV (azul vs. rojo). (D-F) *Contour plots* de PE-CD34, PE-Cy5-CD38 y APC-CD26 versus el *side-scattered light* (SSC) para la región seleccionada en la imagen B ("scatter"). (G-I) *Contour plots* de PE-CD34, PE-Cy-5-CD38 y APC-CD26 versus SSC para la región de las células SPop seleccionada en la imagen C.

3.2.1. Estudio cuantitativo de la subpoblación de células SPop al diagnóstico y durante el tratamiento con el ITQ

A continuación se muestran tres ejemplos representativos de la evolución de la fracción de células SPop desde el diagnóstico y/o durante el tratamiento con el ITQ (Figura 32).

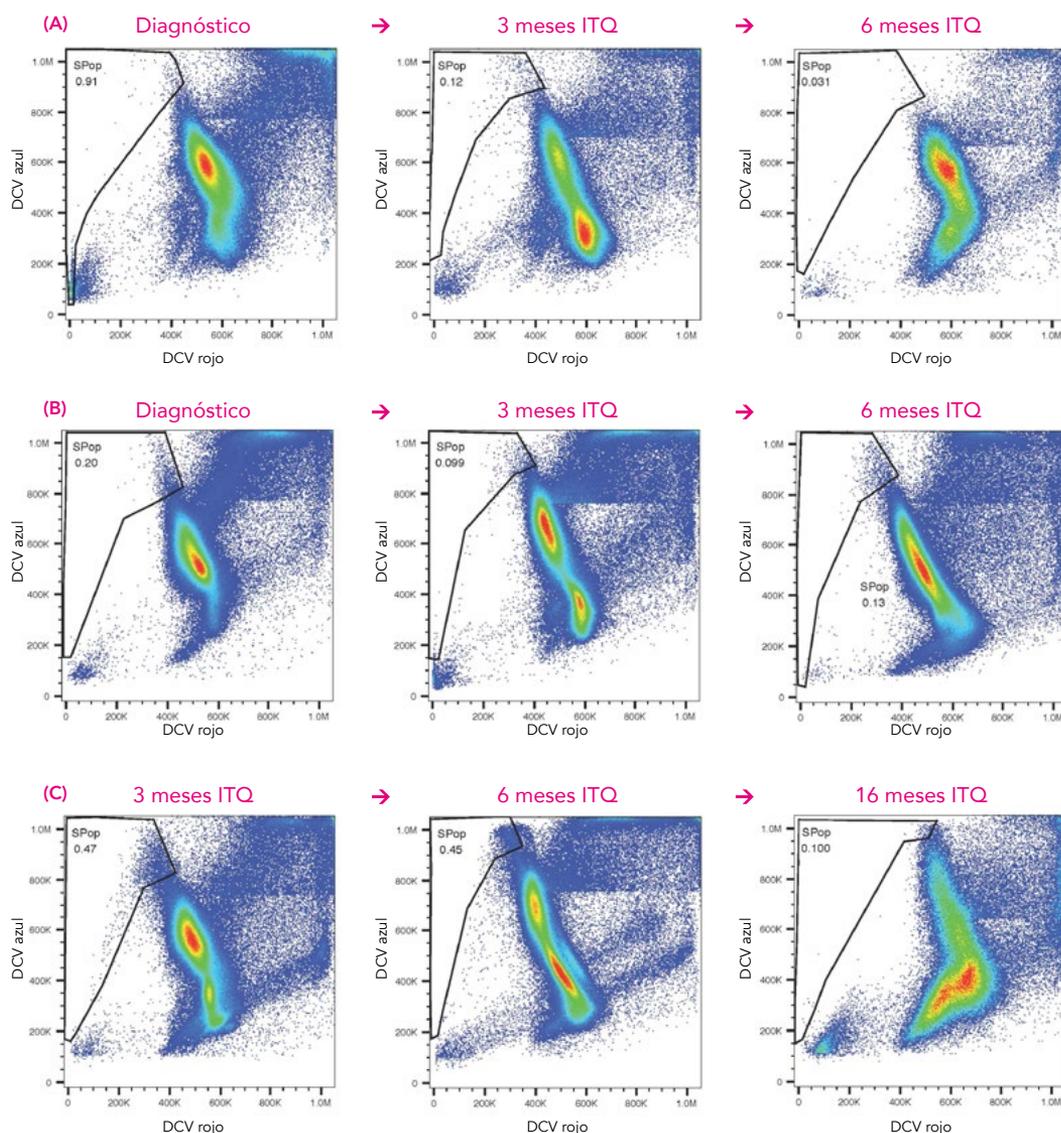


Figura 32. Imágenes correspondientes al análisis de la fracción de células SPop en tres pacientes estudiados desde el diagnóstico y a los 3 y 6 meses de tratamiento con el ITQ (A-B) y en un paciente estudiado a los 3 y 6 meses de tratamiento así como en la muestra posterior a la pérdida de la RMM (C).

La **primera paciente** (Figura 32-A) fue diagnosticada de LMC en FC a los 87 años de edad, con índice Sokal intermedio. La *ratio* BCR-ABL1/ABL1 (IS) en el momento del diagnóstico fue de 36,26% y el cariotipo mostró 20 metafases positivas para Ph, sin ninguna anomalía adicional. Inició tratamiento con imatinib pero se cambió a dasatinib por intolerancia. En el momento del diagnóstico, la muestra de MO mostró una proporción de células de la fracción SPop de 0,91%. La gran mayoría de estas células se ubicaron en la región inferior (negativas para DCV azul y rojo), indicativo de un grado elevado de quiescencia e indiferenciación. Esto se pudo confirmar al estudiar el inmunofenotipo; el 90% de las células SPop fueron negativas para CD34, CD38 y CD26 y solamente un 10% de ellas fue positiva para CD34. Para confirmar que las células de la parte inferior correspondieran a la fracción de células SPop, se seleccionó únicamente esta región y se descartó que fuesen células apoptóticas al representarlas en el gráfico para *forward vs. side scatter* (Figura 31-B). A los 3 meses de tratamiento con dasatinib, el paciente presentaba 5 metafases Ph+ y tenía una *ratio* <0,1%. La proporción de células SPop disminuyó y la mayoría se encontraban en la parte superior (mayor diferenciación). Al estudiar el inmunofenotipo se observó un aumento de células CD26+, las cuales eran negativas para CD34 y CD38. Finalmente, a los 6 meses de tratamiento con dasatinib la paciente consiguió la RM4 (*ratio* 0,0049%). En este momento, la proporción de células SPop disminuyó considerablemente. También se redujo la cantidad de células SPop CD26+ y aumentaron las SPop CD34+.

El **segundo paciente** (Figura 32-B) fue diagnosticado de LMC en FC a los 44 años, con índice Sokal bajo. La *ratio* BCR-ABL1 en el momento del diagnóstico fue de 406% y el cariotipo mostró 20 metafases positivas para Ph, sin ninguna anomalía adicional. Inició tratamiento con imatinib. En el momento del diagnóstico, la muestra de MO mostró una proporción de células de la fracción SPop de 0,2%, todas ellas ubicadas en la parte superior. No obstante, el estudio del inmunofenotipo mostró que la mayoría de células SPop eran negativas para CD34, CD38 y CD26. A los 3 meses de tratamiento con imatinib el paciente consiguió la RCC y la *ratio* fue de 1,09%. La proporción de células SPop disminuyó y aumentó la expresión de los tres marcadores (CD34, CD38 y CD26) en estas células. Se descartó la región de la parte inferior porque al analizarlas por separado (*forward vs. side scatter*) aparecían en la región correspondiente a las células apoptóticas. Finalmente, a los 6 meses de tratamiento con imatinib el paciente seguía en RCC pero sin llegar a obtener la RMM (*ratio* 0,486%). En este momento la proporción de células SPop fue algo superior a la del anterior control, se mantuvo la expresión de CD34 y disminuyó la expresión de CD26 en las SPop. Este paciente consiguió la RM4 a los 21 meses de tratamiento con imatinib.

La **tercera paciente** (Figura 32-C) fue diagnosticada de LMC en FC a los 18 años, con índice Sokal bajo. La *ratio* BCR-ABL1 en el momento del diagnóstico fue de 139% y el cariotipo mostró 20 metafases positivas para Ph, sin ninguna anomalía adicional. La paciente inició tratamiento con imatinib. No se pudo analizar la muestra en el momento del diagnóstico. A los 3 meses de tratamiento con imatinib, la paciente estaba en RCP (dos metafases Ph+) y tenía una *ratio* de 2,8%. En ese momento se observó una elevada proporción de células de la SPop; el 90% de estas eran negativas para los tres marcadores y un 10% eran CD34-CD38-CD26+. A los 6 meses de tratamiento con imatinib, la paciente ya estaba en RCC pero aún no había logrado alcanzar la RMM (*ratio* 0,327%). En este momento, la proporción de células SPop fue muy similar a la observada a los 3 meses, aunque en este caso prácticamente todas las células aparecían en la parte superior. Destaca el marcado aumento en la expresión de CD26, siendo el 90% de las células SPop CD34-CD38-CD26+. Cinco meses después, la paciente consiguió la RMM pero al poco tiempo la perdió. Se analizó la muestra de MO después de la pérdida de la RMM y cuando la paciente ya había recuperado este nivel de respuesta (*ratio* 0,0706%); a los 16 meses, la proporción de células SPop disminuyó de forma significativa y éstas mostraron un inmunofenotipo similar al observado a los 3 meses, siendo el 90% de ellas negativas para todos los marcadores. Hasta la fecha, la paciente no ha conseguido la RM4.

3.2.2. Análisis cuantitativo y caracterización inmunofenotípica de la subpoblación de células SPop en los pacientes que discontinuaron el tratamiento

Dado que el número de eventos de interés (recaídas moleculares) era bajo, se hizo un análisis meramente descriptivo de los datos disponibles y las diferencias encontradas entre los dos grupos deberían tomarse con cautela (Figura 33). Primero, se calculó el número absoluto de células SPop/mm³ tanto para los pacientes con LMC como para los pacientes estudiados al diagnóstico. Tal y como se observa en la Figura 33-A, el número de células SPop en el momento del diagnóstico de la LMC fue significativamente superior comparado con los valores de los pacientes en RMP que discontinuaron el ITQ (tanto para los que mantenían la RLT como para los que recayeron). No obstante, no se observaron diferencias entre los dos grupos de pacientes con LMC (RLT vs. recaída). Posteriormente, se analizó el total de células viables de la MO positivas para CD34, CD38 y CD26 en los pacientes con LMC que discontinuaron el tratamiento (Figura 33-B,C,D). Se observó una reducción significativa del número de células positivas para los tres marcadores entre el momento de la suspensión y el análisis a los 6 meses post-discontinuación en los pacientes que mantuvieron la RLT. Para el marcador CD26, los pacientes en RLT presentaron una cantidad significativa-

mente mayor de células CD26+ en el momento de la suspensión del ITQ comparado con los pacientes que perdieron la RMM. Sin embargo, las células CD26+ disminuyeron significativamente a los 6 meses post-discontinuación en los pacientes en RLT y aumentaron, mostrando una tendencia ($p=0,057$), en los pacientes con pérdida de RMM en el momento de la recaída. En cuanto a la expresión de estos mismos marcadores en la subpoblación de células de la SPop, en general se observó una baja proporción de células SPop positivas para dichos marcadores. Únicamente en los pacientes que mantuvieron la RLT, la expresión de CD38 y CD26 fue algo más elevada en el momento de la suspensión del tratamiento pero posteriormente se redujo de manera significativa (Figura 33-E,F,G).

Finalmente, se representó gráficamente el valor absoluto (cels/mm³) de la población de células CD34+CD38-CD26+ tanto para el total de células viables de la MO como dentro de la población de células SPop (Figura 33-H,I), siendo muy similares entre ambos grupos de pacientes (RLT vs. recaída). Solamente destaca el aumento (no significativo) de células SPop CD34+CD38-CD26+ en el momento de la recaída en los pacientes que pierden la RMM.

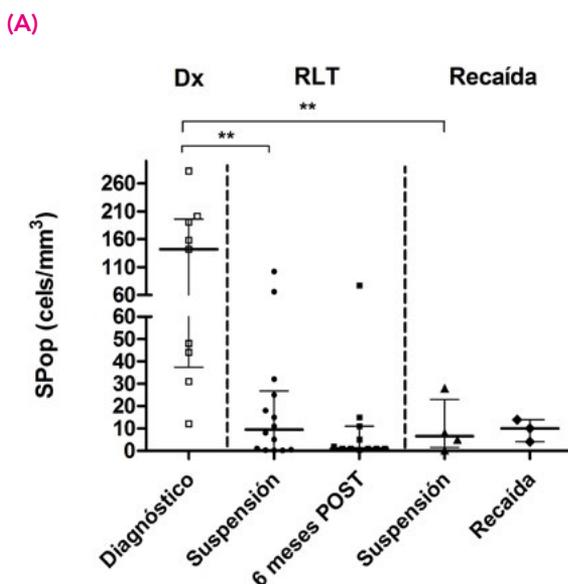


Figura 33. (Continúa en la página siguiente).

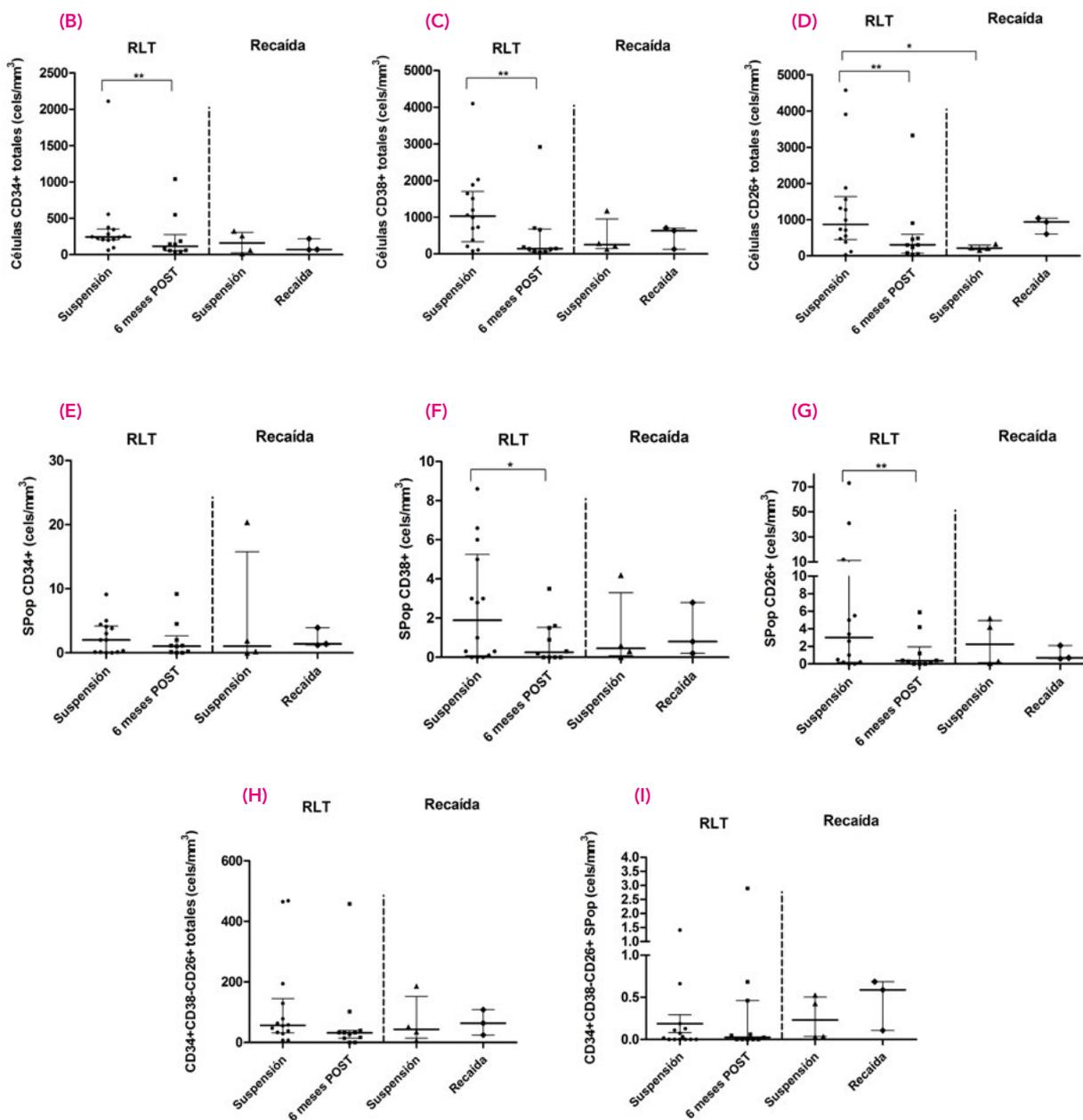


Figura 33. Cifra absoluta del total de células SPop (A), del total de células viables de la MO positivas para CD34 (B), CD38 (C) y CD26 (D) y el total de células de la SPop positivas para CD34 (E), CD38 (F) y CD26 (G). Los dos últimos gráficos muestran la cifra absoluta de células CD34+CD38-CD26+ en (H) el total de células viables en la MO y (I) en la fracción de células SPop. Cada punto corresponde a una muestra y las barras representan la mediana + rango intercuartil (IQR). Todas las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo de enfoque acústico Attune™ NxT (Thermo Fisher). RLT: remisión libre de tratamiento; 6 meses POST: 6 meses tras la discontinuación del ITQ. *: $p < 0,05$; **: $< 0,01$.

3.3. Análisis y cuantificación de las células *Natural Killer*

El estudio de las diferentes poblaciones de células NK se realizó en un total de **18 pacientes** (Tabla 21). El análisis se llevó a cabo en el momento de la suspensión del ITQ y a los 6 meses post-suspensión (en aquellos pacientes en RLT y con este período de seguimiento, n = 11) o en el momento de la recaída y siempre antes de reiniciar el ITQ (n = 4). En el paciente Pt-14 (Tabla 21) no fue posible el análisis a los 6 meses post-suspensión y dos pacientes (Pt-16 y Pt-18, Tabla 21) presentaban, en el momento de escritura de esta tesis, un período de seguimiento post-discontinuación inferior a los 6 meses. Además, se analizaron las células NK en un total de **10 controles sanos**.

En la Figura 34 se muestra un ejemplo del análisis llevado a cabo para la cuantificación de las células NK (total y diferentes subtipos).

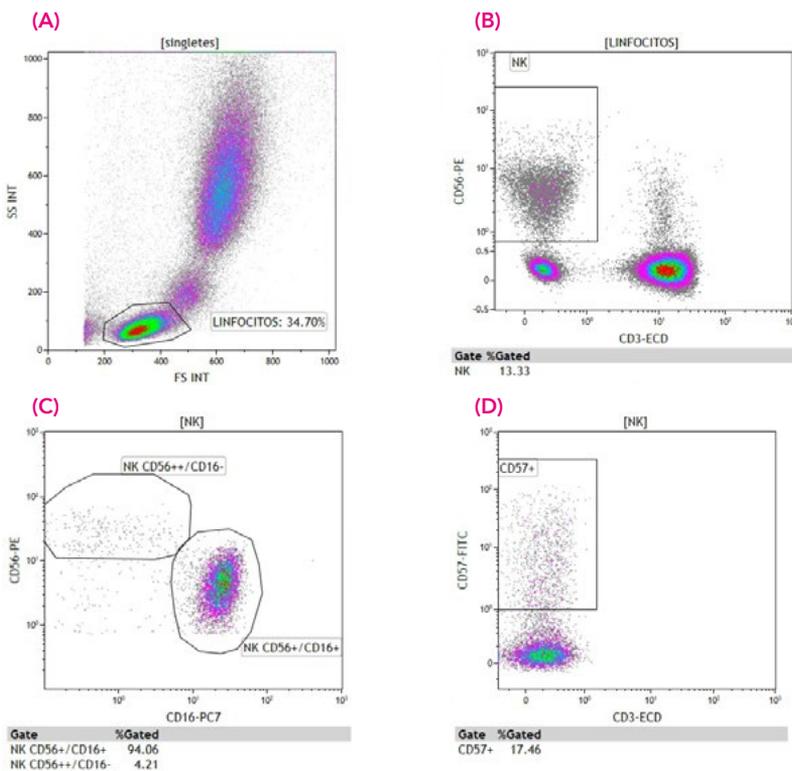


Figura 34. Ejemplo representativo del análisis de las diferentes poblaciones de células NK mediante el software *Kaluza analysis*. (A) Selección de los linfocitos, discriminando por tamaño y complejidad morfológica (*forward vs. side scatter*, FS vs. SS). (B) En la población de linfocitos, selección de las células NK (CD3-CD56+), excluyendo los linfocitos T (CD3+). (C) En la población de células NK, selección de las células NK CD56bright (CD56++/CD16-) y las células NK CD56dim (CD56+/CD16+). (D) En la población de células NK, selección de las células NK CD57+.

De la misma manera que en el apartado anterior, por el número reducido de eventos (recaídas) en el momento del análisis, se estudiaron los datos de forma descriptiva y las diferencias encontradas entre los dos grupos no son concluyentes. En relación al **número total de células NK** (valor absoluto), los controles sanos presentaron valores superiores comparado con los pacientes con LMC en el momento de la suspensión del ITQ (mediana 226 cels/mm³ (extremos 190 - 610)), siendo esta diferencia significativa al compararlo con los pacientes que mantuvieron la RLT (mediana 201,5 cels/mm³ (extremos 82 - 507), $p=0,043$) y con una tendencia (no significativa) al compararlo con los pacientes que presentaron recaída molecular (mediana 218 cels/mm³ (extremos 126-218), $p=0,056$) (Figura 35-A). Los pacientes que mantuvieron la RLT presentaron un aumento significativo en el número de células NK totales a los 6 meses post-discontinuación (mediana 279 cels/mm³ (extremos 114 - 505), $p=0,048$), a diferencia de los que recayeron, ya que se observó una reducción (mediana 148 cels/mm³ (extremos 57,6 - 414), no significativa) del número de células NK en todos los pacientes excepto en un paciente (Pt-15, Tabla 21), en el que estas células aumentaron. No obstante, el promedio de células NK totales no fue significativamente diferente entre los pacientes en RLT y los pacientes con recaída en el momento de la suspensión del tratamiento ($p=0,915$), siendo, de hecho, algo superior en el grupo de las recaídas (201,5 cels/mm³ vs. 218 cels/mm³).

Respecto a la fracción de células NK más inmaduras, con elevada expresión del marcador CD56 (**NK CD56bright**), no se observaron diferencias significativas entre los pacientes en RLT y los pacientes con recaída en el momento de la discontinuación (medianas 5 cels/mm³ vs. 4,5 cels/mm³, respectivamente, $p=0,915$). Tampoco se observaron diferencias significativas entre ningún otro grupo. En este caso, los pacientes con LMC presentaron un mayor número de estas células comparado con los controles sanos (mediana controles sanos 3 cels/mm³ (extremos 1 - 13), diferencias no significativas) (Figura 35-B).

Siguiendo un patrón similar al observado en el número de células NK totales, la fracción de células NK más maduras y citotóxicas, las **NK CD56dim** (con baja expresión del marcador CD56) fueron superiores en los controles sanos (mediana 215,5 cels/mm³ (extremos 170 - 540)) comparado con los pacientes con LMC, siendo significativas las diferencias al compararlo con los pacientes en RLT en el momento de la discontinuación (mediana 174 cels/mm³ (extremos 69 - 476), $p=0,033$) y mostrando una tendencia en los pacientes que presentaron recaída (mediana 199 cels/mm³ (extremos 117,9 - 203), $p=0,054$). No se observaron diferencias en el momento de la discontinuación entre los pacientes en RLT y los que recayeron, pero sí dentro del grupo de pacien-

tes en RLT, ya que la fracción CD56dim aumentó a los 6 meses post-discontinuación (mediana 255 cels/mm³ (extremos 81 - 480), $p=0,024$). En el caso de los pacientes con pérdida de RMM, todos presentaron una disminución de las células CD56dim excepto un paciente, en el que, a diferencia del resto, aumentaron (Pt-15, Tabla 21) (mediana 129,8 cels/mm³ (extremos 47 - 402), Figura 35-C).

Finalmente, al estudiar la fracción de células **NK CD57+** (las más maduras y diferenciadas) no observamos diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos. No obstante, en el momento de la discontinuación la mediana de esta fracción celular en los pacientes que mantuvieron la RLT fue algo superior comparado con los pacientes que recayeron. Estas células aumentaron en el grupo de pacientes que mantuvo la RLT a los 6 meses tras la discontinuación, aunque esta diferencia no fue significativa ($p=0,182$) (Figura 35-D).

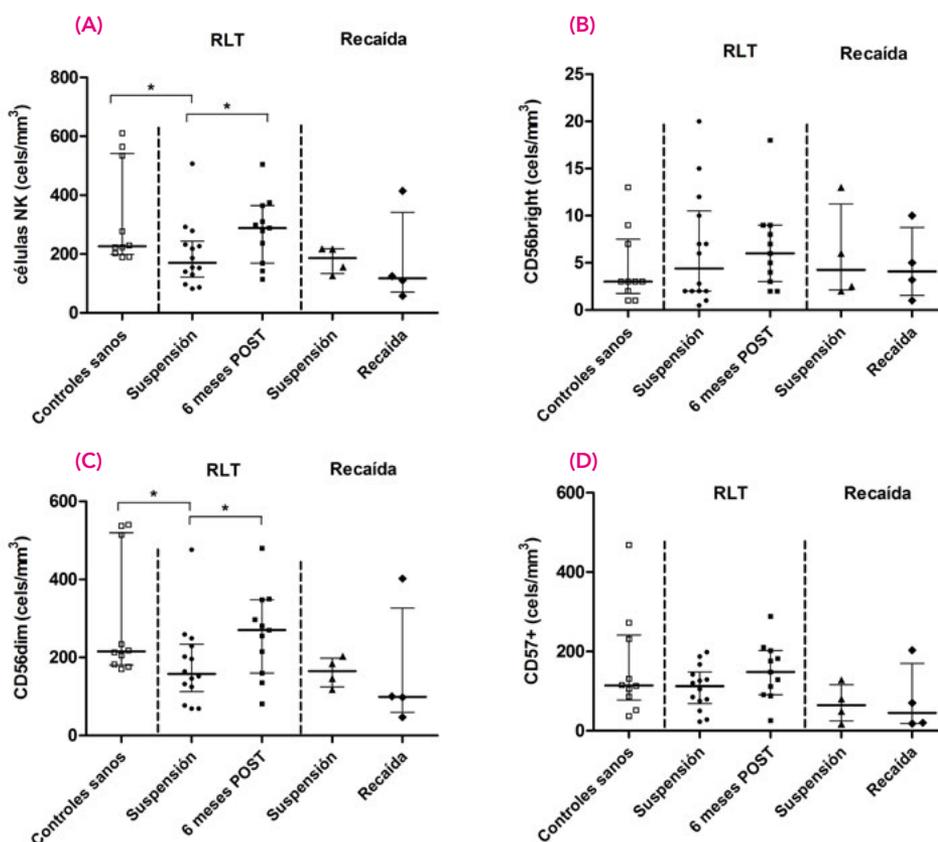


Figura 35. Cifra absoluta de células NK totales (A), células NK CD56bright (B), células NK CD56dim (C) y células NK CD57+ (D) para los controles sanos y los pacientes con LMC que discontinuaron el tratamiento (momento de la suspensión y 6 meses post-suspensión/recaída). Cada punto corresponde a una muestra y las barras representan la mediana + IQR. RLT; remisión libre de tratamiento. *; $p < 0,05$.

3.4. Análisis caso a caso: descripción integrada de los diferentes parámetros biológicos estudiados en los pacientes que presentaron recaída molecular y comparación con pacientes que mantuvieron la RLT.

Con el objetivo de estudiar en profundidad las características biológicas de los pacientes con recaída molecular de los que se dispone de datos biológicos (Tabla 21), a continuación se presenta caso por caso (n=4) el análisis integrado de estos parámetros y se compara con un paciente con características clínicas basales similares (años ITQ, años en RM4 y años en RM4.5) y que continuaba en RLT en el momento del análisis. Se muestran las imágenes correspondientes al análisis de la SPop en el momento de la discontinuación y en el momento de la recaída o a los 6 meses post-discontinuación en los pacientes que mantenían la RLT. En las tablas se recogen los datos de mayor relevancia obtenidos en los diferentes estudios biológicos llevados a cabo en estos pacientes y se destacan las diferencias observadas entre el momento de la suspensión y en el análisis posterior.

3.4.1. Caso A: paciente n°8 (pérdida RMM) vs. paciente n°1 (RLT)

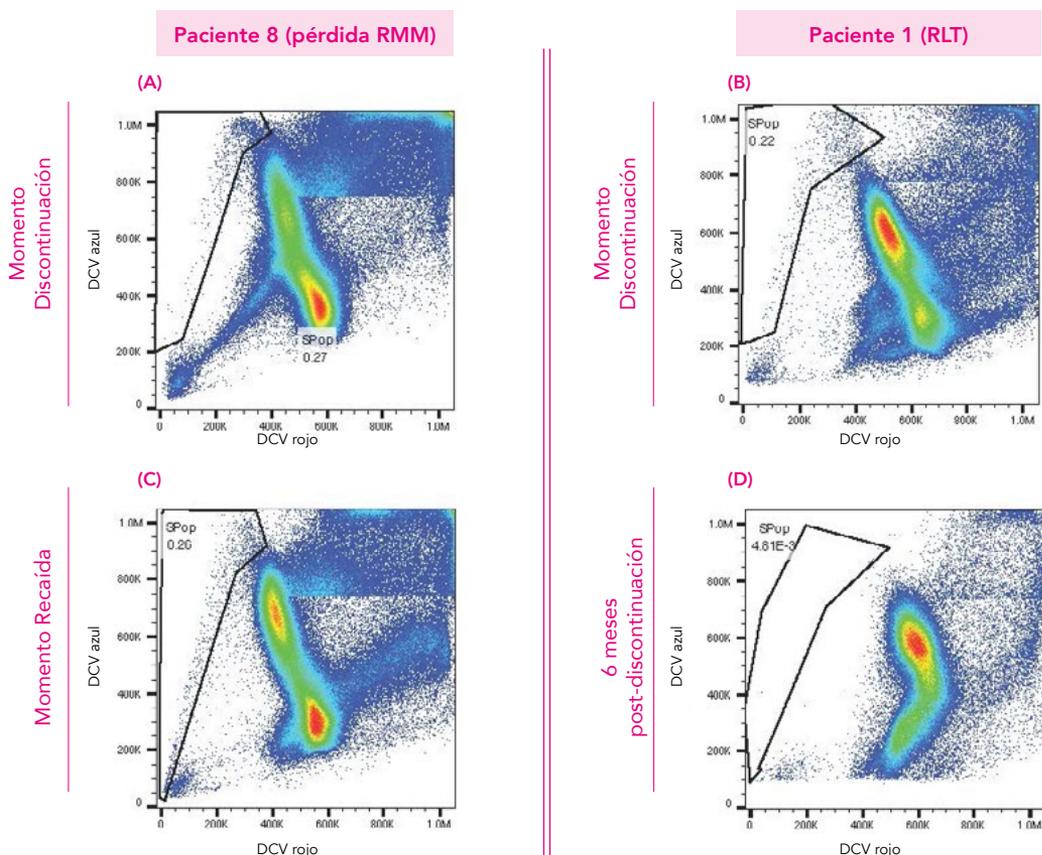


Figura 36. Imágenes correspondientes al análisis de la fracción de células SPop en un paciente que recae (paciente 8) y en uno que mantiene la RLT (paciente 1). Se muestra el análisis en el momento de la discontinuación para ambos pacientes (A y B), en el momento de la recaída del paciente 8 (C) y a los 6 meses tras la discontinuación en el paciente 1 (D).

Tabla 22. Resumen de los principales hallazgos en los estudios biológicos.

	Paciente 8 (Pérdida RMM)	Paciente 1 (RLT)
Total años ITQ	8	8,5
Años en RM4	6,7	5,6
Años en RM4.5	5,4	5,1
SPop	La proporción de células SPop no varía entre el momento de la suspensión y el momento de la recaída. En la <u>suspensión</u> , SPop con menor expresión del transportador ABCG2 y con perfil más diferenciado (células parte superior). En la <u>recaída</u> , aumenta el número de células con elevada expresión de ABCG2 y más indiferenciadas (células de la parte inferior).	Reducción considerable de la proporción de células SPop. En la <u>suspensión</u> , mayor presencia de células diferenciadas (parte superior) que se reducen al mínimo a los <u>6 meses post-discontinuación</u> .
	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 14 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 215 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 157 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 35 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> Células totales CD34+ = 69 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 629 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 601 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 24,6 cels/mm ³	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 229 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 728 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 712 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 129 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> Células totales CD34+ = 281 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 1175 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 86 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 0 cels/mm ³
	Inmunofenotipo SPop: <u>Suspensión:</u> SPop CD34+ = 0 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0,3 cels/mm ³ SPop CD26+ = 4,2 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,034 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> SPop CD34+ = 1,2 cels/mm ³ SPop CD38+ = 2,8 cels/mm ³ SPop CD26+ = 2,1 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,108 cels/mm ³	Inmunofenotipo SPop: <u>Suspensión:</u> SPop CD34+ = 2 cels/mm ³ SPop CD38+ = 3 cels/mm ³ SPop CD26+ = 11 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,129 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> SPop CD34+ = 0,2 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0,3 cels/mm ³ SPop CD26+ = 0,2 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0 cels/mm ³
Células NK	Reducción de células NK totales entre la suspensión y la recaída.	Aumento células NK totales entre la suspensión y los 6 meses posteriores.
	CD56bright: se mantienen iguales.	CD56bright: aumentan un mínimo.
	CD56dim: disminuyen en la recaída.	CD56dim: aumentan.
	CD57+: se mantienen iguales.	CD57+: aumentan un mínimo.
dPCR	5 muestras estudiadas: 3 positivas por dPCR (12 meses PRE, 6 meses PRE y momento suspensión)	7 muestras estudiadas: todas negativas por dPCR excepto 1 (6 meses POST)
	<u>Suspensión:</u> 0,0734 copias BCR-ABL1/μL	<u>Suspensión:</u> 0 copias BCR-ABL1/μL

RMM: respuesta molecular mayor; RLT: remisión libre de tratamiento; ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa; RM4: respuesta molecular grado 4; RM4.5: respuesta molecular grado 4.5; SPop: *side population*; NK: *natural killer*; dPCR: PCR digital; PRE: previo a la discontinuación; POST: tras la discontinuación.

Los dos pacientes analizados presentaban unas características basales muy parecidas. En este caso, el paciente que recayó tras la discontinuación (Pt-8) llevaba más años en RM4 que el paciente que seguía en RLT (Pt-1).

A nivel biológico, la proporción de células SPop fue muy similar entre ambos pacientes en el momento de la suspensión del ITQ, pero se redujo prácticamente a cero en el paciente que mantuvo la RLT a los 6 meses post-suspensión. En cambio, el paciente que recayó tenía una cantidad de células SPop superior en el momento de la recaída. En este caso se observó un cambio de fenotipo de las células SPop, más diferenciadas y con menor expresión del transportador ABCG2 en el momento de la suspensión (aparecen en la parte superior) y con un fenotipo más indiferenciado y con mayor expresión de ABCG2 en el momento de la recaída (células de la parte inferior).

Respecto al inmunofenotipo de las células viables de la MO, en el Pt-8 se observó un aumento de la expresión de todos los marcadores de superficie entre la suspensión y la recaída, aunque las células CD34+CD38-CD26+ disminuyeron ligeramente. En cambio, en el Pt-1, el cambio que más destaca es la disminución de células CD34+CD38-CD26+, siendo nulas a los 6 meses post-discontinuación.

En referencia al inmunofenotipo de las células SPop, en el Pt-8 la expresión de CD26 en las células SPop disminuyó entre ambos tiempos; en la discontinuación, el 83% de las células que aparecen en la parte superior eran CD26+. En cambio, en la recaída, las células de la parte superior perdieron expresión de CD26 (11%) y aumentaron la expresión de CD34 (de 2% a 13%) y CD38 (de 4% a 15%), y las células de la parte inferior presentaron muy poca expresión de estos 3 marcadores (indicativo de un mayor grado de quiescencia). En el caso del paciente que mantuvo la RLT (Pt-1), el 50% de las células SPop que aparecen en la parte superior en el momento de la discontinuación expresaban CD26, y la expresión de este marcador se redujo prácticamente a 0 en el análisis tras los 6 meses de discontinuación. A nivel general, la expresión de CD26+ en las células de la MO del paciente que recayó aumentó significativamente comparado con el paciente que mantuvo la RLT a los 6 meses.

En relación a las células NK, a pesar de que el pt-8 (recaída) tenía un mayor número de células NK totales en el momento de la suspensión comparado con el paciente en RLT (pt-1) (218 cels/mm³ vs. 140 cels/mm³, respectivamente), el paciente que recayó presentó una reducción significativa de estas células en el momento de la recaída, a diferencia del paciente en RLT, en el que aumentaron. Destacar la diferencia en el número de células NK CD57+ entre ambos pacientes, mucho menor en el paciente que recayó, tanto en el momento de la suspensión como en la recaída (17 cels/mm³ y

18 cels/mm³ en el paciente con recaída vs. 75 cels/mm³ y 88 cels/mm³ en el paciente RLT). El análisis de las copias de BCR-ABL1 por *dPCR* parecía indicar mayor persistencia de células de la LMC en el paciente que recayó.

3.4.2. Caso B: paciente n°11 (pérdida RMM) vs. paciente n°12 (RLT)

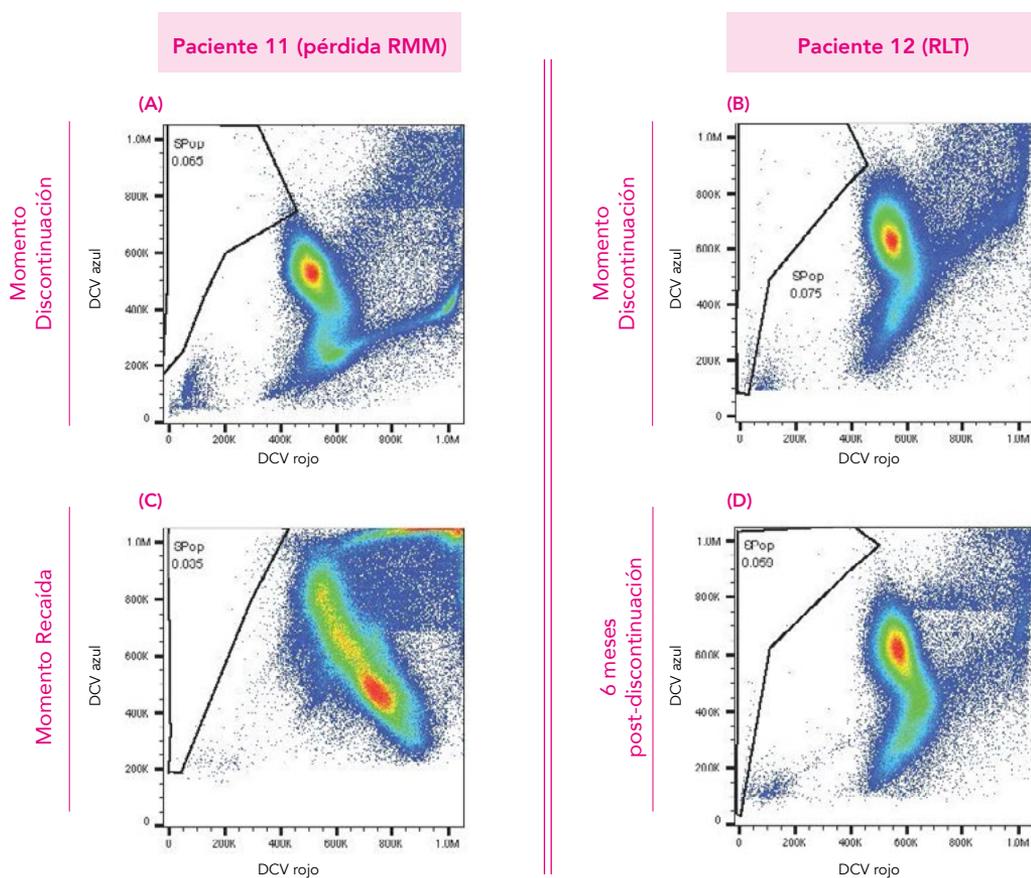


Figura 37. Imágenes correspondientes al análisis de la fracción de células SPop en un paciente que recae (paciente 11) y en uno que mantiene la RLT (paciente 12). Se muestra el análisis en el momento de la discontinuación para ambos pacientes (A y B), en el momento de la recaída del paciente 11 (C) y a los 6 meses tras la discontinuación en el paciente 12 (D).

Tabla 23. Resumen de los principales hallazgos en los estudios biológicos.

	Paciente 11 (Pérdida RMM)	Paciente 12 (RLT)
Total años ITQ	7,8	7,6
Años en RM4	4	5,6
Años en RM4.5	4	4,6
SPop	La proporción de células SPop disminuye ligeramente entre el momento de la suspensión y el momento de la recaída. Tanto en la suspensión como en la recaída, la mayoría de células SPop aparecen en la parte superior (más diferenciadas y menor expresión de ABCG2).	La proporción de células SPop disminuye ligeramente entre el momento de la suspensión y los 6 meses posteriores. En ambos tiempos de análisis, la mayoría de células SPop aparecen en la parte inferior (indiferenciadas y con mayor expresión de ABCG2).
	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 323 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 836 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 221 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 7 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> Células totales CD34+ = 218 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 600 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 934 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 108 cels/mm ³	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 209 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 994 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 381 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 38 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> Células totales CD34+ = 186 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 102 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 83 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 102 cels/mm ³
	Inmunofenotipo SPop: <u>Suspensión:</u> SPop CD34+ = 1,9 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0,6 cels/mm ³ SPop CD26+ = 0,3 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,427 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> SPop CD34+ = 3,9 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0,8 cels/mm ³ SPop CD26+ = 0,7 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,685 cels/mm ³	Inmunofenotipo SPop: <u>Suspensión:</u> SPop CD34+ = 3,82 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0,3 cels/mm ³ SPop CD26+ = 0,19 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 1,407 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> SPop CD34+ = 1,1 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0 cels/mm ³ SPop CD26+ = 0 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,684 cels/mm ³
Células NK	Reducción de células NK totales entre la suspensión y la recaída.	Reducción de células NK totales entre la suspensión y los 6 meses POST.
	CD56bright: se mantienen iguales.	CD56bright: aumentan un mínimo.
	CD56dim: disminuyen en la recaída.	CD56dim: disminuyen.
dPCR	CD57+: disminuyen en la recaída.	CD57+: disminuyen un mínimo.
	7 muestras estudiadas: 2 positivas por dPCR (momento suspensión y 1 mes POST). <u>Suspensión:</u> 0,0744 copias BCR-ABL1/μL	7 muestras estudiadas: todas negativas por dPCR. <u>Suspensión:</u> 0 copias BCR-ABL1/μL

RMM: respuesta molecular mayor; RLT: remisión libre de tratamiento; ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa; RM4: respuesta molecular grado 4; RM4.5: respuesta molecular grado 4.5; SPop: *side population*; NK: *natural killer*; dPCR: PCR digital; POST: tras la discontinuación.

Estos dos pacientes presentaban unas características basales muy similares en cuanto al total de años con ITQ, pero el total de años en RMP en el paciente que recayó (pt-11) fue algo inferior al total de años en RMP del paciente que mantuvo la RLT (pt-12).

A nivel biológico, la proporción de células SPop era muy similar entre ambos pacientes y para los dos tiempos de análisis. En el inmunofenotipo de las células viables de la MO, cabe destacar el aumento de células CD26+ totales en el paciente que recayó comparado con el paciente que mantuvo la RLT, en el que éstas disminuyeron. No obstante, la cantidad de células CD34+CD38-CD26+ fue similar entre ambos pacientes.

Respecto al inmunofenotipo de la SPop, en el pt-11 se observó que el 11% de las células SPop de la parte inferior presentes en el momento de la discontinuación eran CD34-CD38-CD26+ y que la expresión de todos los marcadores para esta fracción SPop de la parte inferior fue negativa en el momento de la recaída. En el pt-12, las células SPop en el momento de la discontinuación expresaban sobre todo CD34 (30%) y tenían una baja o nula expresión de CD38 y CD26. A los 6 meses post-discontinuación, aumentó la expresión de CD26 en las células SPop de la parte inferior (20%).

El papel de las células NK no sería relevante entre ambos pacientes ya que prácticamente presentaban un cantidad de células NK totales similares (también para los diferentes subtipos) en los dos análisis realizados en ambos pacientes, aunque el total de células NK en el momento de la suspensión fue algo superior en el paciente que mantuvo la RLT (232 cels/mm³ vs. 217 cels/mm³). En ambos casos, la cantidad total de células NK y los subtipos CD56dim y CD57+ disminuyen en el momento del análisis post-discontinuación. Igual que en el caso anterior (caso A), el análisis de las copias de BCR-ABL1 por dPCR parecía indicar mayor persistencia de células de la LMC en el paciente que recayó.

3.4.3. Caso C: paciente n°15 (pérdida RMM) vs. paciente n°10 (RLT)

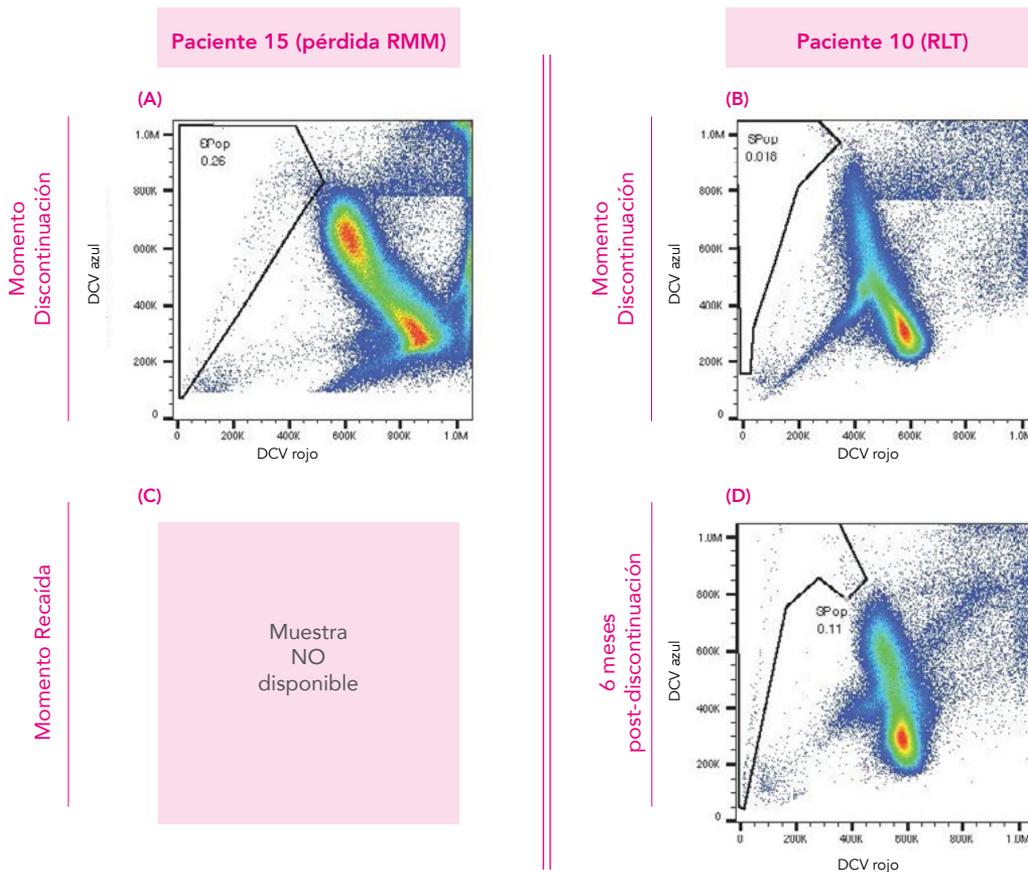


Figura 38. Imágenes correspondientes al análisis de la fracción de células SPop en un paciente que recae (paciente 15) y en uno que mantiene la RLT (paciente 10). Se muestra el análisis en el momento de la discontinuación para ambos pacientes (A y B), y a los 6 meses tras la discontinuación en el paciente 10 (D). No se pudo realizar el análisis en el momento de la recaída del paciente 15 (C).

Tabla 24. Resumen de los principales hallazgos en los estudios biológicos.

	Paciente 15 (Pérdida RMM)	Paciente 10 (RLT)
Total años ITQ	7,1	3,6
Años en RM4	2,4	2,9
Años en RM4.5	(1 mes)	2,4
SPOP	Mayor proporción de células SPOP en el momento de la suspensión, mostrando un patrón característico de estas células.	Muy poca cantidad de células SPOP en el momento de la <u>suspensión</u> . La proporción aumenta entre el momento de la suspensión y los 6 meses posteriores.
	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 260 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 286 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 325 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 186 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> No se pudo obtener muestra	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 61 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 107 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 28 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 7 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> Células totales CD34+ = 142 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 60 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 50 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 17 cels/mm ³
	Inmunofenotipo SPOP: <u>Suspensión:</u> SPop CD34+ = 20,4 cels/mm ³ SPop CD38+ = 4,2 cels/mm ³ SPop CD26+ = 5,2 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,527 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> No se pudo obtener muestra	Inmunofenotipo SPOP: <u>Suspensión:</u> SPop CD34+ = 0 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0 cels/mm ³ SPop CD26+ = 0 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> SPop CD34+ = 2 cels/mm ³ SPop CD38+ = 0 cels/mm ³ SPop CD26+ = 0,1 cels/mm ³ SPop CD34+CD38-CD26+ = 0,049 cels/mm ³
Células NK	Aumento de células NK totales entre la suspensión y la recaída.	Aumento de células NK totales entre la suspensión y los 6 meses POST.
	CD56bright: reducción mínima.	CD56bright: aumentan un mínimo.
	CD56dim: aumentan en la recaída.	CD56dim: aumentan.
	CD57+: aumentan en la recaída.	CD57+: aumentan un mínimo.
dPCR	5 muestras estudiadas: 4 positivas por dPCR (excepto momento suspensión).	7 muestras estudiadas: 4 muestras positivas por dPCR.
	<u>Suspensión:</u> 0 copias BCR-ABL1/μL	<u>Suspensión:</u> 0,171 copias BCR-ABL1/μL

RMM: respuesta molecular mayor; RLT: remisión libre de tratamiento; ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa; RM4: respuesta molecular grado 4; RM4.5: respuesta molecular grado 4.5; SPOP: *side population*; NK: *natural killer*; dPCR: PCR digital; POST: tras la discontinuación.

A pesar de que el paciente que recayó (pt-15) fue tratado durante más años con ITQ comparado con el paciente que mantuvo la RLT (pt-10) y el tiempo en RM4 fue muy parecido, destaca el hecho de que el pt-15 obtuvo la RM4.5 poco antes de suspender el tratamiento, por lo que llegó a estar en este nivel de respuesta no más de un mes. En cambio, el pt-10 consiguió la RM4.5 poco después de conseguir la RM4, y estuvo un total de 2,4 años en RM4.5 previo a la suspensión del ITQ. En este caso, no fue posible analizar la muestra en el momento de la recaída en el pt-15.

A nivel biológico, la principal diferencia entre ambos pacientes fue la cantidad de células SPop en el momento de la suspensión, ya que en el paciente que recayó la proporción fue mucho más elevada. El paciente que recayó (pt-15) presentó mayor cantidad de células CD34+CD38-CD26+ en la MO en el momento de la discontinuación comparado con el paciente que mantuvo la RLT (pt-10).

Respecto al inmunofenotipo de las células SPop, en el pt-15 el 60% de las células SPop expresaban CD34 a lo largo de toda la región marcada. El 45% de las células SPop de la parte inferior expresaban CD26 y este porcentaje se reduce a medida que subimos por la región delimitada. La expresión de CD38 también fue elevada (60%) en las SPop de la parte inferior. En cambio, en el pt-10 (RLT) las células SPop en el momento de la discontinuación tenían muy poca expresión de los tres marcadores. A los 6 meses post-discontinuación, solamente aumentó la expresión de CD34, llegando a ser de 80% en las células de la parte superior y del 55% en las células de la parte inferior, siendo todas ellas negativas para CD38 y CD26.

Respecto a las células NK, destacaba el aumento importante de células NK (todos los subtipos) en el momento de la recaída (pt-15). En ambos pacientes, las células NK totales, CD56dim y CD57+ aumentaron desde la discontinuación, pero el paciente que mantuvo la RLT tenía mayor cantidad de células NK totales en el momento de la suspensión (292 cels/mm³ vs. 156 cels/mm³). En relación al análisis de los transcritos BCR-ABL1 por dPCR, más de la mitad de las muestras estudiadas en ambos pacientes fueron positivas por dPCR. Esto podría ser debido a que el tiempo total en RMP en estos dos pacientes fue inferior al del resto de casos discutidos.

3.4.4. Caso D: paciente n°17 (pérdida RMM) vs. paciente n°16 (RLT)

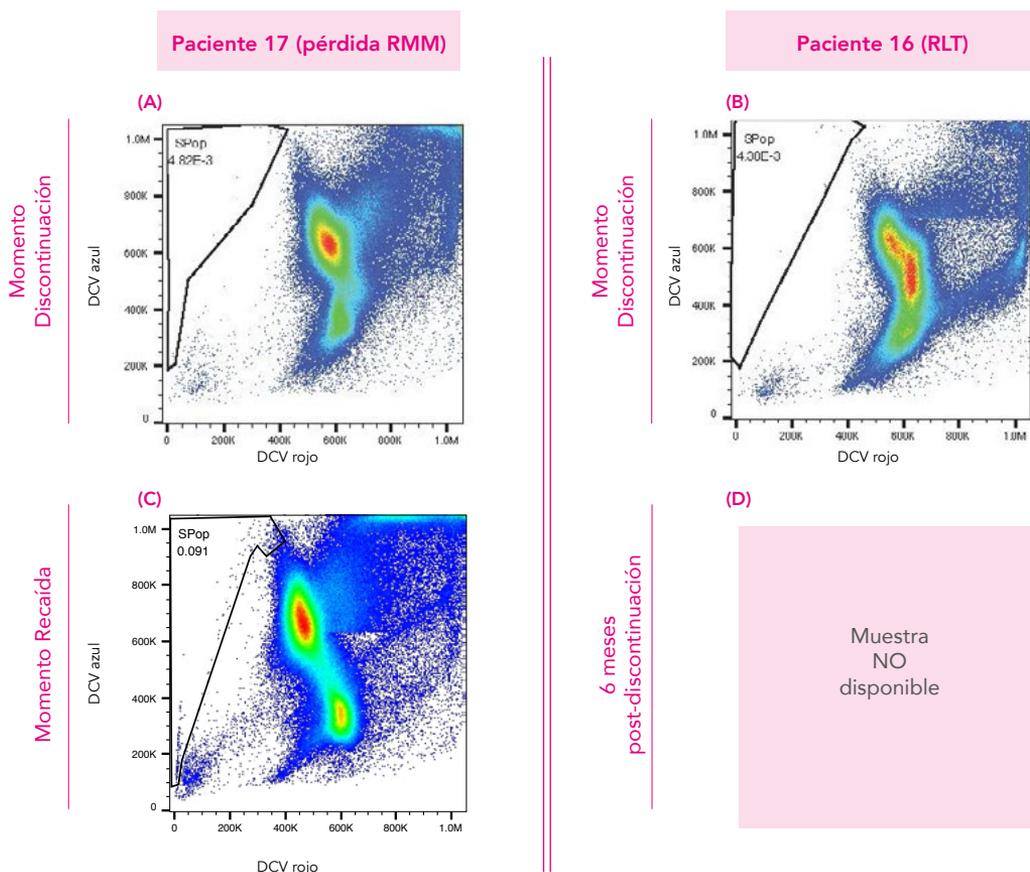


Figura 39. Imágenes correspondientes al análisis de la fracción de células SPop en un paciente que recae (paciente 17) y en uno que mantiene la RLT (paciente 16). Se muestra el análisis en el momento de la discontinuación para ambos pacientes (A y B), y en el momento de la recaída en el paciente 17 (C). El paciente 16, tenía un período de seguimiento post-discontinuación inferior a los 6 meses en el momento de escritura de esta tesis.

Tabla 25. Resumen de los principales hallazgos en los estudios biológicos.

	Paciente 17 (Pérdida RMM)	Paciente 16 (RLT)
Total años ITQ	8,3	5,9
Años en RM4	5,3	5,2
Años en RM4.5	1,7	4,3
SPOP	Presencia de células SPOP en el momento de la <u>suspensión</u> , bien definidas y en mayor cantidad en la parte inferior (más indiferenciadas y mayor expresión de ABCG2). Ligero aumento en el momento de la <u>recaída</u> .	Poca cantidad de células SPOP en el momento de la <u>suspensión</u> .
	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 62,5 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 128 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 212,2 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 51,7 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> Células totales CD34+ = 67,8 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 128,3 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 1039,7 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 63,6 cels/mm ³	Inmunofenotipo células viables MO: <u>Suspensión:</u> Células totales CD34+ = 94 cels/mm ³ Células totales CD38+ = 78 cels/mm ³ Células totales CD26+ = 115 cels/mm ³ Células CD34+CD38-CD26+ = 33 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> <6 meses en RLT
	Inmunofenotipo SPOP: <u>Suspensión:</u> SPOP CD34+ = 0,2 cels/mm ³ SPOP CD38+ = 0 cels/mm ³ SPOP CD26+ = 0,1 cels/mm ³ SPOP CD34+CD38-CD26+ = 0,036 cels/mm ³ <u>Recaída:</u> SPOP CD34+ = 1,4 cels/mm ³ SPOP CD38+ = 0,2 cels/mm ³ SPOP CD26+ = 0,6 cels/mm ³ SPOP CD34+CD38-CD26+ = 0,589 cels/mm ³	Inmunofenotipo SPOP: <u>Suspensión:</u> SPOP CD34+ = 0,1 cels/mm ³ SPOP CD38+ = 0 cels/mm ³ SPOP CD26+ = 0 cels/mm ³ SPOP CD34+CD38-CD26+ = 0,018 cels/mm ³ <u>6 meses post-discontinuación:</u> <6 meses en RLT
Células NK	Células NK totales: se mantienen exactamente iguales entre el momento de la <u>reducción de la dosis del ITQ</u> y el momento de la <u>suspensión</u> . Se reducen a la mitad en el momento de la <u>recaída</u> .	Células NK totales: se mantienen exactamente iguales entre el momento de la <u>reducción de la dosis del ITQ</u> y el momento de la <u>suspensión</u> .
	CD56bright: misma cantidad entre reducción dosis ITQ y suspensión pero aumento en el momento de la <u>recaída</u> .	CD56bright: misma cantidad entre reducción dosis ITQ y suspensión.
	CD56dim: misma cantidad entre reducción dosis ITQ y suspensión pero disminución a la mitad en el momento de la <u>recaída</u> .	CD56dim: misma cantidad entre reducción dosis ITQ y suspensión.
	CD57+: misma cantidad entre reducción dosis ITQ y suspensión pero disminución a la mitad en el momento de la <u>recaída</u> .	CD57+: misma cantidad entre reducción dosis ITQ y suspensión.

RMM: respuesta molecular mayor; RLT: remisión libre de tratamiento; ITQ: inhibidor de la tirosina quinasa; RM4: respuesta molecular grado 4; RM4.5: respuesta molecular grado 4.5; SPOP: *side population*; NK: *natural killer*.

A diferencia de los casos anteriores, estos dos pacientes fueron incluidos en la estrategia *DESTINY-like* (reducción de dosis a la mitad durante el año previo a la discontinuación). Se consideró conveniente comparar ambos pacientes y, a pesar de que el paciente que mantenía la RLT llevaba menos de 6 meses sin tratamiento, está ampliamente demostrado que la mayoría de recaídas se suelen producir en los primeros 6 meses. Es de destacar que el paciente que recae (pt-17) fue tratado con ITQ durante más tiempo que el paciente que mantuvo la RLT (pt-16) y el tiempo en RM4 fue muy similar. Sin embargo, el paciente en RLT llevaba mucho más tiempo en RM4.5 antes de discontinuar el tratamiento.

A nivel biológico, el paciente que recayó (pt-17) presentaba una mayor proporción de células SPop en el momento de la discontinuación. Además, presentó mayor cantidad de células CD34+CD38-CD26+ en la MO en el momento de la discontinuación comparado con el paciente que mantuvo la RLT (pt-16).

Respecto al inmunofenotipo de las células SPop, en el momento de la discontinuación, el 37% de las células SPop del pt-17 (recaída) eran CD34+CD38-CD26+. En cambio, en pt-16 la gran mayoría de las células SPop eran negativas para los tres marcadores. En el momento de la recaída del pt-17, la proporción de células SPop aumentó ligeramente, se redujo la expresión de CD34 y la expresión de CD26 se mantuvo similar a la del momento de la discontinuación.

Respecto a las células NK, estas fueron analizadas también en el momento de la reducción de la dosis del ITQ para ambos pacientes; no se observó prácticamente ninguna diferencia entre el momento de la reducción y el momento previo a la suspensión. En el paciente que recayó se observó una clara reducción del total de células NK, sobretodo de los subtipos más maduros y citotóxicos (CD56dim y CD57+).

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, el pronóstico de la LMC ha mejorado sustancialmente gracias a la aparición primero de imatinib y posteriormente de los ITQs-2G. Antiguamente era una neoplasia incurable en muchos casos, pero hoy en día tiene una supervivencia similar a la de la población general.

Caracterizada por un evento molecular único, el reordenamiento BCR-ABL1, la LMC ha puesto de manifiesto la importancia de entender los mecanismos moleculares que dan lugar a una enfermedad para poder desarrollar tratamientos dirigidos contra una diana. La mejoría en el pronóstico y supervivencia de los pacientes ha ido acompañado, a su vez, de un cambio en los objetivos terapéuticos de la LMC. Dadas las excelentes respuestas hematológicas y citogenéticas observadas en la gran mayoría de pacientes diagnosticados en FC y tratados con ITQ, hoy en día uno de los objetivos principales es que los pacientes consigan la RMM, ya que esto asegura una SLP de alrededor del 100% [166]. El siguiente objetivo terapéutico es lograr el máximo nivel de RM, la RMP, que a su vez permite plantear una posible estrategia de suspensión del tratamiento para conseguir una RLt a largo plazo [126].

A pesar de todos los avances experimentados, la LMC sigue presentando una serie de retos que dificultan la obtención de los objetivos terapéuticos anteriormente mencionados: bajo tratamiento con imatinib, alrededor de un 30% de los pacientes interrumpen el tratamiento por toxicidad o fracaso en la obtención de la RMM [58]. Por otro lado, se estima que únicamente entre el 35%-40% de los pacientes tratados con imatinib en primera línea conseguirá una RMP mantenida [28]. Con los ITQs-2G, la probabilidad de alcanzar tanto la RMM como la RMP es superior pero en ocasiones a costa de toxicidades graves [34,40,43]. Finalmente, sólo aquellos pacientes que consigan la RMP mantenida después de un periodo de tratamiento con ITQ de alrededor de dos años, podrán ser candidatos a discontinuar el tratamiento, pero aproximadamente el 50% de éstos recaerá (pérdida de la RMM) especialmente durante los primeros 6 meses post-suspensión. Aunque ciertos factores clínicos como la duración del tratamiento con ITQ y la duración de la RMP se asocian a una mayor probabilidad de recaída post-suspensión del tratamiento, esto no explica todas la recaídas observadas [79].

Por ello es interesante disponer de marcadores no sólo clínicos sino también biológicos que ayuden a predecir la respuesta óptima al tratamiento con imatinib, con el objetivo de optimizar al máximo el tratamiento, así como identificar los pacientes candidatos a suspender el tratamiento y que van a mantener la RLt a largo plazo. Todo ello permitiría aplicar una medicina mucho más personalizada a los pacientes con LMC para garantizarles alcanzar los diferentes objetivos terapéuticos con una alta probabilidad.

Por ello, la presente Tesis Doctoral se ha centrado en la identificación de nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a imatinib y de recaída tras la suspensión del ITQ. Por un lado, en el Trabajo I se ha estudiado la posible asociación entre determinados SNPs en genes ADME y el fracaso en la obtención de la RMM con imatinib. De la misma manera, el Trabajo II se focaliza en el análisis del papel de la LT al diagnóstico de la LMC como predictor de obtención de RMP con imatinib. De este modo, la presencia de un SNP concreto o una LT determinada al diagnóstico de la LMC nos permitiría identificar un grupo de pacientes con menor probabilidad de obtener una RMM o RMP con imatinib y nos obligaría a plantearnos un tratamiento con un ITQ-2G en primera línea.

Finalmente, el Trabajo III, se ha centrado en la identificación de posibles variables clínicas y biológicas (determinación de transcritos BCR-ABL1 mediante dPCR, cuantificación y caracterización de las células de la SPop y el análisis del inmunofenotipo de las células NK), que podrían estar implicados en el mantenimiento o no de la RLT tras la discontinuación del ITQ en pacientes con LMC tratados según el protocolo de discontinuación del ICO.

1

Resistencia primaria a imatinib: El papel de la farmacogenética

La diferencia en la eficacia de los ITQs es debida principalmente a la potencia de inhibición de BCR-ABL1 y, en ocasiones, a la pérdida de actividad cuando surgen mutaciones puntuales que bloquean la unión del ITQ a la oncoproteína BCR-ABL1 [167]. En ausencia de mutaciones, otros mecanismos, independientes de BCR-ABL1, pueden influir en la respuesta al ITQ.

Como otros muchos fármacos, los ITQs presentan una elevada variabilidad farmacocinética tanto intraindividual como interindividual. La variabilidad intraindividual está asociada a cambios fisiológicos y fisiopatológicos dentro de un mismo individuo, a la adherencia al tratamiento así como a las posibles interacciones farmacológicas [168]. Por otro lado, la variabilidad interindividual está más asociada a factores ambientales y/o genéticos. Parte de las marcadas diferencias entre individuos en cuanto a la farmacocinética de imatinib se puede explicar por variantes en los genes que codifican para transportadores y enzimas de metabolización de los fármacos, dando lugar a diferencias en su actividad. El estudio de los mecanismos implicados en este fenómeno es conocido con el nombre de farmacogenética.

En la LMC, varios estudios han analizado la influencia de polimorfismos en genes ADME en la respuesta a imatinib, pero los que hay disponibles hasta el momento presentan algunas limitaciones, como el hecho de incluir poblaciones heterogéneas de pacientes en diferentes fases de la enfermedad y tratados con otros ITQs además de imatinib en primera línea, así como el hecho de tener un tamaño de muestra reducido [67,169–172]. Además, la gran mayoría de estudios publicados se han centrado en evaluar un número reducido de SNPs en un número limitado de genes [66,173–176].

En el Trabajo I de esta tesis, se han genotipado 1936 marcadores en 231 genes relacionados con la farmacogenética mediante el *array* DMET de Affymetrix. El Trabajo I se diseñó en dos fases (ambas con pacientes diagnosticados de LMC en FC): una fase piloto inicial donde se utilizó este *array* DMET en un total de 45 pacientes y una fase posterior de extensión con una cohorte independiente de 137 pacientes, don-

de se analizaron únicamente los SNPs significativamente asociados con la respuesta a imatinib obtenidos en el estudio piloto. Para el estudio de extensión se utilizó la plataforma de genotipado *Dynamic Array*TM IFC de Fluidigm.

Cabe destacar que en el estudio piloto (n=45), la proporción de pacientes clasificados como no-respondedores (casos) a imatinib (62%) no se corresponde con lo observado en la literatura. Esto es así por dos motivos: el primero es porque al tener un número reducido de pacientes, la selección de estos se hizo con el objetivo de maximizar la presencia de pacientes no-respondedores (casos), equilibrando de esta manera los dos grupos de pacientes e incrementando así la probabilidad de encontrar asociaciones con los polimorfismos estudiados. El segundo motivo es que para este primer estudio se consideró como no-respondedor aquellos pacientes con ausencia de respuesta óptima a los 12 meses (ratio BCR-ABL1^{IS}>0,1%, que incluye tanto pacientes con criterios de alarma como pacientes con criterios de fracaso). Sin embargo, en el estudio de extensión posterior (n=137), se consideró como no-respondedores únicamente a los pacientes en situación de fracaso, (según las recomendaciones de la ELN de 2013), que motivara a un cambio de ITQ. Por ello, en este estudio de extensión la proporción de pacientes resistentes a imatinib (27%) sí que se corresponde con lo reportado en la literatura [28,58].

1.1. Polimorfismos en genes implicados en el transporte de imatinib hacia el interior y el exterior de las células

Las alteraciones en la expresión y actividad de determinados transportadores juegan un papel fundamental en la capacidad de los ITQs para acceder y permanecer en el interior de las células leucémicas, donde pueden ejercer su efecto citotóxico. Algunas de estas alteraciones pueden dar lugar a resistencia primaria al tratamiento, dado que provocan una disminución de la concentración efectiva en la célula, tanto por una disminución en la captación del fármaco como por un aumento en la excreción del mismo.

Uno de los mecanismos de entrada al interior celular mejor estudiados en la LMC es el transportador **hOCT1**, también conocido como **SLC22A1**. Éste ha sido ampliamente relacionado con el **transporte activo hacia el interior celular** tanto de imatinib como de la metformina (fármaco usado para tratar la diabetes tipo II), entre otros. Algunos estudios sugieren que la variabilidad en la expresión y actividad de hOCT1 juega un papel fundamental en la respuesta a imatinib; aquellos pacientes que presentan baja actividad de este transportador tienen una menor probabilidad

de conseguir la RMM, mientras que aquellos con elevada expresión presentan mayores tasas de RCC, RMM [177,178] e incluso de RMP [179]. No obstante, esto sigue siendo un tema controvertido ya que se ha visto que la metodología para la cuantificación de la expresión de *hOCT1* (sobre todo en relación al diseño de los *primers*), podría influir claramente en los resultados obtenidos [66]. En esta línea, en un metanálisis realizado por Watkins y cols. [180], se describió que los niveles de expresión de *hOCT1* no estaban asociados con la RMM a los 12 meses de tratamiento con imatinib, pero sí podría estar relacionado con respuestas tardías (más allá de los 60 meses de tratamiento). Además de los niveles de expresión de *hOCT1*, varios estudios se han centrado en la identificación de polimorfismos en el gen *hOCT1/SLC22A1* y su relación con la respuesta a imatinib. Los estudios más relevantes al respecto se describen a continuación: Kim y cols., estudiaron un total de 5 SNPs en 229 pacientes y encontraron una asociación entre el genotipo GG de rs683369 (L160F) y la pérdida de respuesta y fracaso a imatinib [169]. Bazeos y cols. demostraron, en una cohorte de 132 pacientes con LMC, que el rs34130495 (G401S) se asociaba a la RM con imatinib. Sin embargo, no encontraron ninguna correlación para los SNPs rs12208357 (R61C), rs2282143 (P341L), rs4646277 (P283L), rs4646278 (R287G), rs55918055 (C88R) y rs622342 (variante intrónica) [181]. Zach y cols. analizaron la presencia del SNP rs12208357 en 35 pacientes con LMC y no encontraron ninguna asociación con la respuesta a imatinib [182]. Maffoli y cols. no observaron ninguna asociación entre los polimorfismos rs12208357, rs628031 (M408V) y rs35191146 (M420del), y la respuesta a imatinib en 65 pacientes [171]. White y cols. analizaron un total de 136 pacientes con LMC y tampoco obtuvieron ninguna correlación estadísticamente significativa entre 8 SNPs del gen *SLC22A1* (rs12208357, rs34130495-G401S, rs55918055-C88R, rs2282143, rs36103319-G220V, rs34059508-G465R, rs628031 y rs35191146) y la RMM a imatinib, la progresión a fases avanzadas de la enfermedad o la actividad en *hOCT1* [183], aunque estos mismos autores sí habían demostrado anteriormente una correlación entre los niveles de expresión de *hOCT1* y la respuesta a imatinib [62]. Takahashi y cols., en una cohorte de 67 pacientes japoneses afectados de LMC encontraron una asociación entre el genotipo GG de rs628031 y la obtención de la RMM con imatinib [184]. Angelini y cols. describieron una asociación entre la RMM con imatinib y una combinación de 4 SNPs de *SLC22A1* (rs72552763-MI420I, rs12208357, rs683369-L160P y rs2282143) [176]. Uno de los estudios de mayor relevancia es el publicado por Giannoudis y cols., en el que estudiaron, mediante cultivos *in vitro* con líneas celulares, el efecto de los polimorfismos rs628031(M408V) y rs35191146(M420del) en la eficacia de absorción de imatinib; las células portadoras de la delección M420del y el alelo M408 (M420del/M408) mostraron una reducción significativa de la absorción de imatinib comparado con las células

sin la delección (M420/M408), pero en cambio las células portadoras de la delección y además el alelo V408 (M420del/V408), no presentaron ninguna reducción en la absorción, lo cual sugiere que el alelo V408 estaría contrarrestando el efecto del polimorfismo M420del. Sin embargo, cuando estudiaron ambos polimorfismos en una cohorte de 195 pacientes con LMC, únicamente encontraron una asociación entre el SNP rs35191146(M420del) y la probabilidad de presentar fracaso al tratamiento con imatinib. Tal y como se ha mencionado anteriormente, estos mismos autores determinaron que algunos de los *primers* usados en estudios previos para la determinación de la expresión de *hOCT1* hibridan justamente con el codón 420, por lo que si la delección M420del está presente, se vería afectada la detección del ARNm [66]. Posteriormente, en un estudio publicado por Koren-Michowitz y cols., observaron una tendencia (p -valor=0,06) en la asociación entre los genotipos A/A-A/G de rs628031 y una mayor incidencia de fracaso en la respuesta a imatinib, así como una correlación entre estos genotipos y la SLE [173]. En esta misma línea, Vaidya y cols. también demostraron una correlación entre el SNP rs628031 y la obtención de RCC y RMM con imatinib [175].

En el Trabajo I, se analizaron un total de 25 SNPs presentes en el gen *SLC22A1* en el estudio piloto, mediante el *array* DMET, y únicamente se encontró una asociación estadísticamente significativa con el SNP **rs628031**. Posteriormente, este SNP fue analizado en la cohorte de extensión, donde mantuvo su significación tanto en el análisis de asociación para la cohorte total (bajo el modelo de herencia recesivo), como en el análisis de validación cruzada (modelo de herencia aditivo) y test por permutaciones (modelo de herencia recesivo). También se observó una asociación estadísticamente significativa al incluir la variable “tiempo” en el estudio, observando una mayor incidencia de RMM en el grupo de pacientes portadores de los genotipos G/G y A/G. El SNP rs628031 representa un cambio de adenina (A) por guanina (G) en la posición 1222 del gen *SLC22A1*, correspondiente al exón 7. La consecuencia de este SNP es una variante no-sinónima que implica el cambio del aminoácido metionina (Met, M) por valina (Val, V) en el codón 408 de la proteína (M [ATG] > V [GTG]). Según bases de datos poblacionales como *1000 Genomes*, *HapMap* o *ALFA Project*, en la población europea el alelo más frecuente para este SNP es el alelo G (59%), algo que pudimos confirmar en nuestra cohorte, siendo las frecuencias alélicas de rs628031 del 58% para el alelo G y del 42% para el alelo A. Nuestros resultados sugieren que tener dos copias del alelo A para este SNP, es decir, ser portador del genotipo A/A, estaría asociado a una mayor probabilidad de fracasar a imatinib. Este hallazgo está en línea con algunos de los estudios previamente descritos [173,184], así como lo observado en el metanálisis realizado por Cargnin y cols. [65]. No obstante, tal y como se concluye en este metanálisis, es importante tener en cuenta que los resulta-

dos obtenidos deben ser tomados con cautela por los siguientes motivos: en nuestra serie, los intervalos de confianza (IC95%) obtenidos tanto en el análisis de asociación para la cohorte total como los obtenidos en el análisis de incidencias acumuladas de RMM para este SNP, bajo el modelo de herencia recesivo, son bastante amplios y ello dificulta concluir con firmeza que existe esta asociación. Sería de interés analizar, en series más extensas de pacientes, la influencia de diferentes combinaciones de haplotipos con otros SNPs de *SLC22A1* e incluir en los estudios el papel de la medicación concomitante del paciente, sobretodo si presenta también diabetes tipo II, ya que el transportador *SLC22A1* tiene un papel relevante en la farmacocinética de la metformina y podría competir/interferir con la absorción de imatinib.

Además del transportador hOCT1/*SLC22A1*, imatinib también es sustrato para la **superfamilia de transportadores ABC**, como el transportador ABCB1 (anteriormente conocido como P-glicoproteína o *multidrug resistance protein 1*, MDR1) y el transportador ABCG2 (anteriormente conocido como *breast cancer resistance protein*, BCRP), los cuales están implicados en la **excreción de imatinib hacia el exterior de las células** [185,186]. Algunos estudios sugieren que imatinib actúa como inhibidor de estos transportadores [187,188], pero cada vez hay más evidencia y consenso en que esta inhibición se produce de manera dosis-dependiente y solamente ocurre si la concentración de imatinib es elevada [189]. Los transportadores ABCB1 y ABCG2 se expresan en una gran variedad de tejidos, incluyendo el hígado, intestino, riñón, placenta y la barrera hematoencefálica. La implicación de estos transportadores en la resistencia adquirida a los fármacos ha sido extensamente estudiada dado que parecen tener un papel evidente como mecanismo de defensa contra la penetración al interior celular de xenobióticos. La sobreexpresión de *ABCB1* confiere resistencia a imatinib en modelos de líneas celulares [190,191]. Varios estudios se han centrado en analizar el papel de ciertos polimorfismos en ambos genes de estos dos transportadores. En un metanálisis llevado a cabo por Zheng y cols., se revisaron diversos estudios que analizaban el papel de tres SNPs en el gen *ABCB1* (rs1128503-G412G, rs2032582-S893A/T y rs1045642-I1145I) concluyendo que cada uno de ellos se asocia con la respuesta a imatinib [192]. Por el contrario, Whang y cols. no encontraron ninguna relación con estos tres SNPs y la respuesta a imatinib [193]. Posteriormente, Jiang y cols. identificaron una asociación significativa entre el SNP rs2231142(C421A) de *ABCG2* y la obtención de RMM con imatinib, pero ninguno de los SNPs de *ABCB1* resultó significativo en este metanálisis [194]. En otro estudio llevado a cabo por Rajamani y cols., reportaron una asociación significativa entre el SNP rs1128503-C1236T del gen *ABCB1* y la obtención de la RMT a los 3 meses con imatinib. En este mismo estudio, observaron que los niveles plasmáticos de imatinib también tenían una asociación directa con la obtención de la RMT [195].

En el estudio piloto del Trabajo I se analizaron un total de 39 SNPs en el gen que codifica para el transportador ABCB1 (incluyendo los cuatro SNP mencionados anteriormente) y ocho SNPs en el gen que codifica para el transportador ABCG2 (incluyendo el rs2231142). No obstante, ninguno de ellos fue estadísticamente significativo en el estudio piloto, por lo que no se incluyó posteriormente en el estudio de extensión. Sin embargo, nueve SNPs en diferentes miembros de la superfamilia de transportadores ABC fueron significativos en el estudio piloto y fueron incluidos en el estudio de extensión (Tabla 9). Solo cuatro mantuvieron la significación en el estudio de extensión: el rs492338 del gen *ABCG1* y los SNPs rs496550, rs497692 y rs495714 del gen *ABCB11*. Todos ellos fueron significativos tanto en el análisis de asociación para la cohorte total, como en el análisis de validación cruzada y el test por permutaciones. Otro SNP en el gen *ABCB11*, el rs495714, fue significativo únicamente en el análisis de validación cruzada.

El transportador **ABCG1** (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*) se ha asociado con el transporte de macrófagos y el transporte transmembrana de colesterol y fosfolípidos [196,197]. El gen que codifica para este transportador se sitúa en el cromosoma 21 y está compuesto por un total de 15 exones. El **SNP rs492338** representa una variante intrónica, por lo que no supone ningún cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína, aunque podría jugar un papel importante en la correcta generación de las proteínas. En nuestro estudio, tener una o dos copias del alelo C se asoció con una mayor probabilidad de conseguir la RMM con imatinib. No obstante, este SNP no ha sido descrito previamente en la LMC ni tampoco ha sido relacionado con el transporte de imatinib ni con la respuesta a este tratamiento. Teniendo en cuenta la relación previamente demostrada entre imatinib y los niveles de colesterol [198], así como el posible efecto potenciador de fármacos moduladores del metabolismo del colesterol sobre la actividad anti-leucémica de imatinib [199,200], nuestros resultados sugieren que el SNP rs492338 podría implicar un cambio en la actividad del transportador ABCG1 que a su vez, afectaría al transporte de colesterol, posiblemente produciendo un cambio en la composición lipídica de la membrana celular que aumentaría la retención de imatinib en el interior celular y potenciaría su efecto. No obstante, para demostrar este posible efecto, serían necesarios estudios funcionales en modelos celulares y animales, testando el efecto no solamente de este SNP sino de una batería de variantes en este transportador, así como la consecuencia de posibles cambios en su expresión en relación con el efecto de imatinib.

Además del transportador ABCG1, otros tres SNPs presentes en **ABCB11** se asociaron significativamente con la respuesta a imatinib. El transportador ABCB11, también

conocido como “bomba de extrusión de sales biliares”, se expresa principalmente en las células del hígado, los hepatocitos, y es el transportador primario responsable de la liberación de los ácidos biliares de los hepatocitos hacia la bilis. Algunos polimorfismos en el gen que codifica para este transportador han sido relacionados con el desarrollo de colestasis [201] así como la aparición de toxicidad hepática a diversos fármacos [202,203].

En nuestro estudio, tres SNPs en el gen que codifica para este transportador, el **rs496550**, el **rs497692** y el **rs495714** parecen estar asociados con la respuesta a imatinib. No obstante, ninguno de ellos parece tener una influencia clara cuando se considera la RMM como una variable tiempo-dependiente. El rs496550 y rs495714 representan una variable intrónica y están ubicados en la región 3-prima UTR (*untranslated region*), mientras que el rs497692 representa una variante sinónima. Un hallazgo interesante en nuestro estudio fue la identificación del haplotipo que engloba estos tres SNPs y la asociación entre el genotipo *ABCB11*-AGA y una menor tasa de fracaso a imatinib. No conocemos ningún estudio de farmacocinética que haya descrito una relación entre el transportador *ABCB11* y la respuesta a imatinib; no obstante, teniendo en cuenta nuestros resultados, no puede descartarse que este transportador esté directa o indirectamente relacionado con la excreción de imatinib desde el hígado hacia el conducto biliar. También es posible que la asociación encontrada sea producto del azar, por lo que sería deseable replicar lo observado en una cohorte independiente de pacientes con LMC, así como llevar a cabo estudios funcionales que evalúen el papel de este transportador en la farmacocinética de imatinib.

1.2. Polimorfismos en genes implicados en el metabolismo de imatinib

El metabolismo de imatinib tiene lugar en el hígado, donde se produce la N-desmetilación y da lugar al principal metabolito activo *N-desmethyl-imatinib* (CPG74588, NDIM), equipotente a imatinib. La biotransformación de imatinib a NDIM es un proceso clínicamente importante, ya que da lugar a una amplia variabilidad en las concentraciones plasmáticas de este fármaco. Múltiples ensayos clínicos han demostrado que concentraciones plasmáticas de los ITQs por encima de los niveles estándar están asociadas a mejores tasas de respuesta [204–206]. Aunque existen varios factores que pueden influir en esta variabilidad, las diferencias de respuesta observadas entre los pacientes podrían estar parcialmente determinadas por polimorfismos genéticos en las principales enzimas de metabolización de imatinib; entre ellas, se ha descrito que el citocromo CYP3A, sobretudo las isoformas CYP3A4 y CYP3A5, con-

tribuyen en gran medida en este proceso [207]. También el citocromo CYP2C8 ha ido ganando peso como protagonista en la metabolización de imatinib [208,209]. Otras isoformas del citocromo P450 como son la CYP1A2, CYP2D6 y CYP2C9 parecen jugar un papel (aunque menor) en el metabolismo de imatinib. Varios estudios han analizado el papel de diferentes polimorfismos en estas enzimas y su relación con la respuesta a imatinib: Kim y cols. reportaron una correlación entre el SNP rs776746 (CYP3A5) y la RCC con imatinib, observando una menor tasa de respuesta en los pacientes portadores del genotipo AA [169], asociación que no fue significativa en la cohorte analizada en el estudio de Takahashi y cols. [184]. Posteriormente, en el estudio de Angelini y cols. el genotipo AA del SNP rs2740574 (CYP3A4) se asoció con una menor probabilidad de conseguir la RMM con imatinib [176]. Barrat y cols. demostraron una asociación entre el haplotipo formado por los SNPs rs11572080 y rs10509681 de CYP2C8 y unos niveles plasmáticos de imatinib significativamente altos. Por el contrario, los pacientes portadores del SNP rs1058930 para la misma enzima tenían niveles plasmáticos de imatinib por debajo de la media [210]. En esta misma línea, Harivenkatesh y cols. observaron que los pacientes portadores del genotipo GG para el SNP rs776746 (CYP3A5) tenían niveles plasmáticos de imatinib superiores a los niveles de los pacientes portadores del genotipo AA, presentando estos últimos una mayor tasa de fracaso al tratamiento con imatinib [211]. Recientemente, en un ensayo clínico llevado a cabo por Pena y cols., se analizó la influencia de ciertos polimorfismos en varias isoformas del citocromo P450 sobre los niveles plasmáticos de imatinib en una cohorte de 26 voluntarios sanos que tomaron una única dosis de 400 mg de imatinib. Observaron que el SNP rs374527 de CYP2B6 y los SNPs rs35599367 y rs67666821 de CYP3A4 jugaban un papel importante en las concentraciones plasmáticas de imatinib y en el perfil de seguridad de este fármaco [212].

En el estudio piloto de este trabajo se analizaron múltiples polimorfismos en las diferentes isoformas de la familia del citocromo P450. Un total de 17 variantes fueron significativas en el estudio piloto y se incluyeron en el estudio de extensión. Finalmente, tres SNPs presentaron una asociación significativa con la respuesta a imatinib. Uno de ellos fue el **rs1135840 del CYP2D6**, que fue significativo en todos los análisis de asociación (cohorte total, validación cruzada y test por permutaciones), bajo el modelo de herencia aditivo y recesivo. Según nuestros resultados, ser portador del genotipo G/G predispone a un mayor riesgo de fracaso al tratamiento con imatinib. No obstante, al añadir la variable "tiempo" en el estudio, este SNP no fue significativo. Esta variante comporta un cambio del aminoácido serina por treonina (S [AGC] > T [ACC]) en el codón 486 de la proteína. Sin embargo, este SNP no ha sido

descrito previamente en la LMC ni tampoco ha sido relacionado con el metabolismo de imatinib, aunque sí ha sido relacionado con la respuesta a otros fármacos como tamoxifeno o tramadol. Algo importante a destacar es que este SNP no cumplió el HWE ni en el estudio de asociación para la cohorte total ni en uno de los grupos del análisis de validación cruzada, pero tal y como hemos indicado en el apartado de material y métodos (página 79), se incluyó en el estudio ya que un SNP dentro de una población puede no estar en equilibrio por diferentes motivos (entre ellos, como consecuencia de la propia enfermedad). Las frecuencias alélicas en nuestra cohorte fueron las siguientes: 60% para el alelo C y 40% para el alelo G. Según las bases de datos poblacionales, las frecuencias alélicas para este SNP en la población caucásica son del 43% para C y del 57% para G. Realizando una búsqueda bibliográfica sobre el SNP rs1135840, encontramos una revisión sistemática y metanálisis llevado a cabo por Zhou y cols. en el que se estudia el papel que tienen las variantes del gen *CYP2D6* en el riesgo de desarrollar un cáncer [213]. Aunque la enzima *CYP2D6* representa alrededor del 2% del total de proteínas de la familia del citocromo P450 en el hígado, es una de las isoformas más polimórficas [214] y tiene un importante papel en el metabolismo de xenobióticos y compuesto carcinógenos, por lo que una activación excesiva de esta enzima podría producir la acumulación de compuestos activos nocivos, lo que a su vez, aumentaría el riesgo de desarrollar una neoplasia maligna. La evidencia científica sobre este hecho no es concluyente y debe tomarse con cautela [215,216]. El hecho de que toda la muestra estudiada en el Trabajo I sean pacientes afectados de LMC podría explicar por qué no se cumple el HWE, ya que teniendo en cuenta la literatura disponible a fecha de hoy sobre este SNP, no podemos descartar la posibilidad de que tenga alguna relación (en cierto grado) con la propia LMC, por lo que estaríamos seleccionando positivamente este SNP al no incluir en el presente estudio ningún control sano [217].

Otro SNP en una de las enzimas de la misma familia de citocromos, el **CYP11B1**, también fue estadísticamente significativo en nuestro estudio: el **SNP rs7003319** mostró una asociación con la respuesta a imatinib bajo el modelo de herencia dominante para todos los análisis de asociación del estudio. Además, al añadir la variable “tiempo”, se observó una tendencia entre el hecho de ser portador de los genotipos A/C o A/A y una menor probabilidad de conseguir la RMM con imatinib. El rs7003319 es una variante presente en la zona 3-prima UTR por lo que no implica ningún cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína. Este SNP no ha sido previamente descrito en la LMC pero, recientemente, en un estudio llevado a cabo por Ravegnini y cols. se describió una asociación entre esta variante y una mayor supervivencia en pacientes con tumor de estroma gastrointestinal tratados con imatinib [218].

Por último, el **SNP rs4934027 del gen MAT1A** fue significativo en todos los análisis de asociación (cohorte total, validación cruzada y test por permutaciones) bajo el modelo de herencia dominante y aditivo. Según nuestro estudio, el hecho de tener una o dos copias del alelo T (el de menor frecuencia en nuestra cohorte y también según las bases de datos poblacionales), se asociaría con una mayor probabilidad de conseguir la RMM con imatinib, algo que se pudo corroborar de manera clara al tratar la RMM como variable tiempo-dependiente, observando una incidencia acumulada de RMM para los genotipos C/C, C/T y T/T de 62%, 86% y 100%, respectivamente. Este SNP representa una variante intrónica del gen *MAT1A*, el cual está implicado en la síntesis de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP, proceso que tiene lugar en el hígado adulto. No obstante, ni el SNP rs4934027 ni otras alteraciones en el gen *MAT1A* han sido descritos previamente en la LMC, por lo que se desconoce su significado biológico.

Por último, dos SNPs fueron significativos únicamente en el test por permutaciones y por lo tanto, su implicación en la respuesta a imatinib debe ser tomada con cautela: por un lado tenemos el **SNP rs1065852 del gen CYP2D6**, el cual implica un cambio de aminoácido prolina por serina en el codón 34 de la proteína (P [CCA] > S [TCA]). Este SNP fue significativo bajo el modelo de herencia recesivo y mostró una asociación relevante en el análisis de incidencias acumuladas de RMM, ya que el 100% de los pacientes portadores del genotipo T/T consiguieron este nivel de respuesta, mientras que la mediana de incidencia para los portadores de los genotipos C/C y C/T fue del 69% (IC95%: 60%-76%). No obstante, este SNP no ha sido descrito previamente en la LMC ni relacionado con el metabolismo de imatinib. Por otro lado, el **SNP rs4148304 del gen UGT2A1**, que implica un cambio de valina por isoleucina en el codón 391 de la proteína (V [GTT] > I [ATT]), fue significativo también bajo el modelo de herencia recesivo. La enzima UGT (UDP-glucuronil transferasa) participa en el proceso de glucuronidación, que permite transformar los fármacos en sustancias mucho más solubles en agua, para una posterior eliminación en orina o heces. Sin embargo, este hallazgo presenta una limitación ya que únicamente 5 pacientes eran portadores del genotipo A/A, el de menor frecuencia y el que se asoció con una menor probabilidad de conseguir la RMM con imatinib. Para demostrar que realmente existe una asociación sería necesario ampliar el número de pacientes portadores del genotipo menos frecuente.

El Trabajo I presenta algunas debilidades metodológicas inherentes a los estudios retrospectivos; por un lado, hubiera sido interesante analizar los niveles plasmáticos de imatinib en nuestra cohorte, complementando los resultados obtenidos y permitiendo explorar si los polimorfismos estadísticamente significativos en nuestro estudio

podrían tener un efecto directo en la variación de las concentraciones plasmáticas, reforzando así nuestros hallazgos. Por otro lado, aunque nuestra serie de pacientes no difiere mucho en número de pacientes con los otros estudios previamente publicados, sería conveniente validar los resultados obtenidos en otras cohortes independientes de mayor extensión. A pesar de esta limitación, se trata de una serie particularmente homogénea de pacientes con LMC diagnosticados en FC y tratados homogéneamente (imatinib 400 mg/día), en comparación con muchos estudios que incluyen casos diagnosticados tanto en FC como FA y FB y tratados con diferentes ITQs [67,169,173]. A pesar de que el espectro de años de diagnóstico de la LMC en nuestra serie es amplio (2000-2015), los pacientes fueron seleccionados en base a los mismos criterios de tratamiento y se aplicaron los mismos criterios de respuesta (recomendaciones ELN de 2013 [57]).

También hubiera sido interesante estudiar las interacciones entre los distintos polimorfismos que no forman parte de un mismo patrón de herencia, es decir, que se heredan de forma independiente. Esto también es conocido como epistasis o epistasia, fenómeno que se da cuando la expresión de un gen se ve afectada por la expresión de uno o más genes heredados de forma independiente. Podría ser que ciertos SNPs por sí solos no tuviesen un efecto significativo pero la presencia de varios de ellos generase un efecto aditivo en relación a la tasa de respuesta con imatinib.

Además, debido a la implicación de determinadas enzimas, como la familia de citocromos P450, en el transporte y metabolismo de fármacos y hierbas medicinales, hay que tener presente que ciertos fármacos o alimentos inductores de estas enzimas podrían aumentar la eliminación de los ITQs, con riesgo de pérdida de la respuesta, mientras que los inhibidores podrían aumentar la exposición al ITQ, con riesgo de presentar toxicidad a éste. Teniendo esto en cuenta, hubiera sido interesante disponer de los datos de medicación concomitante de los pacientes incluidos en este trabajo, pero esto resulta una tarea tediosa y difícil de averiguar con total certeza en estudios de práctica clínica y retrospectivos. Finalmente, aunque la evidencia hoy en día es muy limitada, algunas mutaciones somáticas (por ejemplo, en modificadores epigenéticos) podrían jugar un papel en la resistencia a imatinib, por lo que no se puede descartar su posible efecto en la respuesta a imatinib ya que no disponíamos de esta información en la mayoría de pacientes de nuestra serie.

2

La respuesta molecular profunda como requisito para la suspensión segura del ITQ

Varios estudios demuestran que la suspensión del ITQ es una estrategia segura en los pacientes que logran una RMP mantenida. Como consecuencia de esto, la obtención de la RMP se ha convertido en uno de los principales objetivos en una gran proporción de pacientes. Si bien los ITQs-2G no se han comparado directamente frente a imatinib en el contexto de la discontinuación, el número total de pacientes que potencialmente podrían discontinuar sería mayor, puesto que la probabilidad de alcanzar una RMP (requisito imprescindible para la discontinuación) es superior con el uso de ITQs-2G que con imatinib [34,219]. Concretamente, el ensayo clínico ENESTnd demostró que nilotinib tiene una mejor eficacia a largo plazo en comparación con imatinib; en el análisis a los 5 años de seguimiento, una mayor proporción de pacientes consiguió la RMP (65% con nilotinib vs. 41% con imatinib) [40]. La última actualización de este estudio, con 10 años de seguimiento, describe unas tasas de incidencia acumulada de RMP del 72% para los pacientes tratados con nilotinib frente al 45% de los pacientes tratados con imatinib [38]. El estudio llevado a cabo por Breccia y cols., en el que analizaron las tasas de RMP con imatinib, nilotinib y dasatinib en la práctica clínica habitual, corroboró que se requiere más tiempo de tratamiento con imatinib que con nilotinib y dasatinib para conseguir mayores tasas de la RMP (13%, 45% y 29%, respectivamente) [220].

La optimización del tratamiento para conseguir la RMP es fundamental si el objetivo terapéutico es suspender el ITQ. Sin embargo, en la elección del tratamiento no hay que olvidar otras variables como la edad, las comorbilidades y el perfil de seguridad de cada ITQ. Esto último es especialmente relevante ya que imatinib suele tener un perfil de toxicidad a largo plazo algo mejor que el resto de ITQs-2G pero, como contrapartida, las tasas de obtención de RMP son significativamente menores.

Se han descrito algunos parámetros predictivos de obtención de la RMP. Un ejemplo de ello es la *ratio* de BCR-ABL1(IS) a los 3 meses del inicio del tratamiento, ya que una *ratio* <10% se ha asociado con una elevada probabilidad de conseguir la RMP en algunos estudios [221]. No obstante, este parámetro, así como la gran mayoría de los parámetros descritos hasta la fecha, analizan esta probabilidad una vez el tratamiento ha sido iniciado. Disponer de biomarcadores que en el momento del diagnóstico

permitan predecir si el paciente logrará la RMP con imatinib podría ayudar a decidir cuál es la mejor estrategia terapéutica inicial en cada paciente.

Tal y como se ha comentado en la Introducción, la exacerbada reducción de los telómeros en el clon maligno parece tener un papel relevante en la biología de la LMC. Es por ello que en el Trabajo II de esta tesis se ha estudiado si existe asociación entre la LT (corregida por la edad) en el momento del diagnóstico y la probabilidad de obtener la RMP en una cohorte de 96 pacientes con LMC-FC tratados con imatinib en primera línea.

Tras analizar la LT al diagnóstico en nuestros pacientes mediante MM-qPCR y corregir el valor por la edad (delta-LT), encontramos una **asociación significativa con la probabilidad de conseguir la RMP (tanto RM4 como RM4.5) con imatinib**. A menor delta-LT al diagnóstico (es decir, a mayor longitud de los telómeros), mayor probabilidad de conseguir la RMP; los pacientes con delta-LT $<0,4$ presentaron una incidencia acumulada de RM4 y RM4.5 del 63% y 59%, respectivamente, a diferencia de los pacientes con delta-LT $\geq 0,4$, que fue del 46% para la RM4 y del 37% para la RM4.5. Hasta la fecha, el único estudio que ha reportado una correlación entre la LT al diagnóstico de la LMC y la RM con un ITQ es el estudio publicado en 2015 por Wenn y cols [114]. En este estudio, los autores evaluaron la influencia de la LT en la respuesta a nilotinib en una cohorte del mismo tamaño muestral que la de nuestro estudio, y encontraron una asociación con el hecho de tener unos telómeros más largos al diagnóstico (menor valor de delta-LT) y la obtención de la RMM a los 12 y 18 meses. No obstante, los autores no encontraron una asociación con respuestas moleculares más profundas (objetivo principal del estudio). En nuestra serie, también encontramos una **asociación estadísticamente significativa entre la delta-LT y la RMM**; los pacientes con delta-LT $<0,4$ presentaron una incidencia acumulada de RMM del 68%, frente al 43% en los pacientes con delta-LT $\geq 0,4$. En este caso, las diferencias en la incidencia acumulada empiezan a ser evidentes a partir del mes 6 de tratamiento con imatinib (Figura 21, apartado Resultados, Trabajo II). Con esto, podemos hipotetizar que la cinética de reducción de los transcritos BCR-ABL1 durante los 6 primeros meses de tratamiento no depende tanto de la LT al diagnóstico sino de otros factores (como por ejemplo, la potencia del ITQ). Esto estaría en concordancia con lo observado en las curvas de incidencia acumulada de obtención de RM4 y RM4.5 (Figura 19, apartado Resultados, Trabajo II), ya que es a partir de los 24 meses de tratamiento donde se separan de manera más pronunciada las dos curvas (delta-LT $<0,4$ vs. delta-LT $\geq 0,4$), en línea con lo observado en estudios previos, en los que la tasa de incidencia acumulada de RM4 con imatinib fue de alrededor del 60% a los 10 años de tratamiento [28].

En nuestro estudio también pudimos confirmar una **reducción significativa de la LT en las células leucémicas**, tanto en SP como MO, de los pacientes con LMC al diagnóstico **comparado con los donantes sanos**, y que la reducción de los telómeros no parece estar asociada con la edad en los pacientes con LMC, en concordancia con lo descrito previamente [114,222]. De hecho, al comparar la *ratio* T/S de los pacientes con LMC con la edad al diagnóstico (Figura 17), se observó una correlación positiva (pendiente de la recta levemente positiva), lo que indicaría una **reducción de la LT más pronunciada en los pacientes más jóvenes**. Esto se pudo corroborar al dividir la cohorte por la mediana del valor de la delta-LT, ya que la mediana de la edad al diagnóstico de los pacientes situados en el grupo delta-LT $\geq 0,4$ (telómeros cortos) fue significativamente menor (43 años) a la mediana de la edad de los pacientes del grupo delta-LT $< 0,4$ (59 años). Estos datos sugieren que existe una mayor tasa de proliferación de las células leucémicas en los pacientes jóvenes comparado con los pacientes de edad más avanzada, por motivos no del todo claros [223].

Asimismo, en un estudio llevado a cabo por Bouillon y cols., observaron que la reducción acelerada de los telómeros en la LMC parece ser un evento exclusivo del clon maligno (LSC) y la HSC normal no se ve afectada. Además, demostraron que el grado de reducción de la LT en el compartimento de la LSC (CD34+CD48-) permitía discriminar entre una FC temprana y una FC tardía, hecho que, a su vez, estaba directamente relacionado con la carga tumoral de la enfermedad [224]. En línea con este estudio, nuestros resultados muestran que a pesar de que la LT de los pacientes con LMC es en general más reducida que la de los controles sanos, se observa bastante **variabilidad de la LT al diagnóstico entre los pacientes**. En este sentido, la LT al diagnóstico podría dar una idea del tiempo transcurrido entre el inicio de la LMC (aparición de la primera célula BCR-ABL1+) y el diagnóstico definitivo.

En relación a los índices pronóstico, la LT al diagnóstico de la LMC no parece influir en la clasificación de los pacientes dentro de los diferentes grupos de riesgo para los índices Sokal y ELTS, ya que observamos una distribución muy similar en las tres categorías tanto para los pacientes con delta-LT $< 0,4$ como para los pacientes con delta-LT $\geq 0,4$. A diferencia de nuestro estudio, Wenn y cols. sí que reportaron una relación entre la LT y el índice Sokal [114]. No obstante, sí que observamos una asociación estadísticamente significativa entre tener una delta-LT $\geq 0,4$ y pertenecer al grupo de riesgo alto para el índice EUTOS; en nuestra cohorte, 11 (12%) pacientes fueron adjudicados en el grupo de riesgo alto. De estos 11 pacientes, 9 tenían una delta-LT $\geq 0,4$ y solamente dos consiguieron la RMM y posteriormente la RMP.

Según nuestro estudio, el hecho de tener un **índice ELTS** intermedio o alto, así como una delta-LT $\geq 0,4$ (es decir, unos telómeros cortos) al diagnóstico reduciría la pro-

babilidad de obtener una RMP con imatinib en primera línea. El índice ELTS ha sido recientemente asociado como predictor de RMP, sobretodo en pacientes >65 años [225]. Sato y cols. observaron que los pacientes con ELTS de alto riesgo tenían una probabilidad de conseguir la RMP significativamente menor comparado con los pacientes de riesgo bajo o intermedio (23,5% vs 65-44%, respectivamente). Sin embargo, es importante destacar que en este estudio el número de pacientes incluidos en la categoría de riesgo alto era bajo (n=17) comparado con las categorías de riesgo bajo e intermedio (n= 254 y 71, respectivamente) [226].

Otro factor que se ha asociado con la respuesta a los ITQ es el tipo de **isoforma p210** de BCR-ABL1. En este caso, la isoforma e14a2 ha sido relacionada con una mayor probabilidad de conseguir la RMP con imatinib [227–231]. En nuestro estudio, el 39% y el 61% de los pacientes eran portadores de la isoforma e13a2 y e14a2, respectivamente, en línea con lo descrito previamente [232]. Sin embargo, al contrario que en otros estudios, no encontramos ninguna relación entre el tipo de transcrito y la probabilidad de obtener una RMP con imatinib. Tampoco encontramos ninguna relación entre el tipo de isoforma y la LT al diagnóstico, por lo que podemos hipotetizar que el tipo de isoforma no influye en la tasa de replicación celular.

Sabiendo que nuestros resultados pueden estar limitados por el sesgo del número de pacientes estudiados, el hecho de que la variable delta-LT permita diferenciar entre los pacientes que consiguen la RMP y los que no, aún teniendo un tamaño muestral reducido, pone de manifiesto las potenciales implicaciones a nivel clínico sobre la relevancia de la determinación de la LT al diagnóstico de la LMC. Creemos que un mayor número de pacientes podría confirmar su valor predictivo como variable independiente dentro del modelo multivariado.

En este trabajo se ha estudiado la **RM como variable tiempo-dependiente** teniendo en cuenta una situación de **riesgos competitivos**, donde se consideró como riesgo competitivo el hecho de cambiar de imatinib a otro ITQ sin haber conseguido la RM estudiada (RMM o RMP, dependiendo del análisis) además del hecho de cambiar de tratamiento por toxicidad o morir durante el tratamiento con imatinib sin haber conseguido dicha respuesta. Se utilizó esta metodología y no las tradicionales estimaciones de probabilidades de evento por Kaplan-Meier por los siguientes motivos: el primero y más importante es que al tratarse de una serie de pacientes diagnosticados en un rango de tiempo amplio (2004-2016), la disponibilidad de ITQs así como los hitos de respuesta, han variado durante estos años. Por ello, el cambio de imatinib por otros ITQs por fracaso no se ha hecho de forma homogénea en todos los pacientes ya que los criterios de fracaso han cambiado con el tiempo. Por este

motivo, los pacientes diagnosticados hace más años, con criterio de fracaso para las actuales, pero no las anteriores, recomendaciones de la ELN [26, 233], no cambiaron de ITQ y algunos consiguieron posteriormente tanto la RMM como la RMP con la primera línea. Es importante destacar que este estudio ha sido desarrollado con pacientes tratados en la práctica clínica habitual, fuera de un ensayo clínico en donde los criterios de inclusión y de respuesta están bien definidos. Por ello, de la misma manera que en otros estudios publicados previamente [44,159,160] consideramos más apropiado (en términos estadísticos) el uso de las incidencias acumuladas y el modelo Fine & Grey, ya que el método de Kaplan-Meier aplicado a una situación de riesgos competitivos (como en este estudio) sobrestima la tasa real del evento (en nuestro caso, la obtención de RMM y RMP) [234].

La principal limitación del Trabajo II, sobre la influencia de la LT al diagnóstico en la probabilidad de conseguir la RMP con imatinib, es su naturaleza retrospectiva. Por este motivo no se pudo determinar la LT con la técnica de flow-FISH, metodología que combina la hibridación *in situ* fluorescente con la citometría de flujo y que es más sensible y reproducible que la MM-qPCR pero que requiere de muestra fresca de SP o MO. Sería interesante validar nuestros resultados en una cohorte prospectiva más amplia utilizando la técnica de flow-FISH. También sería interesante estudiar los pacientes tratados con ITQ-2G en primera línea para ver cuál es la influencia de la LT en la obtención de la RMP en este subgrupo de pacientes porque hasta ahora, el único estudio que ha evaluado esta relación (con nilotinib en primera línea) no encontró ninguna asociación con la RMP [114].

3

La discontinuación del ITQ: un nuevo objetivo terapéutico y muchas dudas por resolver

La discontinuación del tratamiento ha abierto la puerta a un nuevo cambio en el manejo de la LMC que, sin duda, tendrá grandes repercusiones en los pacientes. En una enfermedad en la que el tratamiento era considerado como crónico, se ha visto que en determinados pacientes se puede discontinuar el ITQ de una forma relativamente segura. ¿Y por qué parar el tratamiento? Si bien hay pacientes con escasos efectos adversos al tratamiento, son muchos los que experimentan algún tipo de toxicidad hematológica (neutropenia, trombocitopenia, anemia) y/o no-hematológica (fatiga, náuseas, diarrea, dolores musculares). En algunos casos, el tratamiento a largo plazo está relacionado con toxicidades más graves como toxicidad hepática, eventos arteriales y cerebrovasculares o hipertensión pulmonar. Esto compromete en gran medida la calidad de vida de los pacientes. Además, en el caso de mujeres con deseo de embarazo, el uso de los ITQs está contraindicado durante el periodo de gestación.

Hasta la actualidad, se han llevado a cabo más de 30 ensayos clínicos en los que se ha demostrado que la suspensión del ITQ es segura en pacientes con una RMP mantenida. En todos ellos, los resultados son muy similares: alrededor del 50% de los pacientes logran mantener la RLT, mientras que la otra mitad presenta una pérdida de la RMM.

Algunos factores, como la duración del tratamiento o el tiempo en RMP previo a la discontinuación, han sido relacionados en menor o mayor grado con la probabilidad de mantener la RLT. Sin embargo, los resultados no han sido consistentes entre los diferentes estudios. Además, a día de hoy, los mecanismos biológicos responsables de la recaída siguen siendo desconocidos.

En el Trabajo III de esta tesis se han analizado diferentes variables clínicas de 56 pacientes que discontinuaron el tratamiento entre los años 2014 y 2020 en tres centros ICO. Además, en un subgrupo de pacientes (n=23) se estudiaron varios parámetros biológicos y su posible asociación con la recaída tras la discontinuación. Los resultados obtenidos en ambos estudios se discuten en mayor detalle en los próximos apartados.

3.1. Parámetros clínicos predictivos de una remisión libre de tratamiento exitosa

El primer ensayo clínico de discontinuación, el estudio STIM1, encontró una asociación entre el índice Sokal y el riesgo de recaída [80,83,115], sugiriendo que los pacientes con Sokal de alto riesgo presentan una serie de atributos biológicos inherentes que provocan la pérdida de la RMM una vez discontinuado el tratamiento. Sin embargo, otros estudios no han encontrado ninguna relación entre ambos factores [89, 91, 235]. Al diseñar el protocolo de discontinuación ICO se descartó desde un inicio la inclusión de pacientes con Sokal de alto riesgo, dado que en el momento de su elaboración el impacto del índice Sokal no era claro. De esta manera, el 65% de los pacientes de nuestra serie tenía Sokal de bajo riesgo y el 35% restante, riesgo intermedio. No se observó ninguna diferencia entre ambos grupos en cuanto a la probabilidad de recaída. Posteriormente, el grupo de expertos de la ELN no ha incluido ninguna contraindicación respecto al grupo de riesgo Sokal en las recomendaciones de discontinuación [26]. De la misma manera que con el índice Sokal, en el protocolo de discontinuación ICO, no se incluyó ningún paciente con ELTS de alto riesgo. Tampoco el índice ELTS mostró una asociación con la tasa de RLT en nuestra serie, aunque cabe destacar que solamente se disponía del valor de este índice en el 54% de los pacientes, por lo que los resultados deben tomarse con cautela.

Por otro lado, el tipo de **isoforma de p210**, que previamente se había asociado con la posibilidad de obtener una RMP, también se ha sugerido que podría predecir la recaída tras discontinuación. De este modo, algunos estudios señalan que los pacientes con la isoforma e14a2 tienen mayores tasas de RLT que los pacientes con la isoforma e13a2, ya que las células portadoras de esta última parecen persistir más (en términos de ERM) que las células con la isoforma e14a2 [108, 227, 236]. El 68% de los pacientes de nuestra serie presentaban la isoforma e14a2 y al contrario que los estudios anteriores no se correlacionó con una mayor tasa de RLT, ya que 8 de los 10 pacientes que recayeron presentaban esta isoforma.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la **duración del tratamiento con el ITQ** ha sido probablemente el factor predictivo de recaída más reproducible entre todos los estudios. Los resultados de uno de los estudios más informativos y con mayor número de pacientes, el estudio EURO-SKI, así como los de otros ensayos clínicos que han evaluado la discontinuación tras tratamiento con imatinib, sugieren un tiempo aproximado de 6 años de tratamiento previo a la interrupción del ITQ como la opción más adecuada [87]. Otros ensayos en pacientes tratados con nilotinib en 1ª línea (ENESTfreedom) muestran unas tasas similares de RLT a las observadas con imatinib tras un menor tiempo de tratamiento (alrededor de los 3 años) [95]. Fuera de ensayo

clínico, el estudio de discontinuación en la práctica clínica habitual llevado a cabo por el GELMC estableció como límite predictor un total de 5 años de tratamiento [116]. Tanto en este estudio del GELMC como en el nuestro, la mediana de duración del tratamiento fue de 10 años. En nuestra serie, no encontramos ninguna diferencia significativa en cuanto a la duración del tratamiento entre el grupo de pacientes en RLT y el grupo de pacientes con recaída molecular. De hecho, el tiempo medio de tratamiento fue muy similar entre ambos grupos (10,7 años en los pacientes en RLT vs. 9,6 años en los pacientes que recayeron), siendo el tiempo mínimo de tratamiento en los pacientes que recayeron de 7 años. Esto podría sugerir, que después de cierto tiempo de tratamiento con ITQ, la duración del mismo dejaría de ser un factor predictivo de recaída. Seis pacientes (11%) discontinuaron el ITQ habiendo recibido menos de 5 años de tratamiento y todos ellos continúan en RLT. De estos seis pacientes, cinco discontinuaron con un ITQ-2G en 1ª línea (n=2) o en líneas posteriores (n=3). Esto apoyaría la hipótesis de que los pacientes tratados con un ITQ-2G requieren de menos tiempo de tratamiento para conseguir una RLT con éxito.

La **duración de la RMP** parece ser menos consistente a la hora de predecir la recaída post-discontinuación. La gran mayoría de los estudios de discontinuación requerían de un tiempo mínimo de 2 años en RMP, aunque la definición de RMP varía entre ellos (Tabla 6, Introducción). La duración de la RMP no fue predictiva de recaída en los estudios STIM1, DASfree i ENESTfreedom [80,93,95] pero sí lo fue en el estudio EURO-SKI [87]. En el estudio del GELMC observaron mayores tasas de RLT en aquellos pacientes con una RM4.5 mantenida durante >4 años [116]. En nuestro estudio, este parámetro no fue significativo aunque sí mostró una tendencia tanto para la duración de la RM4 ($p=0,058$) como para la de RM4.5 ($p=0,082$) al estudiarlas de manera continua. Cuando se estudió categorizando por la mediana (6,8 años para la RM4 y 5,4 años para la RM4.5) no se obtuvo significación. Señalar que dos pacientes discontinuaron el tratamiento sin haber conseguido la RM4.5 o a los pocos días de conseguirla (20 días) y ambos presentaron una recaída molecular. A pesar de ser dos casos aislados, estos resultados sugieren que discontinuar el tratamiento sin haber conseguido la RM4.5 o pocos días después de conseguirla, aumentaría el riesgo de recaída.

Uno de los hallazgos a destacar de nuestro estudio es la **elevada tasa de RLT (82%, rango 72% - 92%)**, en comparación con la de los ensayos clínicos anteriormente mencionados. Esto posiblemente se explica por el hecho de que los pacientes incluidos han sido tratados durante muchos años con los ITQs (una mediana de 10 años) y han permanecido durante un tiempo prolongado en RMP previo a la suspensión del tratamiento (mediana de tiempo en RM4 y RM4,5 de 6,8 y 5,4 años, respectivamen-

te), lo cual supera ampliamente los requisitos mínimos establecidos por los ensayos clínicos de discontinuación. Se han reportado tasas similares de RLT (~70%) en otros estudios de discontinuación en práctica clínica habitual. Estos estudios tenían en común con nuestra serie un tiempo muy parecido tanto de duración del tratamiento como de RMP [116,237]. De nuevo, esto podría explicar porqué en nuestra serie la duración del tratamiento con el ITQ no parece tener ningún impacto en la probabilidad de recaída. Probablemente, a mayor tiempo de tratamiento, mayor importancia empiezan a ganar otros factores en la predicción de la recaída.

En nuestro estudio hemos podido confirmar y validar que **la pérdida de RMM es un criterio seguro para la reintroducción del ITQ**, tal y como ha sido demostrado previamente en otros estudios, como el A-STIM [81] o el EURO-SKI [87]. Sin embargo, algunos expertos aseguran que solamente con la pérdida de la RM4 después de discontinuar ya sería suficiente motivo para reintroducir el tratamiento, sugiriendo que la mayoría de pacientes que pierden la RM4 acabarán perdiendo también la RMM. En nuestro estudio, tres pacientes perdieron la RM4 durante la fase de RLT pero ninguno de ellos llegó a perder la RMM y, sin reintroducir el ITQ, consiguieron de nuevo la RM4.

Un artículo recientemente publicado por Shanmuganathan y cols. [238], demuestra el valor predictivo de la **cinética de reducción de la ratio BCR-ABL1 durante el inicio del ITQ** en la posterior fase de RLT. Según los autores, esta reducción medida en forma de HT sería un potente predictor de recaída tras discontinuación. En nuestro estudio, varios parámetros relacionados con la respuesta inicial al tratamiento fueron evaluados: la *ratio* BCR-ABL1 a los 3 meses (<10% o >10%), el valor del HT, la *ratio* a los 12 meses (<0,01% o >0,01%) y el tipo de RM durante el primer año de tratamiento según los criterios de la ELN 2020 (óptima vs. ≥ 1 criterio de alarma). De todos ellos, el único que mostró una relación estadísticamente significativa con la RLT en el análisis univariado fue el hecho de tener una **respuesta óptima en todas las determinaciones del primer año**, según los criterios de la ELN 2020 [26]. Concretamente, en nuestra serie, observamos que la gran mayoría de los pacientes que mantienen la RLT (72%) habían presentado valores de RM óptima en las determinaciones a los 3, 6 y 12 meses de tratamiento. En cambio, siete de los 10 (70%) pacientes que recayeron tenían uno o más criterios de alarma durante el primer año de ITQ. El hecho de conseguir la RM4 (*ratio* <0,01%) a los 12 meses mostró una tendencia estadística en nuestra serie, pero no llegó a ser significativo ($p=0,081$). Posiblemente relacionado con estos parámetros de respuesta inicial, otro factor estadísticamente significativo en el modelo univariado fue el **tiempo hasta conseguir la RM4.5**; los pacientes en RLT tardaron una mediana de 28 meses en conseguirla, a diferencia de los pacientes

con recaída tras discontinuación, que tardaron una mediana de tiempo de 46 meses. La máxima significación se obtuvo al categorizar esta variable por la mediana de la serie global (36 meses, $p=0,043$). De la misma manera, el tiempo hasta conseguir la RM4 mostró una tendencia ($p=0,061$). Estos datos (respuesta óptima durante el primer año y menor tiempo hasta conseguir la RMP) sugieren que los primeros años de tratamiento con el ITQ podrían ser determinantes para poder discontinuar con éxito el tratamiento. En este sentido, los ITQ-2G podrían jugar un papel importante, ya que se han descrito respuestas más profundas y rápidas en pacientes tratados con estos fármacos. En nuestra serie, únicamente siete (13%) pacientes iniciaron el tratamiento con un ITQ-2G, por lo que la influencia de estos inhibidores en primera línea no pudo ser estudiada en detalle. Si bien actualmente no existen resultados de estudios que hayan evaluado específicamente las tasas de RLT entre pacientes tratados con imatinib y pacientes tratados con un ITQ-2G en primera línea - aunque sí hay algún ensayo clínico en marcha (SUSTRENIM study, NCT02602314, www.clinicaltrials.gov) - estudios como el DASFREE muestran mayores tasas de RLT a los 12 meses en pacientes que discontinuaron con dasatinib en primera línea en comparación con los pacientes que discontinuaron con dasatinib en segunda línea (54% vs 43%, respectivamente) [93]. Sin embargo, el estudio francés STOP-2GTKI mostró tasas globales de RLT similares a las de los estudios en primera línea, pero diferentes en los pacientes que fueron tratados con ITQ-2G por intolerancia frente a resistencia [89]. De la misma manera, el estudio ENESTop mostró también tasas similares de RLT, pero en este caso no observaron ninguna diferencia entre los pacientes tratados con un ITQ-2G en segunda línea por intolerancia o por resistencia [38]. Aún así, los datos disponibles hasta hoy sugieren que la discontinuación en pacientes que han sufrido resistencia severa a imatinib es raramente posible. Por este motivo, no se incluyó ningún paciente con resistencia previa al tratamiento dentro del protocolo de discontinuación ICO.

3.2. Biomarcadores predictivos de recaída tras discontinuación

Existe un especial interés en la identificación de biomarcadores que puedan ser usados para predecir una posible recaída tras la discontinuación y que complementen los factores clínicos anteriormente expuestos. Los resultados de los ensayos clínicos y otros estudios de discontinuación ponen de manifiesto la importancia de seguir investigando en la biología de la LMC para conseguir descifrar qué mecanismos permiten una “cura operacional” en solo una proporción de los pacientes.

3.2.1. El papel de la PCR digital como herramienta para el estudio de la enfermedad residual medible

Además de la ya mencionada duración de la RMP previo a la discontinuación del ITQ, la **profundidad de la respuesta** también ha sido relacionada con la RLT. Así, en estudios como el japonés STAT2 reportaron mayores tasas de RLT tras 36 meses de suspensión del ITQ en pacientes con *ratio* BCR-ABL1 indetectable en comparación con pacientes con ERM detectable por qPCR (76,6% vs. 48,6%, respectivamente) [97]. Este hallazgo fue confirmado posteriormente por el estudio JALSG-STIM213, que incluyó pacientes que habían recibido imatinib durante mínimo tres años y que tenían una RMP mantenida durante al menos dos años (tasa de RLT a los tres años del 72% para los pacientes con *ratio* indetectable por qPCR) [85]. El estudio ISAV fue el primero en evaluar el papel de la **la técnica de la dPCR** en la detección de la ERM para la predicción de la recaída tras discontinuación. En este estudio, se incluyeron pacientes con *ratio* indetectable por qPCR durante al menos 18 meses y se analizaron los transcritos BCR-ABL1 en el momento de la discontinuación mediante dPCR. A pesar de que los resultados de la dPCR mostraron un mayor número de determinaciones positivas por dPCR en los pacientes con recaída molecular, el valor predictivo como parámetro independiente fue limitado, ya que 2/3 de los pacientes que recayeron, tenían determinaciones de dPCR negativas. Sin embargo, se observó una tasa de recaída del 100% en los pacientes menores de 45 años y con dPCR positiva [86]. Posteriormente, otros estudios como uno del grupo italiano GIMEMA demostraron cómo el uso de la dPCR podría mejorar la capacidad predictiva de pérdida de respuesta tras la discontinuación [163]. La principal diferencia entre el estudio ISAV y el del grupo italiano es la plataforma de dPCR usada en cada caso; en el primer estudio, se utilizó la de Fluidigm (12.765 *Digital Array Chip*), que permite hacer una partición de la muestra en 765 pocillos. En cambio, en el estudio del grupo italiano se utilizó la misma plataforma que la empleada en nuestro estudio, la de ThermoFisher (QuantStudio 3D dPCR), que permite hacer una partición de la muestra en 20.000 pocillos. Podría ser que las diferencias observadas en ambos estudios estén relacionadas con la sensibilidad de cada una de estas plataformas. En este sentido, Alikian y cols. llevaron a cabo un estudio en el que examinaron la sensibilidad de diferentes plataformas de dPCR, comparándolas con la sensibilidad de la técnica estándar de la qPCR y observaron una buena correlación entre la dPCR y la qPCR para la cuantificación del transcrito BCR-ABL1 ($R^2 = 0,91 - 0,95$, dependiendo de la plataforma de dPCR), pero no tan buena para el transcrito *ABL1*, ya que las concentraciones del gen de referencia mostraron más variabilidad al estudiarlas por dPCR [239]. Dado que la *ratio* BCR-ABL1/*ABL1*(IS) está intrínsecamente ligada al número de copias de ambos transcritos, podría ser un inconveniente a la hora de determinar

el grado de respuesta. En nuestro estudio, inicialmente evaluamos la posibilidad de analizar ambos transcritos (BCR-ABL1 y ABL1) con el objetivo de tener un cálculo de la *ratio* similar al de la qPCR. No obstante, el uso de los ensayos de dPCR para estos dos transcritos de forma multiplexada no nos permitió establecer de forma correcta el límite de positividad, al margen de que se observaron falsos positivos en varios de los NTCs y controles sanos, algo que fue reportado también por Alikian y cols., concluyendo que la dPCR no mejora la sensibilidad obtenida por la técnica convencional estandarizada de qPCR. Teniendo en cuenta los resultados favorables del estudio del grupo italiano GIMEMA [163], decidimos aplicar la misma metodología en nuestras muestras, analizando únicamente las copias de BCR-ABL1/ μ L. De esta manera, conseguimos diferenciar de manera clara el límite de positividad, obteniendo una buena correlación con la qPCR ($R^2=0,98$, Figura 27) y con ausencia de falsos positivos. No obstante, aún aplicando una metodología muy similar, existen diferencias entre el estudio italiano y el nuestro: el número de copias BCR-ABL1/ μ L para cada grupo de RM, aún siendo muy heterogéneo en ambos estudios, en nuestro caso no mostró la reducción esperada al aumentar el nivel de profundidad de la respuesta (Figura 28), hecho que sí se observó en el estudio italiano. Además, Bernardi y cols. establecieron como valor de LD un total de 0,06 copias de BCR-ABL1/ μ L mientras que en nuestro estudio se estableció como límite de positividad el simple hecho de tener un pocillo positivo por dPCR (es decir > 0 copias BCR-ABL1/ μ L), dado que ninguno de los controles sanos incluidos para el cálculo del LD mostró positividad por dPCR. Finalmente, Bernardi y cols. establecieron como límite predictor de recaída un valor de dPCR de 0,468 copias BCR-ABL1/ μ L, mientras que en nuestro estudio el valor máximo obtenido fue de 0,381 copias BCR-ABL1/ μ L en una de las muestras de discontinuación. Teniendo en cuenta que nuestro estudio incluye un número limitado de pacientes, los resultados muestran valores similares de dPCR entre los pacientes que mantienen la RLT y los pacientes que recayeron. Sí se observó un número superior de positividad por dPCR en los pacientes que recayeron, tanto en el análisis de la muestra 6 meses previos a la discontinuación como en el de la muestra en el momento de la discontinuación (Figura 30), pero no podemos descartar que esto sea un producto del azar.

En los últimos años, han aparecido nuevas plataformas moleculares que supuestamente son más sensibles que la qPCR convencional, como la ya mencionada dPCR, aunque este hecho es controvertido. Otra aproximación es el uso de ADN genómico para estudiar el gen de fusión BCR-ABL1. En un estudio recientemente publicado por Polakova y cols. [240], combinaron ambas metodologías (análisis de muestras de ADN y ARNm mediante *droplet digital PCR*, ddPCR, una de las plataformas de dPCR disponibles), para determinar su valor en la predicción de recaída. De este estudio

se derivó un código de tres colores (semáforo), en el que los pacientes con ddPCR positiva tanto para ADN y ARNm mostraron una mayor tasa de recaída comparado con los pacientes con ddPCR positiva para ADN y negativa para ARNm, y con los pacientes con ddPCR negativa tanto para ADN y ARNm, siendo este último grupo el de mayor tasa de RLT tras discontinuación.

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, muchos pacientes discontinúan el ITQ aun teniendo transcritos de BCR-ABL1 detectables por técnicas de qPCR convencionales y mantienen la RLT durante años sin perder la RMM, incluso en algunos casos, observándose un aumento de los transcritos por qPCR. Claramente, estos pacientes siguen teniendo células leucémicas durante la fase de RLT, lo que sugiere que más allá de la detección precisa de los niveles de ERM en el momento de la discontinuación, es necesario (y quizás más relevante), estudiar la cinética de la evolución clonal a nivel de la LSC, para entender cómo algunos pacientes con enfermedad detectable mantienen la RLT y otros, en la misma situación, recaen.

3.2.2. Las células de la Side Population y su posible papel en la recaída tras la discontinuación

A pesar de los excelentes resultados del tratamiento con los ITQs, existe evidencia clara de que estos fármacos son ineficaces contra las LSCs [120,121,241]. Más allá del valor predictivo de recaída tras la discontinuación del ITQ, el estudio de la LSC de la LMC tiene una gran relevancia para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas que permitan eliminar por completo el clon leucémico. No obstante, en contexto de la RLT, resulta complejo estudiar los mecanismos de persistencia de la LSC y la implicación de esta célula en la recaída. En esta línea, varios estudios han demostrado que la LSC de la LMC es muy heterogénea; Zhang y cols. describieron, en un modelo murino, que células LIC de la LMC con elevada expresión de *MPL* se injertaban de manera más eficaz y tenían una mayor capacidad para desarrollar la LMC, sugiriendo que este tipo de célula podría ser una potente diana terapéutica [242]. También, Warfvinge y cols. estudiaron mediante técnicas de análisis de célula única (*single-cell analysis*) las diferentes poblaciones presentes en la MO de pacientes con LMC y, de la misma manera, observaron un elevado grado de heterogeneidad dentro de la población LSC, destacando la presencia de una subpoblación muy primitiva y quiescente, con muy baja o nula expresión de *cKIT* y con elevada insensibilidad a los ITQs [243].

Algunos investigadores se han focalizado en la identificación de marcadores específicos para la LSC de la LMC, con el objetivo de encontrar una nueva posible diana terapéutica que permita erradicarla. Así, se ha demostrado una sobreexpresión de los marcadores CD26, CD33 y CD93 en la LSC de la LMC [129,132,244]. La expresión de CD26 permite discriminar entre las LSCs de la LMC y las HSC y la cantidad de células LSC CD26+ se ha correlacionado con la respuesta al ITQ [130,131]. Además, los estudios *in vivo* indican que algunos fármacos antidiabéticos, como las gliptinas, podrían reducir la cantidad de LSCs CD26+ [129]. Por otro lado, el tratamiento con el conjugado de anticuerpo y fármaco gemtuzumab ozogamicina (indicado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda) inhibe las células LSC CD33+, pero su utilidad clínica resulta limitada debido al perfil de toxicidades graves e inaceptables para la población de pacientes con LMC en remisión molecular y, especialmente, si están en fase de RLT [244]. Por otro lado, a pesar de que el marcador CD93 se sobreexpresa en la LSC de la LMC, también se expresa en células endoteliales, plaquetas y otras células mieloides más maduras, por lo que no resulta un buen candidato a convertirse en diana terapéutica [245].

En algunos tumores sólidos y hemopatías como la leucemia mieloide aguda o la leucemia linfoblástica aguda, se ha demostrado que algunas células de la fracción SPop son responsables de la persistencia del cáncer [246–249]. No obstante, el papel de esta fracción de células SPop en la patogénesis de la LMC sigue siendo controvertido. El ensayo funcional de la SPop permite identificar esta subpoblación de células madre muy primitivas en la MO. Varios estudios sugieren que la capacidad de expulsión de compuestos desde el interior al exterior de las células SPop está inversamente correlacionado con el grado de madurez celular, siendo las células más primitivas (células madre/progenitoras) las que presentan mayor capacidad de expulsión debido a una elevada expresión del transportador multidroga ABCG2 [250,251]. En un estudio reciente llevado a cabo por Moshaver y cols. en muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda los autores redefinieron el compartimento de las células madre estudiando no solo el inmunofenotipo típico de estas células (CD34+CD38-) sino también el estudio funcional de la SPop [138].

Por todo ello, es especialmente atractivo el estudio de este tipo de células en la LMC. Hasta la fecha, existen muy pocos estudios que hayan abordado este tema; Hu y cols. [252], demostraron la presencia de células con expresión de BCR-ABL1 dentro de la fracción SPop en la MO de modelos murinos de LMC previamente tratados con imatinib o dasatinib, concluyendo que ninguno de estos dos ITQs erradica por completo todas las células madre con expresión de BCR-ABL1 y que el mecanismo de supervivencia es independiente de BCR-ABL1, dado que sí se observó inhibición

de la fosforilación de BCR-ABL1 por dasatinib en estas células, pero esto no condujo a la apoptosis celular. Por lo tanto, la inhibición única de BCR-ABL1 es insuficiente para erradicar la LSC y se cree que en la persistencia de estas células intervienen otras vías de señalización diferentes. Chapuy y cols. [253] demostraron que los clones leucémicos de la LMC estaban representados por células madre de la fracción SPop y progenitores CD34+, los cuales sobreexpresaban el transportador ABCA3 (también característico de la fracción SPop, aunque en menor grado que ABCG2) y esto reducía la sensibilidad a imatinib.

Por todo lo expuesto anteriormente, decidimos explorar esta subpoblación de células SPop en los pacientes que discontinuaron el ITQ dentro del Protocolo ICO. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral son exploratorios y obtenidos tras el estudio de un número reducido de casos, por lo que deben ser tomados con cautela. No obstante, es de destacar que la población de células SPop en los pacientes con reciente diagnóstico de LMC fue significativamente superior a la observada en los pacientes en RMP y que discontinuaron el tratamiento. Esto es probablemente debido a la exacerbada proliferación celular que existe al diagnóstico de la LMC, observada tanto en SP como en la MO. Sin embargo, una elevada proporción de células SPop al diagnóstico no tiene por qué implicar que éstas pertenezcan al clon maligno. De hecho, en dos de los casos descritos en la sección de los Resultados (apartado 3.2.1., Trabajo III), se observó que prácticamente todas las células SPop presentes al diagnóstico eran negativas para CD34, CD38 y CD26. A pesar de que únicamente con el análisis de estos marcadores no podemos confirmar si hay un componente de malignidad o no, lo que sí podemos deducir es que estas células SPop son muy indiferenciadas y quiescentes.

También es interesante la reducción de la proporción de células SPop de la MO a medida que los pacientes conseguían la RMP, tal y como se muestra en el primer ejemplo del apartado 3.2.1. de los Resultados del Trabajo III. En cambio, la persistencia de las células SPop indicaría (de forma directa o indirecta) la persistencia de células BCR-ABL1. Sin embargo, para confirmar este hecho, las células SPop deberían ser aisladas y se debería analizar el reordenamiento BCR-ABL1, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente. De nuestro estudio destaca la elevada expresión de CD26 en prácticamente todas las células de la SPop (todas ellas negativas para CD34 y CD38) en la paciente que presentó una pérdida de RMM durante el tratamiento con el ITQ. Al recuperar la RMM, la expresión de CD26 se redujo significativamente.

Respecto las muestras de pacientes que discontinuaron el ITQ, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes en RLT y el grupo de pacientes con recaída molecular al analizar los resultados de manera cuantitativa, probablemente debido al número limitado de eventos (recaídas) disponibles hasta la fecha. Solamente se observó una mayor cantidad de células CD26+ totales dentro de la fracción de células viables de la MO en los pacientes en RLT respecto los pacientes que recayeron (Figura 33-D). La fracción específica de células CD34+CD38-CD26+ no mostró diferencias significativas en nuestro estudio entre ambos grupos de pacientes, tanto para el total de células viables de la MO como dentro de la fracción SPop.

Finalmente, al analizar y comparar los cuatro casos de pacientes que recayeron con cuatro casos de pacientes en RLT y que tenían características basales similares (apartado 3.4., Resultados Trabajo III), a pesar de no observarse diferencias claras en la expresión de los marcadores CD34, CD38 y CD26 en el momento de la discontinuación entre ambos grupos, sí que destaca el hecho de que los pacientes que mantienen la RLT presenta una marcada reducción de la expresión de los tres marcadores tras los 6 meses posteriores a la discontinuación. En cambio, los pacientes que recaen mantienen la expresión de estos marcadores (especialmente el CD26) o, en algunos casos, ésta aumenta. Al analizar el inmunofenotipo únicamente de la región inferior de la SPop (mayor expresión del transportador ABCG2, y por lo tanto, mayor quimioresistencia) se observó mayor expresión de CD26 en los pacientes que recayeron comparado con los pacientes que mantuvieron la RLT. Todo esto sugiere que las células SPop de los pacientes que recaen tendrían un mayor grado de diferenciación.

Hasta la fecha, este es el único estudio que aborda el análisis del papel de la SPop en la LMC en el contexto de la discontinuación del ITQ. Con los datos disponibles actualmente, no se pueden establecer conclusiones claras pero persiste la hipótesis de que la SPop juega un papel en la biología de la LMC y especialmente en la fase de RLT, por lo que, con esta hipótesis tenemos en marcha actualmente una serie de estudios de caracterización *in vitro* tanto de las células SPop como otras posibles poblaciones de LSCs, con el objetivo de analizar en mayor detalle su papel en la fase de RLT y en la recaída tras la discontinuación.

3.2.3. El papel de las células Natural Killer en el mantenimiento de la RLT

Tal y como hemos visto en los apartados anteriores, la detección de transcritos BCR-ABL1 o la presencia de LSCs (analizado a través de la detección de marcadores de

superficie específicos o análisis funcionales) en pacientes que han discontinuado el ITQ, no siempre se traduce en una recaída molecular tras la discontinuación, siendo esto indicativo de que existen otros mecanismos que intervienen en este proceso. En este sentido, el sistema inmunitario parece jugar un papel relevante en el control o no de la enfermedad residual de la LMC.

Recientemente, varios subestudios inmunológicos llevados a cabo dentro de ensayos clínicos de discontinuación han evaluado el papel predictivo de diferentes componentes del sistema inmunitario en el mantenimiento de la RLT. Los primeros fueron los ensayos DADI, EURO-SKI y STIM (ImmunoSTIM) [91,151,152]; en ellos se evaluaron diferentes componentes del sistema inmunitario innato (células NK) y adaptativo (linfocitos T citotóxicos CD8+ y linfocitos T reguladores CD4+) en pacientes que discontinuaron el ITQ bajo diferentes regímenes de tratamiento (dependiendo del ensayo). En todos ellos, la proporción (o cifra absoluta) de células NK totales fue predictor de recaída tras la discontinuación, observándose una mayor cantidad de células NK en el momento de la discontinuación en pacientes que mantuvieron la RLT. Además, en el estudio EURO-SKI, una mayor proporción de células NK CD56bright se asoció con una mayor probabilidad de recaída, mientras que los estudios DADI e ImmunoSTIM reportaron una proporción significativamente mayor de células NK CD56dim en los pacientes que consiguieron mantener la RLT. También una mayor proporción de células NK más citotóxicas y en su estadio final de maduración (CD16+, CD57+) se ha asociado con una mayor probabilidad de mantener la RLT [91,152].

Fuera de ensayo clínico, otros estudios han mostrado datos similares destacando, de la misma manera, la proporción total de células NK en el momento de la discontinuación como factor predictivo de recaída [254].

Una de las ventajas de nuestro estudio es que evalúa, en la práctica clínica asistencial, la cantidad de células NK de los pacientes tanto en el momento de la discontinuación como posteriormente (6 meses tras discontinuación, en los que mantienen la RLT, o en el momento de la recaída y previo a la reintroducción del ITQ, en los que pierden la RMM), lo que permite estudiar en mayor detalle qué ocurre en cada paciente de manera individual. En nuestro estudio, observamos que en los pacientes que mantienen la RLT el número absoluto de células NK tiende a aumentar a los 6 meses tras la discontinuación, mientras que en los pacientes que recaen, el total de células NK tiende a disminuir. No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número total de células NK en el momento de la discontinuación entre el grupo que mantuvo la RLT y los pacientes que recayeron

(Figura 35-A), probablemente debido al número limitado de pacientes estudiados, especialmente en el grupo que recayó. Algo similar se observó en el subgrupo de células NK CD56dim (un aumento significativo a los 6 meses post-discontinuación en los pacientes en RLT a diferencia de los pacientes que recayeron, en los que esta fracción de células NK disminuyó en todos excepto en un paciente). Sin embargo, las diferencias entre el grupo de pacientes en RLT y el grupo de pacientes que recayeron no fueron significativas (Figura 35-C). Respecto al subgrupo de células NK CD57+ (máxima diferenciación y mayor citotoxicidad), se observó una proporción algo menor en el momento de la discontinuación dentro del grupo de pacientes que recayeron comparado con los que mantuvieron la RLT, sin ser las diferencias significativas (Figura 35-D).

Todo esto estaría en concordancia con lo observado en los estudios mencionados anteriormente, aunque de nuestro estudio destaca especialmente el aumento de células NK totales y de los subgrupos más maduros y citotóxicos (CD56dim y CD57+) a los 6 meses tras la discontinuación en los pacientes que mantuvieron la RLT. Esto último difiere de lo observado por Rea y cols. [151], ya que en este estudio observaron un aumento del total de células NK y también de los diferentes subtipos tanto en el grupo que mantuvo la RLT como en los que recayeron.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que no solo un mayor número de células NK más maduras y citotóxicas en el momento de la discontinuación, sino un aumento posterior de éstas (hasta niveles similares a los de la población sana) podría estar jugando un papel clave en el mantenimiento de la RLT. En este sentido, varios estudios han reportado un mayor restablecimiento del sistema inmune efector en pacientes tratados con dasatinib comparado con imatinib y nilotinib [255,256], por lo que esto podría proporcionar una ventaja en la fase de RLT. La capacidad del sistema inmunitario de cada paciente para restablecer los valores normales de células efectoras podría estar condicionado por el tipo de ITQ con el que han sido tratados. Esto no pudo ser evaluado en nuestro estudio debido al número limitado de pacientes tratados con dasatinib incluidos en los subestudios biológicos.

Más allá del estudio cuantitativo de las células NK (proporciones y/o valores absolutos), otros parámetros intrínsecos de estas células se han asociado como factores predictivos de recaída tras la discontinuación: uno de ellos es la expresión de los receptores KIR, sobretodo al estudiarlos como haplotipos A y B (ver Introducción, página 66). Caocci y cols. fueron de los primeros en reportar, a partir de una cohorte de 35 pacientes, una asociación entre el haplotipo B y una mayor probabilidad de recaída [257]. Esto fue confirmado también por el estudio de Vigón y cols. [254]. Sin

embargo, en el estudio llevado a cabo por Dumas y cols. [258] con un mayor número de pacientes ($n = 242$), esta asociación no pudo ser confirmada y, de hecho, los pacientes portadores del haplotipo B presentaron menos recaídas, aunque la diferencia no fue significativa.

Algunos estudios han evaluado también el estado funcional de estas células mediante el análisis de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como INF- γ o TNF- α ; el estudio EURO-SKI mostró niveles de secreción significativamente mayores para ambas citoquinas por parte de las células NK CD56dim en los pacientes que mantuvieron la RLT tras la discontinuación [152], algo que fue confirmado por el estudio de Vigón y cols. [254]. No obstante, en el estudio ImmunoSTIM no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a los niveles de secreción de dichas citoquinas entre el grupo de pacientes en RLT y el grupo de pacientes que presentaron recaída molecular [151]. Estas discrepancias, no solamente en el estado funcional de las células NK sino también en la expresión de los diferentes marcadores de superficie y receptores, podrían ser debidas a diferencias en el diseño metodológico de estos estudios; algunos realizan el análisis de las células NK directamente de SP total fresca, otros a partir de células mononucleares de SP (PBMC) aisladas mediante gradiente por Ficoll o incluso a partir de PBMC criopreservadas. Los diferentes componentes del sistema inmunitario y, especialmente, las células NK pueden verse afectados por el procesamiento de las muestras previo al análisis. Si bien es cierto que la mayoría de estudios que analizan el papel de las células NK (no solamente en la LMC sino también en otras patologías) han utilizado PBMCs criopreservados por aspectos logísticos (estas células se pueden tener criopreservadas hasta acumular un número suficiente de muestras para realizar el análisis correspondiente), este tipo de procedimientos puede generar artefactos. Se ha visto que el gradiente de densidad por Ficoll puede activar las células NK y modificar la expresión de los receptores de quimiocina [259] y esto empeora si además se utilizan PMBCs criopreservados. Por el contrario, el estudio de las células NK a partir de SP total fresca puede reducir el tiempo de análisis, el volumen de muestra requerido y los potenciales artefactos derivados de una manipulación excesiva de la muestra [260].

Finalmente, mencionar que el análisis de otros componentes del sistema inmunitario, como las células supresoras Treg o las MDSCs podrían ayudar en la predicción de una posible recaída tras la discontinuación. Un ejemplo sería el score predictivo elaborado por Irani y cols. [261], el cual incluye la cifra absoluta no solo de las células NK sino también de las Treg y las MDSCs. Los pacientes con un número elevado de células efectoras (células NK) y un número reducido de células supresoras (Treg y

MDSC) fueron clasificados dentro del grupo de bajo riesgo según el *score* predictivo y ello se asoció con una mayor tasa de RLT.

Con todo esto, son necesarios estudios longitudinales (idealmente, con metodologías similares) que evalúen diferentes componentes del sistema inmunitario desde el diagnóstico hasta el momento de la discontinuación y que, además, incluyan pacientes tratados con diferentes ITQs para poder compararlos, con el objetivo de tener una visión completa del papel del sistema inmunitario durante todo el transcurso de la LMC.

CONCLUSIONES

1.

En relación al análisis de polimorfismos en genes implicados en el transporte y metabolismo de fármacos y su asociación con la obtención de la RMM en pacientes tratados con imatinib en primera línea:

- 1.1.** Nuestros resultados muestran una asociación entre la obtención de la RMM con imatinib en primera línea y la presencia de seis SNPs (rs1135840, rs7003319, rs492338, rs4934027, rs496550 y rs497692) en cinco genes diferentes, además de la presencia del SNP rs628031, ya previamente descrito en la LMC.
- 1.2.** El genotipo A/A del SNP rs628031 presente en el gen *SLC22A1*, el genotipo G/G del SNP rs1135840 del gen *CYP2D6* y los genotipos A/C y A/A del SNP rs7003319 del gen *CYP11B1*, se asocian a una mayor tasa de fracaso a imatinib en primera línea.
- 1.3.** Los genotipos C/T y C/C del SNP rs492338 presente en el gen *ABCG1*, los genotipos C/T y T/T del SNP rs4934027 del gen *MAT1A* y los genotipos A/G y A/A de los SNPs rs496550 y rs497692 del gen *ABCB11*, se asocian a una mayor tasa de RMM con imatinib en primera línea. Además, el haplotipo *ABCB11*-AGA formado por estos dos últimos SNPs y el rs495714 estaría relacionado con la obtención de la RMM con imatinib.

2.

En relación al estudio de la LT al diagnóstico de la LMC estudiada mediante MM-qPCR y su papel en la respuesta al tratamiento con imatinib en primera línea:

- 2.1.** La LT de los pacientes con LMC es significativamente menor a la LT del grupo de controles sanos. Además, la reducción de la LT observada en el grupo de controles sanos a medida que aumenta la edad no se observa en los pacientes con LMC.
- 2.2.** El análisis de la LT al diagnóstico de la LMC es capaz de identificar un subgrupo de pacientes con mayor probabilidad de alcanzar tanto la RMM como la RMP con imatinib en primera línea. Los pacientes con un valor de la delta-LT (correspondiente a la LT corregida por la edad) $<0,4$ (equivalente a tener unos telómeros más largos al diagnóstico) presentaron mayores incidencias acumuladas de RMM, RM4 y RM4.5 comparado con los pacientes con delta-LT $\geq 0,4$ (equivalente a tener unos telómeros más cortos al diagnóstico).
- 2.3.** La LT al diagnóstico no se asocia con las isoformas de la proteína p210 ni con los índices pronóstico de la LMC pero un índice ELTS intermedio o alto así como una LT corta (delta-LT $\geq 0,4$) en el momento del diagnóstico, reduciría la probabilidad de obtener la RMP con imatinib en primera línea.

3.

En el análisis de los factores clínico-biológicos predictivos de recaída tras discontinuación, es de destacar que la tasa de RLT en nuestra serie de pacientes fue del 82%, claramente superior a lo descrito en los ensayos clínicos, pero similar a lo reportado en otros estudios de práctica clínica, en los que se han incluido pacientes con un tiempo de tratamiento con ITQ más prolongado y en los que se han observado menos recaídas. En este contexto:

- 3.1.** Las variables clínicas tradicionales como un tiempo prolongado de tratamiento con ITQ y de duración de la RMP no se han asociado a mayores tasas de RLT. En cambio, una respuesta óptima durante el primer año o alcanzar una RM4.5 antes de los 3 años se asoció a una menor probabilidad de recaída tras la discontinuación del ITQ.
- 3.2.** La determinación de los transcritos de BCR-ABL1 por dPCR en pacientes con una RMP durante los dos años previos a la discontinuación, según la qPCR estándar, no parece identificar los pacientes con mayor probabilidad de recaída.
- 3.3.** El estudio exploratorio de la SPop ha evidenciado que ésta expresa CD26, marcador previamente descrito como específico de la LSC de la LMC. Esta subpoblación de células madre podría estar relacionada con la patogenia de la LMC y la recaída tras la discontinuación del ITQ.
- 3.4.** El aumento, tras la discontinuación, de células NK totales así como de las fracciones más maduras y citotóxicas (NK CD56dim y NK CD57+), sería un factor protector contra la recaída molecular.



LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

De la presente Tesis Doctoral, se derivan las siguiente líneas de investigación futuras:

- **Análisis de las posibles interacciones entre diferentes SNPs** con patrón de herencia independiente (epistasia) y su papel en la respuesta al tratamiento con imatinib.
- Validación de los resultados obtenidos en el estudio de los **telómeros** de manera prospectiva mediante Flow-FISH.
- Estudiar si la longitud de los **telómeros** al diagnóstico de la LMC en pacientes tratados con ITQ-2G (nilotinib y dasatinib), tiene el mismo efecto en la obtención de la RMP que en el caso de los pacientes tratados con imatinib.
- **Caracterización *in vitro* de la población SPop y otras subpoblaciones de LSCs (estudio en marcha)**: cultivos primarios de muestras de MO criopreservadas provenientes de los pacientes que han discontinuado el ITQ e incluidos en el Protocolo ICO de Discontinuación. Así mismo, explorar el efecto de la combinación de ITQs y otros compuestos en la erradicación de estas células madre.
- **Estudio cuantitativo y longitudinal de las células NK, MDSCs y Treg**: analizar estas tres poblaciones de células del sistema inmunitario en pacientes con LMC desde el diagnóstico hasta el momento de la discontinuación y en diferentes momentos post-discontinuación.
- **Análisis del genotipo de los receptores KIR (estudio en marcha dentro del GELMC)**: determinación del genotipo de los diferentes receptores KIR de las células NK en muestras de ADN de pacientes que han discontinuado el tratamiento mediante el uso de técnicas de NGS, con el objetivo de detectar posibles diferencias entre los pacientes que recaen tras la discontinuación y los pacientes que mantienen la RLT. Este estudio es en colaboración con uno de los grupos de investigación del Banc de Sang i Teixits de Barcelona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a008250-a008250.
2. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell.* 2012;10:120-36.
3. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114:937-51.
4. Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J. (2001) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2001.
5. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
6. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2017.
7. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol.* 2015;1:97.
8. Heisterkamp N, Kees S, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature.* 1985;315:758-61.
9. Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica.* 2016;101:541-58.
10. Goldman JM, Melo JV. Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med.* 2003;349:1451-64.
11. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science.* 1960;142:1497.
12. Rowley J. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243:290-3.
13. de Klein A, van Kessel A, Grosveld G, Bartram C, Hagemeijer A, Bootsma D, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1982;300:765-7.
14. Bartram C, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel, Bootsma D, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1983;306:277-80.

15. Groffen J, Stephenson J, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram C, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36:93-9.
16. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson A, Witte O, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986;233:212-4.
17. Sasaki K, Strom SS, O'Brien S, Jabbour E, Ravandi F, Konopleva M, et al. Relative survival in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia in the tyrosine-kinase inhibitor era: analysis of patient data from six prospective clinical trials. *Lancet Haematol*. 2015;2:e186-93.
18. Huang X, Cortes J, Kantarjian HM. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*. 2012;118:3123-7.
19. Redaelli A, Bell C, Casagrande J, Stephens J, Botteman M, Laskin B, et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2004;4:85-96.
20. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341:164-72.
21. Bonifacio M, Stagno F, Scaffidi L, Krampera M, Di Raimondo F. Management of Chronic Myeloid Leukemia in Advanced Phase. *Front Oncol*. 2019;9:1132.
22. Sokal J, Cox E, Baccharani M, Tura S, Gomez G, Robertson J, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63:789-99.
23. Hasford J, Hehlmann R, Allan NC. A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon Alfa. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:9.
24. Hasford J, Baccharani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011;118:686-92.
25. Pfirrmann M, Baccharani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30:48-56.
26. Hochhaus A, Baccharani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34:966-984.
27. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2015;385:1447-59.

28. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376:917-27.
29. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, Casado LF, García-Gutiérrez V, Hochhaus A, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2016;30:1648-71.
30. Glivec® (imatinib mesilato): ficha técnica. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR__Product_Information/human/000406/WC500022207.pdf.
31. Lombardo L, Lee F, Chen P, Norris D, Barrish J, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methyl-pyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004;47:6658-61.
32. Shah NP, Tran C, Lee F, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*. 2004;305:399-401.
33. Kantarjian H, Shah N, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2260-70.
34. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34:2333-40.
35. Radich JP, Kopecky K, Appelbaum F, Kamel-Reid S, Stock W, Malnassy G, et al. A randomized trial of dasatinib 100 mg versus imatinib 400 mg in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120:3898-905.
36. Naqvi K, Jabbour E, Skinner J, Anderson K, Dellasala S, Yilmaz M, et al. Long-term follow-up of lower dose dasatinib (50 mg daily) as frontline therapy in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2020;126:67-75.
37. Sprycel® (dasatinib): ficha técnica. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR__Product_Information/human/000709/WC500056998.pdf.
38. Kantarjian HM, Hughes TP, Larson RA, Kim D-W, Issaragrisil S, le Coutre P, et al. Long-term outcomes with frontline nilotinib versus imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 10-year analysis. *Leukemia*. 2021;35:440-53.
39. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, Le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362:2251-9.
40. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim D-W, Issaragrisil S, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016;30:1044-54.

41. Tasigna® (nilotinib): ficha técnica. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR__Product_Information/human/000798/WC500034394.pdf.
42. Brümmendorf T, Cortes JE, De Souza CA, Guilhot F, Duvillié L, Pavlov D, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukaemia: results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *Br J Haematol*. 2015;168:69-81.
43. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, Mauro MJ, Chuah C, Kim D-W, et al. Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J Clin Oncol*. 2018;36:231-7.
44. Gambacorti-Passerini C, Cortes JE, Lipton JH, Kantarjian HM, Kim DW, Schafhausen P, et al. Safety and efficacy of second-line bosutinib for chronic phase chronic myeloid leukemia over a five-year period: final results of a phase I/II study. *Haematologica*. 2018;103:1298-307.
45. on behalf of the BYOND Study Investigators, Hochhaus A, Gambacorti-Passerini C, Aboud C, Gjertsen BT, Brümmendorf TH, et al. Bosutinib for pretreated patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: primary results of the phase 4 BYOND study. *Leukemia*. 2020;34:2125-37.
46. Ficha Técnica Bosulif® European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/002373/WC500141721.pdf.
47. Cortes JE, Kim D, Pinilla-Ibarz J, le Coutre PD, Paquette R, Chuah C, et al. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood*. 2018;132:393-404.
48. Ficha Técnica Iclusig® European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/002695/WC500145646.pdf.
49. Hughes TP, Mauro MJ, Cortes JE, Minami H, Rea D, DeAngelo DJ, et al. Asciminib in Chronic Myeloid Leukemia after ABL Kinase Inhibitor Failure. *N Engl J Med*. 2019;381:2315-26.
50. Garcia-Gutiérrez V, Luna A, Alonso-Dominguez JM, Estrada N, Boque C, Xicoy B, et al. Safety and efficacy of asciminib treatment in chronic myeloid leukemia patients in real-life clinical practice. *Blood Cancer J*. 2021;11:16.
51. Hochhaus A, Boquimpani C, Rea D, Minami Y, Lomaia E, Voloshin S, et al. Efficacy and safety results from ASCSEMBL, a multicenter, open-label, phase 3 study of asciminib, a first-in-class STAMP inhibitor, vs bosutinib (BOS) in patients (pts) with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) previously treated with ≥ 2 tyrosine kinase inhibitors (TKIs). En: 2020 American Society of Hematology Annual Meeting; Abstract LBA-4. Orlando, USA; 2020.

52. Patel AB, O'Hare T, Deininger MW. Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31:589-612.
53. Eadie L, Saunders VA, Branford S, White DL, Hughes TP. The new allosteric inhibitor asciminib is susceptible to resistance mediated by ABCB1 and ABCG2 overexpression in vitro. *Oncotarget.* 2018;9:13423-37.
54. Shaffer L, McGowan-Jordan J, Schmid M. *ISCN2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* Switzerland: Karger; 2013.
55. Branford S, Fletcher L, Cross NCP, Müller MC, Hochhaus A, Kim D-W, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood.* 2008;112:3330-8.
56. White H, Matejtschuk P, Rigsby P, Gabert J, Lin F, Wang Y, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood.* 2010;116:e111-7.
57. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013;122:872-84.
58. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, et al. Imatinib for Newly Diagnosed Patients With Chronic Myeloid Leukemia: Incidence of Sustained Responses in an Intention-to-Treat Analysis. *J Clin Oncol.* 2008;26:3358-63.
59. Darkow T, Henk HJ, Thomas SK, Feng W, Baladi J-F, Goldberg GA, et al. Treatment Interruptions and Non-Adherence with Imatinib and Associated Healthcare Costs: A Retrospective Analysis among Managed Care Patients with Chronic Myelogenous Leukaemia. *Pharmacoeconomics.* 2007;25:481-96.
60. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Pane F, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. 2011;118:9.
61. Barnes DJ, Palaiologou D, Panousopoulou E, Schultheis B, Yong ASM, Wong A, et al. Bcr-Abl Expression Levels Determine the Rate of Development of Resistance to Imatinib Mesylate in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Res.* 2005;65:8912-9.
62. White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, et al. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood.* 2007;110:4064-72.

63. Mahon F-X, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, et al. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 2003;101:2368-73.
64. Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd LA. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood*. 2011;117:e75-87.
65. Cargnin S, Ravegnini G, Soverini S, Angelini S, Terrazzino S. Impact of SLC22A1 and CYP3A5 genotypes on imatinib response in chronic myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res*. 2018;131:244-54.
66. Giannoudis A, Wang L, Jorgensen AL, Xinarianos G, Davies A, Pushpakom S, et al. The hOCT1 SNPs M420del and M408V alter imatinib uptake and M420del modifies clinical outcome in imatinib-treated chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121:628-37.
67. Dulucq S, Bouchet S, Turcq B, Lippert E, Etienne G, Reiffers J, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2008;112:2024-7.
68. Polillo M, Galimberti S, Baratè C, Petrini M, Danesi R, Di Paolo A. Pharmacogenetics of BCR/ABL Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2015;16:22811-29.
69. Majlis A, Smith T, Talpaz M, O'Brien S, Rios MB, Kantarjian HM. Significance of cytogenetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14:196-203.
70. O'Dwyer M, Mauro MJ, Blasdel C, Farnsworth M, Kurilik G, Hsieh Y, et al. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. *Blood*. 2004;103:451-5.
71. Wang W, Cortes JE, Tang G, Khoury JD, Wang S, Bueso-Ramos CE, et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2016;127:2742-50.
72. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003;101:690-8.
73. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Targeting ABL and SRC kinases in chronic myeloid leukemia: experience with dasatinib. *Future Oncol*. 2006;2:655-65.
74. Kim T, Tyndel MS, Kim HJ, Ahn J-S, Choi SH, Park HJ, et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*. 2017;129:38-47.
75. on behalf of the International CML Foundation Genomics Alliance, Branford S, Kim DDH, Apperley JF, Eide CA, Mustjoki S, et al. Laying the foundation for genomically-based risk assessment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33:1835-50.

76. Nteliopoulos G, Bazeos A, Claudiani S, Gerrard G, Curry E, Szydlo R, et al. Somatic variants in epigenetic modifiers can predict failure of response to imatinib but not to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. 2019;104:2400-9.
77. García-Gutiérrez V, Hernández-Boluda JC. Tyrosine Kinase Inhibitors Available for Chronic Myeloid Leukemia: Efficacy and Safety. *Front Oncol*. 2019;9:603.
78. Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:1029-35.
79. Harrington P, Radia D, de Lavallade H. What are the considerations for tyrosine kinase inhibitor discontinuation in chronic-phase chronic myeloid leukemia? *Expert Rev Hematol*. 2020;13:213-22.
80. Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Charbonnier A, et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35:298-305.
81. Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, Agape P, Nicolini FE, Varet B, et al. Loss of Major Molecular Response As a Trigger for Restarting Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Patients With Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia Who Have Stopped Imatinib After Durable Undetectable Disease. *J Clin Oncol*. 2014;32:424-30.
82. Nicolini FE, Cony-Makhoul P, Charbonnier A, Escoffre-Barbe M. Evaluation of Residual Disease and TKI Duration Are Critical Predictive Factors for Molecular Recurrence after Stopping Imatinib First-line in Chronic Phase CML Patients. *Clin Cancer Res*. 2019;25:6606-6613.
83. Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarzer AP, Arthur C, Yeung DT, et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood*. 2013;122:515-22.
84. Lee S, Choi SY, Bang J, Kim S, Jang E, Byeun J, et al. Predictive factors for successful imatinib cessation in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Am J Hematol*. 2013;88:449-54.
85. The Japan Adult Leukemia Study Group, Takahashi N, Tauchi T, Kitamura K, Miyamura K, Saburi Y, et al. Deeper molecular response is a predictive factor for treatment-free remission after imatinib discontinuation in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: the JALSG-STIM213 study. *Int J Hematol*. 2018;107:185-93.
86. Mori S, Vagge E, le Coutre P, Abruzzese E, Martino B, Pungolino E, et al. Age and dPCR can predict relapse in CML patients who discontinued imatinib: The ISAV study: ISAV study results: Age and dPCR predict relapse. *Am J Hematol*. 2015;90:910-4.

87. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19:747-57.
88. Clark RE, Polydoros F, Apperley JF, Milojkovic D, Rothwell K, Pocock C, et al. De-escalation of tyrosine kinase inhibitor therapy before complete treatment discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia (DESTINY): a non-randomised, phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2019;6:e375-83.
89. Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, Guilhot F, Guilhot J, Guerci-Bresler A, et al. Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood*. 2017;129:846-54.
90. Atallah E, Schiffer CA, Weinfurt KP, Zhang M-J, Radich JP, Oehler VG, et al. Design and rationale for the life after stopping tyrosine kinase inhibitors (LAST) study, a prospective, single-group longitudinal study in patients with chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer*. 2018;18:359.
91. Imagawa J, Tanaka H, Okada M, Nakamae H, Hino M, Murai K, et al. Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2015;2:e528-35.
92. Kumagai T, Nakaseko C, Nishiwaki K, Yoshida C, Ohashi K, Takezako N, et al. Discontinuation of Dasatinib after Deep Molecular Response for over 2 Years in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia and the Unique Profiles of Lymphocyte Subsets for Successful Discontinuation: A Prospective, Multicenter Japanese Trial (D-STOP Trial). *Blood*. 2016;128:791.
93. Shah NP, García-Gutiérrez V, Jiménez-Velasco A, Larson S, Saussele S, Rea D, et al. Dasatinib discontinuation in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia and stable deep molecular response: the DASFREE study. *Leuk Lymphoma*. 2020;61:650-9.
94. Kim D, Bence-Bruckler I, Forrest D, Savoie M, Couban S, Busque L, et al. Treatment-Free Remission Accomplished By Dasatinib (TRAD): Preliminary Results of the Pan-Canadian Tyrosine Kinase Inhibitor Discontinuation Trial. *Blood*. 2016;128:1922.
95. Ross DM, Masszi T, Gómez Casares MT, Hellmann A, Stentoft J, Conneally E, et al. Durable treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following frontline nilotinib: 96-week update of the ENESTfreedom study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144:945-54.
96. Mahon FX, Boquimpani C, Takahashi N, Benyamini N, Clementino NCD, Shuvaev V, et al. ENESTop 192-Weeks Results: Treatment-Free Remission (TFR) in Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) After Stopping Second-Line Nilotinib. *En Cl Lymph Myelom Leuk*; 2019. p. S288-9.

97. Takahashi N, Nishiwaki K, Nakaseko C, Aotsuka N, Sano K, Ohwada C, et al. Treatment-free remission after two-year consolidation therapy with nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia: STAT2 trial in Japan. *Haematologica*. 2018;103:1835-42.
98. Ritchie EK, Catchatourian R, Klisovic R, Pinilla-Ibarz J, Deininger M, Erba H, et al. Results from Enestgoal: A Phase 2 Study of Treatment-Free Remission (TFR) in Patients (pts) with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Who Switched from Imatinib to Nilotinib. *Blood*. 2017;130:2875.
99. Nagafuji K, Matsumura I, Shimose T, Kawaguchi T, Kuroda J, Nakamae H, et al. Cessation of nilotinib in patients with chronic myelogenous leukemia who have maintained deep molecular responses for 2 years: a multicenter phase 2 trial, stop nilotinib (NILSt). *Int J Hematol*. 2019;110:675-82.
100. Hughes TP, Ross DM. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML. *Blood*. 2016;128:17-23.
101. Rousselot P, Loiseau C, Delord M, Besson C, Cayuela J, Spentchian M. A Report on 114 Patients Who Experienced Treatment Free Remission in a Single Institution during a 15 Years Period: Long Term Follow-up, Late Molecular Relapses and Second Attempts. *Blood*. 2019;134:27.
102. Hochhaus A. Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the ENESTfreedom study. 2017;7.
103. Mahon F-X, Boquimpani C, Kim D-W, Benyamini N, Clementino NCD, Shuvaev V, et al. Treatment-Free Remission After Second-Line Nilotinib Treatment in Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Results From a Single-Group, Phase 2, Open-Label Study. *Ann Intern Med*. 2018;168:461.
104. Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, Gerrard G, Wang L, Szydlo RM, et al. Assessment of BCR-ABL1 Transcript Levels at 3 Months Is the Only Requirement for Predicting Outcome for Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Clin Oncol*. 2012;30:232-8.
105. Breccia M, Molica M, Colafigli G, Massaro F, Alimena G. Early molecular response in chronic myeloid leukemia and halving time: Latest evidences. *Leuk Res*. 2016;48:20-5.
106. for the SAKK and the German CML Study Group, Hanfstein B, Shlyakhto V, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014;28:1988-92.
107. Sasaki K, Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, Konopleva M, Borthakur G, et al. Prediction for sustained deep molecular response of BCR-ABL1 levels in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: Prediction of Sustained MR 4.5 in CML-CP. *Cancer*. 2018;124:1160-8.

- 108.** D'Adda M, Farina M, Schieppati F, Borlenghi E, Bottelli C, Cerqui E, et al. The e13a2 BCR-ABL transcript negatively affects sustained deep molecular response and the achievement of treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukemia who receive tyrosine kinase inhibitors. *Cancer*. 2019;125:1674-82.
- 109.** Park J-H, Woo YM, Youm EM, Hamad N, Won H-H, Naka K, et al. HMGCLL1 is a predictive biomarker for deep molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33:1439-50.
- 110.** Brümmendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, et al. Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood*. 2000;95:1883-90.
- 111.** Drummond MW, Lennard A, Brümmendorf TH, Holyoake TL. Telomere Shortening Correlates with Prognostic Score at Diagnosis and Proceeds Rapidly during Progression of Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:1775-81.
- 112.** Brümmendorf TH, Ersöz I, Hartmann U, Bartolovic K, Balabanov S, Wahl A, et al. Telomere length in peripheral blood granulocytes reflects response to treatment with imatinib in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2003;101:375-375.
- 113.** Drummond MW, Balabanov S, Holyoake TL, Brummendorf TH. Concise Review: Telomere Biology in Normal and Leukemic Hematopoietic Stem Cells. *STEM CELLS*. 2007;25:1853-61.
- 114.** Wenn K, Tomala L, Wilop S, Vankann L, Hasenbank C, Frank O, et al. Telomere length at diagnosis of chronic phase chronic myeloid leukemia (CML-CP) identifies a subgroup with favourable prognostic parameters and molecular response according to the ELN criteria after 12 months of treatment with nilotinib. *Leukemia*. 2015;29:2402-4.
- 115.** Yhim H-Y, Lee N-R, Song E-K, Yim C-Y, Jeon SY, Shin S, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia who have received front-line imatinib mesylate therapy and achieved complete molecular response. *Leuk Res*. 2012;36:689-93.
- 116.** on behalf of the Grupo Español de Leucemia Mieloide Crónica (GELMC), Hernández-Boluda JC, Pereira A, Pastor-Galán I, Alvarez-Larrán A, Savchuk A, et al. Feasibility of treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia in clinical practice: results from a nationwide series of 236 patients. *Blood Cancer J*. 2018;8:91.
- 117.** Takahashi N, Kyo T, Maeda Y, Sugihara T, Usuki K, Kawaguchi T, et al. Discontinuation of imatinib in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97:903-6.
- 118.** Vogelstein B, Kinzler K. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:9236-41.
- 119.** Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a Highly Quiescent Subpopulation of Primitive Leukemic Cells in Chronic Myeloid Leukemia. 1999;10.

- 120.** Copland M, Hamilton A, Elrick L, Baird J, Allan E, Jordanides N, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier pro- genitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006;107:4532-9.
- 121.** Jørgensen HG, Allan E, Jordanides N, Mountford J, Holyoake TL. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+CML cells. *Blood*. 2007;109:4016-9.
- 122.** Graham SM, Vass J, Holyoake TL, Graham G. Transcriptional analysis of quiescent and proliferating CD34+human hemopoietic cells from normal and chronic myeloid leukemia sources. *STEM CELLS*. 2007;25:3111-20.
- 123.** Ross DM, Branford S, Seymour JF, Schwarer AP, Arthur C, Bartley P, et al. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia*. 2010;24:1719-24.
- 124.** Goh H-G, Lin M, Fukushima T, Saglio G, Kim D, Choi S-Y, et al. Sensitive quantitation of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia using nanofluidic digital polymerase chain reaction assay. *Leuk Lymphoma*. 2011;52:896-904.
- 125.** Tang M, Foo J, Gonen M, Guilhot J, Mahon F-X, Michor F. Selection pressure exerted by imatinib therapy leads to disparate outcomes of imatinib discontinuation trials. *Haematologica*. 2012;97:1553-61.
- 126.** Mahon F-X, Etienne G. Deep Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia: The New Goal of Therapy? *Clin Cancer Res*. 2014;20:310-22.
- 127.** Sadovnik I, Hoelbl-Kovacic A, Herrmann H, Eisenwort G, Cerny-Reiterer S, Warsch W, et al. Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph+ CML. *Clin Cancer Res*. 2016;22:2051-61.
- 128.** Ågerstam H, Hansen N, von Palffy S, Sandén C, Reckzeh K, Karlsson C, et al. IL1RAP antibodies block IL-1-induced expansion of candidate CML stem cells and mediate cell killing in xenograft models. *Blood*. 2016;128:2683-93.
- 129.** Herrmann H, Sadovnik I, Cerny-Reiterer S, Rüllicke T, Stefanzi G, Willmann M, et al. Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2014;123:3951-62.
- 130.** Bocchia M, Sicuranza A, Abruzzese E, Iurlo A, Sirianni S, Gozzini A, et al. Residual Peripheral Blood CD26+ Leukemic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia Patients During TKI Therapy and During Treatment-Free Remission. *Front Oncol*. 2018;8:194.
- 131.** Culen M, Borsky M, Nemethova V, Razga F, Smejkal J, Jurcek T, et al. Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem cell compartment in chronic myeloid leukemia: patient-subgroups, prognostic impact, and technical aspects. *Oncotarget*. 2016;7:33016-24.

- 132.** Kinstrie R, Horne GA, Morrison H, Irvine D, Munje C, Castañeda EG, et al. CD93 is expressed on chronic myeloid leukemia stem cells and identifies a quiescent population which persists after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leukemia*. 2020;34:1613-1625.
- 133.** Goodell M, Brose K, Paradis G, Conner A, Mulligan R. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183:1797-806.
- 134.** Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res*. 2006;312:3701-10.
- 135.** Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:48-58.
- 136.** Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:12339-44.
- 137.** Wolmarans E, Nel S, Durandt C, Mellet J, Pepper MS. Side Population: Its Use in the Study of Cellular Heterogeneity and as a Potential Enrichment Tool for Rare Cell Populations. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1-7.
- 138.** Moshaver B, Wouters RF, Kelder A, Ossenkoppele GJ, Westra GAH, Kwidama Z, et al. Relationship between CD34/CD38 and side population (SP) defined leukemia stem cell compartments in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2019;81:27-34.
- 139.** Hughes A, Yong ASM. Immune Effector Recovery in Chronic Myeloid Leukemia and Treatment-Free Remission. *Front Immunol*. 2017;8:469.
- 140.** Molldrem JJ, Lee PP, Kant S, Wieder E, Jiang W, Lu S, et al. Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J Clin Invest*. 2003;111:639-47.
- 141.** Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010;116:3865-74.
- 142.** Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112:461-9.
- 143.** Lee H, Baek K. Role of natural killer cells for immunotherapy in chronic myeloid leukemia (Review). *Oncol Rep*. 2019;41:2625-1635.
- 144.** Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, Marelli-Berg F, Dazzi F, Simpson E, et al. Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood*. 2003;101:3560-7.

- 145.** Gabrilovich D, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:162-74.
- 146.** Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Cross-Tolerance in B-Cell Lymphoma by Expanding Regulatory T Cells. *Cancer Res.* 2008;68:5439-49.
- 147.** Giallongo C, Parrinello N, Tibullo D, La Cava P, Romano A, Chiarenza A, et al. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are increased and exert immunosuppressive activity together with polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in chronic myeloid leukemia patients. *PLoS ONE.* 2014;9:e101848.
- 148.** Bachy E, Bernaud J, Roy P, Rigal D, Nicolini F. Quantitative and functional analyses of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells in chronic phase chronic myeloid leukaemia patients at diagnosis and on imatinib mesylate. *Br J Haematol.* 2011;153:139-43.
- 149.** Shi L, Chen S, Yang L, Li Y. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 2013;6:74.
- 150.** Swatler J, Dudka W, Bugajski L, Brewinska-Olchowik M, Kozłowska E, Piwocka K. Chronic myeloid leukemia-derived extracellular vesicles increase Foxp3 level and suppressive activity of thymic regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2020;50:606-9.
- 151.** Rea D, Dulphy N, Henry G, Guilhot J, Guilhot F, Nicolini F, et al. Low natural killer (NK) cell counts and functionally are associated with molecular relapse after imatinib discontinuation in patients with chronic phase-chronic myeloid leukemia with undetectable BCR-ABL transcripts for at least 2 years: preliminary results from immunostim, on behalf of STIM investigators. *Haematologica.* 2017;102:1368-77.
- 152.** Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, Guilhot J, Brück O, Lähdenmäki H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2017;31:1108-16.
- 153.** Schütz C, Inselmann S, Saussele S, Dietz CT, Müller MC, Eigendorff E, et al. Expression of the CTLA-4 ligand CD86 on plasmacytoid dendritic cells (pDC) predicts risk of disease recurrence after treatment discontinuation in CML. *Leukemia.* 2017;31:829-36.
- 154.** Burmester J, Sedova M, Shapero M, Mansfield E. DMET TM Microarray Technology for Pharmacogenomics-Based Personalized Medicine. *Methods Mol Biol.* 2010;632:99-124.
- 155.** Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics.* 2007;23:654-5.
- 156.** Barrett J, Fry B, Maller J, Daly M. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21:263-5.

- 157.** Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e21-e21.
- 158.** Hsieh AYY, Saberi S, Ajaykumar A, Hukezalie K, Gadawski I, Sattha B, et al. Optimization of a Relative Telomere Length Assay by Monochromatic Multiplex Real-Time Quantitative PCR on the LightCycler 480. *J Mol Diagn.* 2016;18:425-37.
- 159.** Geelen IGP, Thielen N, Janssen JJWM, Hoogendoorn M, Roosma TJA, Willemsen SP, et al. Treatment outcome in a population-based, 'real-world' cohort of patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2017;102:1842-9.
- 160.** Cortes J, Huynh L, Mendelson E, Brandt P, Dalal D, DerSarkissian M, et al. Treatment patterns and deep molecular response in chronic phase – chronic myeloid leukemia patients treated with second-line nilotinib or dasatinib: a multi-country retrospective chart review study. *Leuk Lymphoma.* 2020;61:98-107.
- 161.** Gambacorti-Passerini C, Brümmendorf TH, Kim D, Turkina AG, Masszi T, Assouline S, et al. Bosutinib efficacy and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib resistance or intolerance: Minimum 24-month follow-up. *Am J Hematol.* 2014;89:732-42.
- 162.** Fine JP, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *J Am Stat Assoc.* 1999;94:496-509.
- 163.** Bernardi S, Malagola M, Zanaglio C, Polverelli N, Dereli Eke E, D'Adda M, et al. Digital PCR improves the quantitation of DMR and the selection of CML candidates to TKIs discontinuation. *Cancer Med.* 2019;8:2041-55.
- 164.** Petriz J. Flow Cytometry of the Side Population (SP). *Curr Protoc Cytom.* 2013;64:9.23.1-9.23.20.
- 165.** Westfall P, Young S. Resampling-Based Multiple Testing: Examples and Methods for P-value Adjustment. Vol. xvii. John Wiley & Sons; 1993.
- 166.** Druker BJ, Gathmann I, Kantarjian H, Deininger MW, Goldman JM, Hochhaus A, et al. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2006;10.
- 167.** O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007;110:2242-9.
- 168.** Josephs D, Fisher D, Spicer J, Flanagan R. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: implications for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2013;35:562-87.
- 169.** Kim DH (Dennis), Sriharsha L, Xu W, Kamel-Reid S, Liu X, Siminovitich K, et al. Clinical Relevance of a Pharmacogenetic Approach Using Multiple Candidate Genes to Predict Response and Resistance to Imatinib Therapy in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4750-8.

- 170.** Ni L-N, Li J-Y, Miao K-R, Qiao C, Zhang S-J, Qiu H-R, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol.* 2011;28:265-9.
- 171.** Maffioli M, Camós M, Gaya A, Hernández-Boluda J-C, Álvarez-Larrán A, Domingo A, et al. Correlation between genetic polymorphisms of the hOCT1 and MDR1 genes and the response to imatinib in patients newly diagnosed with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011;35:1014-9.
- 172.** Ben Hassine I, Gharbi H, Soltani I, Ben Hadj Othman H, Farrah A, Amouri H, et al. Molecular study of ABCB1 gene and its correlation with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;80:829-39.
- 173.** Koren-Michowitz M, Buzaglo Z, Ribakovsky E, Schwarz M, Pessach I, Shimoni A, et al. OCT1 genetic variants are associated with long term outcomes in imatinib treated chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol.* 2014;92:283-8.
- 174.** de Lima LT, Bueno CT, Vivona D, Hirata RDC, Hirata MH, Hungria VT de M, et al. Relationship between SLCO1B3 and ABCA3 polymorphisms and imatinib response in chronic myeloid leukemia patients. *Hematology.* 2015;20:137-42.
- 175.** Vaidya S, Ghosh K, Shanmukhaiah C, Vundinti BR. Genetic variations of hOCT1 gene and CYP3A4/A5 genes and their association with imatinib response in Chronic Myeloid Leukemia. *Eur J Pharmacol.* 2015;765:124-30.
- 176.** Angelini S, Soverini S, Ravegnini G, Barnett M, Turrini E, Thornquist M, et al. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica.* 2013;98:193-200.
- 177.** Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;82:258-64.
- 178.** Ben Hassine I, Gharbi H, Soltani I, Teber M, Farrah A, Ben Hadj Othman H, et al. hOCT1 gene expression predict for optimal response to Imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79:737-45.
- 179.** Nardinelli L, Sanabani SS, Didone A, Ferreira P de B, Serpa M, Novaes MMY, et al. Pre-therapeutic expression of the hOCT1 gene predicts a complete molecular response to imatinib mesylate in chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2012;127:228-34.
- 180.** Watkins DB, Hughes TP, White DL. OCT1 and imatinib transport in CML: is it clinically relevant? *Leukemia.* 2015;29:1960-9.

- 181.** Bazeos A, Marin D, Reid AG, Gerrard G, Milojkovic D, May PC, et al. hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24:1243-5.
- 182.** Zach O, Krieger O, Foedermayr M, Zellhofer B, Lutz D. OCT1 (SLC22A1) R61C polymorphism and response to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia patients. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:2222-3.
- 183.** White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Hughes TP. OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1. *Leukemia*. 2010;24:1962-5.
- 184.** Takahashi N, Miura M, Scott SA, Kagaya H, Kameoka Y, Tagawa H, et al. Influence of CYP3A5 and drug transporter polymorphisms on imatinib trough concentration and clinical response among patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *J Hum Genet*. 2010;55:731-7.
- 185.** Burger K, Nooter K. Pharmacokinetic Resistance to Imatinib Mesylate: Role of the ABC Drug Pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the Oral Bioavailability of Imatinib. *Cell Cycle*. 2004;3:1502-5.
- 186.** Eechoute K, Sparreboom A, Burger H, Franke RM, Schiavon G, Verweij J, et al. Drug Transporters and Imatinib Treatment: Implications for Clinical Practice. *Clin Cancer Res*. 2011;17:406-15.
- 187.** Hamada A, Miyano H, Watanabe H, Saito H. Interaction of Imatinib Mesilate with Human P-Glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307:824-8.
- 188.** Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E, et al. Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the ABCG2 (BCRP) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and SN-38 in Vitro . *Cancer Res*. 2004;64:2333-7.
- 189.** Shukla S, Sauna ZE, Ambudkar SV. Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site(s) of the multidrug-resistance-linked ABC drug transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2. *Leukemia*. 2008;22:445-7.
- 190.** Assef Y, Rubio F, Coló G, del Mónaco S, Costas MA, Kotsias BA. Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. *Leuk Res*. 2009;33:710-6.
- 191.** Eadie LN, Hughes TP, White DL. Interaction of the efflux transporters ABCB1 and ABCG2 with imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;95:294-306.
- 192.** Zheng Q, Wu H, Yu Q, Kim DH (Dennis), Lipton JH, Angelini S, et al. ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2015;15:127-34.

- 193.** Wang JL, Liu HJ, Li F, Yang WY, Wang JM, Tan SF, et al. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms may not be directly associated with response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Genet Mol Res.* 2015;14:14967-78.
- 194.** Jiang Z-P, Zhao X-L, Takahashi N, Angelini S, Dubashi B, Sun L, et al. Trough concentration and ABCG2 polymorphism are better to predict imatinib response in chronic myeloid leukemia: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2017;18:35-56.
- 195.** Rajamani BM, Benjamin ESB, Abraham A, Ganesan S, Lakshmi KM, Anandan S, et al. Plasma imatinib levels and ABCB1 polymorphism influences early molecular response and failure-free survival in newly diagnosed chronic phase CML patients. *Sci Rep.* 2020;10:20640.
- 196.** Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán Á, Tarr P, Fishbein MC, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005;1:121-31.
- 197.** Tarling EJ, Edwards PA. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:19719-24.
- 198.** Michele G, Enzo M, Filippo G. Imatinib and Hyperlipidemia. *N Engl J Med.* 2005;2.
- 199.** Glodkowska-Mrowka E, Mrowka P, Basak GW, Niesiobedzka-Krezel J, Seferynska I, Wlodarski PK, et al. Statins inhibit ABCB1 and ABCG2 drug transporter activity in chronic myeloid leukemia cells and potentiate antileukemic effects of imatinib. *Exp Hematol.* 2014;42:439-47.
- 200.** Bandyopadhyay S, Li J, Traer E, Tyner JW, Zhou A, Oh ST, et al. Cholesterol esterification inhibition and imatinib treatment synergistically inhibit growth of BCR-ABL mutation-independent resistant chronic myelogenous leukemia. Agoulnik IU, editor. *PLOS ONE.* 2017;12:e0179558.
- 201.** Nayagam JS, Williamson C, Joshi D, Thompson RJ. Review article: liver disease in adults with variants in the cholestasis-related genes ABCB11, ABCB4 and ATP8B1. :12.
- 202.** Roustit M, Fonrose X, Montani D, Girerd B, Stanke-Labesque F, Gonnet N, et al. CYP2C9, SLCO1B1, SLCO1B3, and ABCB11 Polymorphisms in Patients With Bosentan-Induced Liver Toxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95:583-5.
- 203.** Chen R, Wang J, Tang S, Zhang Y, Lv X, Wu S, et al. Role of polymorphic bile salt export pump (BSEP, ABCB11) transporters in anti-tuberculosis drug-induced liver injury in a Chinese cohort. *Sci Rep.* 2016;6:27750.
- 204.** Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard M-A, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2007;109:3496-9.
- 205.** Sohn SK, Oh SJ, Kim BS, Ryoo HM, Chung JS, Joo YD, et al. Trough plasma imatinib levels are correlated with optimal cytogenetic responses at 6 months after treatment with standard dose of imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2011;52:1024-9.

- 206.** Bouchet S, Titier K, Moore N, Lassalle R, Ambrosino B, Poulette S, et al. Therapeutic drug monitoring of imatinib in chronic myeloid leukemia: experience from 1216 patients at a centralized laboratory. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013;27:690-7.
- 207.** Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Imatinib in a Phase I Trial With Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J Clin Oncol.* 2004;22:935-42.
- 208.** Filppula AM, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ, Backman JT. Autoinhibition of CYP3A4 Leads to Important Role of CYP2C8 in Imatinib Metabolism: Variability in CYP2C8 Activity May Alter Plasma Concentrations and Response. *Drug Metab Dispos.* 2013;41:50-9.
- 209.** Nebot N, Crettol S, D'Esposito F, Tattam B, Hibbs DE, Murray M. Participation of CYP2C8 and CYP3A4 in the N-demethylation of imatinib in human hepatic microsomes: Human CYPs 2C8 and 3A, and imatinib N-demethylation. *Br J Pharmacol.* 2010;161:1059-69.
- 210.** Barratt DT, Cox HK, Menelaou A, Yeung DT, White DL, Hughes TP, et al. CYP2C8 Genotype Significantly Alters Imatinib Metabolism in Chronic Myeloid Leukaemia Patients. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56:977-85.
- 211.** Harivenkatesh N, Kumar L, Bakhshi S, Sharma A, Kabra M, Velpandian T, et al. Influence of MDR1 and CYP3A5 genetic polymorphisms on trough levels and therapeutic response of imatinib in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia. *Pharmacol Res.* 2017;120:138-45.
- 212.** Pena MÁ, Muriel J, Saiz-Rodríguez M, Borobia AM, Abad-Santos F, Frías J, et al. Effect of Cytochrome P450 and ABCB1 Polymorphisms on Imatinib Pharmacokinetics After Single-Dose Administration to Healthy Subjects. *Clin Drug Investig.* 2020;40:617-28.
- 213.** Zhou L-P, Luan H, Dong X-H, Jin G-J, Man D-L, Shang H. Genetic Variants of CYP2D6 Gene and Cancer Risk: A HuGE Systematic Review and Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:3165-72.
- 214.** Rendic S, Carlo FJD. Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metab Rev.* 1997;29:413-580.
- 215.** Kroemer HK, Eichelbaum M. "It's the genes, stupid" Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sci.* 1995;56:2285-98.
- 216.** Fernández-Santander A, del Saz Sánchez M, Tejerina Gómez A, Bandrés Moya F. CYP2D6*4 allele and breast cancer risk: Is there any association? *Clin Transl Oncol.* 2012;14:157-9.
- 217.** Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A, Cox NJ. Rational Inferences about Departures from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005;76:967-86.
- 218.** Ravegnini G, Urbini M, Simeon V, Genovese C, Astolfi A, Nannini M, et al. An exploratory study by DMET array identifies a germline signature associated with imatinib response in gastrointestinal stromal tumor. *Pharmacogenomics J.* 2019;19:390-400.

- 219.** Larson RA, Hochhaus A, Hughes TP, Clark RE, Etienne G, Kim D-W, et al. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia*. 2012;26:2197-203.
- 220.** Breccia M, Colafigli G, Molica M, Scalzulli E, Diverio D, Latagliata R, et al. Timing and deepness of response to tyrosine kinase inhibitors as a measure of potential treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia patients managed in the real-life. *Am J Hematol*. 2017;92:E668-70.
- 221.** Wang R, Cong Y, Li C, Zhang C, Lin H. Predictive value of early molecular response for deep molecular response in chronic phase of chronic myeloid leukemia: *Medicine (Baltimore)*. 2019;98:e15222.
- 222.** Keller G, Brassat U, Braig M, Heim D, Wege H, Brümmendorf TH. Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol Oncol*. 2009;27:123-9.
- 223.** Castagnetti F, Gugliotta G, Baccarani M, Breccia M, Specchia G, Levato L, et al. Differences among young adults, adults and elderly chronic myeloid leukemia patients. *Ann Oncol*. 2015;26:185-92.
- 224.** Bouillon A-S, Ventura Ferreira MS, Awad SA, Richter J, Hochhaus A, Kunzmann V, et al. Telomere shortening correlates with leukemic stem cell burden at diagnosis of chronic myeloid leukemia. *Blood Advances*. 2018;2:1572-9.
- 225.** Pfirrmann M, Clark RE, Prejzner W, Lauseker M, Baccarani M, Saussele S, et al. The EUTOS long-term survival (ELTS) score is superior to the Sokal score for predicting survival in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34:2138-49.
- 226.** Sato E, Iriyama N, Tokuhira M, Takaku T, Ishikawa M, Nakazato T, et al. The EUTOS long-term survival score predicts disease-specific mortality and molecular responses among patients with chronic myeloid leukemia in a practice-based cohort. *Cancer Med*. 2020;9:8931-9.
- 227.** Baccarani M, Rosti G, Soverini S. Chronic myeloid leukemia: the concepts of resistance and persistence and the relationship with the BCR-ABL1 transcript type. *Leukemia*. 2019;33:2358-64.
- 228.** Hanfstein B, Lauseker M, Hahlmann R, Saussele S, Erben D, Dietz C, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica*. 2014;99:1441-7.
- 229.** Jain P, Kantarjian H, Patel KP, Gonzalez GN, Luthra R, Shamanna RK, et al. Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2016;127:1269-75.
- 230.** Molica M, Abruzzese E, Breccia M. Prognostic Significance of Transcript-Type BCR-ABL1 in Chronic Myeloid Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2020;12:e2020062.

- 231.** Nachi M, Kihel I, Entasoltane B, Brahimi M, Yafour N, Guella D, et al. Impact of the major BCR-ABL1 transcript type on clinical and biological parameters and molecular response in patients with chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2020;S1658-3876.
- 232.** for the International BCR-ABL Study Group, Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G, Soverini S, et al. The proportion of different BCR-ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. *Leukemia.* 2019;33:1173-83.
- 233.** Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009;27:6041-51.
- 234.** Pintilie M. Análisis de riesgos competitivos. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:599-605.
- 235.** Lee S-E, Choi SY, Song H-Y, Kim S-H, Choi M-Y, Park JS, et al. Imatinib withdrawal syndrome and longer duration of imatinib have a close association with a lower molecular relapse after treatment discontinuation: the KID study. *Haematologica.* 2016;101:717-23.
- 236.** Claudiani S, Apperley JF, Gale RP, Clark R, Szydlo R, Deplano S, et al. E14a2 BCR-ABL1 transcript is associated with a higher rate of treatment-free remission in individuals with chronic myeloid leukemia after stopping tyrosine kinase inhibitor therapy. *Haematologica.* 2017;102:e297-9.
- 237.** Fava C, Rege-Cambrin G, Dogliotti I, Cerrano M, Berchiolla P, Dragani M, et al. Observational study of chronic myeloid leukemia Italian patients who discontinued tyrosine kinase inhibitors in clinical practice. *Haematologica.* 2019;104:1589-96.
- 238.** Shanmuganathan N, Pagani IS, Ross DM, Park S, Yong ASM, Braley JA, et al. Early BCR-ABL1 kinetics are predictive of subsequent achievement of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2021;137:1196-207.
- 239.** Alikian M, Whale AS, Akiki S, Piechocki K, Torrado C, Myint T, et al. RT-qPCR and RT-Digital PCR: A Comparison of Different Platforms for the Evaluation of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Chem.* 2017;63:525-31.
- 240.** Polakova KM, Zizkova H, Zuna J, Motlova E, Hovorkova L, Gottschalk A, et al. Analysis of chronic myeloid leukaemia during deep molecular response by genomic PCR: a traffic light stratification model with impact on treatment-free remission. *Leukemia.* 2020;34:2113-2124.
- 241.** Graham SM, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood.* 2002;99:319-25.
- 242.** Zhang B, Li L, Ho Y, Li M, Marcucci G, Tong W, et al. Heterogeneity of leukemia-initiating capacity of chronic myelogenous leukemia stem cells. *J Clin Invest.* 2016;126:975-91.

- 243.** Warfvinge R, Geironsen L, Sommarin MNE, Lang S, Karlsson C, Roschupkina T, et al. Single-cell molecular analysis defines therapy response and immunophenotype of stem cell subpopulations in CML. *Blood*. 2017;129:2384-94.
- 244.** Herrmann H, Cerny-Reiterer S, Gleixner KV, Blatt K, Herndlhofer S, Rabitsch W, et al. CD34(+)/CD38(-) stem cells in chronic myeloid leukemia express Siglec-3 (CD33) and are responsive to the CD33-targeting drug gemtuzumab/ozogamicin. *Haematologica*. 2012;97:219-26.
- 245.** C. Greenlee-Wacker M, D. Galvan M, S. Bohlsón S. CD93: Recent Advances and Implications in Disease. *Curr Drug Targets*. 2012;13:411-20.
- 246.** Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis*. 2005;11:729-37.
- 247.** Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:14228-33.
- 248.** Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;98:1166-73.
- 249.** Baeten JT, Waarts MR, Pruitt MM, Chan W-C, Andrade J, de Jong JLO. The side population enriches for leukemia-propagating cell activity and Wnt pathway expression in zebrafish acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2019;104:1388-95.
- 250.** Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2002;99:507-12.
- 251.** Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7:1028-34.
- 252.** Hu Y, Swerdlow S, Duffy TM, Weinmann R, Lee FY, Li S. Targeting multiple kinase pathways in leukemic progenitors and stem cells is essential for improved treatment of Ph+ leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:16870-5.
- 253.** Chapuy B, Panse M, Radunski U, Koch R, Wenzel D, Inagaki N, et al. ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica*. 2009;94:1528-36.
- 254.** Vigón L, Luna A, Galán M, Rodríguez-Mora S, Fuertes D, Mateos E, et al. Identification of Immunological Parameters as Predictive Biomarkers of Relapse in Patients with Chronic Myeloid Leukemia on Treatment-Free Remission. *J Clin Med*. 2020;10:42.
- 255.** Hayashi Y, Nakamae H, Katayama T, Nakane T, Koh H, Nakamae M, et al. Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib. *Leuk Lymphoma*. 2012;53:1084-9.

- 256.** El Missiry M, Adnan Awad S, Rajala HL, Al-Samadi A, Ekblom M, Markev n B, et al. Assessment of bone marrow lymphocytic status during tyrosine kinase inhibitor therapy and its relation to therapy response in chronic myeloid leukaemia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016;142:1041-50.
- 257.** Caocci G, Martino B, Greco M, Abruzzese E, Trawinska MM, Lai S, et al. Killer immunoglobulin-like receptors can predict TKI treatment-free remission in chronic myeloid leukemia patients. *Exp Hematol.* 2015;43:1015-1018.e1.
- 258.** Dumas Y, B rard E, Br al C, Dulucq S, R a D, Nicolini F, et al. Killer immunoglobulin-like receptor genotypes and chronic myeloid leukemia outcomes after imatinib cessation for treatment-free remission. *Cancer Med.* 2019;8:4976-4985.
- 259.** Naranbhai V, Bartman P, Ndlovu D, Ramkalawon P, Ndong'u T, Wilson D, et al. Impact of blood processing variations on natural killer cell frequency, activation, chemokine receptor expression and function. *J Immunol Methods.* 2011;366:28-35.
- 260.** Market M, Tennakoon G, Ng J, Scaffidi M, de Souza CT, Kennedy MA, et al. A Method of Assessment of Human Natural Killer Cell Phenotype and Function in Whole Blood. *Front Immunol.* 2020;11:963.
- 261.** Irani YD, Hughes A, Clarkson J, Kok CH, Shanmuganathan N, White DL, et al. Successful treatment-free remission in chronic myeloid leukaemia and its association with reduced immune suppressors and increased natural killer cells. *Br J Haematol.* 2020;191:433-41.

ANEXOS

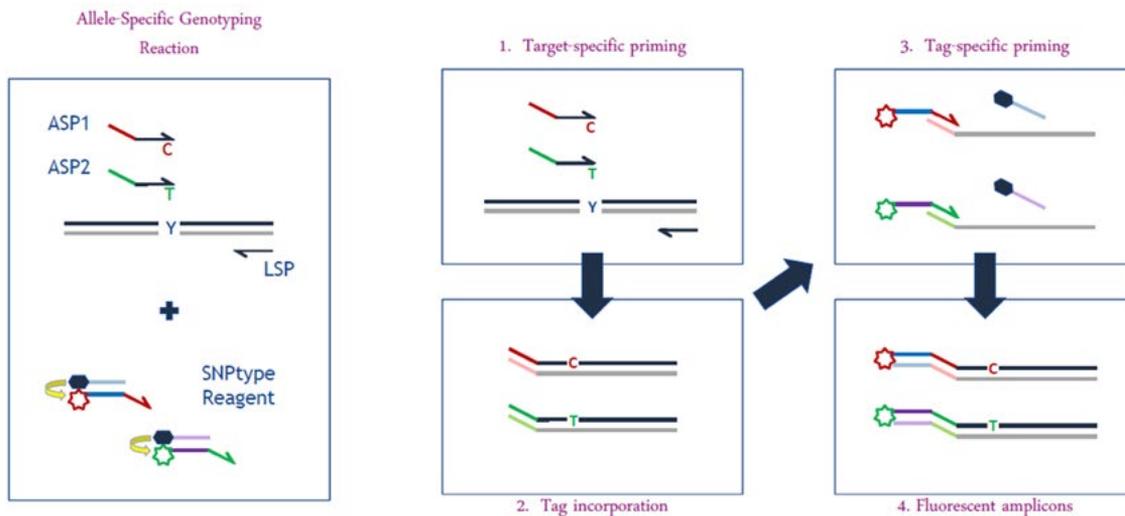
ANEXO I - Metodología suplementaria

1. Listado de todos los genes incluidos en el array DMET (Affimetrix)

Genes represented by DMET™ Plus Panel								
ABC81	ALDH2	COMT	CYP4F3	EPHX2	MAOA	RPL13	SLC22A14	TBXA51 *
ABC84	ALDH3A1	CROT	CYP4F8	FAAH	MAOB	RXRA	SLC25A27	TPMT *p
ABC87	ALDH3A2	CYP1A1 *	CYP4F11	FMO1	MAT1A	SERPINA7	SLC28A1	TPSG1
ABC811	AOX1	CYP1A2 *p	CYP4F12	FMO2 *	METTL1	SLC5A6	SLC28A2	TYMS
ABCC1	APOA2	CYP1B1 *	CYP4Z1	FMO3	NAT1 *p	SLC6A6	SLC28A3	UGT1A1 *p
ABCC2	ARNT	CYP2A6 *p	CYP7A1	FMO4	NAT2 *p	SLC7A5	SLC29A1	UGT1A3 *
ABCC3	ARSA	CYP2A7	CYP7B1	FMO5	NNMT	SLC7A7	SLC29A2	UGT1A4 *
ABCC4	ATP7A	CYP2A13*	CYP8B1	FMO6	NQO1	SLC7A8	SLCO1A2	UGT1A5
ABCC5	ATP7B	CYP2B6 *p	CYP11A1	G6PD	NR1I2	SLC10A1	SLCO1B1*p	UGT1A6 *
ABCC6	CA5P	CYP2B7P1	CYP11B1	GSTA1	NR1I3	SLC10A2	SLCO1B3	UGT1A7 *
ABCC8	CBR1	CYP2C8 *p	CYP11B2	GSTA2	NR3C1	SLC13A1	SLCO2B1*	UGT1A8 *
ABCC9	CBR3	CYP2C9 *p	CYP17A1	GSTA3	ORM1	SLC15A1	SLCO3A1	UGT1A9 *
ABCG1	CDA *	CYP2C18	CYP19A1*	GSTA4	ORM2	SLC15A2*	SLCO4A1	UGT1A10*
ABCG2	CES2	CYP2C19*p	CYP20A1	GSTA5	PGAP3	SLC16A1	SLCO5A1	UGT2A1
ABP1	CHST1	CYP2D6 *p	CYP21A2	GSTM1 *p	PNMT	SLC19A1	SPG7	UGT2B4
ADH1A	CHST2	CYP2E1 *p	CYP24A1	GSTM2	PON1	SLC22A1	SPN	UGT2B7 *p
ADH1B	CHST3	CYP2F1 *	CYP26A1	GSTM3	PON2	SLC22A2*	SULT1A1*	UGT2B11
ADH1C	CHST4	CYP2J2 *	CYP26C1	GSTM4	PON3	SLC22A3	SULT1A2	UGT2B15*
ADH4	CHST5	CYP2S1 *	CYP27A1	GSTM5	POR	SLC22A4	SULT1A3	UGT2B17*
ADH5	CHST6	CYP3A4 *p	CYP27B1	GSTO1	PPARD	SLC22A5	SULT1B1	UGT2B28
ADH6	CHST7	CYP3A5 *p	CYP39A1	GSTP1 *p	PPARG	SLC22A6	SULT1C2	UGT8
ADH7	CHST8	CYP3A7 *p	CYP46A1	GSTT1 *	PPP1R9A	SLC22A7	SULT1C4	VKORC1 *p
AHR	CHST9	CYP3A43*	CYP51A1	GSTT2	PRSS53	SLC22A8	SULT1E1	XDH
AKAP9	CHST10	CYP4A11	DCK	GSTZ1	PTGIS *	SLC22A11	SULT2A1	
ALB	CHST11	CYP4B1 *	DPYD *	HMGCR	QPRT	SLC22A12	SULT2B1	
ALDH1A1	CHST13	CYP4F2 *	EPHX1	HNMT	RALBP1	SLC22A13	SULT4A1	

* = translated to star allele classification p = translated to predicted phenotype/metabolizer status

2. Descripción de la tecnología *SNPtype Assay* de Fluidigm



3. Protocolo de qPCR para la detección y cuantificación del gen de fusión BCR-ABL1 (transcritos b2a2 o b3a2 de la forma p210)

Esta técnica fue usada para **todos los trabajos de la presente Tesis Doctoral** con el fin de determinar las respuesta moleculares a diferentes tiempos en los pacientes incluidos en los estudios.

Para este protocolo de qPCR se utiliza la tecnología TaqMan, que se basa en una sonda que contiene un fluorocromo emisor (*reporter*) en el extremo 5' y un fluorocromo receptor (*quencher*) en el extremo 3'. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda TaqMan se hidroliza debido a la actividad nucleasa de la Taq polimerasa, lo que comporta la separación de los 2 fluorocromos (*reporter* y *quencher*) y consecuentemente, un aumento de la fluorescencia. Esta fluorescencia se cuantifica por el software del programa y es proporcional al número de copias del gen de estudio presentes en la muestra.

La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR System* (ThermoFisher, cat. no. 4329001), en placas de 384 pocillos. En cada uno de los pocillos se añadió:

- 2,5µL de ADNc (obtenido en el proceso de retrotranscripción del ARN de la muestra correspondiente)
- 6,25µL de Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (Takara, cat. no. RR390W)
- 0,5µL de la mezcla de primers y sondas para la detección de p210 incluida en el kit Ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR (QIAGEN, cat. no. 670723)
- 0,25µL de ROX (Takara, cat. no. RR390W)
- 3µL de *nuclease-free* H₂O (Sigma, cat. no. W4502)

Como control interno se amplifica un gen endógeno en cada una de las muestras para comprobar que la integridad del ADNc sea la adecuada. En nuestro caso, el gen utilizado es el *ABL1*. Como control externo se incluye el IS que proporciona el propio kit (BCR-ABL1 MbcR IS-MMR). Tanto del gen de fusión (BCR-ABL1 p210) como del gen endógeno (*ABL1*) se hacen triplicados para cada muestra.

El protocolo de termociclador consta de:

- Incubación a 95°C durante 10 segundos
- 50 ciclos de PCR a:
 - 95°C durante 5 segundos
 - 60°C durante 30 segundos
- Incubación a 36°C durante 1 minuto

El resultado se reporta como el porcentaje de la *ratio* entre las copias de BCR-ABL1 y las copias de *ABL1*. A este porcentaje se le aplica un factor de conversión para poder expresar los resultados en el sistema internacional (IS) y así poder comparar los resultados entre diferentes laboratorios.

