

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Estudio de factores moleculares predictores de respuesta a
IMATINIB en pacientes diagnosticados de leucemia mieloide
crónica en fase crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Manuel Alonso Domínguez

Directores

**Joaquín Martínez López
Florinda Gilsanz Rodríguez**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Programa de Doctorado en Investigación Biomédica
Departamento Medicina



TESIS DOCTORAL
**ESTUDIO DE FACTORES MOLECULARES
PREDICTORES DE RESPUESTA A
IMATINIB EN PACIENTES
DIAGNOSTICADOS DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRÓNICA EN FASE CRÓNICA**

Juan Manuel Alonso Domínguez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento Medicina



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE FACTORES MOLECULARES

PREDICTORES DE RESPUESTA A

IMATINIB EN PACIENTES

DIAGNOSTICADOS DE LEUCEMIA

MIELOIDE CRÓNICA EN FASE CRÓNICA

Juan Manuel Alonso Domínguez

Directores:

Joaquín Martínez López

Florinda Gilsanz Rodríguez

Madrid, 2015

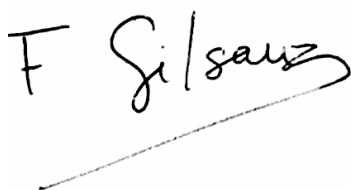
Doña Florinda Gilsanz Rodríguez, catedrática del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (emérita).

Don Joaquín Martínez López, profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

CERTIFICAMOS: Que la Tesis Doctoral realizada bajo nuestra dirección por Don Juan Manuel Alonso Domínguez titulada “Estudio de Factores Moleculares Predictores de Respuesta a Imatinib en Pacientes Diagnosticados de Leucemia Mieloide Crónica en Fase Crónica” reúne las condiciones de originalidad y rigor científico requeridos, y corresponde fielmente con los resultados obtenidos.

El presente trabajo ha sido revisado por los que suscriben, encontrándolo apto para su presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste donde proceda, firman el presente documento en Madrid, a diecinueve de noviembre de dos mil quince.



Dra. Florinda Gilsanz Rodríguez



Dr. Joaquín Martínez López

El verdadero sentido de la vida

“Somos visitantes en este planeta.

Estamos aquí durante noventa

o cien años a lo sumo.

Durante ese periodo

debemos intentar hacer algo bueno,

algo útil, con nuestras vidas.

Si contribuyes a la felicidad de los demás

habrás encontrado la verdadera meta,

el verdadero sentido de la vida.”

XIV Dalai Lama

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, y con mayor énfasis, me gustaría agradecerles a mis padres el haberme inculcado la pasión por el aprendizaje y el conocimiento. Siempre recordaré que “lo primero es lo primero” y que “hay tiempo para todo”. Y por todo lo demás, que no hace falta mencionar.

A mi hermana, por haber sido tan buen ejemplo en la vida, tan buena hermana, por la puerta preguntadora... y por darle formato a esta tesis.

Al resto de mi familia y amigos, y en especial a mi tío José por corregir la ortografía y sintaxis de la tesis.

A mis adjuntos y compañeros de residencia del Ramón y Cajal, por las enseñanzas de hematología y el trato que me dieron, especialmente a Valentín, por conseguirme la rotación en Hammersmith Hospital, y a Jesús, por ofrecerme un trabajo cuando no había becas para seguir investigando.

A Letizia Foroni, Gareth Gerrard y Jane Apperley por ofrecerme a mí este interesante estudio. A la Fundación Leucemia Linfoma y la Fundación Vistare por concederme la Beca Marcos Fernández para llevar a cabo la estancia en Londres para desarrollar la primera parte de este proyecto. A la fundación Leuka por hacerse cargo de parte de los gastos de esa primera parte del estudio.

A Joaquín Martínez por su tutorización durante el estudio y por brindarme la oportunidad de aprender biología molecular en su laboratorio. A la Fundación Cris Contra el Cáncer por cubrir los gastos de la segunda parte del estudio.

A Lorena por aguantar mis preocupaciones y quebraderos de cabeza desde que comencé este estudio. Periodo que curiosamente coincide con el tiempo que hemos compartido. Sin ti no lo hubiera conseguido.

ÍNDICE

Abreviaturas	17
Resumen	23
Abstract	31
1. Introducción	39
1.1. Epidemiología	42
1.2. Patogenia	43
1.2.1 Vía del erizo	47
1.3. Diagnóstico	51
1.4. Seguimiento	54
1.5. Tratamiento	58
1.5.1 Terapia pre-inhibidores de tirosinkinasa	58
1.5.2 Inhibidores de tirosinkinasa	59
1.6. Factores pronósticos al diagnóstico	63
1.7. Factores pronósticos al diagnóstico clínicos	64
1.8. Factores pronósticos al diagnóstico moleculares	68
1.9. Justificación del estudio	73
2. Hipótesis	75
3. Objetivos	79
4. Material y Métodos	83
4.1. Cohortes	85
4.1.1 Cohorte TLDA 1	85
4.1.2 Cohorte TLDA 2	86
4.1.3 Cohorte qPCR 1	86
4.1.4 Cohorte qPCR2	86
4.2. Muestras: almacenamiento, extracción ARN, retrotranscripción y análisis BCR-ABL1	90
4.2.1 Muestras cohorte TLDA1, TLDA2 y qPCR1	90
4.2.2 Muestras Cohorte qPCR2	91
4.3. Análisis de las muestras	93
4.3.1 TaqMan Low Density Array	93
4.3.2 qPCR cohorte 1	94
4.3.3 qPCR cohorte 2	95
4.4. Estudios in-vitro	97
4.4.1 Tratamiento con ITK	97
4.4.2 Tratamiento con Ciclopamina	97

4.5.	Análisis estadístico	99
4.5.1	Variables	99
4.5.2	Establecimiento de los puntos de corte de expresión génica	100
4.5.3	Análisis univariante	101
4.5.4	Análisis multivariante	102
4.5.5	Cálculo de la validez pronóstica de la prueba	102
4.5.6	Análisis estudios in-vitro	102
5.	Resultados	105
5.1.	Cohorte TLDA1	107
5.2.	Cohorte TLDA2	113
5.3.	Cohorte qPCR1	118
5.4.	Cohorte qPCR2	123
5.5.	Multivariante	126
5.6.	Cálculo de la validez pronóstica de la prueba	127
5.7.	Estudios in-vitro	128
6.	Discusión	133
6.1.	Objetivos 1,2 y 3	135
6.2.	Objetivo 4	146
7.	Conclusiones	151
8.	Bibliografía	155
	Anexos	173
	Hoja de información y Consentimiento informado para recogida prospectiva de muestras para estudios in-vitro	175
	Proteínas Incluidas en el Array	181
	Publicaciones y reconocimientos derivados del estudio	183

ABREVIATURAS

18S	18S ARN ribosomal
ACA	Alteraciones citogenéticas adicionales
ARNm	ARNm mensajero
AUC	Área bajo la curva
B2M	β 2-microglobulina
CB	crisis blástica
CMLQ	Células madre leucémicas quiescentes
Cq	Ciclo de cuantificación
ELN	Red de Leucemia Europea
Exp	Expresión
FA	Fase acelerada
FI	Fallo a imatinib
FISH	Hibridación in situ fluorescente
FC	fase crónica
GUSB	β -glucuronidasa
kDa	kiloDaltons
H12O	Hospital Doce de Octubre
HH	Hammersmith Hospital
IC	Intervalo confianza
IS	Escala internacional
ITK	Inhibidores de tirosinkinasa
LMC	Leucemia mieloide crónica

LSC	Células madre leucémicas
MGB	Minor-groove binding
MO	Médula ósea
NA	No aplicable
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ph+	Philadelphia positiva
PTCH	Patched
qPCR	PCR cuantitativa
RCC	Respuesta citogenética completa
RHC	Respuesta hematológica completa
RM ⁴	Respuesta molecular grado 4
RM ^{4.5}	Respuesta molecular grado 4.5
RMM	Respuesta molecular mayor
RNA _m	RNA mensajero
ROC	Receiver operating characteristic
RT	Retrotranscripción
SG-LMC	Supervivencia global asociada a LMC
SHH	Lipoproteína Erizo Sonic
SLFI	Supervivencia libre de fallo a imatinib
SLP	Supervivencia libre de progresión
Smo	Smoothened

SP	sangre periférica
STI571	Inhibidor de la señal de transducción 571
TLDA	TaqMan Low Density Array
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

RESUMEN

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad clonal originada en la célula madre totipotente hematopoyética, caracterizada por la translocación de los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, y que da lugar al gen de fusión BCR-ABL1.

En 1996 se reporta la gran eficacia in-vitro del compuesto STI571 y en 2003 se publican los resultados del estudio IRIS. Los resultados de este estudio suponen un hito en la historia de la LMC y, por extensión, del tratamiento de la patología tumoral. Posteriormente, dasatinib y nilotinib fueron también aprobados para su uso en primera línea. De los 3 inhibidores de tirosinkinasa (ITK) disponibles en primera línea, imatinib parece ser el de uso más extendido por la buena respuesta de la mayoría de los pacientes y por la mayor experiencia de uso que se tiene con el mismo, durante la cual no se han desarrollado efectos secundarios severos. No obstante, en torno al 25% de los pacientes requerirá el uso de los ITK de segunda generación por falta de eficacia de imatinib.

En la LMC hay 3 scores clínicos: Sokal, Hasford y EUTOS. Ninguno de los cuales está claramente recomendado para dirigir la terapia de primera línea, aunque la clasificación en el grupo de alto riesgo en cualquiera de ellos podría apoyar el uso de los ITK de segunda generación, al ser considerado una alarma por la ELN. Se han desarrollado diversos estudios comparando el perfil de expresión génica de pacientes respondedores frente a no respondedores a imatinib pese a lo cual actualmente no se aplica ningún test molecular al diagnóstico que ayude a predecir la respuesta a imatinib. Por lo tanto, la mejor manera de saber la respuesta del paciente a los ITK es valorando esta, una vez iniciado el tratamiento y la tendencia es a hacerlo lo antes posible para llevar a cabo un cambio de línea precoz. Parece razonable pensar que sería incluso más beneficioso saber, antes de iniciar el tratamiento, las probabilidades de respuesta al mismo para comenzar desde el inicio con el ITK adecuado. De todo lo expuesto se deriva la necesidad de desarrollar un test que informe de las

probabilidades del paciente de responder adecuadamente a imatinib, con lo que, en caso contrario, los ITK de segunda generación serían una mejor opción terapéutica. Y ya que la LMC se caracteriza por una alteración molecular específica, parece posible que quizás una alteración molecular pueda ser la responsable de dicha resistencia al tratamiento.

Objetivos

1. Encontrar un gen, o genes, cuya expresión permita dividir a los pacientes en 2 grupos con diferentes probabilidades de discontinuación de imatinib por falta de eficacia, aplicando para ello la tecnología TaqMan Low Density Array (TLDA).
2. Establecer un nivel de expresión de este, o estos genes, que clasifique a los pacientes en 2 grupos con diferente probabilidad de presentar un nivel de BCR-ABL1 < 10% a los 3 meses, alcanzar respuesta citogenética completa (RCC) y respuesta molecular mayor (RMM), progresar a fases avanzadas (SLP) y morir por causas relacionadas con la LMC (SG-LMC).
3. Validar su aplicabilidad en distintas cohortes usando qPCR convencional y su independencia de otros factores pronósticos ya conocidos mediante un análisis multivariante.
4. Estudiar la posible relación molecular del gen encontrado (que fue PTCH1) con BCR-ABL1 y las vías afectadas por la expresión diferencial del mismo para valorar su posible importancia como diana terapéutica.

Material y Métodos

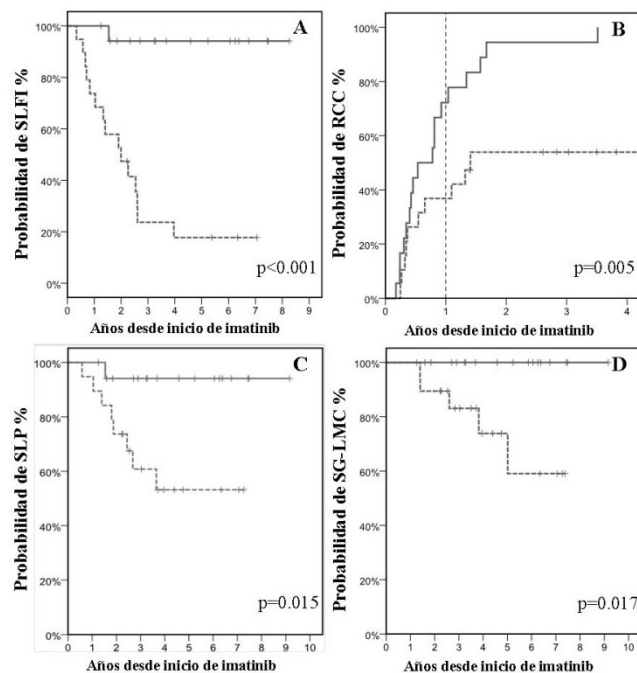
Se analizaron de manera secuencial 4 cohortes, llamadas TLDA 1 y 2 y qPCR1 y 2, y compuestas respectivamente por 73, 56, 37 y 101 pacientes. Todas las cohortes, menos la qPCR2 cuyos pacientes pertenecían a 16 centros españoles, procedían de Hammersmith Hospital (Londres). Para el análisis de la expresión génica, se usó la tecnología TaqMan Low Density Array (TLDA) o qPCR según lo indicado en el nombre

de la cohorte. En la primera cohorte se comparó la capacidad predictiva de 24 genes, ya implicados en el pronóstico o la patogenia de la enfermedad, y en las siguientes cohortes solo fueron analizados aquellos genes que habían mostrado potencia pronóstica.

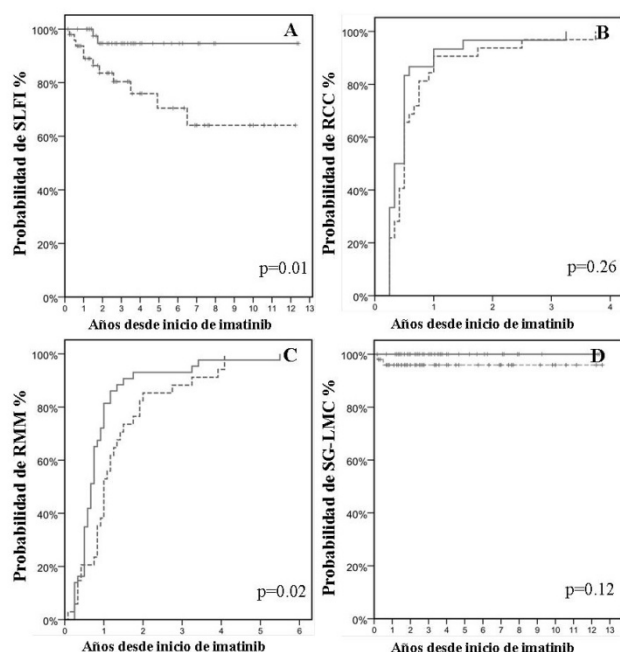
La variable principal analizada fue la supervivencia libre de fallo a imatinib (SLFI). El fallo a imatinib (FI) se definió, como en estudios previos, como cambio del tratamiento debido a falta de eficacia. Diferentes estudios in-vitro también se llevaron a cabo.

Resultados

En la cohorte TLDA1, *PTCH1*, *XIAP*, *PR3*, *ABCB1* y *MPO* predijeron adecuadamente alguna de las variables analizadas. Tras el análisis de la cohorte TLDA2, solo *PTCH1* y *XIAP* permanecieron con significación estadística, de los cuales únicamente *PTCH1* la mantuvo tras el estudio de la cohorte qPCR1.



Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte qPCR1 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1*. Línea continua: alta expresión de *PTCH1* (>0,42), 18 pacientes. Línea discontinua: baja expresión de *PTCH1*, 19 pacientes.



Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte qPCR2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1*. Línea continua: alta expresión de *PTCH1* ($>2,6 \times 10^{-2}$), 49 pacientes; Línea discontinua: baja expresión de *PTCH1*, 50 pacientes.

La regresión de Cox incluyendo la expresión categorizada de *PTCH1*, la edad y los scores Sokal y EUTOS, mostró que la expresión categorizada de *PTCH1* fue el factor pronóstico con mayor significación en las 4 cohortes. Únicamente en la cohorte qPCR1 el modelo final incluyó otra variable, que fue el Sokal Score. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) para la predicción de FI en las 4 cohortes.

	TLDA1	TLDA2	qPCR1	qPCR2
Sensibilidad (IC 95%)	60% (42-75)	33% (14-61)	88.2% (66-97)	84,6% (58-96)
Especificidad (IC 95%)	76.7% (62-87)	95,5% (85-99)	80% (58- 92)	55,7% (45-66)
Valor predictivo negativo (IC 95%)	73.4% (63-82)	84% (78-89)	88.9% (68- 97)	96,1% (87-99)
Valor predictivo positivo(IC 95%)	64.1% (49-77)	67% (29-91)	78.9% (61-90)	22% (17-28)

Valoración de la medición de *PTCH1* como prueba pronóstica para la predicción de fallo a imatinib.

No se obtuvieron resultados concluyentes al analizar la modificación de la expresión de *PTCH1* tras tratamiento de la fracción CD34+ en muestras primarias con diferentes ITK. Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar las fracciones CD34+ y CD34- de las muestras. La ausencia de significación en ambos estudios

quizás se deba al reducido número de muestras analizadas (5 y 4 respectivamente). Se detectó una disminución de la expresión proteica de BCL2 en la línea celular K562 tratada con ciclopamina frente a la no tratada.

Conclusiones

1. De un total de 24 genes estudiados, ya relacionados con la respuesta a imatinib o la patogenia de la enfermedad, solo la expresión de *PTCH1* ha mostrado significación pronóstica en las 4 cohortes analizadas.
2. La medición de la expresión de *PTCH1* al diagnóstico en pacientes con LMC en fase crónica identifica un grupo de pacientes con alta expresión del gen que presentan bajas probabilidades de discontinuar imatinib por falta de eficacia.
3. Los pacientes con alta expresión de *PTCH1* también presentan mayores probabilidades de alcanzar un nivel de BCR-ABL1<10% a los 3 meses y de presentar en cualquier momento respuesta citogenética completa y respuesta molecular mayor. Asimismo, presentan menores posibilidades de progresión a fases avanzadas y de muerte asociada a LMC.
4. La aplicabilidad de la medición de *PTCH1*, al diagnóstico, como predictor de respuesta a imatinib ha sido probada en cohortes procedentes de distintos países y aplicando la tecnología TLDA y la qPCR convencional.
5. La expresión categorizada de *PTCH1* ha demostrado ser un factor pronóstico independiente, de la edad y los índices de Sokal y EUTOS, para la predicción de FI en todas las cohortes analizadas.
6. No se han obtenido resultados concluyentes sobre la relación o independencia de la expresión de *PTCH1* y la actividad tirosinkinasa aumentada de BCR-ABL1.
7. La expresión proteica de BCL2 en la línea celular K562 parece que se reduce al inhibir la vía del erizo mediante ciclopamina.

ABSTRACT

Introduction

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a clonal disorder of the pluripotent hematopoietic stem cell compartment, characterized by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, giving rise to the BCR-ABL1 oncogene. In 1996 the efficacy of the compound STI571 is reported and in 2003 the results of IRIS study were published. The results of this study became a milestone in CML and, by extension, in the oncological treatment. A few years later, Dasatinib and Nilotinib were also approved for first-line treatment. Both of them show a deeper and faster response than imatinib. From the 3 TKI available for first-line therapy, imatinib remains the most popular, predominantly because of efficacy in the majority, but also because after more than 14 years of experience, severe or late unexpected toxic effects have not occurred. However, around 25% of the patients will discontinue the drug due to lack of efficacy.

There are 3 clinical scores available: Sokal, Hasford and EUTOS. None of them is recommended to guide first-line therapy, although classification of a patient in a high-risk level in any of the scores is considered a warning and could support the election of a second generation TKI. Several gene expression profile studies have attempted to identify a signature capable of distinguishing imatinib responders and non-responders. In spite of this, no molecular test is applied at diagnosis in order to predict imatinib response. Currently there is no way to predict imatinib response and its assessment is performed once treatment is started. The tendency is to carry out this assessment earlier in order to switch the TKI as soon as possible. Therefore, it seems that knowing the probabilities of having a good response, in order to prescribe the adequate drug from the beginning, could be a better option. In conclusion, there is a need to develop a test that could help clinicians to know the probabilities of response to imatinib of every patient. In case of having low probabilities of imatinib response, second generation TKI would be a better option. Given that CML is characterized by a molecular feature maybe another molecular characteristic is responsible of resistance.

Objectives

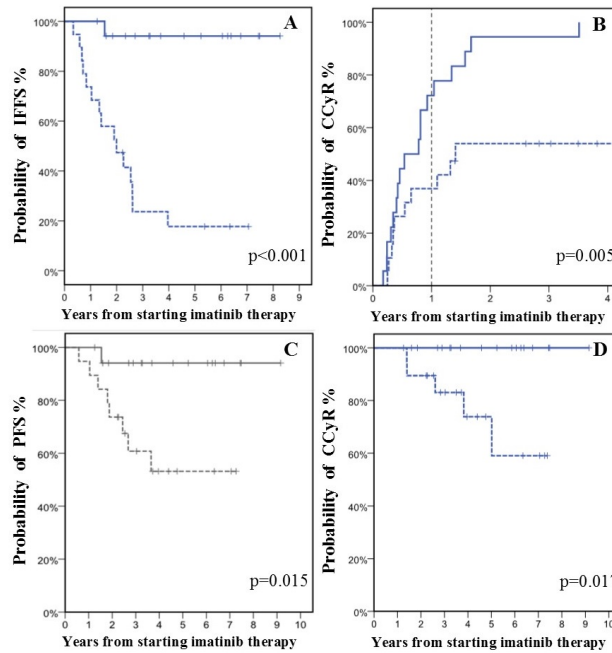
1. To find a gene, or genes, which expression level divides patients in 2 groups with different probabilities of imatinib discontinuation due to lack of efficacy, by applying TaqMan Low Density Array Technology (TLDA).
2. To establish an expression level of this, or these genes, which classifies patients in 2 groups with different probabilities of attaining BCR-ABL1<10% at 3 months, reaching complete cytogenetic response (CCyR) or major molecular response (MMR), progress to advanced phases (PFS) and die due to CML (CML OS).
3. To validate the findings by using conventional qPCR in different cohorts and test the independence from another well-known prognostic factors by carrying out a multivariate analysis.
4. To analyse the possible relationship between the gene found (PTCH1) and BCR-ABL1 and the downstream pathways modified by differential expression of the gene in order to test its importance as a therapeutic target.

Material and methods

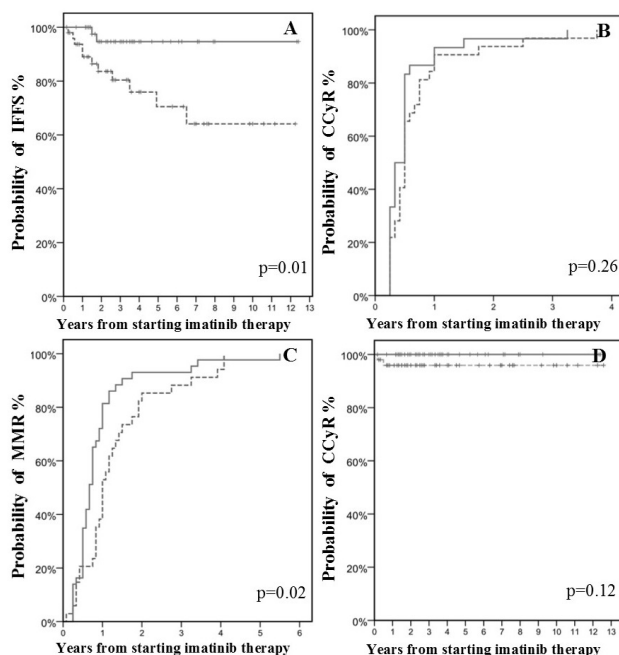
Four cohorts, called TLDA 1 and 2 and qPCR 1 and 2, were analyzed. There were 73, 56, 37 and 101 patients included in each cohort, respectively. All of them, but qPCR2 cohort which patients came from 16 different Spanish hospitals, were composed of patients from Hammersmith Hospital (London). TaqMan Low Density Array Technology (TLDA) or qPCR were used according to what is indicated in the cohort name. In TLDA1 cohort the prognostic performance of 24 genes, already related to CML prognosis or pathogeny, were compared. Only those with prognostic significance were analysed in subsequent cohorts. Main variable analysed was imatinib failure free survival (IFFS). Imatinib failure (IF) was defined, as in previous studies, as change of treatment due to lack of efficacy. Different in-vitro studies were also performed.

Results

In TLDA1 cohort, the genes *PTCH1*, *XIAP*, *PR3*, *ABCB1* and *MPO* predicted for any of the variables analysed. After the analysis of TLDA2 cohort, *PTCH1* and *XIAP* remained significant and only *PTCH1* retained its prognostic power when qPCR1 was analysed.



Kaplan-Meier analysis of 4 variables analysed in qPCR1 cohort comparing groups with high and *PTCH1* expression. Unbroken line: high *PTCH1* expression (>0.42), 18 patients. Dashed line: low *PTCH1* expression, 19 patients.



Kaplan-Meier analysis of 4 variables analysed in qPCR2 cohort comparing groups with high and low *PTCH1* expression. Unbroken line: high *PTCH1* expression ($>2.6 \times 10^{-2}$), 49 patients. Dashed line: low *PTCH1* expression, 50 patients.

Cox regression analysis, including *PTCH1* categorised expression, age and Sokal and EUTOS scores showed, showed *PTCH1* categorised expression was the most significant prognostic factor in the 4 cohorts. Only in qPCR1 cohort, the final model included other variable, namely Sokal score. Sensitivity, specificity, positive and negative prognostic power for the prediction of IF was calculated in each cohort.

	TLDA1	TLDA2	qPCR1	qPCR2
Sensitivity (CI 95%)	60% (42-75)	33% (14-61)	88.2% (66-97)	84,6% (58-96)
Specificity (CI 95%)	76.7% (62-87)	95,5% (85-99)	80% (58- 92)	55,7% (45-66)
Negative predictive value (CI 95%)	73.4% (63-82)	84% (78-89)	88.9% (68- 97)	96,1% (87-99)
Positive predictive value (CI 95%)	64.1% (49-77)	67% (29-91)	78.9% (61-90)	22% (17-28)

PTCH1 Sensitivity, Specificity, Negative and Positive Predictive Values for Imatinib Failure Prediction in the Different Cohorts

No significant results were obtained from the analysis of *PTCH1* expression modification of CD34+ fraction of primary CML samples treated with different TKI. No significant differences were detected comparing CD34+ and CD34- fractions of these samples either. Maybe the lack of significance of both analyses was due to the low

number of samples analysed. A reduction of the expression of the protein BCL2 in the cell line K562 was detected with cyclopamine treatment.

Conclusions

1. From a total of 24 genes, already related to imatinib response or CML pathogenesis, only *PTCH1* expression showed prognostic power in the 4 cohorts analysed.
2. The measurement of *PTCH1* expression in patients diagnosed of CML in CP identifies a group of patients with high *PTCH1* expression and low probabilities of imatinib discontinuation due to lack of efficacy.
3. Those patients with high *PTCH1* expression also show greater probabilities of attaining a BCR-ABL1<10% at 3 months and reaching CCyR or MMR at any time. Additionally, high *PTCH1* expression patients show lower probabilities of progression to advanced phases and of CML related death.
4. The applicability of *PTCH1* measurement at diagnosis as a predictor of imatinib response has been confirmed in cohorts from different countries and applying TLDA and conventional qPCR technologies.
5. *PTCH1* categorised expression has shown to be an independent prognostic factor when included alongside age, EUTOS and Sokal Score in a multivariate analysis for IF prediction in every cohort analysed.
6. No conclusive results have been obtained regarding the relationship of *PTCH1* expression and the increased tyrosine kinase activity of BCR-ABL1.
7. BCL2 protein expression seems to be reduced when hedgehog pathway is inhibited with cyclopamine in the cell line K562.

1. INTRODUCCIÓN

En 1960 los científicos Peter Nowell, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pensilvania, y David Hungerford, del instituto Fox Chase Cancer Center, descubrieron un cromosoma 22 disminuido de tamaño (1). Se le nombró cromosoma Philadelphia por ser la ciudad donde se encontraban ambos centros de investigación. Supuso el descubrimiento de la primera alteración citogenética asociada a una patología concreta. No fue hasta 1973 cuando Janet D. Rowley identificó la translocación recíproca $t(9;22)(q34;q11)$ como la causante de ese acortamiento del cromosoma 22 ya que la parte que le faltaba al cromosoma 22 se encontraba adherida al cromosoma 9 (2). Posteriormente se identificó a los genes BCR y ABL1 como los implicados en la translocación. Actualmente la leucemia mieloide crónica (LMC) se define como una enfermedad clonal originada en la célula madre totipotente hematopoyética caracterizada por la translocación de los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 dando lugar al gen de fusión *BCR-ABL1*. Sin intervención terapéutica la enfermedad progresa desde una fase crónica (FC) a una fase acelerada (FA) para terminar desarrollando una crisis blástica (CB) generalmente tras 3-5 años de evolución. Sin embargo, el desarrollo de los inhibidores de tirosinkinasa (ITK) ha cambiado radicalmente el curso de la enfermedad y de la medicina. Supuso el desarrollo de la primera terapia dirigida contra una alteración molecular concreta causante de una enfermedad y ha conseguido transformar la LMC en una enfermedad crónica y en algunos casos curable (3). Un tema todavía por resolver es la elección del ITK a usar en primera línea en los pacientes diagnosticados en FC entre las distintas opciones disponibles: imatinib, dasatinib y nilotinib.

1.1. Epidemiología

El único factor de riesgo probado para su desarrollo es la exposición a radiaciones ionizantes a altas dosis (4). Afecta a un individuo por cada 100.000 personas al año y representa el 15% de todos los casos nuevos de leucemia diagnosticados en el mundo occidental (5). Muestra una ligera mayor incidencia en hombres con una ratio 1.3–1.5:1. Se ha estimado que su prevalencia en EEUU rondará los 112.000 casos en 2020 y alcanzará un máximo en 2050 de 181000 casos debido a los nuevos tratamientos que cronifican la enfermedad. La edad media de presentación depende de la localización geográfica. De este modo, en África y América latina los pacientes son diagnosticados al menos 15 años más jóvenes que en Australia, Europa y Estados Unidos, donde la edad mediana es de 55 años (6,7).

1.2. Patogenia

En condiciones normales, el gen *ABL1*, homólogo humano del oncogén de la leucemia murina de Abelson, se encuentra en el cromosoma 9 y codifica una proteína con actividad tirosina kinasa no asociada a receptor (8). Por su parte el gen *BCR* (breakpoint cluster región) se encuentra en el cromosoma 22 y codifica una proteína cuyo papel en la hematopoyesis no parece muy relevante (9). El gen de fusión *BCR-ABL1* se forma por la unión del extremo 5' del gen *BCR* y el extremo 3' del gen *ABL1*. La localización de los puntos de corte en ambos genes es muy variable, pero la recombinación normalmente involucra al intrón 13 o 14 de *BCR* y a una región de 140kb en *ABL1* entre los exones 1b y 2 (10). Sin embargo, pese a las diferentes localizaciones del punto de corte en *ABL1*, por *splicing* del ARN mensajero el primer exón de *ABL1* en formar parte de manera habitual del gen de fusión suele ser el segundo. De este modo, el gen de fusión resultante detectado de manera más frecuente en la LMC suele ser el *BCR-ABL1* e13a2 (antes conocido como b2a2) o el *BCR-ABL1* e14a2 (previamente referenciado como b3a2). Pese al diferente punto de corte que presentan, ambos transcritos dan origen a una proteína de 210 kilodaltons (kDa) conocida como BCR-ABL p210.

La proteína BCR-ABL p210 es la causante de la LMC en la inmensa mayoría de las ocasiones; sin embargo, hay otros puntos de corte a nivel del gen *BCR* que originan proteínas de fusión de diferente peso molecular y pueden desarrollar un cuadro clínico de LMC. Así, si el punto de corte involucra a los exones 17-20 de *BCR*, se origina la proteína BCR-ABL p230, que es la causante de la LMC en un muy reducido porcentaje de las ocasiones y cursa habitualmente con una mayor maduración de la serie granulocítica y/o con trombocitosis (11,12). En ocasiones, los exones 1 o 2 son los que participan en la translocación, lo que ocasiona la proteína BCR-ABL p190. Esta proteína produce de manera mucho más frecuente leucemia linfoblástica aguda. Se detecta en casi todas las LLA infantiles y el 50% de las LLA del adulto; sin embargo,

se ha descrito asociada a cuadros de LMC con elevación de la cifra monocitaria y su pronóstico parece ser mucho peor que el de la LMC asociada a la isoforma p210 (13,14).

En la proteína BCR-ABL p210 se conservan los dominios serina/treonina kinasa, Rho/GEF y el dominio de dimerización procedente de BCR. De ABL1 se conservan los dominios SH (1,2 y 3) tirosina kinasa, la zona rica en prolina, la zona de unión al ADN, la zona de unión a la actina, la zona de localización nuclear y la de exportación nuclear (15). El dominio SH1 tirosina kinasa es la región más estudiada, ya que es la que lleva a cabo la fosforilación descontrolada responsable de la patogenia de la LMC. Sin embargo, el residuo tirosina-177 en el dominio serina/treonina kinasa es también fundamental para el funcionamiento de BCR-ABL1(16–19). Aunque la proteína de fusión conserva la mayor parte de la proteína ABL1 original, le falta la zona de miristoilación en el extremo N-terminal. Se cree que la falta de la zona de miristoilación es la causante de la actividad kinasa descontrolada de BCR-ABL1, ya que de manera fisiológica esta zona, una vez sufrida la adición del grupo miristoil, se une con los bolsillos de unión a la miristoilación del propio ABL1, lo que causa la autoinhibición de la actividad kinasa del dominio SH1 (17).

De lo explicado anteriormente se deriva que la actividad tirosina kinasa descontrolada de BCR-ABL1 juega un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad. Se ha demostrado que su sola presencia es suficiente para provocar el fenotipo de la LMC, ya que ratones trasplantados con células madre hematopoyéticas que expresaban BCR-ABL1 desarrollaron LMC (20,21). Del mismo modo, mediante el uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el transcrito de fusión o mediante la inhibición de su actividad tirosina kinasa se demostró que BCR-ABL1 era esencial para el mantenimiento de la LMC (22).

La proteína BCR-ABL1 altera la señalización celular, lo que provoca proliferación independiente de factores de crecimiento, disregulación de la apoptosis y cambios en

la adhesión celular (20). Los cambios celulares producidos por BCR-ABL1 se producen por la desregulación de numerosas vías, entre las que se encuentran JAK/STAT, PI3K/AKT y Ras/MEK (13). La interacción de BCR-ABL1 con estas vías se produce a través de la proteína adaptadora Crkl, que está constitutivamente activada por BCR-ABL1 (23). BCR-ABL1 parece activar directamente STAT5 sin ser necesaria la activación del receptor de membrana JAK2 (24). PI3K es necesario para la transformación leucémica de las células hematopoyéticas llevada a cabo por BCR-ABL1 (25). También se demostró que el eje PI3K/AKT es importante para el mantenimiento de la enfermedad y que la inhibición de PI3K puede matar las células primarias de LMC (26). La inhibición de la señal de Ras altera el desarrollo de la LMC inducido por BCR-ABL1 en ratones (27). A través de la activación de Ras, BCR-ABL1 activa NF- κ B, que es un factor de transcripción necesario para la inducción de la leucemogénesis (28).

Las Src-familia kinasas son otro grupo de efectores de BCR-ABL1 muy estudiados. Hck, Lyn y Fyn, que son miembros de la familia de las Src kinasas, llevan a cabo la fosforilación de varios residuos tirosina de BCR-ABL1 (29,30). BCR-ABL1 parece que también inhibe la expresión de un ARN no codificante de cadena larga llamado BGL3. Este ARN fisiológicamente actúa como un señuelo, de manera que diversos microARN, que van dirigidos a disminuir la expresión de un gen supresor tumoral llamado PTEN, se unen al ARN BGL3, en vez de a PTEN, y de esta manera aumenta el nivel de expresión de PTEN. BCR-ABL1, al inhibir el ARN BGL3, disminuye la expresión del gen supresor tumoral PTEN (31).

BCR-ABL1 también interfiere con la apoptosis, ya que aumenta la expresión de BCL2 y BCL-X_L, que son proteínas anti-apoptóticas (32). De manera adicional, a través de PI3K, fosforila a Bad, que es una proteína pro-apoptótica, de manera que esta no puede entrar en la mitocondria, donde ejerce de manera habitual su función (33). El

aumento de BCL2 y BCL-X_L y la disfunción provocada en Bad provocan la disminución de la apoptosis, que se observa de manera habitual en la LMC.

En modelos murinos se ha demostrado que la expresión de Musashi2 se encuentra aumentada en un modelo de CB de la LMC caracterizado por la translocación t(7;11)(p15;p15) en comparación a la FC. Este gen de fusión incrementa los niveles de Musashi2, cuya función es unirse al ARN y disminuye de esta manera la expresión de Numb, lo que explica la menor expresión de esta proteína detectada en CB. La recuperación de la expresión de Numb, ya sea de manera ectópica o indirectamente por la disminución de la expresión de Musashi2, desencadena la diferenciación y disminuye el desarrollo y propagación de la LMC en CB tanto in vivo como in vitro (34).

La Aurora-kinasa A es una serina/treonina kinasa que regula la mitosis en las células normales y se ha visto sobreexpresada en malignidades hematológicas (35,36). También se ha relacionado con diversos tumores sólidos en los que su sobreexpresión se ha asociado a un peor pronóstico (37). En LMC la Aurora-kinasa A podría servir como una posible diana para la terapia celular (38).

La expresión del gen *BMI1*, que codifica la proteína del complejo policomb, está aumentada tanto en células CD34+ como en células mononucleares de sangre periférica de pacientes en fases avanzadas de la LMC en comparación con pacientes en FC de la enfermedad (39).

En un estudio sobre metilación, realizado mediante PCR específica de metilación, se estudiaron genes relacionados con la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis, diferenciación celular y la señal de citoquinas en muestras de 16 pacientes con LMC en CB. Detectaron metilación del gen *p53*, *MGMT* y *RARβ* en el 18%, 13% y 13% de las muestras analizadas respectivamente. Sin embargo, no estudiaron los niveles de expresión para comprobar si se encontraban disminuidos (40).

WT1 es una proteína cuya expresión se encuentra aumentada de manera fisiológica en las células hematopoyéticas inmaduras (41). Se detecta tanto en blastos no clonales como en blastos leucémicos y su expresión se usa para seguimiento de la enfermedad mínima residual y como factor pronóstico en leucemia mieloide aguda (42). Sin embargo, dada la expresión en blastos no leucémicos, su uso como marcador de enfermedad mínima residual en LMA es controvertido (43). La expresión de WT1 en muestras primarias de LMC se reduce tras tratamiento *in vitro* con imatinib en aquellos pacientes que responden al fármaco. Sin embargo, en los pacientes no respondedores la expresión no se modifica tras el tratamiento (44).

1.2.1 Vía del erizo

Haremos mención especial a la llamada vía del erizo, o *Hedgehog Pathway* en inglés, que debe su nombre a que alteraciones en esta vía producen una larva con puntas que recuerdan a un erizo. En vertebrados hay al menos 3 lipoproteínas que activan la vía, llamadas Erizo Sonic (SHH por las siglas en inglés), Erizo Indio y Erizo del Desierto, que en su forma activa se encuentran covalentemente unidas a un colesterol y a una cadena de ácido graso (45). De las 3 moléculas, la más estudiada, dada su aparente mayor importancia en mamíferos, es la SHH, la cual hace que en ocasiones al conjunto de la vía se le llame vía del Erizo Sonic (46,47). Estas moléculas, de manera habitual, son secretadas de manera paracrina, es decir, por las células circundantes, y se unen a la familia de proteínas transmembrana de 12 pasos Patched, de la cual existen dos componentes PTCH1 y PTCH2 (48,49). Esta unión de los ligandos lipoproteicos a la familia de receptores Patched produce la internalización de estos y como consecuencia la unión a la membrana plasmática y la activación de la proteína transmembrana de 7 pasos Smoothed (Smo), lo que a su vez produce la estabilización y acumulación nuclear de la familia de factores de transcripción Gli (50,51). Los mecanismos concretos por los que se produce la activación de la vía todavía no están muy bien definidos y se conocen mucho mejor en *Drosophila*. La

familia de factores de transcripción está compuesta por 3 elementos Gli1, Gli2 y Gli3. Estos factores de transcripción tienen un dominio de unión al ADN, con forma de dedo de zinc, muy conservado entre especies, el cual hace que se unan a una secuencia común (GACCACCCA), con lo cual estimulan la transcripción de numerosos genes (52,53). No todos los genes activados coinciden entre los diferentes miembros de la familia. Su activación produce (54,55):

- Promoción de la proliferación celular.
- Promoción de la supervivencia celular.
- Regulación de la quiescencia de las células madre y mantenimiento del equilibrio entre células madre, células progenitoras y células más diferenciadas.
- Regulación de la homeostasis del tejido adulto.
- Regulación del desarrollo embrionario.

En caso de no producirse la unión de las lipoproteínas a PTCH1, este se encuentra unido a Smo, al cual inhibe, y los factores de transcripción Gli son fosforilados por la proteína quinasa A (PKA) y la glucógeno sintetasa quinasa 3 (GSK-3). La fosforilación sufrida por los factores de transcripción Gli sirve para mediar una ubiquitinización posterior, que conlleva la degradación en el caso de Gli2 y la transformación en un represor en caso de Gli3. De manera adicional, cuando la vía está inactiva, la proteína SUFU evita la acumulación de las proteínas Gli en el núcleo.

La regulación de la vía tiene incorporados unos mecanismos de feed-back positivos, ya que aumenta la expresión de *Gli1*, y negativos, al aumentar la transcripción de los represores *PTCH1*, *PTCH2* y *HHIP1*(55). La función de *PTCH2*, aunque menos conocida que la de *PTCH1*, parece ser la misma, pero de menor importancia promoviendo por tanto la inhibición de la vía producida a través de *PTCH1* (56).

Teniendo en cuenta las importantes funciones desarrolladas por la vía del erizo cabe esperar que alteraciones en su funcionamiento produzcan importantes manifestaciones patogénicas. Una de las primeras patologías relacionadas con el

funcionamiento alterado de la vía del erizo fue el síndrome de Gorlin. Este síndrome se desencadena por mutaciones monoalélicas de *PTCH1* y se caracteriza por defectos del desarrollo del cerebro, la médula espinal y el esqueleto y predisposición al desarrollo de carcinomas basocelulares y meduloblastomas (49,57,58). Este hallazgo supuso uno de los primeros indicios de que alteraciones de esta vía se asociaban a cáncer. Posteriormente se ha demostrado la relación de la vía del erizo con el desarrollo y/o mantenimiento de distintos tipos de tumores sólidos y hematológicos. Se han encontrado alteraciones de la vía del erizo en el carcinoma basocelular, meduloblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de pulmón, tracto gastrointestinal y páncreas entre otros (59–63).

Uno de los tumores donde de manera más extensa se han estudiado las alteraciones de esta vía es en el carcinoma basocelular, en el que se han encontrado mutaciones inactivantes de *PTCH1* o *SUFU* o mutaciones activadoras de *SMO*. Independientemente de donde se produzca la alteración, el resultado es la actividad aumentada de la vía con el incremento de la actividad de los factores de transcripción Gli (64). En algunos tumores ováricos se han descrito alteraciones epigenéticas consistentes en un aumento del patrón de metilación de dos regiones promotoras (65). Tanto los mecanismos genéticos como epigenéticos descritos hacen a la célula tumoral independiente de la estimulación paracrina, es decir, no necesitan la unión de los ligandos lipoproteicos a *PTCH1*, ya que la vía se encuentra activa de manera basal. Sin embargo, en linfoma y mieloma parece que la hiperestimulación de la vía detectada es debida a un aumento de la secreción paracrina de los ligandos lipoproteicos activadores por parte del estroma tumoral (66).

Experimentos en modelos murinos eliminando y aumentando la expresión génica han demostrado que la actividad de *Smo* controla la cantidad y el mantenimiento de las células madre leucémicas y por consiguiente el desarrollo y latencia de la LMC. En el mismo estudio llevaron a cabo la inhibición farmacológica de la vía mediante

ciclopamina, el mismo compuesto usado en nuestro estudio, y demostraron que disminuía el número de unidades formadoras de colonias en líneas celulares de LMC sensibles y resistentes a imatinib y en muestras primarias (67). En otro estudio similar, también desarrollado en modelos murinos, observaron que la delección bialélica de *SMO* redujo el desarrollo de leucemia *BCR-ABL1* positiva, aumentó la latencia e impidió la viabilidad de la enfermedad al ser retransplantada, indicando, al igual que se demostró en el estudio previamente comentado, una importante pérdida de células madre leucémicas (68).

1.3. Diagnóstico

La LMC se suele detectar casualmente al realizar un hemograma de sangre periférica por la presencia de leucocitosis a base principalmente de neutrófilos, con aumento también de basófilos y en algunas ocasiones de eosinófilos. También se puede encontrar trombocitosis asociada a la neutrofilia o de manera aislada (6).

En la extensión de sangre periférica se detecta desviación izquierda de la serie granulocítica con presencia de promielocitos, mielocitos y metamielocitos, y es posible también la presencia de blastos en mayor o menor porcentaje dependiendo de la fase de la enfermedad (69). Los síntomas más habituales que produce son esplenomegalia, fatiga, sudores nocturnos y pérdida de peso. De manera menos frecuente se puede observar priapismo, hemorragias retinianas, trombosis, sangrados y hepatomegalia (9). La presencia de dolor óseo, linfadenopatía, infiltración cutánea o cloromas debería hacernos sospechar la presencia de fases avanzadas de la LMC, y es que el curso natural de la enfermedad consiste en tres etapas diferentes: una FC que sin tratamiento adecuado evoluciona a FA y por último a CB. El fenotipo de las crisis blástica puede ser mieloide, linfoide o, en raros casos, mixto. Sin embargo, el mieloide es el más frecuente con una ratio 2:1 sobre el linfoide (70). La inmensa mayoría de los casos se diagnostican en FC, y con los tratamientos actuales la evolución a fases avanzadas de la enfermedad es rara.

Como se puede observar en la tabla I, hay 2 clasificaciones diagnósticas, propuestas por la Organización Mundial de la salud (OMS) y por la Red de Leucemia Europea (ELN, por sus siglas en inglés), con similares criterios para diferenciar la FC, la FA y la CB (71–73).

Fase acelerada	
ELN	Blastos en SP o MO 15-29% Blastos más promielocitos en SP o MO >30% siendo la cifra de blastos <30% Basófilos en SP ≥20% Plaquetas <100 x 10 ⁹ /L no siendo efecto secundario del tratamiento Aparición de ACA ruta mayor en la clona Ph+ durante el tratamiento
OMS	Blastos en SP o MO 10-19% Basófilos en SP ≥20% Plaquetas <100 x 10 ⁹ /L no siendo efecto secundario del tratamiento Aparición de ACA en la clona Ph+ durante el tratamiento Plaquetas >1000 x 10 ⁹ /L a pesar de tratamiento Aumento de la cifra leucocitaria y de la esplenomegalia pese a tratamiento
Crisis blástica	
ELN	Blastos en SP o MO ≥30% Proliferación blástica extramedular excluyendo el bazo
OMS	Blastos en SP o MO ≥20% Proliferación blástica extramedular excluyendo el bazo Grandes focos o clusters de blastos en la biopsia de MO

Tabla I. Criterios para la definición de fase acelerada y crisis blástica conforme a las definiciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Red de Leucemia Europea (ELN).

Dado que la LMC se define por la presencia del gen de fusión *BCR-ABL1*, generalmente producido por la translocación recíproca t(9;22)(q34;q11), para llegar a un diagnóstico de certeza es necesario demostrar la presencia de esta alteración, bien mediante técnicas citogenéticas, bien mediante técnicas moleculares. De manera habitual, tras la realización de un hemograma y visualización de la extensión de sangre periférica, se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en sangre periférica (SP). Si se detecta la presencia del transcrito de fusión *BCR-ABL*, bien el e13a2 bien el e14a2 u otros menos comunes, ya se tiene el diagnóstico de certeza de la enfermedad, pero será recomendable la realización de manera adicional de técnicas citogenéticas.

La técnica citogenética de elección es el cariotipo de células en metafase, preferiblemente de médula ósea (MO), realizado con técnica de bandas G (74). El objetivo de las técnicas citogenéticas es detectar la presencia de anomalías citogenéticas añadidas a la translocación t(9;22)(q34;q11), bien una translocación variante, donde en la misma translocación se implican cromosomas adicionales al 9 y al 22, bien las conocidas como alteraciones citogenéticas adicionales (ACA), en las que se detectan otras alteraciones añadidas a la t(9;22)(q34;q11) (75,76).

Otra de las técnicas citogenéticas habitualmente usadas es la hibridación in situ fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés). Sin embargo, con su realización únicamente veríamos si está o no presente la t(9;22), por lo que no añadiría nada al diagnóstico molecular. En un mínimo porcentaje de los casos la alteración citogenética que causa el gen de fusión *BCR-ABL1* puede producirse por la translocación de un pequeño fragmento del cromosoma 9 en el 22 y no ser visible por cariotipo. Únicamente en estos casos se recomienda la realización de FISH al diagnóstico (74).

Hay algunos pacientes que cursan con neutrofilia y presencia de formas mieloides inmaduras en la extensión de sangre periférica; sin embargo, presentan un cierto grado de displasia asociada y no es posible detectar la translocación que da lugar al gen de fusión *BCR-ABL1* ni por técnicas citogenéticas ni por técnicas moleculares. Estos casos corresponden a una entidad distinta que la OMS define como leucemia mieloide crónica philadelphia negativa (77). En esta patología y en la leucemia neutrofílica crónica, que es similar fenotípicamente a la LMC, aunque con mayor maduración de la serie granulocítica y ausencia del gen de fusión *BCR-ABL1*, se han detectado mutaciones de SETBP1 y/o CSF3R (78,79).

1.4. Seguimiento

El seguimiento de la enfermedad se realiza mediante hemograma, PCR cuantitativa (qPCR) de SP y cariotipo de MO. Si bien se puede optar por el seguimiento molecular exclusivo siempre que las medidas de la PCR cuantitativa se informen en Escala internacional (IS, por las siglas en inglés). Los objetivos de respuesta mayormente aceptados en nuestro ámbito son los acordados por los expertos de la ELN (74). Las definiciones de respuesta son las siguientes:

- Respuesta hematológica completa (RHC): normalización del hemograma, desaparición de la desviación izquierda, de la basofilia y de la esplenomegalia.
- Respuestas citogenéticas:
 - Respuesta citogenética parcial: 1-35% metafases Ph+ habiendo contado un mínimo de 20 metafases en el análisis mediante cariotipo de MO.
 - Respuesta citogenética completa (RCC): no visualización de ninguna metafase Ph+ habiendo contado como mínimo 20 de ellas en el estudio de cariotipo de MO. También se puede definir una RCC si se observa como mucho una célula Ph+ entre 200 al realizar un FISH en SP.
- Respuestas moleculares:
 - Respuesta molecular mayor (RMM): se define como la presencia de un nivel de transcritos de $BCR-ABL1 \leq 0,1\%$ IS.
 - Respuesta molecular grado 4 (RM⁴): nivel de $BCR-ABL1 \leq 0,01\%$ IS o enfermedad indetectable con más de 10.000 transcritos de *ABL1*.
 - Respuesta molecular grado 4.5 (RM^{4.5}): nivel de $BCR-ABL1 \leq 0,0032\%$ IS o enfermedad indetectable con más de 32.000 transcritos de *ABL1* (80).

Y en la tabla II podemos ver las respuestas que recomienda la ELN en cada momento para pacientes tratados con ITK en primera línea:

	Óptima	Alarma	Fallo
Diagnóstico	NA	Alto riesgo en scores clínicos ACA/Ph+ ruta mayor	NA
3 meses	<i>BCR-ABL1</i> ≤10% Ph+ ≤35%	<i>BCR-ABL1</i> >10% Ph+ 36-95%	No RHC Ph+ >95%
6 meses	<i>BCR-ABL1</i> <1% Ph+ 0	<i>BCR-ABL1</i> 1-10% Ph+ 1-35%	<i>BCR-ABL1</i> >10% Ph+ >35%
12 meses	<i>BCR-ABL1</i> ≤0,1%	<i>BCR-ABL1</i> 0,1-1%	<i>BCR-ABL1</i> >1% Ph+ >0
A partir de entonces	<i>BCR-ABL1</i> ≤0,1%	ACA/Ph- (-7 o7q-)	Pérdida RHC Pérdida RCC Pérdida de RMM confirmada* Mutaciones ABL1 kinasa ACA/Ph+

NA indica no aplicable; ACA/Ph+, alteraciones citogenéticas adicionales en la clona philadelphia positiva; ACA/Ph-, alteraciones citogenéticas adicionales en la clona philadelphia negativa; * La pérdida de RMM debe ser confirmada en dos qPCR consecutivas de las cuales una debe tener un resultado ≥1%.

Tabla II. Definiciones de respuesta a los inhibidores de tirosinkinasa (ITK) en primera línea.

Las definiciones de respuesta recogidas en la tabla II aplican también a la segunda línea si el primer ITK fue cambiado por intolerancia. Según la OMS, la aparición de cualquier ACA en la clona Ph+ durante el tratamiento no solo significa fallo sino progresión a FA. La ELN establece que la ACA que aparezca en la clona Ph+ debe ser de la ruta mayor para ser considerada evolución a FA; en caso contrario, únicamente se considera fallo (71,72,81).

Las ACA en la clona Ph- son evoluciones clonales que se observan en la clona que no presenta la t(9;22); únicamente representan una alarma en caso de involucrar al cromosoma 7, ya que se ha visto que pueden evolucionar a síndrome mielodisplásico o leucemia mieloide aguda (82,83).

La ELN, tal y como se puede ver en la tabla II, establece 3 grados diferentes de respuesta, los cuales determinan la actitud terapéutica y de seguimiento:

- Óptima: necesario seguimiento molecular y/o citogenético cada 3 meses hasta alcanzar RMM. Después seguimiento molecular cada 3 o 6 meses.

- Fallo: necesario un cambio de tratamiento y la repetición del cariotipo, qPCR y estudio de mutaciones del dominio kinasa de *ABL1*.
- Alarma: es una situación intermedia entre las otras dos condiciones previas. Sería necesario la realización de cariotipo, qPCR y estudio de mutaciones opcional así como un seguimiento más estrecho.

El estudio de mutaciones del dominio ABL1kinasa se realiza en el momento en el que el paciente presenta un fallo o alarma, ya que se ha visto que se detectan en un 25-30% de los casos que presentan resistencia al tratamiento sin evolución de la enfermedad, siendo especialmente frecuentes en los casos con resistencia secundaria, es decir, resistencias al tratamiento desarrolladas tras haber alcanzado algún grado de respuesta. La presencia de determinadas mutaciones orienta la terapia, dada su mayor o menor sensibilidad a los diferentes ITK (84,85).

Un punto controvertido de las recomendaciones de la ELN es la consideración de un nivel de *BCR-ABL1* >10% a los 3 meses únicamente como alarma. Hay numerosas publicaciones que demuestran diferencias estadísticamente significativas en los grupos definidos por esta medida, sea cual sea el tratamiento de primera línea recibido (86–88). El panel de expertos de la ELN argumenta que el resultado de una única qPCR es poco seguro como para decidir el cambio de tratamiento y que es más sensato esperar a una segunda determinación por encima del 10% a los 6 meses. También esgrimen que no hay ensayos que demuestren que esos pacientes se beneficiarían de un cambio temprano de tratamiento y que se cambiaría a todos para beneficiar únicamente a una minoría (la supervivencia global en caso de *BCR-ABL1* >10% a los 3 meses es de alrededor del 85% y si *BCR-ABL1* ≤10% está sobre el 95%). No obstante, y pese a lo recogido en las guías de la ELN, la adquisición de un nivel de *BCR-ABL1* ≤10% es considerado por algunos como un factor clave en la actualidad y el no logro de este nivel de respuesta hace necesario el cambio de

tratamiento tal y como se recoge en las guías americanas NCCN versión 1.2016 (http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf)..

La no consecución de los niveles de respuesta definidos por la ELN en los tiempos establecidos son el factor predictor de respuesta al tratamiento, y por lo tanto pronóstico, más importante utilizado en la actualidad por encima de los scores clínicos aplicables al diagnóstico que se discutirán más adelante.

1.5. Tratamiento

1.5.1 Terapia pre-inhibidores de tirosinkinasa

El tratamiento de la LMC ha evolucionado de manera espectacular a lo largo de los años. Se inició en el siglo XIX con el uso de compuestos de arsénico. En el inicio del siglo XX se usaba la irradiación esplénica, consiguiendo reducir el tamaño del bazo, pero no fue hasta 1960 cuando se comenzó a utilizar el busulfán, tras mostrar su superioridad en el primer ensayo clínico realizado en la historia de la enfermedad. Tras el descubrimiento del posible potencial mutagénico de esta droga, se sustituyó su uso por el de la hidroxycarbamida. Ambos fármacos mejoraban las cifras hematimétricas y producían un alivio sintomático, pero no disminuían el porcentaje de metafases con la translocación ni retrasaban la progresión de la enfermedad (9). En la década de 1970 se demostró que el interferón- α producía reducción de la clona Ph+ en un porcentaje importante de pacientes, llegando incluso a conseguir la desaparición de la misma en un 10-15% de los pacientes (89). Se llevaron a cabo ensayos clínicos que demostraron su clara superioridad sobre busulfán e hidroxycarbamida y se observó un aumento de la supervivencia (90). La adición de citarabina subcutánea al tratamiento con interferón- α aumentó la proporción de pacientes que alcanzaban desaparición de la clona Ph+, y se demostró que conseguía también un aumento de la supervivencia (91).

En la misma década de los 70 se realizaron los primeros trasplantes alogénicos de médula ósea para tratamiento de la LMC. Esta modalidad terapéutica conseguía la desaparición de la clona Ph+ con mantenimiento duradero de la respuesta en la mayoría de pacientes (92). Sin embargo, es un tratamiento agresivo que provocaba una importante mortalidad: por un lado, por el tratamiento mieloablativo; y, por otro, por complicaciones derivadas de la enfermedad de injerto contra huésped. Modificaciones en la técnica del trasplante alogénico, como el inóculo deplecionado en linfocitos T, provocaron que en los años 90 fuera la primera opción terapéutica para

aquellos pacientes en los que la edad y comorbilidades los hacían aptos para este procedimiento (9).

1.5.2 Inhibidores de tirosinkinasa

No fue hasta 1996 cuando Druker y colaboradores publicaron los efectos del inhibidor de la señal de transducción 571 (STI571 por sus siglas en inglés), derivado de la 2-Fenilaminopirimidina, que en líneas celulares producía un 95% de disminución de las colonias *BCR-ABL1* positivas sin inhibir el crecimiento de las colonias *BCR-ABL1* negativas (93). El ensayo fase I reclutó a 83 pacientes con LMC en FC en los que el tratamiento con interferón- α no había obtenido respuesta. De los 54 tratados con dosis de STI571 iguales o superiores a 300mg, 53 obtuvieron una respuesta hematológica completa y se observó una disminución de las metafeses Ph+ en 29 de ellos (94). En el ensayo fase II se evaluaron las respuestas citogenéticas mayores y hematológicas, que fueron del 60% y 95% respectivamente (95). Posteriormente se llevó a cabo el ensayo IRIS, en el que se introdujeron 1100 pacientes que eran asignados aleatoriamente a recibir 400 mg de imatinib una vez al día por vía oral o una combinación de citarabina e interferón- α . De esta forma, a los 2 años de concluido el ensayo fase I los resultados del estudio IRIS eran publicados y los mismos revolucionarían el tratamiento de la LMC para siempre. La desaparición de metafases Ph+ ocurrió en un 76% de los pacientes en tratamiento con imatinib versus un 15% en la otra rama (96). Los resultados fueron tan abrumadores que la mayor parte de los pacientes que iniciaron en la rama de interferón- α -citarabina discontinuaron el tratamiento y pasaron a la rama de imatinib o dejaron el estudio para iniciar tratamiento con el nuevo fármaco. Los resultados del estudio IRIS suponen un hito en la historia de la LMC y, por extensión, del tratamiento de la patología tumoral: se había desarrollado el primer tratamiento dirigido contra una diana molecular que era la responsable de la fisiopatología de la enfermedad, lo que abriría el camino a nuevas drogas dirigidas igualmente contra *BCR-ABL1* y contra otras dianas moleculares

causantes de diversas patologías tumorales. Desde este momento imatinib, comercializado por Novartis® en forma de Gleevec® en EEUU o como mesilato de imatinib bajo el nombre de Glivec® en Europa, Australia y Latinoamérica, se convirtió en el fármaco de primera línea para pacientes con LMC en FC, FA y CB. En el caso de la CB continúa usándose en combinación con fármacos quimioterápicos convencionales para intentar devolver al paciente a una segunda FC.

La actualización a los 8 años del estudio IRIS mostró que del 60% de los pacientes que seguían bajo tratamiento con imatinib tenían 81% y 92% de supervivencia libre de evento y libre de progresión respectivamente (97). Sin embargo, también puso de manifiesto que alrededor de un 40% de los pacientes había discontinuado el tratamiento, por falta de eficacia en un 15% de las ocasiones, efectos adversos en un 8% o por causas no aclaradas en el resto. Resultados similares se obtuvieron en estudios realizados en centros de referencia de LMC (98,99). Para este nada desdeñable porcentaje de pacientes que requieren el uso de terapias distintas a imatinib se inició el desarrollo de nuevos ITK.

Dasatinib es un potente inhibidor de ABL1 que actúa contra un mayor número de tirosina kinasas que imatinib, como la familia de las Src kinasas. El ensayo fase II mostró que un 40% y 75% de pacientes resistentes e intolerantes a imatinib conseguían RCC a los 15 meses, por lo que consiguió la aprobación para su uso en pacientes intolerantes o resistentes a imatinib (100). En el estudio randomizado fase III llamado Dasision se comparó la eficacia y tolerabilidad de dasatinib 100mg vs imatinib 400mg. El objetivo primario era la RCC en el primer año de tratamiento, que resultó significativo (83% vs 72%, $p < 0,001$), por lo que recibió la aprobación para primera línea de tratamiento (101). Tras 5 años de seguimiento, la tasa de RMM era mayor con dasatinib (76% vs 64%, $p=0,002$), la tasa de RM^{4.5} también era mayor (42% vs 33%, $p=0,025$); sin embargo, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global fueron similares entre los grupos (102).

Nilotinib es otro ITK desarrollado por análisis cristalográfico de compuestos que se unían a BCR-ABL1 con una mutación que los hacía resistentes a imatinib. Los resultados de los ensayos fase 2 replicaron los de Dasatinib, por lo que igualmente consiguió la aprobación para su uso en pacientes intolerantes o resistentes a Imatinib (103). El ensayo fase III aleatorizado ENESTnd comparó nilotinib 300mg/12h, nilotinib 400mg/12h y imatinib 400mg/24h. El objetivo primario, que era la tasa de RMM en el primer año, fue alcanzado (44%, 43% vs 22%, para nilotinib 400, 300 e imatinib, $p < 0,001$ en ambas comparaciones), por lo que la dosis de 300mg/12h recibió la aprobación para primera línea de tratamiento (104). Tras 5 años de seguimiento, las tasas de RMM y $RM^{4.5}$ siguen siendo mayores en el brazo de nilotinib 300mg que en el de imatinib (RMM 77% vs 60%, $RM^{4.5}$ 54% vs 31%, $p < 0,001$ en ambas comparaciones). Hubo menos progresiones a FA o CB entre los que recibieron nilotinib 300mg comparado con el brazo de imatinib (2 vs 12, $p = 0,006$) (105).

Bosutinib es otro potente inhibidor dual de BCR-ABL y de Src kinasas (106). En el ensayo randomizado fase III BELA, comparando bosutinib 500mg vs imatinib 400mg, no mostró superioridad en la tasa de RCC en el primer año, con lo que no está aprobado para primera línea, aunque sí se puede administrar como segunda línea de tratamiento (107).

Ponatinib es el único ITK de tercera generación y es así clasificado porque es el único activo frente a la terrible mutación del dominio ABL1kinasa T315I, que es resistente al resto de ITK. El ensayo fase III fue cerrado unos meses después de su inicio porque los datos del ensayo fase II indicaban una incidencia aumentada de eventos trombóticos arteriales (6). Está aprobado para segunda línea y especialmente indicado en pacientes que presenten la citada mutación.

Actualmente se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos con imatinib, nilotinib y dasatinib administrados en primera línea para testar la discontinuación del tratamiento. Resultados publicados con imatinib muestran una incidencia acumulada

de pérdida de RMM del 36% a los 2 años, en pacientes que habían mantenido un *BCR-ABL1* indetectable de forma prolongada previo a la discontinuación (108).

Por lo tanto, en la actualidad disponemos de 3 ITK para su uso en primera línea en pacientes de LMC en FC. Imatinib parece ser el de uso más extendido, por la buena respuesta de la mayoría de los pacientes y por la mayor experiencia de uso que se tiene con el mismo durante la cual no se han desarrollado efectos secundarios severos (9). No obstante, un porcentaje nada desdeñable de pacientes, en torno al 25%, requerirán el uso de otros ITK por falta de eficacia de imatinib (99).

1.6. Factores pronósticos al diagnóstico

En medicina, las características de los pacientes o de su patología que muestran una asociación estadísticamente significativa y clínicamente relevante con algún resultado clínico de la enfermedad son denominados factores pronósticos. Varios factores pronósticos pueden ser combinados para formar lo que se denomina un score. Esta combinación suele consistir en una fórmula matemática que asigna un cierto peso a cada variable, siendo también posibles transformaciones de las mismas. Finalmente, mediante puntos de corte se definen los grupos pronósticos en los que, según el resultado del score, se clasificarán los pacientes (109). Lógicamente, los distintos grupos deberán mostrar diferencias estadísticamente significativas y clínicamente relevantes entre ellos.

Los factores pronósticos son indispensables en la medicina actual. Sus aplicaciones son:

- Predecir la evolución de los pacientes.
- Selección del tratamiento adecuado en función del pronóstico del paciente.
- Comparar los grupos establecidos mediante aleatorización a diferentes tratamientos en ensayos clínicos.
- Comparar los resultados de varios ensayos clínicos, ya que pueden no ser homogéneos en la composición de la muestra incluida.

1.7. Factores pronósticos al diagnóstico clínicos

En el año 1984 se publicó el score pronóstico Sokal para pacientes de LMC en FC (110). El estudio se llevó a cabo sobre una cohorte inicial de 813 pacientes de 6 series, procedentes de distintos hospitales y países, diagnosticados entre 1962 y 1981. Los pacientes fueron tratados de acuerdo con el arsenal terapéutico de la época, es decir, con monoterapia de quimoterápicos, siendo el busulfan el tratamiento más utilizado. Aquellas variables con significación estadística en el modelo univariable y con un número no muy elevado de valores perdidos (alrededor del 5%) fueron introducidos en una regresión de riesgos proporcionales, también llamada regresión de Cox. Así, el modelo resultante fue el siguiente:

$$\text{Sokal score} = \exp(0,0116 \times (\text{edad}[\text{en años}] - 43,4) + 0,0345 \times (\text{tamaño esplénico} [\text{cm por debajo del reborde costal}] - 7,51) + 0,1880 \times ((\text{cifra plaquetaria}[\text{expresada en } 10^9/\text{L}]/700)^2 - 0,563) + 0,0887 \times (\text{blastos} [\% \text{ en sangre periférica}] - 2,1)).$$

Como se puede observar, en la fórmula se aplica un peso determinado a cada variable expresado por el coeficiente que precede a cada una de las variables. En el caso de las plaquetas también se aplica una transformación consistente en la elevación de la cifra plaquetaria dividido entre 700 al cuadrado. De este modo se da un mayor peso a valores muy altos de plaquetas, con lo que se mejora la capacidad de predicción del modelo. El resultado de la fórmula proporciona un valor numérico que clasifica a los pacientes atendiendo a los siguientes puntos de corte:

Bajo riesgo: <0,8.

Riesgo intermedio: $\geq 0,8$ y $\leq 1,2$.

Alto riesgo: >1,2

El grupo de bajo riesgo mostraba una supervivencia a los 2 años del 90% y una mediana de supervivencia de 5 años. El grupo de alto riesgo tenía una supervivencia a

los 2 años del 65% y una mediana de supervivencia de 2,5 años. Un porcentaje de basófilos más eosinófilos mayor del 15%, un porcentaje de blastos en MO mayor del 5% y la presencia de ACA al cromosoma philadelphia no fueron introducidas en el modelo por un alto número de valores perdidos, pero los autores encontraron significación en el análisis univariable, por lo que comunicaron que posiblemente mejorarían la capacidad pronóstica del modelo (110) .

Una vez el tratamiento de la LMC había evolucionado desde los agentes quimioterápicos hacia el interferón- α , se hizo necesario el desarrollo de nuevos scores pronósticos. Así, en 1998 fue publicado el Euro score, más conocido como Hasford score, que fue desarrollado a partir de un metaanálisis que incluía inicialmente 1573 pacientes tratados con interferón- α , en monoterapia o en combinación, enrolados en ensayos clínicos randomizados entre 1983 y 1994 (111) . En esta cohorte el Sokal score no era capaz de diferenciar los grupos pronósticos satisfactoriamente. Usaron igualmente una regresión de Cox para establecer el score, que fue definido en una cohorte inicial de 908 pacientes y confirmado en una cohorte de validación compuesta por otros 285 pacientes, todos ellos sin valores perdidos para las variables incluidas en el modelo.

El modelo definido era el siguiente:

$$\text{Euro Score} = (0,6666 \times \text{edad [0 si edad} < 50 \text{ años; 1 si } \geq 50]) + 0,0420 \times \text{tamaño esplénico [cm por debajo reborde costal]} + 0,0584 \times \text{blastos [\% en sangre periférica]} + 0,0413 \times \text{eosinófilos [\% en sangre periférica]} + 0,2039 \times \text{basófilos [0 si \% basófilos } < 3 \text{ en sangre periférica; 1 si } \geq 3\%]} + 1,0956 \times \text{cifra plaquetaria [0 si plaquetas } < 1500 (\times 10^9/L); 1 \text{ si } \geq 1500] \times 1000$$

Los puntos de corte en el Hasford score son:

Bajo riesgo: ≤ 780 .

Riesgo intermedio: > 780 y ≤ 1480 .

Alto riesgo:>1480.

El grupo de bajo riesgo, que incluía un 41% de todos los pacientes, mostró una mediana de supervivencia de 98 meses y una supervivencia a los 5 años del 76%. El de riesgo intermedio, compuesto por un 45% de los pacientes, tenía una mediana de supervivencia de 65 meses y una supervivencia a los 5 años del 55%; y el de alto riesgo tenía 42 meses y 25% respectivamente (111) .

Con el uso de los ITK el pronóstico de los pacientes de LMC mejoró notablemente, por lo que se desarrolló un nuevo índice pronóstico específico para pacientes tratados con estas drogas. Así, en 2011 la ELN publicó el índice EUTOS, para el desarrollo del cual se incluyeron 1261 pacientes pertenecientes a ensayos clínicos prospectivos del grupo alemán, italiano, francés, nórdico y holandés (112). Todos los pacientes habían sido tratados con imatinib, la mitad de ellos en monoterapia a dosis de 400mg/día y el resto con dosis mayores de Imatinib o en combinación con bajas dosis de citarabina subcutánea o interferón- α . El objetivo del estudio era encontrar un score para predecir respuesta citogenética completa a los 18 meses. Aplicaron una regresión logística y definieron el siguiente modelo:

$$\text{EUTOS} = (7 \times \% \text{ de basófilos en sangre periférica}) + (4 \times \text{tamaño esplénico en cm por debajo del reborde costal})$$

Con esta fórmula diferenciaban dos grupos, en vez de 3 como en los scores previos:

Bajo riesgo ≤ 87 .

Alto riesgo: > 87 .

En el grupo de alto riesgo la probabilidad de alcanzar RCC a los 18 meses era del 66% frente al 86% en el de alto riesgo. Esta respuesta citogenética se traducía en una supervivencia libre de progresión a los 5 años del 82% y 90% en los grupos de alto y bajo riesgo respectivamente. Los autores calcularon también la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para la predicción

de no alcanzar RCC a los 18 meses. En los pacientes tratados con Imatinib 400mg eran de 15%, 95%, 31% y 87%. De esta forma 1 de cada 3 pacientes en el grupo de alto riesgo, al que eran asignados únicamente un 10% de los pacientes, no alcanzaban RCC, lo que constituye un fallo al tratamiento y la necesidad, por tanto, de un cambio de línea (112). Posteriormente la propia ELN publicó otro estudio en el que se incluyeron 1288 pacientes, no incluidos en ningún ensayo clínico, de los registros nacionales de España, Polonia, Rusia, República Checa y Rumania. Igual que en el estudio anterior se incluyeron pacientes tratados con imatinib a diferentes dosis y un mínimo porcentaje (<1%) de pacientes tratados con imatinib en combinación. La supervivencia libre de progresión a los 5 años en este estudio fue de 89% vs 82% ($p=0,04$) y la supervivencia global 91% y 83% ($p=0,03$) en los grupos de alto y bajo riesgo respectivamente (113).

Sin embargo, en dos estudios llevados a cabo en MDAnderson y Hammersmith Hospital con 465 y 282 pacientes respectivamente no encontraron diferencias estadísticamente significativas en distintas variables evaluadas entre los grupos definidos por el EUTOS score (114,115).

Por tanto, tenemos 3 scores pronósticos clínicos, ninguno de los cuales está claramente recomendado para dirigir la terapia de primera línea, aunque la clasificación de un paciente en el grupo de alto riesgo en cualquiera de ellos pudiera apoyar el uso de un ITK de segunda generación, al ser considerado una alarma en las últimas recomendaciones de la ELN (74).

1.8. Factores pronósticos al diagnóstico moleculares

Sokal, Hasford y EUTOS score incluyen diferentes variables clínicas que reflejan la agresividad de la enfermedad, sin embargo, parece lógico pensar que es posible encontrar una característica biológica intrínseca de la enfermedad que nos pueda ayudar a predecir el pronóstico de los pacientes.

Ha habido mucho debate sobre si la presencia del transcrito e13a2 o e14a2 modificaba en algo el curso de la enfermedad, aunque actualmente la opinión mayoritaria es que no modifica el pronóstico de la enfermedad, parece ser que sí difieren en la cifra plaquetaria y leucocitaria (116,117).

La presencia de translocaciones variantes, en las que junto al cromosoma 22 y al 9 se ven otros asociados en la translocación, no parece alterar el curso clínico de los pacientes (75). Sin embargo, la detección al diagnóstico de ACA de la ruta mayor (trisomías del cromosoma 8 o 19, isocromosoma 17q o presencia de cromosoma philadelphia adicional) en la clona philadelphia positiva (Ph+), sí que conlleva un peor pronóstico, disminuyendo incluso la supervivencia global (76). Por este motivo, su detección al diagnóstico es considerado una alarma por la ELN (74).

Con el fin de encontrar una huella molecular que pudiera identificar a los pacientes que van a presentar una peor respuesta a los ITK se han desarrollado diversos estudios: algunos comparando respondedores frente a no respondedores, definidos mediante diferentes criterios, y otros comparando pacientes en FC con pacientes en fases evolucionadas de la enfermedad. Las fases avanzadas de la enfermedad, especialmente la CB, se caracterizan por su escasa respuesta a imatinib, por lo que el hallazgo de genes diferencialmente expresados entre FC y CB podría ser la característica molecular responsable de esta resistencia al fármaco.

En el estudio llevado a cabo por Oehler et al. compararon muestras totales de 42 pacientes en FC, 9 en FA, 9 con FA debida a evolución clonal, 30 en CB y 4 pacientes

con segunda FC tras tratamiento de una CB. Utilizaron un microarrays para medir la expresión de 24000 genes. Siguiendo un enfoque bayesiano identificaron 6 genes (NOB1, DDX47, IGSF2, LTB4R, SCARB1, SLC25A3). En una segunda fase usaron la plataforma Taqman Low Density Array (TLDA) y compararon la expresión de los genes seleccionados en la primera fase, de 45 pacientes antes de ser incluidos en el estudio RIGHT, en el que se les administraba imatinib 800mg, con la de 22 pacientes, que estaban siendo evaluados para su inclusión en el estudio AMN107, en el que recibirían nilotinib 800 mg tras fallo a imatinib. Con los 6 genes descritos elaboraron un modelo que diferenciaba entre FC, FA y CB y entre buenos y malos respondedores a imatinib (118).

En el estudio realizado por McWeeney et al. compararon en una primera fase la expresión génica de 36 pacientes divididos en dos grupos: uno con RCC antes del año de tratamiento, y otro que no había alcanzado respuesta citogenética menor (>66% de metafases Ph+) en el mismo periodo de tratamiento con imatinib. Seleccionaron células CD34+ y utilizaron microarrays para medir la expresión génica. Mediante la aplicación de un análisis no supervisado identificaron la expresión diferencial de 75 genes, que en una segunda fase clasificaron correctamente a 15 de los 17 respondedores y a 5 de los 6 no respondedores, definiendo la respuesta como la obtención de <35% metafases Ph+ en el primer año de tratamiento (119).

En el estudio realizado por Zheng et al. compararon la expresión de 14500 genes, en células CD34+, de 11 pacientes al diagnóstico de la FC con 9 pacientes en CB usando, como en los estudios previos, la tecnología de microarrays. El análisis supervisado de los datos detectó 34 genes con un cambio en la expresión mayor de 2 veces entre los grupos. Las diferencias encontradas en algunos de estos genes (SOCS2, CD52, CD74, CD34, GAPDH) fueron confirmadas mediante qPCR y citometría de flujo, por lo que concluyeron que se trataba de genes que conformaban una huella genética de las fases aceleradas de la enfermedad (120).

En el estudio publicado por Yong, bajo la supervisión de Melo en Hammersmith Hospital (HH), seleccionaron también células CD34+ y compararon mediante *microarrays* la expresión génica de 10 pacientes que desarrollaron en los 3 años siguientes una transformación blástica con la de 9 pacientes cuya transformación blástica sucedió a partir de los 7 años del diagnóstico (no habiendo recibido ninguno de ellos ITK). Las muestras habían sido recogidas anteriormente al inicio del tratamiento. Usando un análisis no supervisado encontraron 20 genes con expresión diferencial entre ambos grupos. En una segunda fase ampliaron la serie a 23 pacientes con CB tardía, 18 con CB temprana y 27 intermedios. Usaron qPCR y, aplicando una regresión de Cox, identificaron la baja expresión de CD7 combinada con una alta expresión de PR-3 o ELA2 como predictora de una larga supervivencia (121).

En otro estudio llevado a cabo en HH por de Lavallade et al. analizaron mediante *microarrays* muestras de células mononucleares de sangre periférica extraídas previamente al inicio del tratamiento. Las muestras estudiadas fueron de 8 pacientes que habían alcanzado RCC durante el primer año de tratamiento con imatinib, 5 pacientes sin ningún grado de respuesta citogenética, y otros 2 pacientes con resistencia secundaria, es decir, habían alcanzado RCC pero la perdieron posteriormente. Detectaron 50 genes sobreexpresados y 36 infraexpresados en las muestras de los pacientes no respondedores, entre los cuales destacaron a *PTEN* por ser un conocido supresor tumoral relacionado con diversos tumores sólidos (122).

En el estudio publicado por Villuendas et al. fueron analizadas muestras de MO previas a tratamiento con imatinib 400mg de 32 pacientes que habían fallado previamente a interferón- α . Midieron mediante *microarrays* la expresión de 6500 genes relacionados con cáncer. Seleccionaron 6 genes mediante *bootstrap* análisis (*XIAP*, *FZD7*, *IKBKB*, *IL7R*, *TNC*, *VWF*) que se expresaban de manera diferencial entre no respondedores y respondedores, definidos estos últimos como aquellos pacientes que

habían alcanzado respuesta citogenética mayor a los 12 meses de tratamiento con imatinib. El score clasificó correctamente al 80% de los pacientes. Los hallazgos fueron validados en otra cohorte de 12 pacientes tratados con imatinib 400mg en primera línea. Sin embargo, el test de correlación de Pearson entre las mediciones de los genes descritos realizadas con qPCR y con el *microarray* fueron no significativas en muchos de ellos (123).

Radich et al. publicaron un estudio en el que mediante *microarrays* compararon la expresión de muestras de MO de 42 pacientes en FC, 17 en FA y 32 en CB. Aplicaron un análisis de la varianza y encontraron que con la progresión de la enfermedad se desregulaba la vía WNT/ β -catenina y algunas kinasas como Abl2, disminuía la expresión de los factores de transcripción Jun y Fos, y aumentaba la expresión de PRAME (124). Por otra parte, también se ha descrito que la expresión de PRAME inhibe la diferenciación mieloide en líneas celulares de LMC (125).

En un estudio desarrollado en MDAnderson por Zhang usaron inicialmente, a diferencia de los estudios previos, la tecnología TLDA y midieron la expresión de 21 genes en muestras previas a tratamiento de 41 pacientes con respuesta óptima, 7 pacientes con respuesta subóptima y 20 con resistencia primaria. Además, se analizaron muestras de 29 pacientes con resistencia secundaria sin mutaciones del dominio ABL1 kinasa, 15 en CB linfóide y 12 en CB mieloide. Mediante análisis discriminante lineal identificaron COX1 expresado de manera diferencial entre buenos respondedores y resistentes primarios a imatinib. Esto fue validado en una segunda cohorte de 68 pacientes. Once genes se encontraron diferencialmente expresados entre pacientes con resistencia secundaria vs buenos respondedores (126). Entre ellos cabe destacar *SLC22A1*, también conocido como *OCT1*, el principal transportador de imatinib, cuyos niveles de expresión o variantes genotípicas han sido relacionadas en varios estudios con la respuesta a imatinib (127,128).

Todos los estudios citados previamente tratan de encontrar diferencias en la expresión génica que diferencien entre respondedores y no respondedores o entre diversas fases de la enfermedad. Sin embargo, es posible que estas diferencias se encuentren a nivel genómico y no transcriptómico. Así, con la expansión de la *Next-Generation-Sequencing* se han llevado a cabo estudios que han detectado mutaciones de *GATA2*, *ANO5*, *MAX5*, *ANGEL1*, *ENO1*, *CLO3A1*, *AFP*, *SERPINA1*, *MGAT5B* y *ZNF208* en muestras de un paciente en FA y CB(129). Estas u otras mutaciones también podrían estar relacionadas con la falta de respuesta a imatinib observada en estas fases.

Pese a la cantidad de estudios realizados, e incluso la coincidencia de algunos de los genes encontrados entre los distintos estudios, actualmente no se aplica ningún test molecular al diagnóstico que ayude a predecir la respuesta a imatinib de los pacientes de LMC en FC.

1.9. Justificación del estudio

Como hemos repasado en los apartados previos, la LMC es un hito en la historia de la medicina, no solo porque se produce como consecuencia de la formación del gen de fusión *BCR-ABL1*, el cual fue la primera alteración molecular específica causante de una enfermedad descubierta, sino también porque contra esta alteración se desarrolló la primera terapia dirigida de la historia. Esa droga es el imatinib, y posteriormente a su desarrollo se han comercializado ITK de segunda (nilotinib, dasatinib y bosutinib) y tercera generación (ponatinib). De todos ellos sólo imatinib, dasatinib y nilotinib están autorizados para su uso en primera línea en pacientes diagnosticados de LMC en FC. Hay un mayor conocimiento sobre la seguridad del uso a largo plazo de imatinib, sin embargo, los ITK de 2ª generación producen respuestas más rápidas y al parecer más profundas que imatinib.

En la actualidad al diagnóstico disponemos de 3 scores clínicos, de los cuales quizás Sokal y EUTOS score sean los más utilizados. Pese a que la clasificación de un paciente entre los de alto riesgo en cualquiera de los 3 scores se considera una alarma, ninguno de ellos tiene el suficiente valor predictivo para pronosticar respuesta a imatinib y, por lo tanto, ninguno es recomendado de manera explícita para decidir el tratamiento de primera línea.

Numerosos estudios se han hecho para intentar encontrar una característica molecular diferencial entre buenos y malos respondedores a imatinib o entre las fases avanzadas y la FC de la enfermedad. Las fases avanzadas se caracterizan por resistencia al tratamiento, por lo que aquellos genes diferencialmente expresados entre las fases podrían ser los causantes de esta mala respuesta al tratamiento. Pese a los muchos estudios llevados a cabo, ninguno de los test moleculares, al igual que ocurre con los scores clínicos, es aplicable para predecir al diagnóstico la respuesta a imatinib.

Por lo tanto, actualmente la mejor manera de saber la respuesta del paciente a los ITK es valorando esta, una vez iniciado el tratamiento y la tendencia es a hacerlo lo antes posible para llevar a cabo un cambio de línea precoz. Por todo ello, la valoración de la respuesta a los 3 meses de tratamiento está ganando protagonismo en los últimos tiempos. Siguiendo esta tendencia a evaluar la respuesta lo antes posible, parece razonable pensar que sería incluso más beneficioso saber antes de empezar el tratamiento las probabilidades de respuesta al mismo para comenzar desde el inicio con el ITK adecuado.

Derivado de lo anteriormente explicado, se deduce que existe la necesidad de desarrollar un test que ayude al clínico a saber si el paciente responderá adecuadamente a imatinib, con lo que en caso contrario los ITK de segunda generación serían una mejor opción terapéutica. Y ya que la LMC se caracteriza por una alteración molecular específica, parece posible que quizás una alteración molecular pueda ser la responsable de dicha resistencia al tratamiento. Para encontrar la característica molecular diferencial, la mejor opción sería analizar genes que ya han sido previamente descritos como relevantes en la resistencia al tratamiento o en la patogenia de la LMC, incluyendo principalmente aquellos destacados por más de un estudio, y comparar su rendimiento pronóstico.

2. HIPÓTESIS

Por lo todo lo expuesto en la introducción, planteamos la siguiente hipótesis: entre muchos de los genes ya resaltados como importantes en la resistencia a imatinib o en la patogenia de la LMC, puede existir alguno cuya expresión diferencial al diagnóstico pueda identificar buenos y malos respondedores a imatinib y sirva para clasificar a los pacientes en dos grupos con diferentes probabilidades de resistencia a esta droga.

3. OBJETIVOS

1. Encontrar un gen, o genes, cuya expresión permita dividir a los pacientes en 2 grupos con diferentes probabilidades de discontinuación de imatinib por falta de eficacia, aplicando para ello la tecnología TaqMan Low Density Array (TLDA).
2. Establecer un nivel de expresión de este, o estos genes, que clasifique a los pacientes en 2 grupos con diferente probabilidad de:
 - a. Presentar un nivel de BCR-ABL1 < 10% a los 3 meses.
 - b. Alcanzar respuesta citogenética completa.
 - c. Alcanzar respuesta molecular mayor.
 - d. Progresión a fases avanzadas.
 - e. Muerte relacionada a LMC.
3. Validar su aplicabilidad en distintas cohortes usando qPCR convencional y su independencia de otros factores pronósticos ya conocidos mediante un análisis multivariante.
4. Estudiar la posible relación molecular del gen encontrado (que fue PTCH1) con BCR-ABL1 y las vías afectadas por la expresión diferencial del mismo para valorar su posible importancia como diana terapéutica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Cohortes

4.1.1 Cohorte TLDA 1

La cohorte inicial estaba compuesta por 73 pacientes diagnosticados de LMC en FC, definida siguiendo los criterios de la ELN, tratados en Imperial College Healthcare NHS Trust, Londres, Reino Unido (74). Este hospital es de nivel terciario y de referencia en LMC en toda Inglaterra. Los pacientes fueron seleccionados en función de la disponibilidad de material biológico, es decir, no hubo criterio de selección alguno además de la existencia de muestra disponible. Aquellos pacientes que habían formado parte de ensayos clínicos no fueron incluidos en esta cohorte. Los pacientes habían firmado un consentimiento informado, siguiendo la declaración de Helsinki, permitiendo el uso de las muestras biológicas para investigación y el registro de los datos clínicos en la base de datos de pacientes de LMC del HH. Todos fueron tratados inicialmente con imatinib 400mg y la dosis ajustada posteriormente, dependiendo de la tolerancia y la respuesta (130,131). El estudio citogenético de médula ósea y la monitorización molecular fueron llevados a cabo siguiendo las recomendaciones de la ELN. La RCC fue definida como se ha descrito previamente (74).

Los detalles de esta y el resto de cohortes se muestran en la tabla III. La mediana de seguimiento era de 4,3 años, 39 de los 73 pacientes continuaban recibiendo imatinib en el último seguimiento. Había 15 pacientes que mostraron resistencia primaria al tratamiento (no llegaron a alcanzar RCC con imatinib) y 16 pacientes con resistencia secundaria. Entre los pacientes con resistencia secundaria, 14 alcanzaron RCC y la perdieron, y los 2 pacientes restantes alcanzaron RMM y perdieron la respuesta. Diez pacientes murieron; 3 de ellos debido al desarrollo de diferentes neoplasias sólidas por lo que su muerte no parece relacionada con la LMC, ya que en el momento de la defunción se encontraban en RCC y recibiendo tratamiento con imatinib.

4.1.2 Cohorte TLDA 2

La segunda cohorte estaba compuesta por 56 pacientes incluidos en el ensayo Spirit I. En este ensayo, pacientes diagnosticados de LMC en FC eran randomizados a recibir imatinib 400mg, imatinib 800mg o imatinib 400mg asociado a interferón- α . Únicamente los pacientes randomizados a recibir imatinib 400mg fueron incluidos en esta cohorte. Todos los pacientes habían firmado un consentimiento informado permitiendo el uso de las muestras y los datos clínicos para investigación. La cesión de las muestras y datos clínicos nos fue concedida por el comité del ensayo clínico. Los datos clínicos se muestran en la tabla III. Doce pacientes discontinuaron el tratamiento con imatinib debido a falta de eficacia: 4 mostraron resistencia primaria y 8 resistencia secundaria. El ensayo estaba diseñado de manera que, cuando la dosis de 400mg de imatinib inicial era modificada o se cambiaba el ITK, el paciente abandonaba el ensayo y no había información disponible sobre su evolución posterior, ni en los registros del HH ni en los del comité del ensayo clínico. Esto condicionó el análisis de esta cohorte de la manera que se explicará más adelante.

4.1.3 Cohorte qPCR 1

De los 73 pacientes analizados en la cohorte TLDA1, todos aquellos con material biológico restante tras el análisis previo fueron seleccionados para su inclusión en esta cohorte, lo que supuso un total de 37 pacientes. Por lo tanto, realmente se trataba de una subcohorte (se ha usado el término cohorte para simplificar la terminología). Las características clínicas se muestran en la tabla III.

4.1.4 Cohorte qPCR2

Todas las cohortes analizadas previamente provenían y fueron analizadas en Reino Unido, concretamente en HH. Esta cohorte, sin embargo, se formó con pacientes procedentes de 16 centros españoles de nivel secundario y terciario:

- Hospital Universitario Doce de Octubre (H12O), Madrid.

- Hospital Doctor Negrín, Las Palmas.
- Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.
- Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia.
- Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid.
- Hospital Virgen de la Salud, Toledo.
- Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid.
- Hospital Severo Ochoa, Leganés, Madrid.
- Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid.
- Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Madrid.
- Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid.
- Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid.
- Hospital Universitario de Móstoles, Madrid.
- Hospital del Sureste, Arganda, Madrid.
- Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid.
- Hospital Universitario de Getafe, Madrid.
- Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

Un total de 101 pacientes tratados con imatinib 400mg en primera línea fueron incluidos en esta cohorte. Las muestras se encontraban en los biobancos de diferentes centros y los pacientes habían firmado un consentimiento cediendo el uso de las muestras y los datos clínicos para investigación. Los datos clínicos se encontraban recogidos en el registro español de la LMC (RELMC) o bien fueron recopilados con motivo de este estudio en el caso de los pacientes procedentes del Hospital Doctor Negrín y del Hospital Morales Meseguer, ya que los datos de sus pacientes no estaban en el RELMC. Como en la cohorte TLDA1, la dosis fue ajustada dependiendo de la tolerancia y la respuesta (130,131). Los estudios citogenéticos y moleculares fueron llevados a cabo siguiendo las recomendaciones de la ELN y la RCC fue definida como se ha descrito previamente (74). Los datos clínicos se pueden ver en la

tabla III. La mediana de seguimiento era de 2,8 años. Catorce pacientes presentaron resistencia a imatinib, es decir discontinuaron el fármaco por falta de eficacia. De ellos, 5 presentaron resistencia primaria y 9 resistencia secundaria a imatinib. Entre los que presentaron resistencia secundaria 5 alcanzaron RCC y 4 RMM que posteriormente perdieron motivo por el cual fueron cambiados de línea terapéutica.

Características Clínicas	Cohorte TLDA1			Cohorte TLDA2			Cohorte qPCR1			Cohorte qPCR2		
	Total n=73	Alta exp. PTCH1 n=45	Baja exp. PTCH1 n=28	Total n=56	Alta exp. PTCH1 n=50	Baja exp. PTCH1 n=6	Total n=37	Alta exp. PTCH1 n=18	Baja exp. PTCH1 n=19	Total n=101	Alta exp. PTCH1 n=51	Baja exp. PTCH1 n=50
Mediana edad. Años	46	46	45	50	49	58	47	51	45	55	55	55
Rango	18-86	21-73	18-86	20-77	20-77	44-67	18-86	25-73	18-86	19-88	33-87	19-88
Mediana seguimiento. Años	4,3	5	3,6	3,30	3,30	2,50	3,8	4,9	3,7	2,8	3	2,7
Rango	1,3-9,4	1,3-9,4	1,3-7,4	0,9-6,1	0,9-6,1	1,4-5,7	1,3-9,2	1,3-9,2	1,4-7,4	0,2-12,6	0,2-12,4	0,2-12,6
Sokal Score												
Bajo (%)	22 (30)	17 (38)	5 (18)	6 (23)	6 (25)	0	8 (22)	5 (28)	3 (16)	43 (43)	19(38)	24 (48)
Intermedio (%)	32 (44)	22 (49)	10 (36)	13 (50)	13 (54)	0	19 (51)	10 (56)	9 (47)	47 (47)	25 (50)	22 (44)
Alto (%)	19 (26)	6 (13)	13 (46)	7 (27)	5 (21)	2 (100)	10(27)	3 (17)	7 (37)	10 (10)	6 (12)	4 (8)
EUTOS score												
Bajo (%)	48 (86)	30 (88)	18 (82)	38 (90)	35 (92)	3 (75)	26 (93)	14 (93)	12 (92)	96 (96)	47 (94)	49 (98)
Alto (%)	8 (14)	4 (12)	4 (18)	4 (10)	3 (8)	1 (25)	2 (27)	1 (7)	1 (8)	4 (4)	3 (6)	1 (2)
Mediana de blastos en SP al diagnóstico. Porcentaje	1	1	1	2	2	2	1	1	1	ND	ND	ND
Rango	0-15	0-12	0-15	0-7	0-7	0-3	0-15	0-8	0-15	ND	ND	ND
Median platelets at diagnosis. 10 ⁹ /L	370	400	322	405	400	714	410	375	434	ND	ND	ND
Rango	108-2161	108-1437	124-2161	95-2128	95-2128	171-1169	108-2161	108-979	210-2161	ND	ND	ND
Mediana tamaño esplénico desde reborde costal. Cm	4	2	7	3	0	8	4,5	2	8	ND	ND	ND
Rango	0-25	0-20	0-25	0-24	0-24	0-14	0-25	0-15	0-25	ND	ND	ND
Respuesta a los 3 meses												
<9.84%BCRABL/ABL IS (%)	39 (72)	27 (87)	12 (52)	43 (86)	41 (89)	2 (50)	20 (69)	12 (80)	8 (57)	41 (71)	24 (86)	17 (57)
>=9.84%BCRABL/ABL IS (%)	15 (28)	4 (13)	11 (48)	7 (14)	5 (11)	2 (50)	9 (31)	3 (20)	6 (43)	17 (29)	4 (14)	13(43)
Respuesta al año												
RCC (%)	49 (67)	34 (76)	15 (54)	39 (70)	38 (76)	1 (17)	22 (59)	14 (78)	8 (42)	57 (92)	28 (93)	29 (91)
No RCC (%)	24 (33)	11 (24)	13 (46)	17 (30)	12 (24)	5 (83)	15 (41)	4 (22)	11 (58)	5 (8)	2 (7)	3 (9)
Pacientes en imatinib en el último seguimiento	39	29	10	ND	ND	ND	19	15	4	73	41	32
Pacientes con grado de respuesta ≥ RMM	30	24	6	ND	ND	ND	15	11	4	62	31	31
Evolución a FA/CB	8/5	3/2	5/3	ND	ND	ND	6/3	1/0	5/3	2/1	0/0	2/1
Alotrasplante de MO	11	4	7	ND	ND	ND	7	1	6	0	0	0
Muertes	10	3	7	ND	ND	ND	7	0	7	6	3	3
Muertes relacionadas a LMC	7	2	5	ND	ND	ND	5	0	5	2	0	2

Exp. indica expresión. Se muestran las características de las cohortes globales y divididas conforme a la expresión de *PTCH1*.

Tabla III. Características de los pacientes incluidos en las distintas cohortes.

4.2. Muestras: almacenamiento, extracción ARN, retrotranscripción y análisis BCR-ABL1

Todas las muestras analizadas eran SP de pacientes con LMC en FC, extraídas antes del inicio del tratamiento con ITK. En algunos casos en el momento de la extracción de la muestra el paciente estaba recibiendo hidroxycarbamida para disminuir las elevadas cifras leucocitarias.

4.2.1 Muestras cohorte TLDA1, TLDA2 y qPCR1

Las muestras de las citadas cohortes estaban almacenadas en Hammersmith Hospital y procesadas en el laboratorio de biología molecular del departamento de patología de un modo homogéneo. Eran alícuotas de muestras de SP total almacenadas en un compuesto, que contiene tiocianato de guanidina, llamado RLT (Qiagen, Hilden, Alemania). El procesamiento y análisis de la expresión de *BCR-ABL1* se realizó según las guías publicadas (132,133). La cifra media de leucocitos era de $165 \times 10^9/l$ (rango $17-435 \times 10^9/l$) y la mediana de la ratio de *BCR-ABL1* ratio era del 72% en IS (rango 38-100%).

El RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) fue usado para extraer ARN de 100 μ L de lisado de RLT, siguiendo el protocolo del fabricante. Un tratamiento con una ADNasa llamada DNase I (Quiagen) fue incluido durante la extracción de ARN, para eliminar el posible resto de ADN genómico, ya que había sets de *primers* y sonda (*RNASE3*, *PTEN*, *NOB1*, *FZD7*, *CEBPB* y *18S*) del TaqMan Low Density Array (TLDA) (Life Technologies, USA) que se encontraban en el mismo exón o en exones separados por un intrón muy pequeño lo que hacía posible la obtención de señal procedente de ADN genómico residual. Con el objetivo de medir la posible alteración de la medición de la expresión génica derivada de la señal obtenida de ADN genómico se hizo un control negativo de la retrotranscripción (RT). La RT, mediante síntesis de la primera hebra,

se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante del High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies).

4.2.2 Muestras Cohorte qPCR2

Las muestras analizadas en la cohorte qPCR2 al proceder de distintos centros presentaban una mayor heterogeneidad en su procesamiento. Cincuenta del total de 101 muestras se encontraban almacenadas en el biobanco del H12O ya que habían sido remitidas en un ámbito asistencial. Por lo tanto, el procesamiento de la muestra y la medición de la expresión de *BCR-ABL1* se habían llevado a cabo en el H12O al tratarse de un centro de referencia en el diagnóstico y seguimiento de la LMC. Las muestras de los siguientes hospitales fueron remitidas como ARN o cADN al H12O para la realización del estudio:

- Hospital Doctor Negrín: 20 muestras, ARN.
- Hospital General Universitario Gregorio Marañón: 16 muestras, cADN.
- Hospital Universitario Morales Meseguer: 9 muestras, cADN.
- Hospital Universitario Clínico San Carlos: 2 muestras, ARN.
- Hospital Virgen de la Salud: 3 muestras, cADN.
- Hospital Universitario de la Princesa: 1 muestra, ARN.

Así en el H12O, donde se llevaron a cabo la mayoría de los estudios de diagnóstico y seguimiento de *BCR-ABL1*, se lisaron los hematíes con Buffer EL (Qiagen), después se usó el método del trizol para la extracción del ARN usando Trireagent (MRC, USA) y la retrotranscripción se hizo con el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). En cuanto a la qPCR de *BCR-ABL1* p210 se usaron los *primers* y sondas ya descritos por otros autores, el plásmido empleado era el Ipsogen BCR-ABL1 Mbc Standards (Qiagen) y el calibrador ARQ IS Calibrator Panel (e14a2) (Asuragen, Austin, USA) y se han seguido las recomendaciones proporcionadas por EUTOS (80,134). Además de usar los calibradores para llevar a cabo la

transformación de los resultados a IS el H12O también dispone de un factor de conversión.

En los otros centros la metodología empleada fue heterogénea. Para la extracción de RNA se usaron métodos basados en trizol, el RNeasy Kit (Qiagen) o el 16 LEV Simply RNA Blood Kit (Maxwell, San Diego, USA). La retrotranscripción se llevó a cabo con QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basilea, Suiza) o SuperscriptIII (Invitrogen, Massachussets, USA). Los *primers* y sonda empleados en la qPCR fueron iguales a los usados en el H12O y descritos previamente (134). Los plásmidos eran el BCR-ABL pDNA Calibrant (Sigma Aldrich, San Luis, USA) y el calibrador el ARQ IS Calibrator Panel (Asuragen). En otro centro los plásmidos y el calibrador procedían del Qiagen Ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit (Qiagen).

En dos de los centros, Hospitales Gregorio Marañón y Doctor Negrín, usaron para la cuantificación de BCR-ABL1 el Genexpert (Cepheid, USA) que es un sistema de procesado automático de la muestra en el que introduces la sangre total lleva a cabo todos los procesos automáticamente y reporta el resultado (135).

4.3. Análisis de las muestras

4.3.1 TaqMan Low Density Array

EL TLDA es un método de análisis de expresión génica basado en una RT-qPCR microfluídica. En la placa de 384 pocillos, que sirve de soporte físico de la tecnología, están dispuestos sets de *primers* y sondas *minor-groove binding* (MGB) prediseñados, que pueden ser seleccionados por el cliente. Las placas fueron analizadas en un termociclador de tiempo real 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies). El análisis se llevó a cabo en modo rápido. Los 29 genes incluidos en el TLDA fueron extraídos de la literatura. Algunos habían sido descritos como diferencialmente expresados entre buenos y malos respondedores a imatinib o entre las distintas fases de la LMC. Se puso especial énfasis por incluir aquellos que habían sido hallados en más de un estudio. También se incluyeron otros genes que habían sido descritos como relevantes en la patogenia de la enfermedad. La relación de los genes incluidos y las referencias de donde se extrajeron se pueden ver en la tabla IV.

Gen	Referencias
<i>RNA18S1</i> [*] , <i>GUSB</i> [*] , <i>B2M</i> [*]	136
<i>XIAP</i> [†] , <i>IKBKB</i> [†] , <i>VWF</i> [†] , <i>FZD7</i> [†]	123
<i>PRTN3</i> [†] , <i>MPO</i> [†]	120,121
<i>SOCS2</i> [†] , <i>CSTA</i> [†] , <i>PLAUR</i> [†] , <i>RNASE3</i> [†] , <i>CEBPB</i> [†]	119,12
<i>DDX47</i> [†] , <i>IGSF2</i> [†] , <i>LTB4R</i> [†] , <i>NOB1</i> [†]	118
<i>KIF23</i> [†] , <i>DDX11</i> [†] , <i>RNF13</i> [†] , <i>AURKB</i> [†] , <i>PTEN</i> [†]	122
<i>SCL22A1</i> [†] , <i>ABCB1</i> [†]	126
<i>MSI2</i> [‡]	34
<i>AURKA</i> [‡]	38
<i>MGMT</i> [‡]	40
<i>WT1</i> [‡]	44
<i>PTCH1</i> [‡]	67
<i>PRAME</i> [†]	124
<i>BMI1</i> [‡]	39

*Genes control, [†]Genes extraídos de estudios de expresión génica diferencial entre buenos y malos respondedores a imatinib, [‡] Genes extraídos de estudios sobre patogenia molecular de la LMC.

Tabla IV. Genes analizados en el TaqMan Low Density Array y las referencias originales.

El diseño de la placa se realizó online a través del portal de la casa comercial y se eligió el formato 32 x 4, es decir, en cada placa se analizarían 32 genes de 4 muestras diferentes. De los 32 genes, 3 correspondían a genes control: 18S ARN ribosomal (*18S*), β 2-microglobulina (*B2M*) y β -glucuronidasa (*GUSB*). Todos ellos validados como genes control en tumores hematológicos (136). Todos los genes eran analizados en triplicado.

Cien microlitros de cADN de cada paciente se mezclaban con TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies) y agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 200 μ l. Cien microlitros eran cargados en cada línea de pocillos de la placa, por lo que la muestra de cada paciente se distribuía en 2 líneas diferentes. En la primera carrera se usó la asignación automática del punto de corte para establecer como significativa la fluorescencia y de este modo establecer el ciclo de cuantificación (Cq). La expresión de cada gen se calculó con el Cq medio de los 3 replicados. En caso de haber algún outlier entre los replicados, se eliminaba. En las siguientes carreras se fijaron los mismos puntos de corte que en la carrera inicial de manera manual para asegurar la mínima variabilidad inter-ensayo. El análisis inicial fue llevado a cabo con el software Data Assist v3 (Life Technologies), el cual aplicaba el método $2^{-\Delta Cq}$ para calcular la expresión relativa de cada gen en la que el Cq medio de los 3 replicados era normalizado frente a la media geométrica de los 3 genes control (*18S*, *GUSB* and *B2M*) (137).

4.3.2 qPCR cohorte 1

El análisis de la cohorte qPCR1 se llevó a cabo para tener una validación técnica de los genes que habían mostrado potencia pronóstica en las cohortes previas analizadas con la tecnología TLDA (basada en una qPCR microfluídica, no convencional). Se diseñó un set diferente de *primers* y sonda, también MGB, usando Primer Express 3 (Life Technologies) con información de la secuencia extraída de la base datos Ensembl y una validación del diseño de los primers y sonda llevada a cabo con el

UCSC *in silico* PCR tool. Las PCR de la cohorte qPCR1 se realizaron en modo rápido en un *Step-One-Plus analyser* (Life Technologies). Se usaron los mismos tres genes control que en el TLDA (GUSB, B2M and 18S), siguiendo las recomendaciones de las guías MIQE (138,139). Las qPCR se realizaron en dúplex, las sondas se usaron a una concentración de 200nM, los *primers* del gen a cuantificar se ajustaron a 300nM y a 150 nM en el caso de los genes control. Las secuencias de los *primers* y sondas están detalladas en la tabla V. El análisis de la expresión génica se llevó a cabo usando el método $2^{-\Delta Cq}$ tal y como se ha detallado en el análisis del TLDA.

Gen	Primer/sonda	Secuencia (5'→3') y marcaje
<i>PTCH1</i>	Forward primer	AGCTCAGTGCCGTGCC
<i>PTCH1</i>	Reverse primer	CTCCAGGGCAAGCACAGC
<i>PTCH1</i>	MGB sonda	6FAM-ACGTTGCTTTGGCCTT
<i>XIAP</i>	Forward primer	GGATATACTCAGTTAACAAGGAGCAGCT
<i>XIAP</i>	Reverse primer	TCAGTTAGCCCTCCTCCACAGT
<i>XIAP</i>	MGB sonda	6FAM-TGCTTTAGGTGAAGGTGAT
<i>18S</i>	Forward primer	GCCACCCGAGATTGAGCA
<i>18S</i>	Reverse primer	GTAGCGACGGGCGGTGT
<i>18S</i>	MGB sonda	VIC-GCTACACTGACTGGCT
<i>GUSB</i>	Forward primer	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
<i>GUSB</i>	Reverse primer	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
<i>GUSB</i>	MGB sonda	VIC-ACTCTCGTCGGTGACTG
<i>B2M</i>	Forward primer	GAGTATGCCTGCCGTGTG
<i>B2M</i>	Reverse primer	ATCCAAATGCGGCATCT
<i>B2M</i>	MGB sonda	VIC-TCCATGATGCTGCTTAC

Tabla V. *Primers* y sondas no comerciales usados en la cohorte qPCR1.

4.3.3 qPCR cohorte 2

Esta cohorte se analizó para terminar de confirmar la potencia pronóstica de *PTCH1* que resultó ser el único gen que se validó como significativo en todas las cohortes previas. También se analizó *SMO*, que es un gen cuya proteína está directamente regulada por *PTCH1*, para ver si mejoraba la potencia pronóstica de manera aislada o combinando ambas medidas tal y cómo se había descrito (140). Los *primers* y sondas utilizados fueron de nuevo comerciales e igualmente usaban la tecnología MGB de TaqMan (Life Technologies). Únicamente se usó un gen control y es que otro de los objetivos del análisis de esta cohorte era comprobar si se podía simplificar la

realización de la qPCR reduciendo el número de genes control de 3 a 1. La referencia del ensayo de *GUSB* es Hs00939627_m1, de *PTCH1* es Hs00181117_m1 y de *SMO* es Hs01090242_m1. Se cuantificó cada gen por separado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un termociclador de tiempo real 7900HT FastReal-Time PCR System (Life Technologies) en modo estándar. Se estableció el punto de corte para la determinación del Cq de manera manual. El análisis de la expresión génica fue tal y como se ha descrito en los apartados previos.

4.4. Estudios in-vitro

4.4.1 Tratamiento con ITK

Se llevaron a cabo cultivos celulares de muestras primarias de pacientes de LMC en FC al diagnóstico con el objetivo de ver si los ITK modificaban la expresión de *PTCH1*, que era el gen seleccionado tras el análisis de todas las cohortes. Las muestras fueron recopiladas prospectivamente durante un periodo de 10 meses (septiembre 2014 hasta junio 2015) en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Universitario Infanta Sofía, Hospital del Sureste y H12O. Los pacientes firmaron el consentimiento informado que puede verse en el Anexo. Las muestras, tras la realización de un ficoll, fueron sometidas a selección inmunomagnética de células CD34 usando la tecnología de microbeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos se realizaron en RPMI 1640 (Biowest, Nuaille, Francia) mezclado al 10% con suero bovino fetal con una concentración celular que oscilaba entre 7×10^4 - 1×10^6 /mL, dependiendo de la cantidad de células disponibles. Con el fin de ver la posible relación de la expresión de *PTCH1* con la actividad tirosinkinasa aumentada de *BCR-ABL1*, se trataron las células primarias con imatinib a 700nM, dasatinib a 1,5nM y nilotinib a 30nM y 200µM. Los cultivos se recogieron a las 3h y tras incubación durante la noche. Además de las células cultivadas con los distintos fármacos, se procesaron muestras basales (previo a cultivo) de las fracciones CD34+ y CD34- con el fin de valorar la relación en la expresión de *PTCH1*. Se extrajo el ARN usando el RNAeasy Micro Kit (Qiagen), y el resto del procesamiento y análisis de *PTCH1* se hizo tal y como se ha indicado en las muestras de la cohorte qPCR2.

4.4.2 Tratamiento con Ciclopamina

La línea celular K562 fue sembrada a una concentración de 2×10^5 células/ml y tratada con ciclopamina a concentraciones de 0, 2.5 y 5 µM. Posteriormente se recogieron 5×10^6 células por cada concentración, se realizó una cuantificación de

proteínas por el método de Bradford y se emplearon 300µg de proteínas para la realización de un array de 34 proteínas relacionadas con la apoptosis entre las que se encontraba BCL2, llamado Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit (R&D Systems, Mineapolis, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (puede verse el listado de proteínas incluidas en los Anexos) (141). La intensidad de la señal de los spots del array fue medida mediante un sistema de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad,USA) y el análisis llevado a cabo con el software Imagelab versión 5.1 (Bio-Rad).

4.5. Análisis estadístico

4.5.1 Variables

El objetivo primario del estudio era la predicción de supervivencia libre de fallo a imatinib (SLFI). El fallo a imatinib (FI) fue definido como en estudios previos (99):

- Muerte por cualquier causa
- Progresión a FA o CB
- Pérdida de RHC
- Pérdida de RCC
- Pérdida de RMM
- No logro de RCC sin pérdida de RHC.

De esta manera, FI se definió como cambio de imatinib debido a falta de eficacia. Aquellos pacientes que presentaron efectos secundarios a imatinib (lo que provocó la reducción de dosis, la pérdida de respuesta y consecuentemente el cambio de tratamiento) no fueron considerados como fallo, sino como intolerancia.

En la cohorte TLDA2, a diferencia del resto de cohortes, el cambio de la dosis inicial de 400mg de imatinib debido a falta de eficacia fue considerado FI. Esto fue motivado porque el paciente en ese momento abandonaba el estudio y no había disponibilidad de información sobre la evolución posterior de estos pacientes.

Entre los objetivos secundarios del estudio se encontraban la predicción de:

- Probabilidad de alcanzar RCC
- Probabilidad de alcanzar RMM
- Probabilidad de alcanzar $BCR-ABL1 \leq 10\%$ en IS a los 3 meses
- Supervivencia libre de progresión (SLP) a FA o CB(81)
- Supervivencia global asociada a LMC (SG-LMC) (donde las muertes no asociadas a LMC no eran consideradas como un evento)

Todas las variables fueron analizadas por intención de tratar. En las cohortes TLDA 1, 2 y qPCR1 no se analizó la posibilidad de alcanzar RMM ni la de alcanzar *BCR-ABL1*<10% en IS a los 3 meses por no tener acceso a los datos. En la cohorte TLDA2 tampoco se analizaron SLP ni SG-LMC, ya que no había datos sobre la progresión o la muerte.

4.5.2 Establecimiento de los puntos de corte de expresión génica

El método de las curvas Receiver operating characteristic (ROC) fue aplicado a cada uno de los 29 genes medidos en la cohorte TLDA1, para intentar encontrar el punto de corte óptimo que diferenciara un grupo con alta y otro con baja expresión del gen en cuestión con diferentes probabilidades de SLFI, RCC, SLP y SG-LMC.

En el estudio se utilizó un punto de corte arbitrario de AUC=0.65. De este modo, en aquellos genes con AUC>0,65 se fijó un punto de corte basándose en la Se y Sp de los distintos puntos proporcionados por la curva ROC. En aquellos genes con AUC≤0,65 se usó la mediana de expresión del gen. En cada gen se utilizó el mismo punto de corte para la predicción de todas las variables.

El procedimiento descrito se llevó a cabo en la cohorte TLDA1. Únicamente los genes que mostraron significación estadística para la predicción de alguna variable fueron analizados en las siguientes cohortes. Si en la cohorte TLDA1 el punto de corte del gen se había establecido mediante una curva ROC, se usó el mismo punto de corte para el análisis de la cohorte TLDA2. Sin embargo, en aquellos casos en los que se había usado la mediana en la cohorte TLDA1 se determinaba la nueva mediana de la cohorte TLDA2.

Los genes que mantuvieron la significación en el análisis de la cohorte TLDA2 pasaron a analizarse en las siguientes cohortes.

Para establecer los puntos de corte de expresión génica en las cohortes qPCR1 y qPCR2, se usó el método de las curvas ROC o el de la mediana, conforme a lo

realizado previamente para cada gen. En estos nuevos análisis no se pudo aplicar el punto de corte fijado en la cohorte TLDA1, ya que se trataba de una tecnología diferente, ni el de la cohorte qPCR1 en la cohorte qPCR2, ya que se habían usado *primers* y sondas diferentes.

4.5.3 Análisis univariante

El método de Kaplan-Meier fue usado para estimar las probabilidades de las diferentes variables en los grupos con alta y baja expresión de cada uno de los genes. El test log-rango fue usado para establecer la significación estadística de la diferencia de probabilidades entre los grupos. En aquellos casos en los que no se disponía de la fecha del evento, como ocurrió con la progresión en la cohorte qPCR2, o era una medición en un momento fijo, como es el caso del nivel de *BCR-ABL1* a los 3 meses, se compararon proporciones mediante el test de chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Se aplicaba este último test si la frecuencia esperada en alguna de las casillas era inferior a 5.

Como hemos explicado, el análisis de la cohorte qPCR1 fue llevado a cabo con el fin de realizar una validación técnica de los resultados obtenidos con la tecnología previa. Para comparar las mediciones de los 37 pacientes analizados mediante la tecnología TLDA y qPCR convencional, se aplicó el test de Pearson.

En la cohorte qPCR2 se analizaron *PTCH1* y *SMO*. También se calculó una nueva variable predictora que consistía en el cociente entre la expresión de ambos genes. La potencia pronóstica de los dos genes y su cociente se comparó mediante la determinación del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de sus curvas ROC para la predicción de FI (142). Aquella determinación con una mayor AUC fue seleccionada para la comparación de los grupos con alta y baja expresión génica, como se ha explicado anteriormente.

4.5.4 Análisis multivariante

Se llevó a cabo un análisis multivariante para la predicción de SLFI en todas las cohortes introduciendo la expresión categorizada de *PTCH1*. La edad, el índice de Sokal y el índice de EUTOS fueron las covariables introducidas en una regresión de Cox con un proceso de introducción de variables condicional por pasos hacia delante. Los límites habituales de entrada (0.05) y salida (0.1) de variables fueron aplicados, y los valores de significación fueron calculados mediante el método de Wald. Se comprobaron los supuestos de proporcionalidad de riesgos y de relación log-lineal (143).

4.5.5 Cálculo de la validez pronóstica de la prueba

La sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la expresión categorizada de *PTCH1* fue calculada para cada cohorte. El intervalo de confianza (IC) bilateral fue calculado por el método de Wilson usando la macro Domenech Macro !DT for SPSS (<http://www.metodo.uab.cat/macros.htm>). Es conveniente aclarar que el evento a predecir era FI, de modo que la sensibilidad valoraba la proporción de pacientes correctamente clasificados como malos respondedores entre el total de aquellos que presentaban FI.

4.5.6 Análisis estudios in-vitro

La comparación de la expresión génica fue llevada a cabo mediante la prueba de la T de Student o el test de Wilcoxon para pruebas emparejadas, dependiendo de la normalidad o no de la distribución de las diferencias. La normalidad fue valorada mediante el test de Shapiro-Wilk. Cada muestra tratada fue emparejada con la muestra del mismo paciente, sembrada bajo las mismas condiciones sin tratamiento. También se compararon siguiendo esta metodología las fracciones CD34- y CD34+ de las muestras.

Para comparar la intensidad de la señal de la proteína BCL2 en la línea K562 sin tratamiento y con tratamiento a 2,5 y 5 μ M, se usó el test de Anova de un factor, y la comparación posterior entre los distintos grupos se llevó a cabo aplicando la corrección de Bonferroni. Las otras 34 proteínas incluidas en el array proteico y relacionadas con la apoptosis celular pueden verse en el Anexo, y su expresión fue comparada también mediante un test de Anova aplicando la corrección de Bonferroni, dado el elevado número de comparaciones y que se trataba de un análisis exploratorio sin ningún tipo de hipótesis previa.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 (IBM, Armonk, USA), y los gráficos realizados con el mismo programa y con Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA).

5. RESULTADOS

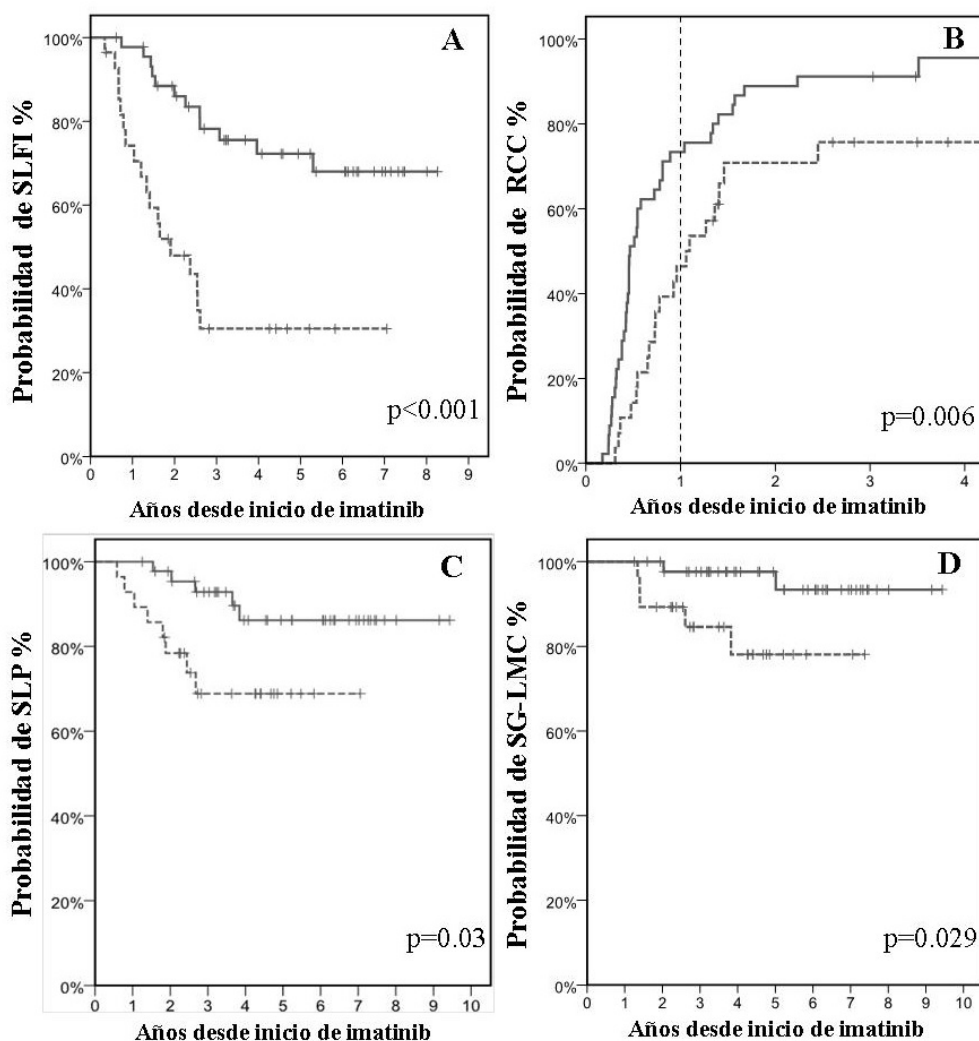
5.1. Cohorte TLDA1

La tecnología TLDA funcionó correctamente, se detectaron señales fuertes y reproducibles en cada gen estudiado. Sin embargo, el control negativo de la retrotranscripción mostró señal, a pesar del tratamiento realizado con ADNasa, en los 6 ensayos susceptibles de amplificar señal procedente de DNA genómico: *RNASE3*, *PTEN*, *NOB1*, *FZD7*, *CEBP* y *18S*. Se excluyó del análisis *RNASE3*, *PTEN*, *NOB1*, *FZD7* y *CEBP* para evitar alteraciones de los resultados. En el caso de *18S* se decidió mantenerlo como gen control, ya que había más de 20 ciclos de diferencia entre la señal observada en las muestras y la señal detectada en el control negativo de la retrotranscripción. De este modo, la alteración de los resultados que pudiera provocar sería mínima. Además, era el gen control que se expresaba de manera más estable según el programa Data Assist v3 software, lo que también influyó en la decisión de no eliminar sus resultados.

Del total de 29 genes estudiados, solo se analizaron los resultados de 24, una vez eliminados los que presentaban amplificación procedente de DNA genómico. Del total de 24 genes analizados, en 5 de ellos se detectó poder pronóstico en alguna de las variables. Es decir, se detectó un resultado significativo del test log-rango al comparar los grupos con alta y baja expresión de dicho gen en alguna de las 4 variables. Estos genes eran *PTCH1*, *XIAP*, *PR3*, *ABCB1* y *MPO*.

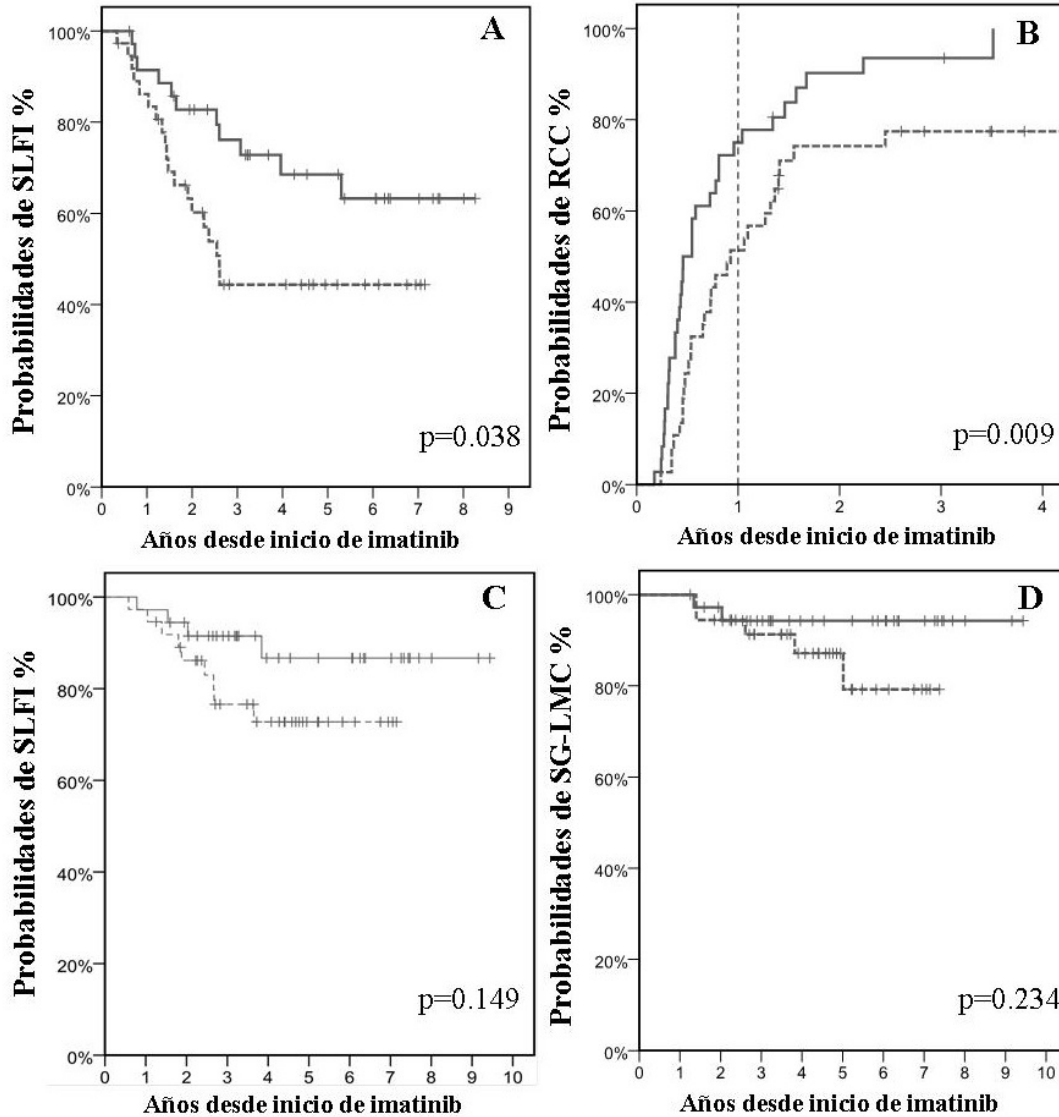
De todos ellos, únicamente en el caso de *PTCH1* el AUC de la curva ROC fue mayor de 0,65 (0,72). La curva ROC se realizó para la predicción de SLFI; sin embargo, tal como se ha explicado, este mismo punto de corte se utilizó para el resto de variables. Se estableció como punto de corte una expresión relativa de *PTCH1* respecto a la media geométrica de los 3 genes control de $1,6 \times 10^{-5}$. Usando este punto de corte se dividió a los pacientes en un grupo con alta y otro con baja expresión de *PTCH1*, y en la figura 1 podemos ver los análisis de Kaplan-Meier para las 4 variables. En el resto

de genes se usó la mediana como punto de corte. Podemos ver los resultados en las figuras 2 (*XIAP*), 3 (*MPO*), 4 (*ABCB1*) y 5 (*PR3*).



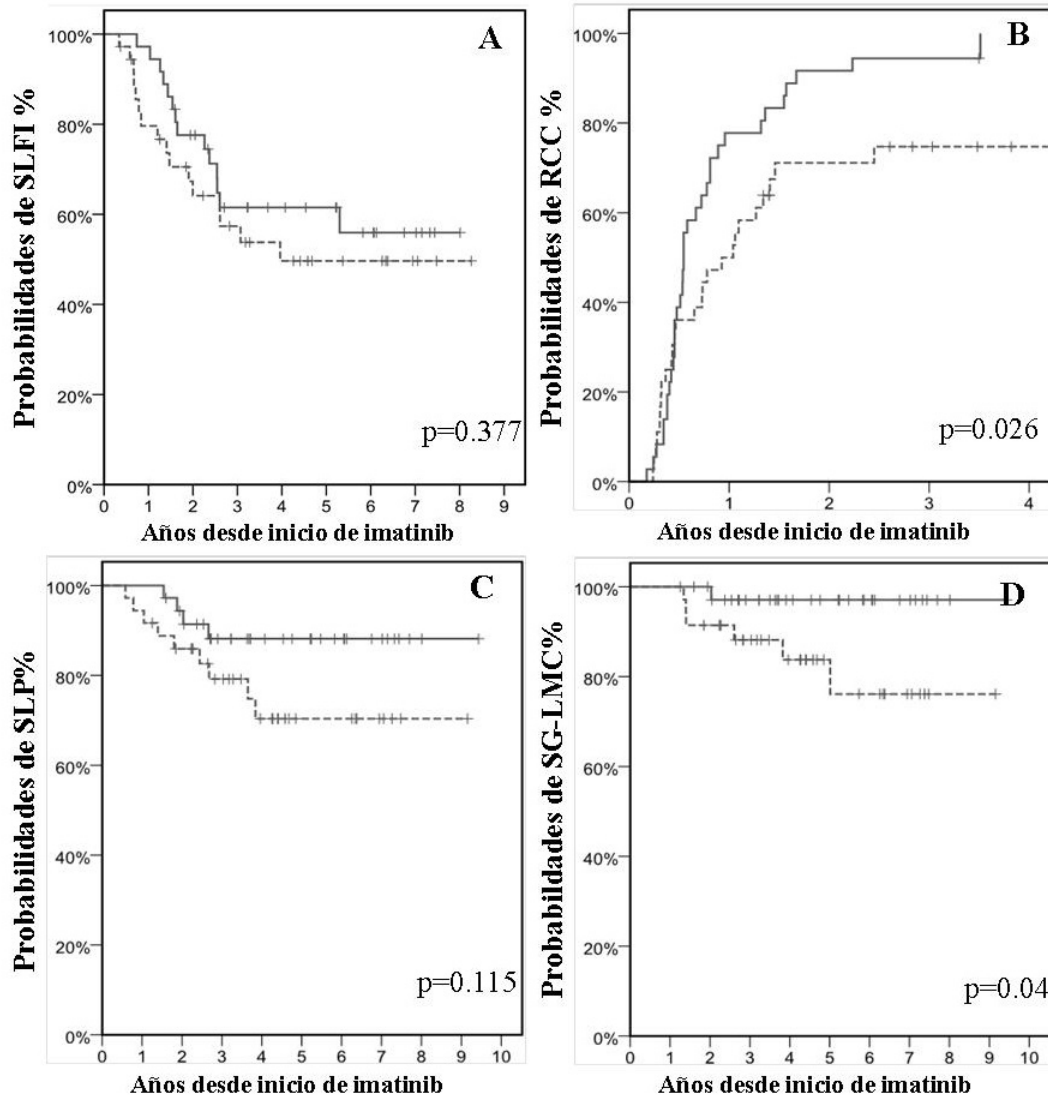
Línea continua: alta expresión de *PTCH1* ($>1,6 \times 10^{-5}$), 45 pacientes. Línea discontinua: baja expresión de *PTCH1*, 28 pacientes. (A) Supervivencia libre de fallo a imatinib (SLFI); (B) probabilidades de alcanzar respuesta citogenética completa (RCC); (C) Supervivencia libre de progresión (SLP); (D) Supervivencia global asociada a LMC (SG-LMC). La probabilidad de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1* era de 72% y 31% respectivamente ($p < 0,001$). La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión era de 73% vs 46% ($p = 0,006$). La SLP a los 5 años era de 69% vs 86% ($p = 0,03$), y la SG-LMC en el mismo momento era de 78% vs 98% ($p = 0,029$) en los grupos con baja y alta expresión de *PTCH1* respectivamente.

Figura 1. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte TLDA1 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1*.



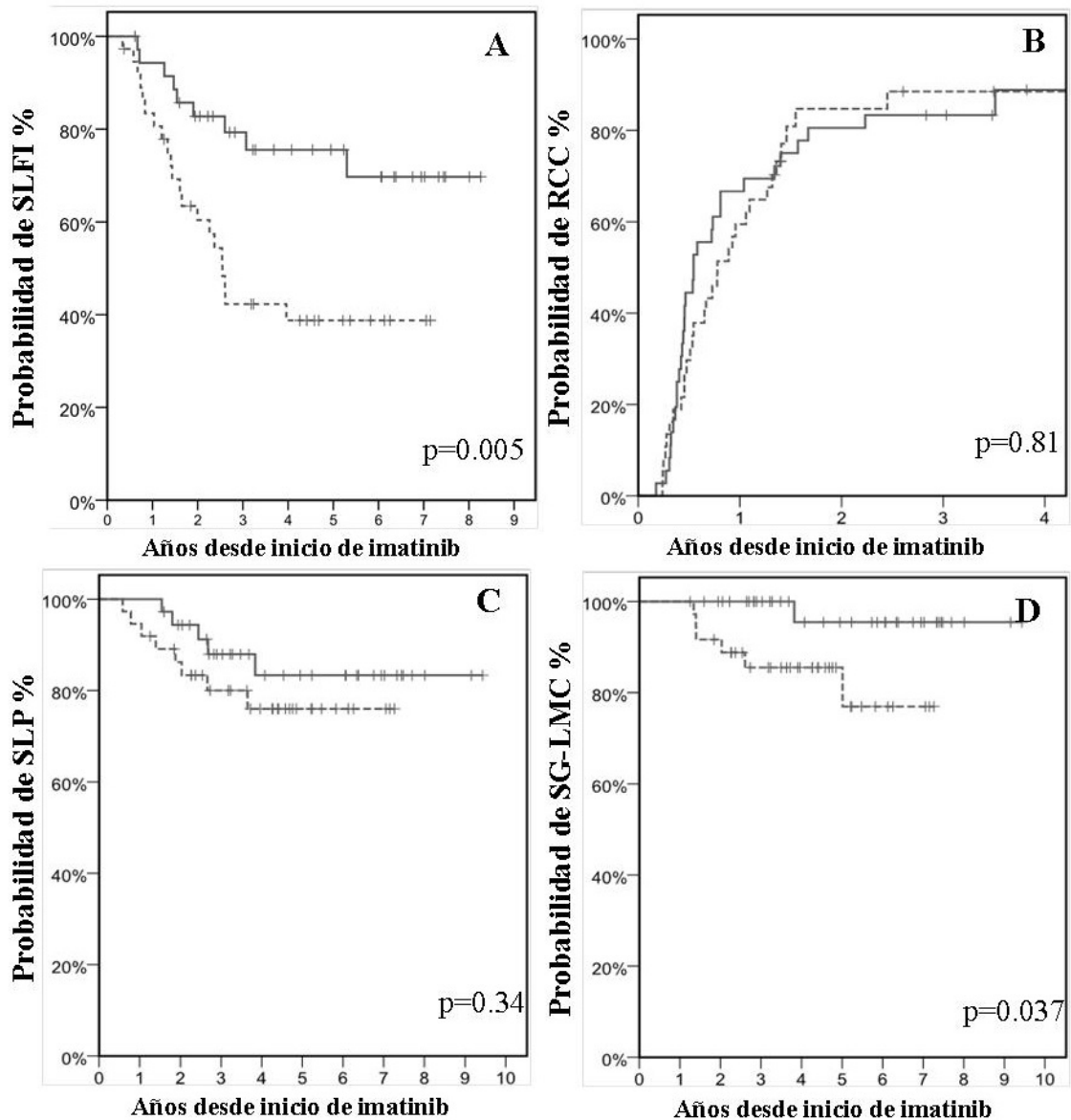
Línea continua: alta expresión de *XIAP* (>3,3 x 10⁻³). Línea discontinua: baja expresión de *XIAP*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC; (C) SLP; (D) SG-LMC. La probabilidad de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *XIAP* era de 69% y 44% respectivamente (p=0,038). La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión era de 75% vs 51% (p=0,009). Resultados no significativos se observaron para la predicción de SLP y SG-LMC.

Figura 2. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte TLDA1 comparando los grupos con alta y baja expresión de *XIAP*.



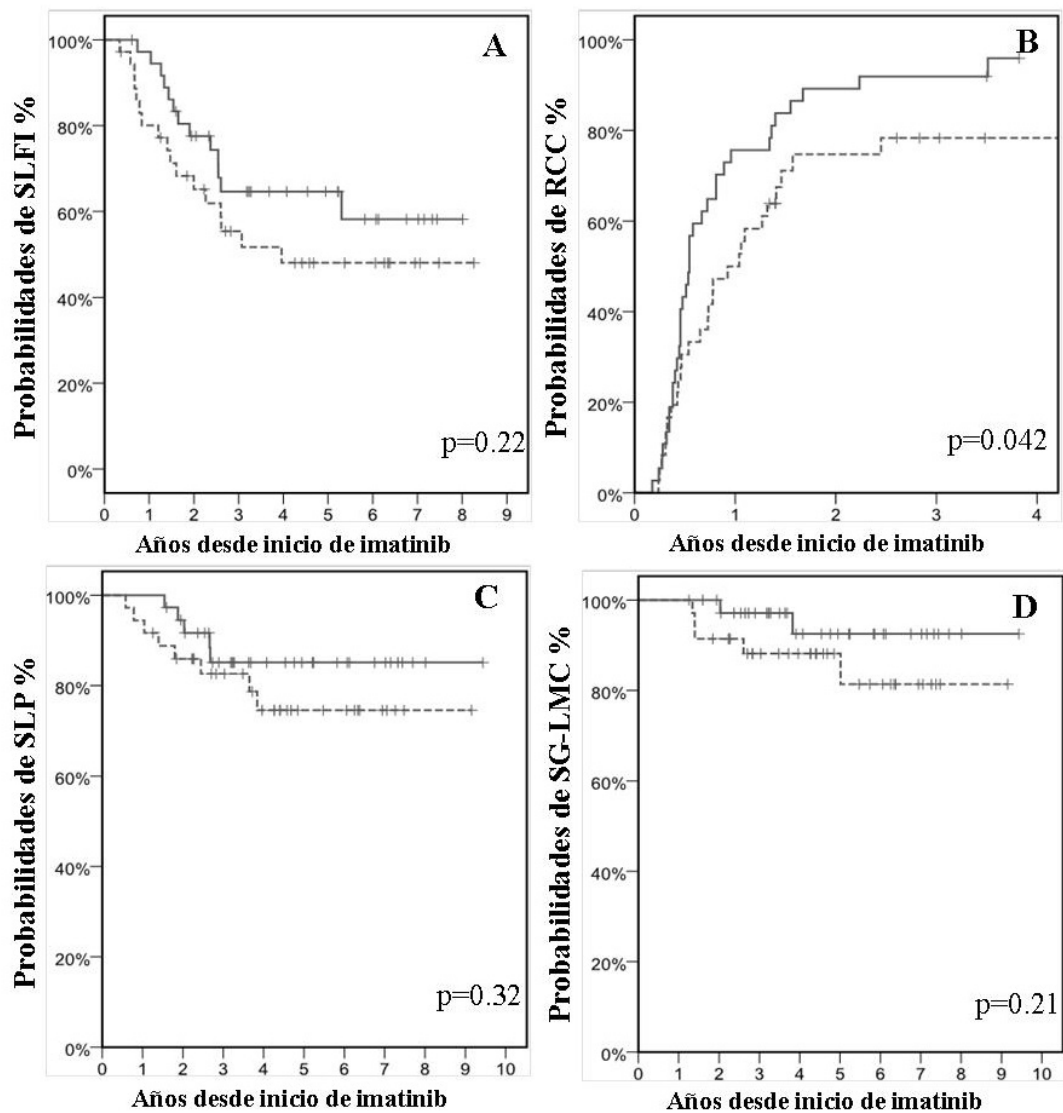
Línea continua: baja expresión de *MPO* ($\leq 0,14$). Línea discontinua: alta expresión de *MPO*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC; (C) SLP; (D) SG-LMC. La probabilidad de RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión de *MPO* era de 50% y 78% respectivamente ($p=0,026$). La probabilidad de no haber muerto por causa relacionada con la LMC a los 5 años de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión era de 84% vs 97% ($p=0,04$). Resultados no significativos se observaron para la predicción de SLFI y SLP.

Figura 3. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte TLDA1 comparando los grupos con alta y baja expresión de *MPO*.



Línea continua: alta expresión de *ABCB1* ($>1.4 \times 10^{-4}$). Línea discontinua: baja expresión de *ABCB1*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC; (C) SLP; (D) SG-LMC. La probabilidad de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *ABCB1* era de 76% y 39% respectivamente ($p=0,005$). La probabilidad de no haber muerto por causa relacionada a la LMC era de 96% vs 86% ($p=0,037$) en los grupos con alta y baja expresión. Resultados no significativos se observaron para la predicción de SLP y RCC.

Figura 4. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte TLDA1 comparando los grupos con alta y baja expresión de ABCB1.



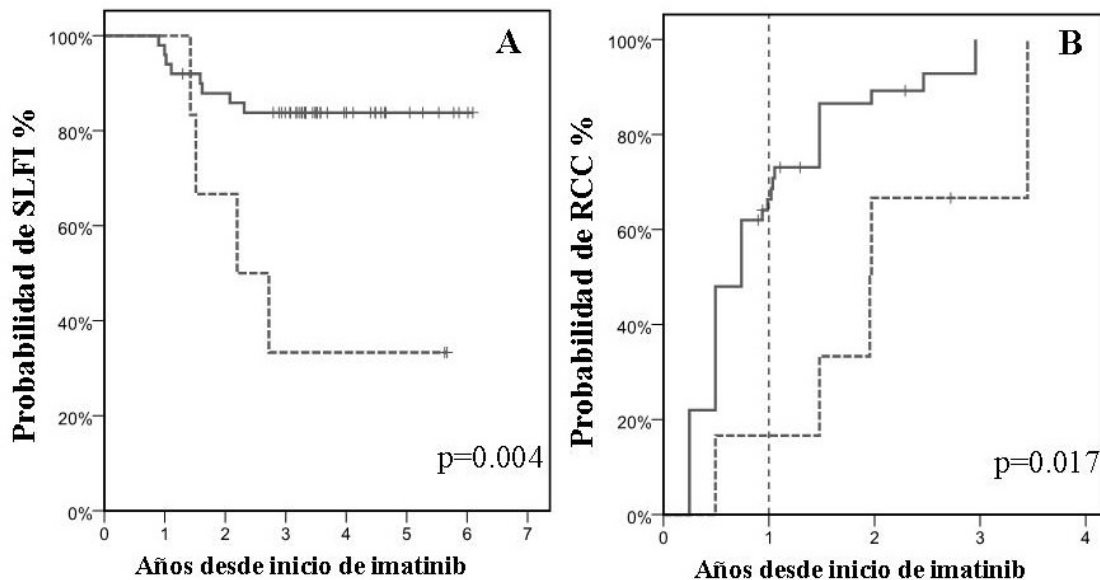
Línea continua: baja expresión de *PR3* ($\leq 4,1 \times 10^{-2}$). Línea discontinua: alta expresión de *PR3*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC; (C) SLP; (D) SG-LMC. La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión de *PR3* era de 50% vs 76% ($p=0,042$). Resultados no significativos se observaron para la predicción de SLFI, SLP y SG-LMC.

Figura 5. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte TLDA1 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PR3*.

5.2. Cohorte TLDA2

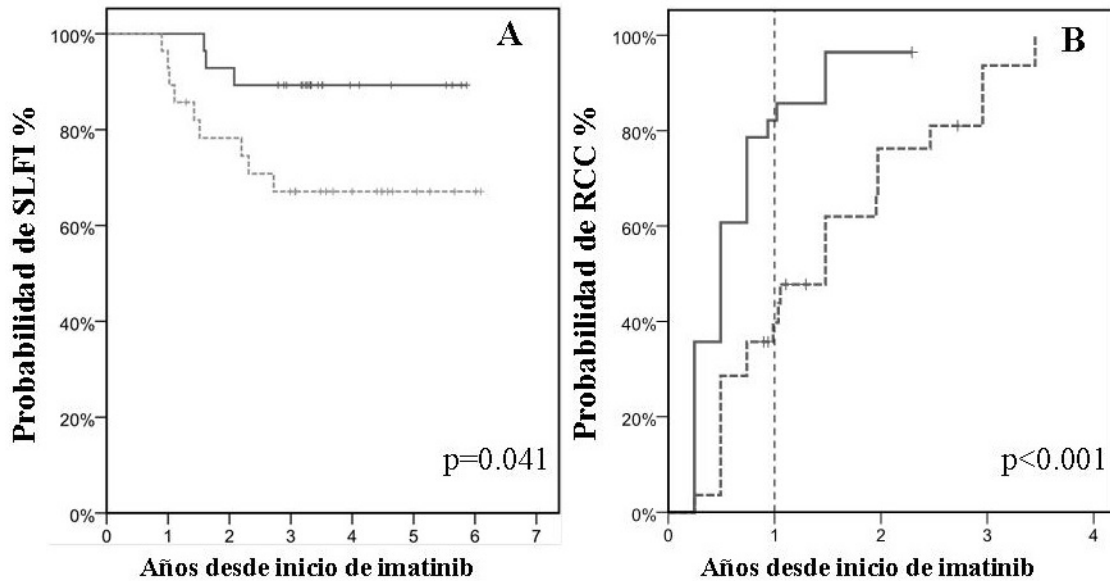
Los 5 genes descritos, que mostraron valor pronóstico para alguna de las variables estudiadas, fueron analizados en la siguiente cohorte, compuesta por 56 pacientes enrolados en el ensayo Spirit I. Como se ha explicado previamente, en esta cohorte, una vez que se modificaba la dosis de imatinib de los 400mg iniciales o se cambiaba el ITK, el paciente abandonaba el estudio y no había información alguna sobre su evolución posterior. De este modo, no se pudo analizar la SLP ni la SG-LMC.

Los resultados obtenidos se pueden observar en las figuras 6 (*PTCH1*), 7(*XIAP*), 8 (*MPO*), 9 (*ABCB1*) y 10(*PR3*).



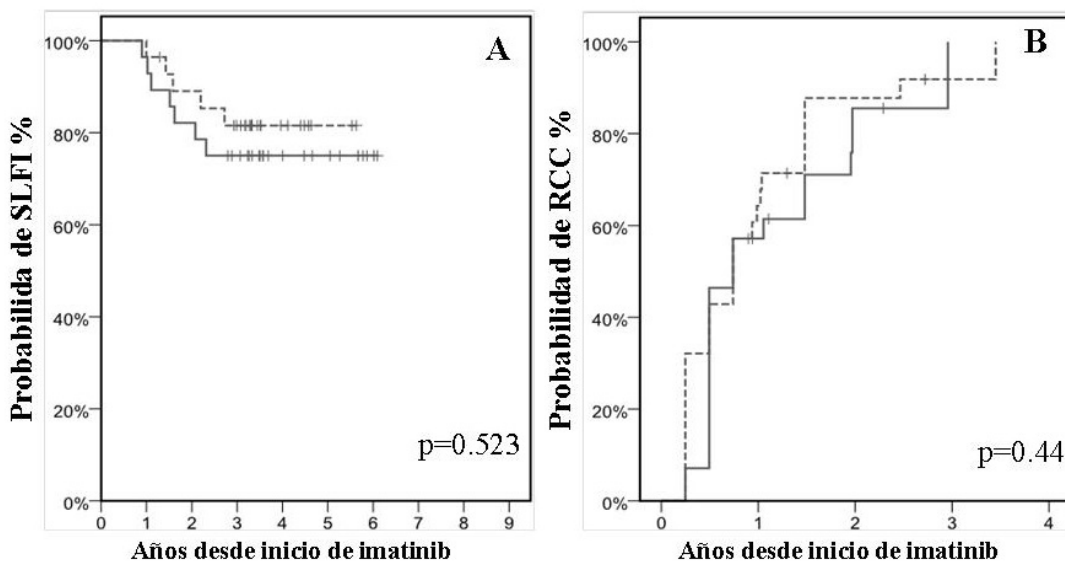
Línea continua: alta expresión de *PTCH1* (>1,6 x 10⁻⁵), 50 pacientes. Línea discontinua: baja expresión de *PTCH1*, 6 pacientes. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC. La probabilidad de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1* era de 84% y 33% respectivamente (p=0,004). La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión era de 66% vs 17% (p=0,017).

Figura 6. Análisis de Kaplan-Meier de las 2 variables analizadas en la cohorte TLDA2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1*.



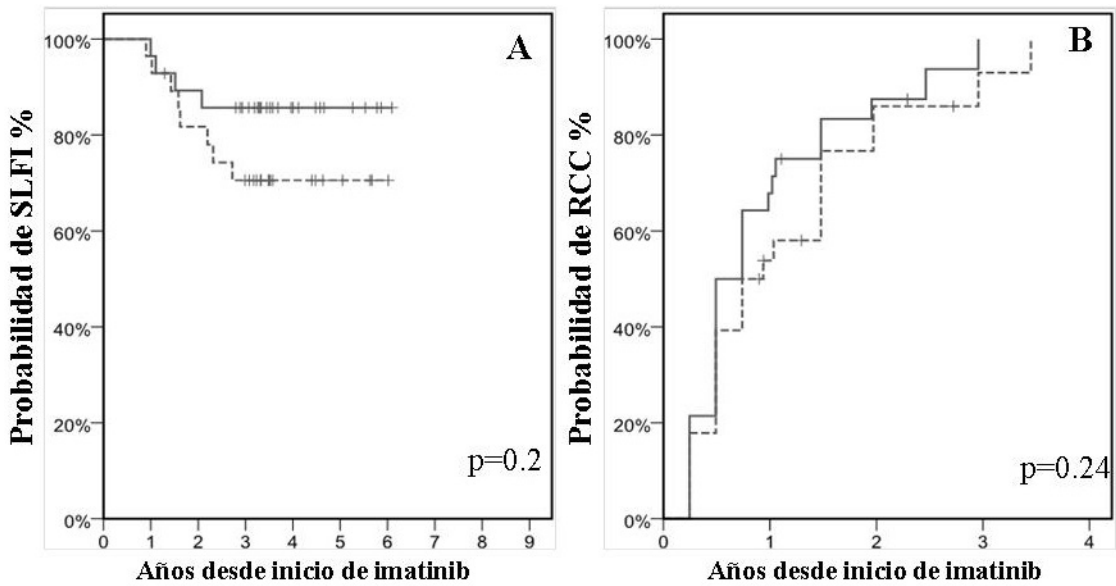
Línea continua: alta expresión de *XIAP* ($>5,7 \times 10^{-3}$). Línea discontinua: baja expresión de *XIAP*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC. Las probabilidades de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *XIAP* era de 89% vs 67% ($p=0.041$). La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento era de 82% vs 40% ($p < 0.001$) en aquellos pacientes con alta y baja expresión de *XIAP*.

Figura 7. Análisis de Kaplan-Meier de las 2 variables analizadas en la cohorte TLDA2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *XIAP*.



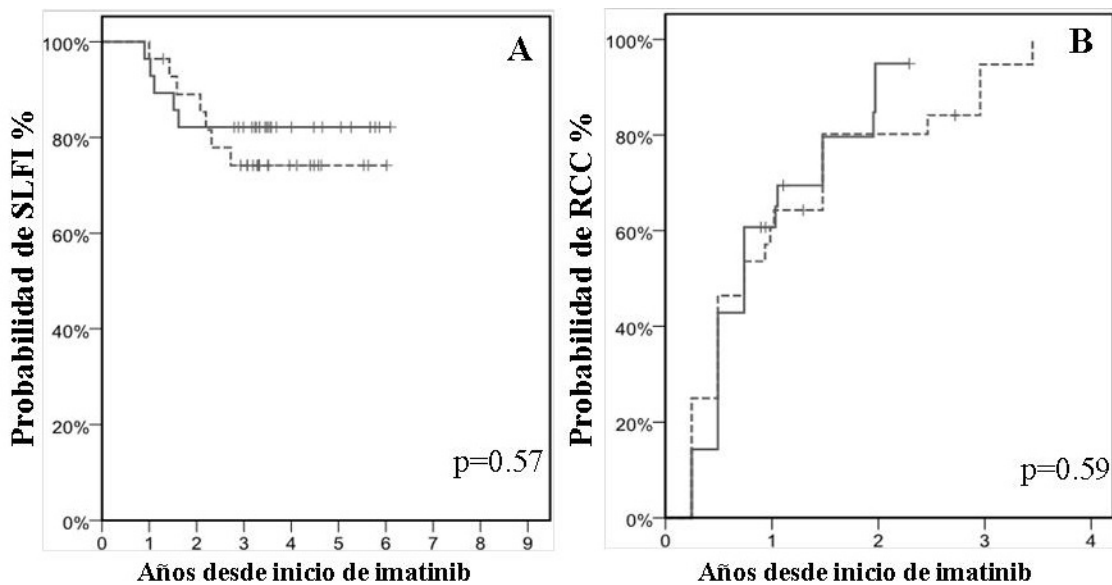
Línea continua: baja expresión de *MPO* ($\leq 0,11$). Línea discontinua: alta expresión de *MPO*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC. No se obtuvieron resultados significativos.

Figura 8. Análisis de Kaplan-Meier de las 2 variables analizadas en la cohorte TLDA2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *MPO*.



Línea continua: alta expresión de *ABCB1* ($>1,2 \times 10^{-4}$). Línea discontinua: baja expresión de *ABCB1*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC. No se obtuvieron resultados significativos en ninguna de las dos variables.

Figura 9. Análisis de Kaplan-Meier de las 2 variables analizadas en la cohorte TLDA2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *ABCB1*.

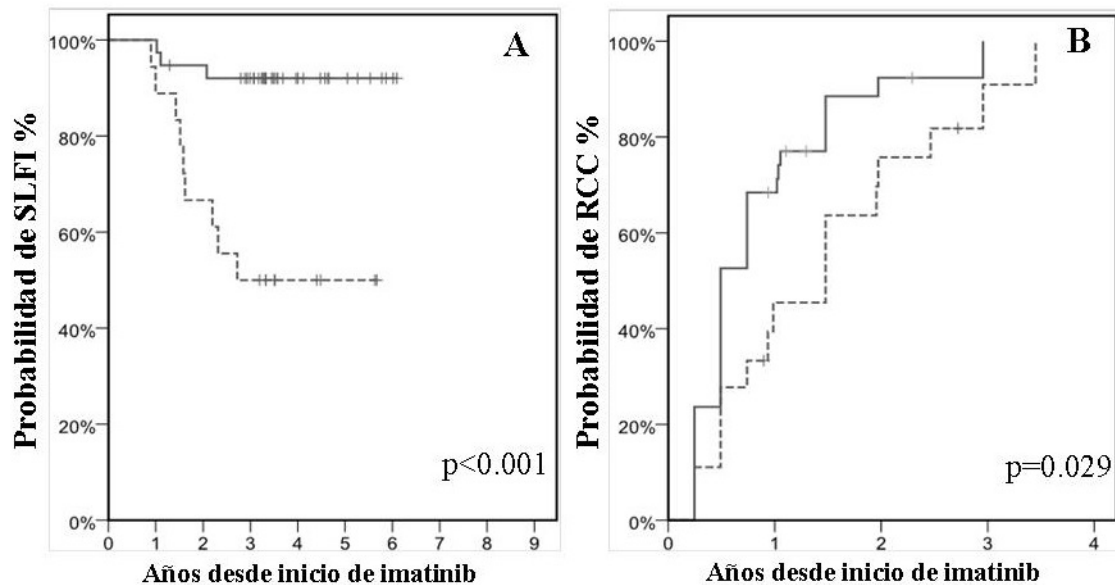


Línea continua: baja expresión de *PR3* ($>1,6 \times 10^{-2}$). Línea discontinua: alta expresión de *PR3*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC. No se obtuvieron resultados significativos en ninguna de las dos variables.

Figura 10. Análisis de Kaplan-Meier de las 2 variables analizadas en la cohorte TLDA2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PR3*.

Como se puede observar, únicamente mantuvieron la potencia pronóstica *PTCH1* y *XIAP*. En el análisis de esta cohorte el punto de corte de expresión de *PTCH1* ($1,6 \times 10^{-5}$) era igual al usado en la cohorte TLDA1, que se había obtenido mediante curva ROC. En el análisis del resto de genes se aplicó la mediana de expresión de cada cohorte como punto de corte, tal y como se había hecho en la cohorte TLDA1.

Cabe destacar que en la cohorte TLDA1 28 pacientes (38%) del total de 73 fueron incluidos en el grupo de baja expresión de *PTCH1*, y 45 pacientes (62%) en el de alta expresión. Sin embargo, en la cohorte TLDA2, usando el mismo punto de corte, los pacientes asignados al grupo de baja expresión eran 6 (11%), y 50 (89%) al grupo de alta expresión. Por la diferente proporción de pacientes clasificados en los grupos de alta y baja expresión de *PTCH1* en las cohortes TLDA 1 y 2, un nuevo punto de corte específico para la cohorte TLDA2 se estableció y dio como resultado grupos con proporciones de pacientes más similares. En el grupo de baja expresión de *PTCH1* fueron incluidos 18 pacientes (32%), y 38 (68%) en el de alta expresión. Los resultados pueden observarse en la figura 11.



Línea continua: alta expresión de *PTCH1* ($>3 \times 10^{-5}$), 38 pacientes. Línea discontinua: baja expresión de *PTCH1*, 18 pacientes. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC. La probabilidad de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1* era de 92% vs 50 % respectivamente (p<0,001). La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión era de 68% vs 45% (p=0,029).

Figura 11. Análisis de Kaplan-Meier de las 2 variables analizadas en la cohorte TLDA2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1* aplicando el nuevo punto de corte específico para esta cohorte.

Como se puede observar, *PTCH1* mantuvo su poder pronóstico, tanto aplicando el punto corte derivado de la cohorte TLDA1 como con el nuevo punto de corte calculado para la cohorte TLDA2. *XIAP* mostró igualmente capacidad de predecir SLFI y RCC en la cohorte TLDA2. Los otros tres genes (*MPO*, *ABCB1*, *PR3*) no mostraron resultados significativos en la predicción de ninguna de las 2 variables. Dado que en la primera cohorte se realizaron múltiples análisis estadísticos, puede ser que la significación encontrada pudiera ser debida al azar y, por lo tanto, únicamente se continuó el estudio con *PTCH1* y *XIAP*.

5.3. Cohorte qPCR1

La siguiente fase del estudio consistió en una validación técnica para comprobar si los resultados obtenidos con el uso de la tecnología TLDA se confirman con el uso de la qPCR convencional. Con este fin se analizó la cohorte qPCR1, que realmente representa una subcohorte de la TLDA1, en la que se incluyeron los 37 pacientes con muestra restante. En esta cohorte se midieron únicamente *PTCH1* y *XIAP*, que habían demostrado su validez pronóstica en ambas cohortes. Se diseñaron nuevos primers y sondas. Se usó el test de Pearson para correlacionar la expresión de cada uno de los genes medidos por TLDA y qPCR. Las medidas de *PTCH1* por las dos técnicas mostraron una buena correlación ($r= 0,823$, $p<0,001$); sin embargo, las medidas de *XIAP* tuvieron una correlación no significativa ($r=-0,01$, $p=0,99$), como puede observarse en las figuras 12 y 13.

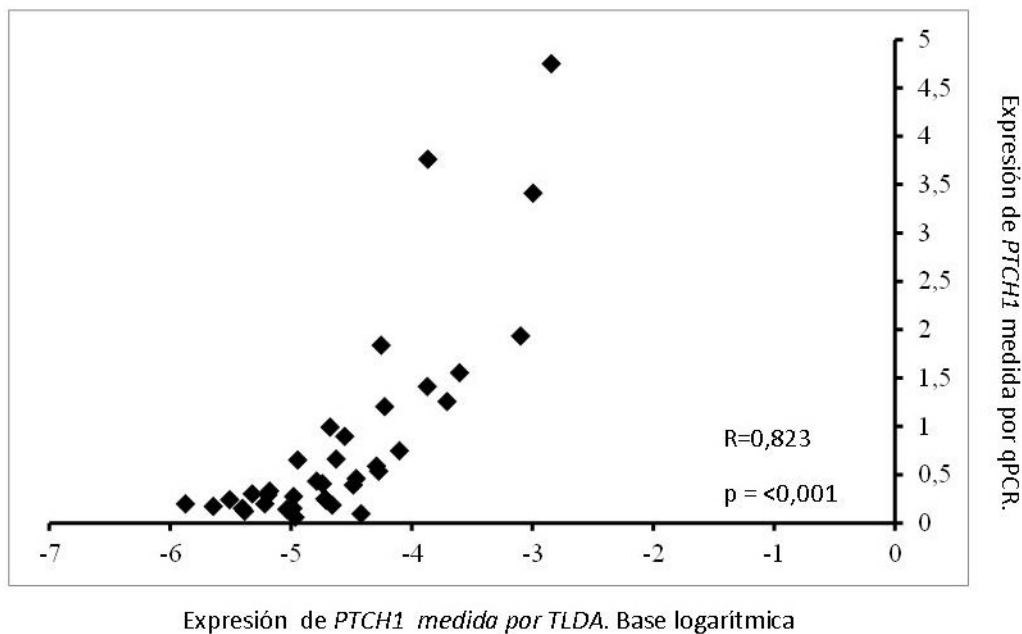


Figura 12. Correlación de la expresión relativa de *PTCH1* medido por TaqMan Low Density Array (TLDA) y PCR cuantitativa convencional (qPCR).

La expresión relativa medida mediante TLDA presentaba valores muy bajos, por lo que, para una correcta visualización, se ha mostrado en escala logarítmica. Sin embargo, el test de Pearson se calculó sin transformar la variable y se observó una importante correlación ($R=0,8$) con significación estadística ($p<0,001$).

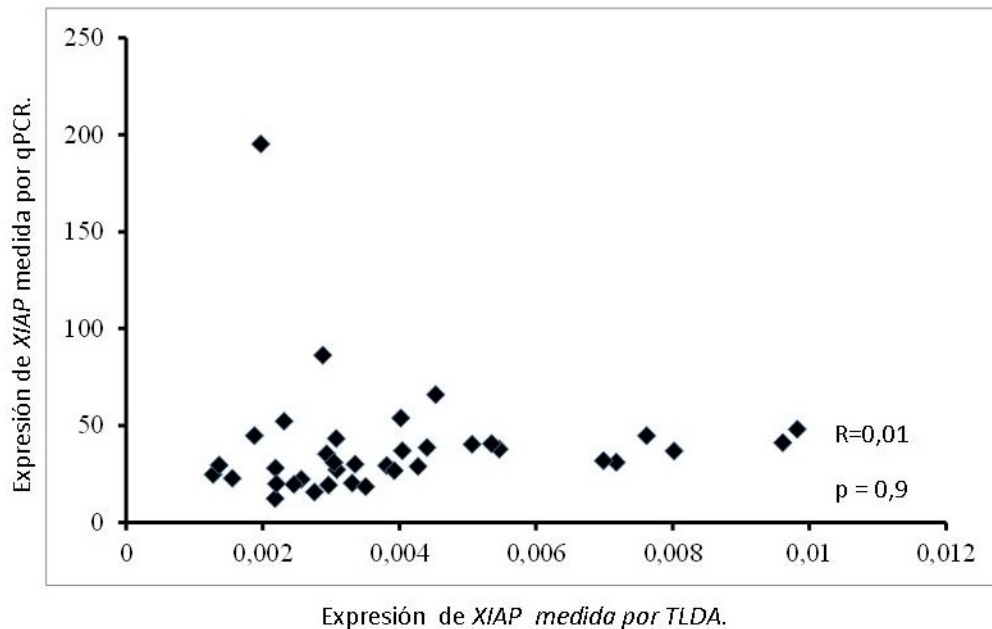
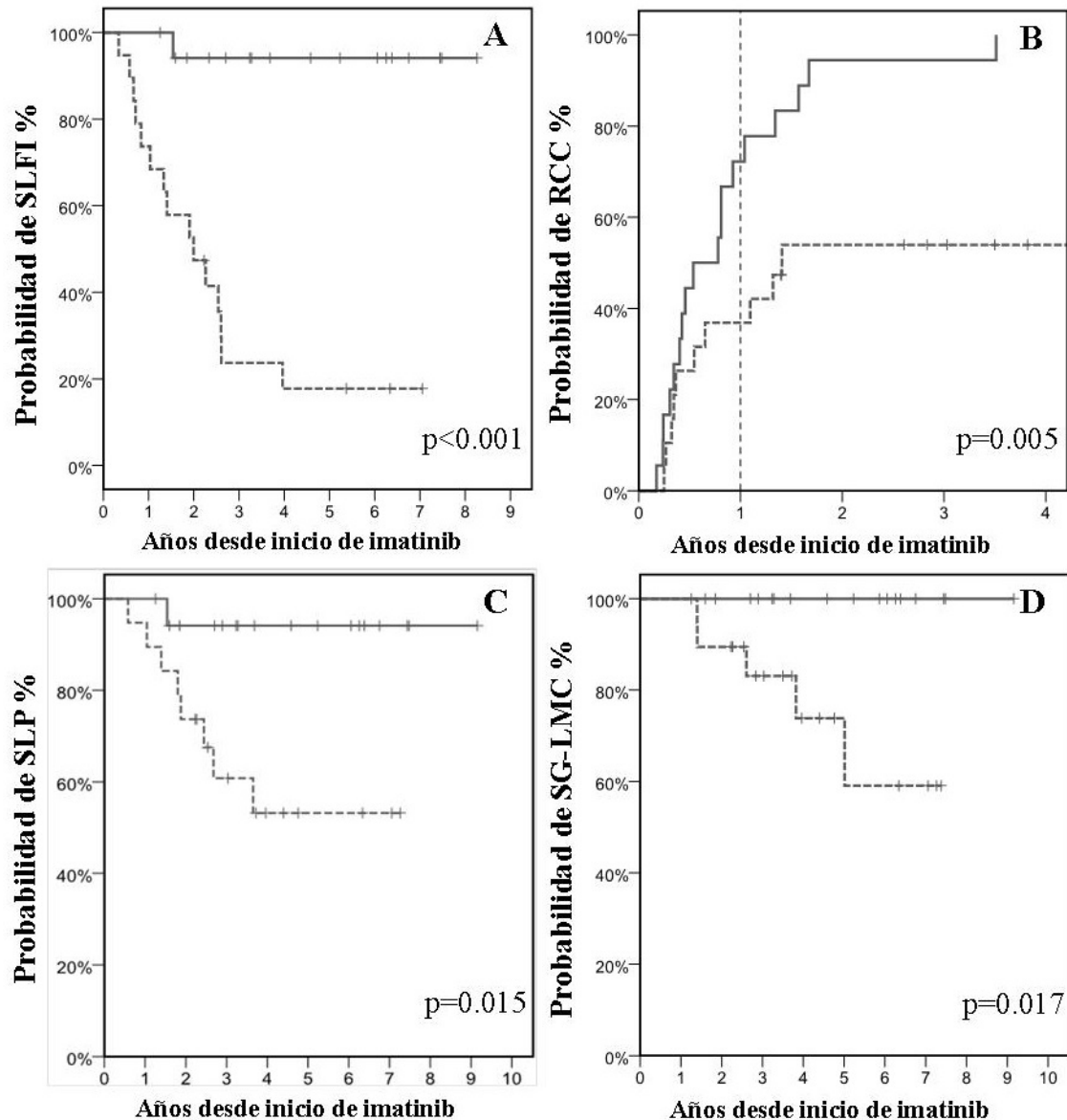


Figura 13. Correlación de la expresión relativa de XIAP medido por TaqMan Low Density Array (TLDA) y PCR cuantitativa convencional (qPCR).

La correlación no fue significativa; sin embargo, se observa un punto outlier, que pudiera estar provocando alteración de los resultados. Se llevó a cabo el test de Pearson de nuevo excluyendo este punto y tampoco fue significativa la correlación ($R=0,281$, $p=0,1$).

Posteriormente se llevó a cabo la curva ROC de la expresión de *PTCH1* para la predicción de FI. Mostró un AUC de 0,87 y se seleccionó el punto de corte de expresión relativa de 0,42. Se pueden observar los resultados obtenidos para las 4 variables analizadas en la figura 14.

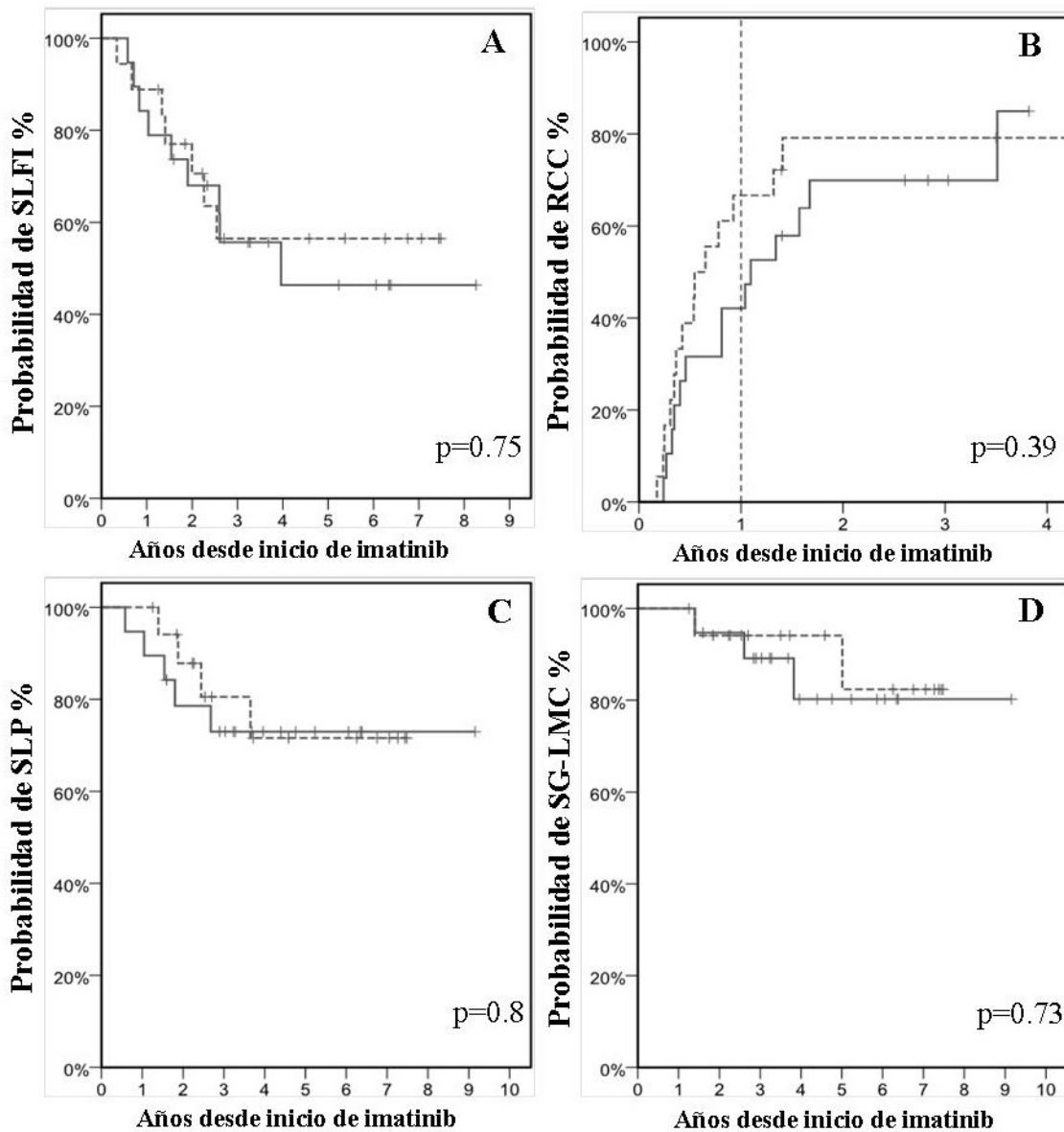


Línea continua: alta expresión de *PTCH1* (>0,42), 18 pacientes. Línea discontinua: baja expresión de *PTCH1*, 19 pacientes. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC; (C) SLP; (D) SG-LMC. La probabilidad de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1* era de 94% vs 18% respectivamente ($p < 0,001$). La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión era de 72% vs 37% ($p = 0,005$). La SLP y la SG-LMC a los 5 años en los grupos de alta y baja expresión era de 94% vs 53% ($p = 0,015$) y 100% vs 74% ($p = 0,017$) respectivamente.

Figura 14. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte qPCR1 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1*.

Pese a que el resultado del test de Pearson no mostró correlación entre las medidas de *XIAP* realizadas mediante TLDA y la qPCR, llevamos a cabo el análisis de las 4

variables. Como en las cohortes previas, se utilizó la mediana como punto de corte de la expresión de *XIAP*. Se pueden observar los resultados en la figura 15.



Línea continua: alta expresión de *XIAP* (>31). Línea discontinua: baja expresión de *XIAP*. (A) SLFI; (B) probabilidades de alcanzar RCC; (C) SLP; (D) SG-LMC. No se obtuvieron resultados significativos.

Figura 15. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte qPCR1 comparando los grupos con alta y baja expresión de *XIAP*.

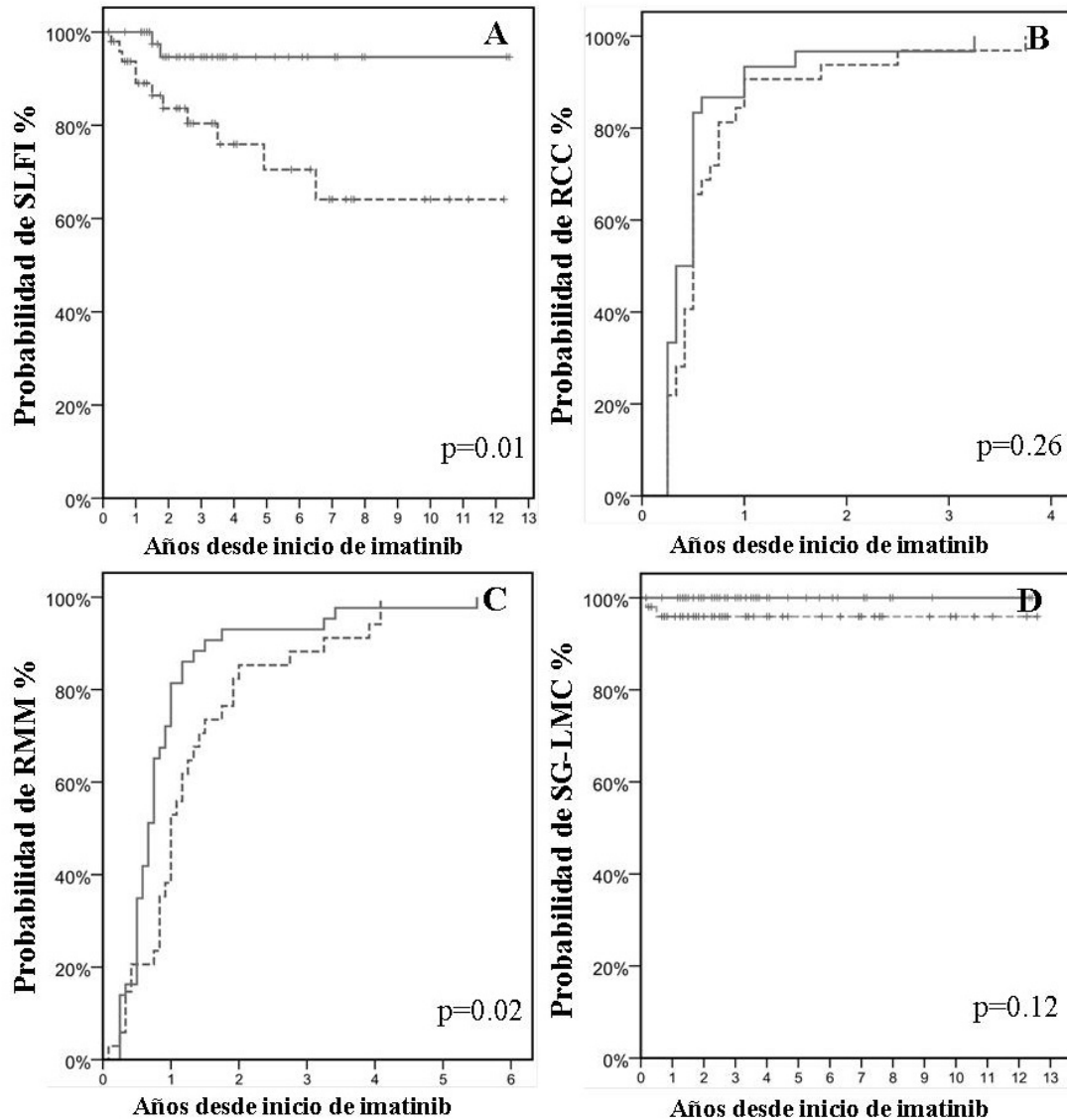
Por lo tanto, tras el análisis de las cohortes TLDA1, 2 y qPCR1, únicamente *PTCH1* continuaba manteniendo su significación pronóstica. No se continuó investigando la falta de concordancia de las medidas de *XIAP* observadas. Los análisis llevados a

cabo a partir de este momento estaban centrados en *PTCH1* y la vía molecular a la que pertenece, conocida como la vía del erizo.

5.4. Cohorte qPCR2

Se llevó a cabo el análisis de *PTCH1* y de *SMO*, que es un gen que traduce una proteína que se encuentra regulada por *PTCH1*. También se calculó una nueva medida pronóstica: expresión de *PTCH1*/ expresión de *SMO*. Se comparó el poder predictivo de las medidas de los dos genes y de su cociente mediante la determinación del AUC de las curvas ROC. EL AUC de la curva ROC de *PTCH1*, *SMO* y *PTCH1/SMO* fue de 0,72, 0,55 y 0,71 respectivamente. Dado que ni la medición de *SMO* ni el cociente *PTCH1/SMO* mejoraban el AUC de *PTCH1*, es decir, no presentaban mayor potencia pronóstica, no se procedió al establecimiento de un punto de corte para ninguna de las dos nuevas medidas.

Prestando atención a los valores de sensibilidad y especificidad de cada valor de expresión de *PTCH1*, proporcionados mediante la curva ROC, se estableció un punto de corte de expresión relativa de *PTCH1* de 2.6×10^{-2} . Este punto de corte estaba muy próximo a la mediana de expresión; por lo tanto, en los grupos de alta y baja expresión había 51 y 50 pacientes respectivamente. Podemos ver los resultados en la figura 16. En ella, a diferencia de las figuras previas, se indica el número de sujetos en cada grupo por cada variable analizada, ya que esta cohorte presentaba un mayor número de valores perdidos que las analizadas en HH.



Línea continua: alta expresión de *PTCH1* ($>2,6 \times 10^{-2}$). Línea discontinua: baja expresión de *PTCH1*. (A) SLFI (alta 49, baja 50); (B) Probabilidades de alcanzar RCC (alta 30, baja 32); (C) Probabilidades de alcanzar RMM (alta 43, baja 34); (D) SG-LMC (alta 49, baja 50). La probabilidad de SLFI a los 5 años en los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1* era de 95% vs 71% respectivamente ($p=0,01$). La probabilidad de haber alcanzado RCC al año de tratamiento en los grupos con alta y baja expresión era de 93% vs 91% ($p=0,26$). Al año de tratamiento con imatinib un 81% y 53% ($p=0,02$) de los pacientes habían alcanzado RMM en los grupos de alta y baja expresión. La SG-LMC a los 5 años en los grupos de alta y baja expresión era de 100 % vs 96% ($p=0,12$).

Figura 16. Análisis de Kaplan-Meier de las 4 variables analizadas en la cohorte qPCR2 comparando los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1*.

En esta cohorte se analizaron también las probabilidades de RMM, cuyos datos no estaban disponibles para el análisis en las cohortes previas. La SLP no se pudo

analizar mediante un análisis de Kaplan-Meier, ya que no estaba disponible el tiempo hasta el evento. Por ello se compararon las proporciones de pacientes que habían evolucionado a FA o CB en cada uno de los grupos, como puede observarse en la tabla VI.

			Fase acelerada o crisis blástica	
			No	Si
Expresion categorizada de PTCH1	baja	Frec.observada	47	3
		Frec. esperada	48,5	1,5
	alta	Frec. observada	51	0
		Frec. esperada	49,5	1,5

Tabla VI. Tabla de contingencia comparando las proporciones de pacientes que evolucionaron a FA o CB en los grupos con alta y baja expresión de PTCH1.

Se aplicó el test exacto de Fisher, al encontrarse una frecuencia esperada en dos casillas menor de 5, cuyo resultado mostró tendencia a la significación ($p=0,076$).

En esta cohorte también se analizó la proporción de pacientes que alcanzaban un nivel de $BCR-ABL1 \leq 10\%$ en IS a los 3 meses en los dos grupos, como se puede ver en la tabla VII.

			BCR-ABL IS >10% a los 3 meses	
			No	Si
Expresion categorizada de PTCH1	baja	Frec.observada	17	13
		Frec. esperada	21,2	8,8
	alta	Frec. observada	24	4
		Frec. esperada	19,8	8,2

Tabla VII. Tabla de contingencia comparando las proporciones de pacientes que alcanzaron un nivel de $BCR-ABL1 > 10\%$ en IS a los 3 meses en los grupos con alta y baja expresión de PTCH1.

Se aplicó el test de chi-cuadrado de Pearson ($p=0,015$) con resultado significativo, lo que indicaba que la proporción de pacientes con $BCR-ABL1 > 10\%$ a los 3 meses era mayor entre los pacientes con baja expresión de PTCH1 (43%) que entre aquellos con alta expresión (14%). Dicho de otro modo, del total de 17 pacientes que presentan un nivel de $BCR-ABL1 > 10\%$, 13 (76%) presentan baja expresión de PTCH1.

5.5. Multivariante

Para determinar la importancia de la expresión categorizada de *PTCH1* como factor pronóstico, se incluyó en una regresión de Cox o regresión de riesgos proporcionales para la predicción de SLFI, que era el objetivo principal, en las 4 cohortes analizadas. Se introdujo la expresión categorizada de *PTCH1* junto a los índices Sokal y EUTOS y a la edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad.

Se comprobó el supuesto de relación log-lineal para la edad, ya que era la única variable cuantitativa, mediante el análisis de los residuales martingale. No se demostró la vulneración del supuesto de relación log-lineal. Se utilizó una regresión de Cox con variables dependientes del tiempo para comprobar el supuesto de proporcionalidad de riesgos, no encontrándose tampoco vulneración del supuesto, por lo que no fue necesaria la transformación de ninguna de las variables para llevar a cabo los 4 análisis.

La expresión categorizada de *PTCH1* fue el factor pronóstico con mayor significación en las 4 cohortes. Únicamente en la cohorte qPCR1 entró también en el modelo el Sokal Score. Los resultados se pueden observar en la tabla VIII.

	TLDA1		TLDA2		qPCR1		qPCR2	
	valor p	Hazard Ratio (IC95%)	valor p	Hazard Ratio (IC95%)	valor p	Hazard Ratio (IC95%)	valor p	Hazard Ratio (IC95%)
<i>PTCH1</i> expresión c:	<0,001	4 (1,9-8,5)*	0,027	7 (1,3-38,6)*	0,001	48 (4,9-470,8)*	0,023	5,8 (1,3-26)
Sokal Score	0,3 [†]	NA	0,4 [†]	NA	0,003	(0,1-1,7)-(1,5-53,3)#	0,06 [†]	NA
Edad	0,095 [†]	NA	0,4 [†]	NA	0,6 [†]	NA	0,1 [†]	NA
EUTOS Score	0,9 [†]	NA	0,4 [†]	NA	0,4 [†]	NA	0,04 [†]	NA

*Grupo de baja expresión de *PTCH1* usado como grupo de referencia. † Significación en caso de que la variable hubiera entrado en el modelo. #El primer IC indica el hazard ratio resultante de la comparación del grupo con sokal intermedio y el de sokal bajo que resulta no significativo.

El segundo IC muestra la comparación entre los grupos de alto y bajo riesgo que es significativo. Se muestra la significación proporcionada por el método de Wald.

Tabla VIII. Resultado de la regresión de Cox llevada a cabo para predecir supervivencia libre de fallo a imatinib (SLFI) en las 4 cohortes analizadas.

5.6. Cálculo de la validez pronóstica de la prueba

Se calcularon la sensibilidad, especificidad, VPN y VPP de la expresión categorizada de *PTCH1* para la predicción de FI en las 4 cohortes analizadas. Los resultados pueden observarse en la tabla IX.

	TLDA1	TLDA2*	qPCR1	qPCR2
Sensibilidad (IC 95%)	60% (42-75)	33% (14-61)	88.2% (66-97)	84,6% (58-96)
Especificidad (IC 95%)	76.7% (62-87)	95,5% (85-99)	80% (58- 92)	55,7% (45-66)
Valor predictivo negativo (IC 95%)	73.4% (63-82)	84% (78-89)	88.9% (68- 97)	96,1% (87-99)
Valor predictivo positivo(IC 95%)	64.1% (49-77)	67% (29-91)	78.9% (61-90)	22% (17-28)

* Aplicando el punto de corte establecido en la cohorte TLDA1.

Tabla IX. Valoración de la medición de *PTCH1* como prueba pronóstica para la predicción de fallo a imatinib.

5.7. Estudios in-vitro

Se recopilaron 9 muestras de pacientes en el periodo de 10 meses indicado. Del total de muestras en 6 se separaron las fracciones celulares CD34+ y CD34-. Se obtuvo una adecuada amplificación en la qPCR para comparar la expresión de *PTCH1* entre la fracción CD34 + y CD34- en 4 de ellas (figura 14). Se realizó la prueba de la T de Student para muestras pareadas, no encontrándose diferencias significativas en la expresión de *PTCH1* entre ambas subpoblaciones celulares ($p=0,157$).

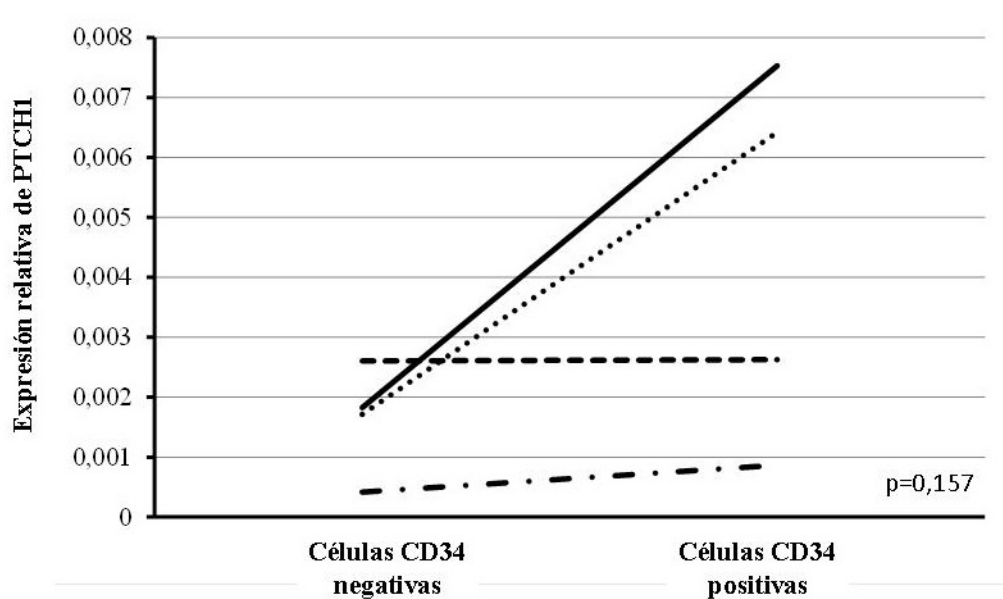


Figura 16. Comparación de la expresión relativa de *PTCH1* en células CD34 positivas y células CD34 negativas en muestras de medula ósea de 4 pacientes diagnosticados de leucemia mieloide crónica en fase crónica previo al inicio de ITK.

La fracción CD34+ de las muestras primarias fue sometida al tratamiento con distintos ITK durante 3h y durante toda la noche, y su expresión comparada con la de la misma muestra sin tratamiento. Los hallazgos pueden observarse en las figuras 17 y 18.

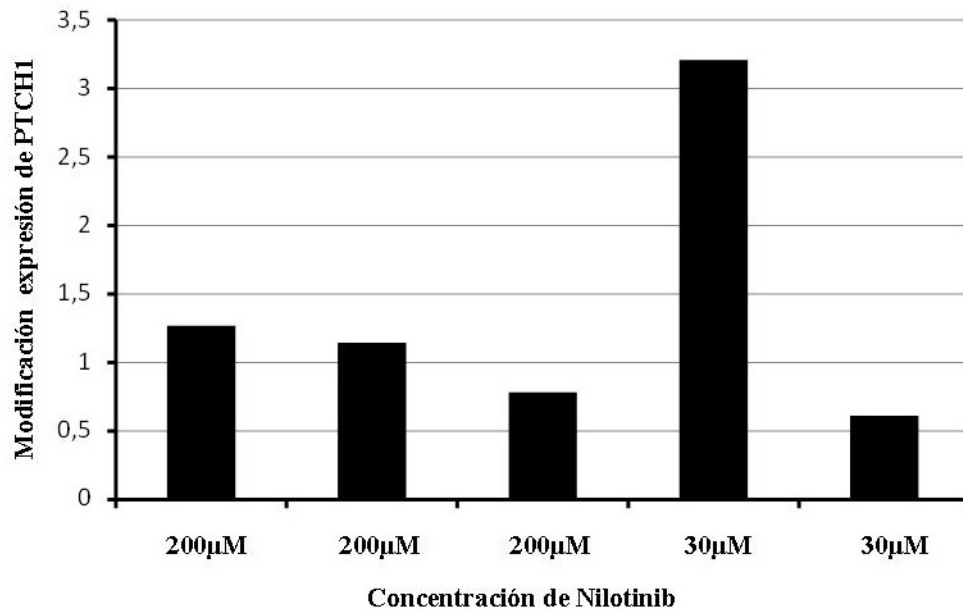


Figura 17. Modificación de la expresión de *PTCH1* en la fracción CD34+ de 5 muestras primarias de pacientes diagnosticados de LMC tratadas con nilotinib durante 3 horas.

Se representa la expresión de la muestra tratada, a la concentración indicada, como *fold change* con respecto a la muestra sin tratamiento correspondiente. No se encontraron diferencias significativas ni al comparar las 3 muestras con concentración de 200µM ni al hacerlo con las 2 muestras tratadas a una concentración de 30µM.

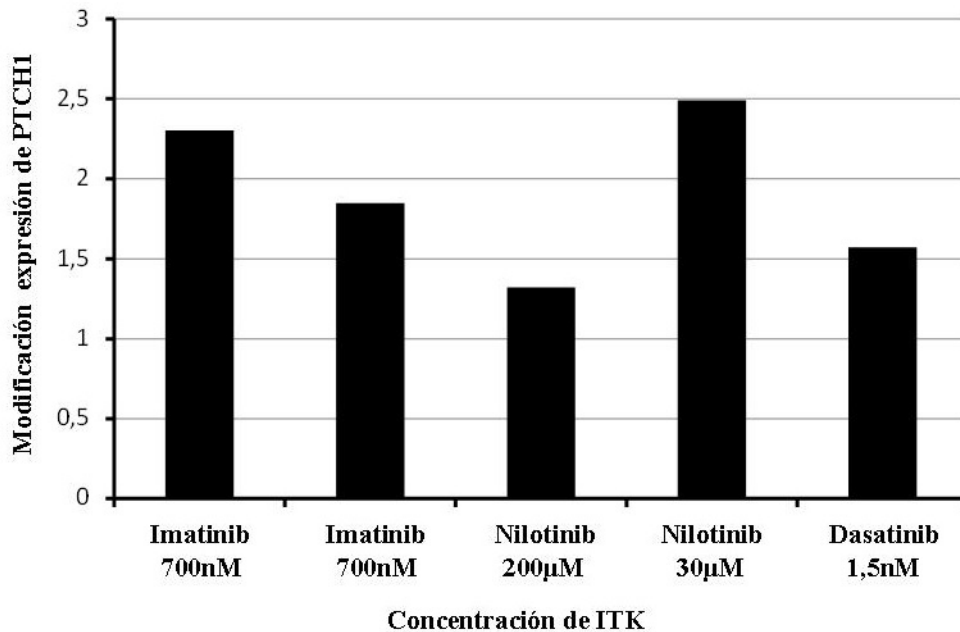


Figura 18. Modificación de la expresión de *PTCH1* en la fracción CD34+ de muestras primarias de pacientes diagnosticados de LMC tratadas con diferentes ITK durante la noche.

Se representa la expresión de la muestra tratada, con el fármaco y la concentración indicada, como *fold change* con respecto a la muestra sin tratamiento correspondiente. No se encontraron diferencias significativas ni al comparar las 2 muestras tratadas con imatinib ni al hacerlo con las 2 muestras tratadas con nilotinib.

Entre las 3 muestras tratadas a 3h con Nilotinib 200µM el test de la T de Student para muestras pareadas no mostró resultados significativos ($p=0,71$). El test de Wilcoxon para muestras pareadas, comparando las dos muestras tratadas con nilotinib 30 µM durante 3h tampoco fue significativo ($p=0,65$). El conjunto de las 5 muestras tratadas con distintas concentraciones de nilotinib a 3h tampoco mostró diferencia estadísticamente significativa (Wilcoxon, $p=0,69$).

En el análisis de las muestras tratadas durante toda la noche la comparación de las 2 tratadas con imatinib a 700nM no fue significativa (Wilcoxon, $p=0,18$); tampoco lo fue la comparación de las dos muestras tratadas con nilotinib (Wilcoxon, $p=0,18$).

Al comparar la expresión proteica de BCL2 en la línea celular K562 sin tratamiento y tratada con ciclopamina, a distintas concentraciones, se detectó una diferencia estadísticamente significativa en el test de ANOVA ($p=0,015$). La comparación entre grupos, realizada aplicando la corrección de Bonferroni, mostró que la expresión de BCL2 era menor cuando la K562 era tratada con ciclopamina a cualquier concentración ($p= 0,026$ frente a $2,5 \mu\text{M}$, $p=0,038$ frente a $5\mu\text{M}$) que cuando la línea se cultivaba sin tratamiento. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la expresión proteica de BCL2 entre el tratamiento con ciclopamina a las distintas concentraciones. El nivel de intensidad de los spots sin tratamiento fue de 1 y 0,9, con $2,5 \mu\text{M}$ fue de 0,54 y 0,53, y con $5 \mu\text{M}$ de 0,66 y 0,52. Ninguna de las otras 34 proteínas mostró diferencias de expresión significativas.

6. DISCUSIÓN

6.1. Objetivos 1,2 y 3

La hipótesis sobre la que se basaba el estudio era que era posible encontrar algún gen cuya expresión diferencial al diagnóstico sirva para clasificar a los pacientes en dos grupos con diferentes probabilidades de resistencia a imatinib. Para ello se seleccionaron genes que habían sido descritos como diferencialmente expresados entre buenos y malos respondedores, o entre las distintas fases de la enfermedad. También se incluyó un menor número de genes relacionados con la patogenia de la LMC hasta un total de 29. El estudio se desarrolló en dos fases, con un período de 2 años entre ellas, y se planificó en 2010; por lo tanto, aquellos genes que posteriormente se han relacionado con el pronóstico o patogenia de la LMC, como es el caso de *PP2A*, no han podido ser incluidos en el estudio (144).

Como primer objetivo se definió la predicción de SLFI, que en resumen se definía, tal y como en estudios previos, como discontinuación de imatinib debido a falta de eficacia (99). Los pacientes incluidos en las diferentes cohortes habían sido diagnosticados desde 2001 hasta 2014; es decir, desde el inicio del tratamiento con imatinib hasta nuestros días. Las recomendaciones de seguimiento se han hecho cada vez más estrictas, siendo recomendada una más profunda y más rápida respuesta conforme iban apareciendo nuevos y más potentes ITK (74). Por lo tanto, la definición de lo que se consideraba una mala respuesta, que requería el consiguiente cambio de tratamiento, no ha sido uniforme en todos los pacientes analizados. Sin embargo, el objetivo principal del estudio era el identificar factores moleculares de respuesta a imatinib, y el uso de cualquier otra variable, como por ejemplo, la probabilidad de alcanzar RCC o RMM a los 12 meses, como se ha hecho en otros estudios, supondría el uso de una variable uniforme pero intermedia, que no refleja directamente el evento que se quiere predecir (119,123). Además, también se definieron como objetivos secundarios la predicción de un nivel de BCR-ABL $\leq 10\%$ a los 3 meses, RCC, RMM, SLP y SG-LMC, lo que complementaba y reforzaba el objetivo primario. Los grupos,

con alta y baja expresión de cada gen, tenían la misma composición para la predicción de todas las variables; es decir, se aplicaba un mismo punto de corte para la predicción de todas las variables, lo que incrementa la validez de los resultados encontrados.

En el análisis de la cohorte TLDA1 se llevó a cabo un control negativo de la retrotranscripción, dada la posibilidad de que algunos de los genes amplificaran señal procedente de ADN genómico (133). En 5 de ellos se detectó una señal significativa que podía artefactar los resultados, por lo que tuvieron que ser excluidos del análisis. Esto provocó que únicamente se estudiaran 24 de los 29 genes inicialmente programados. En la cohorte TLDA1, compuesta por 73 pacientes no incluidos en ningún ensayo clínico, se encontró significación estadística para la predicción de alguna de las 4 variables analizadas en 5 genes: *PTCH1*, *XIAP*, *PR3*, *ABCB1* y *MPO*.

Dado el alto número de comparaciones realizadas, para estar completamente seguro de que el resultado es estadísticamente significativo, hay dos opciones. Bien dividir el "0,05", clásicamente usado como punto de corte para aceptar como significativo un resultado en ciencias de la salud, entre el número de comparaciones, y el nuevo valor se convierte en tu punto de corte para aceptar la significación, o bien validar los resultados en una nueva cohorte (145). Se llevó a cabo la segunda opción, para lo que se analizó la cohorte TLDA2, que estaba compuesta por 56 pacientes incluidos en el ensayo clínico fase III randomizado Spirit I desarrollado en Inglaterra. En esta cohorte, una vez la dosis de imatinib era modificada, el paciente salía del estudio, lo que modificó la definición de la variable SLFI e hizo que no se pudiera analizar SG-LMC ni SLP. En esta cohorte *PR3*, *ABCB1* y *MPO* no mostraron resultados significativos. Por lo expuesto anteriormente, se asumió que esta pérdida de significación era debida a que los resultados encontrados en la cohorte TLDA1 fueron encontrados por azar.

En el análisis de *PTCH1*, aplicando el punto de corte derivado de la cohorte TLDA1, los pacientes eran clasificados en grupos con proporciones muy diferentes a las de la

cohorte TLDA1 (TLDA1 alta expresión/baja expresión: 62%/38% vs TLDA2: 89%/11%). Esta diferente proporción de pacientes en los grupos de alta y baja expresión de *PTCH1* en las cohortes TLDA 1 y 2 podría deberse a la muy dispar evolución clínica que presentaron los pacientes de las dos cohortes. En la cohorte TLDA1 31 pacientes (42%) presentaron FI, mientras que en la cohorte TLDA2 únicamente 12 pacientes (21%) tuvieron FI. Hay que tener en cuenta que en esta cohorte se incluyeron como FI a los que sufrieron cambio de dosis de imatinib, con lo que el porcentaje de pacientes que realmente sufriría un cambio de tratamiento posteriormente, y por lo tanto tendría FI acorde con la definición de la cohorte TLDA1, sería incluso menor. En cualquier caso, se calculó un nuevo punto de corte para la cohorte TLDA2, que originó grupos más comparables (alta expresión: 68%, baja expresión: 32%) y resultados igualmente significativos. En definitiva, tras el análisis de la cohorte TLDA2, de los 5 genes que inicialmente mostraron capacidad predictiva únicamente mantenían la significación estadística para alguna de las 4 variables 2: *PTCH1* y *XIAP*.

El hallazgo de *PTCH1* y *XIAP* como predictores de respuesta a imatinib, y el sentido de esa relación, encajaba con lo previamente descrito acerca de ambos. Y es que *XIAP* es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis, y su sobreexpresión ya había sido relacionada con una mejor respuesta al tratamiento por Villuendas et al (123). Por su parte, *PTCH1* es un conocido gen supresor tumoral integrado en la vía del erizo, lo que explicaba el que una mayor expresión conllevara una mejor respuesta a imatinib (146).

El TLDA está basado en una qPCR microfluídica, por lo tanto, se trata de una PCR cuantitativa levemente modificada. En ocasiones se ha usado para validar resultados de expresión génica obtenidos mediante microarrays (118). No obstante, pese a la similitud del TLDA con la qPCR convencional, y dado que esta última sería la técnica de elección en el caso de una posible implementación en el ámbito asistencial,

consideramos necesario el análisis de una nueva cohorte denominada cohorte qPCR1. El objetivo del análisis de esta cohorte era el llevar a cabo la validación técnica de los resultados. Se modificó, además de la técnica, la secuencia de los primers y sondas, que fueron diseñados para asegurar que no anidaban sobre ningún polimorfismo o mutación, consultando para ello las secuencias génicas más actualizadas en aquel momento en la base de datos Ensembl. Y es que la secuencia de los primers y sonda utilizados en el TLDA no estaba, ni está, disponible ya que son comerciales. Por lo tanto, no se podía comprobar que los primers y sonda no anidaran en zonas con polimorfismos o mutaciones descritos posteriormente al desarrollo del ensayo comercial, ni que los resultados hallados no se debieran a diferencias de expresión, sino a la presencia o no de estas variantes génicas. De esta manera, en caso de validarse los resultados, en la cohorte qPCR1, se podría asegurar que el cambio de expresión génica detectado entre buenos y malos respondedores a imatinib no se debía a alteraciones en la secuencia que producían defectos en el anidamiento de primers o sonda, sino a verdaderos cambios en el número de moléculas de ARNm mensajero (ARNm) de cada uno de los genes.

La cohorte qPCR1, en realidad, era una subcohorte de la cohorte TLDA1, ya que estaba compuesta por los 37 pacientes con muestra restante tras el análisis de esta. Los resultados de su análisis mostraron una correlación con los del TLDA en el caso de *PTCH1*, pero *XIAP* no mostró correlación significativa, aun cuando se excluyó del análisis un valor *outlier*, que quizás estaba artefactando los resultados. Esta falta de correlación mostrada por las medidas de *XIAP* se tradujo en la ausencia de significación estadística para la predicción de cualquiera de las 4 variables analizadas. De este modo, *PTCH1* se convirtió en el único gen que había superado con éxito el análisis de las 3 primeras cohortes.

La no validación de los resultados encontrados en las cohortes previas por parte de *XIAP* pudiera ser debida a su anidación sobre algún polimorfismo o mutación, y su posible relación con la patogenia de la LMC debiera ser objeto de estudio en el futuro.

Tras el análisis de las cohortes TLDA1, TLDA2 y qPCR1 tenemos a *PTCH1* como el único gen con potencia pronóstica. Mediante la cuantificación de su expresión se han formado dos grupos, cuya comparación, mediante el test log-rango, de las probabilidades de FI, RCC, SLP o SG-LMC son estadísticamente diferentes en las 3 cohortes analizadas hasta el momento.

Todos los análisis realizados hasta ese punto se habían llevado a cabo con pacientes procedentes de HH. Como ya se ha explicado, el análisis de la cohorte qPCR1 se llevó a cabo con el fin de realizar una validación técnica y testar el posible uso de la qPCR convencional para medir la expresión de *PTCH1* al diagnóstico en pacientes de LMC. Sin embargo, un escaso número de pacientes fueron incluidos en esta cohorte, debido a la falta de muestra disponible. Con el objetivo de intentar aumentar la muestra analizada mediante qPCR y de ver si era posible mantener la potencia pronóstica y aumentar la simplicidad del análisis, al reducir el número de genes control de 3 a 1, se decidió analizar una nueva cohorte mediante qPCR convencional.

En la cohorte qPCR2 se incluyeron 101 pacientes, lo cual mejoraba mucho el reclutamiento de la cohorte qPCR1, que, además, procedían de otro país y de un ámbito asistencial diferente. Y es que HH es un centro terciario de referencia de LMC en Inglaterra, al cual son derivados pacientes cuya evolución clínica no es óptima. Los pacientes incluidos en la cohorte qPCR2 corresponden a 16 centros españoles de nivel secundario y terciario. De este modo, la validación de los resultados en diferentes cohortes compuestas por pacientes incluidos y no incluidos en ensayos clínicos, y procedentes de distintos países y de hospitales de distinto nivel, aporta gran validez externa a los resultados. Es decir, maximiza la posibilidad de que estos resultados sean generalizables a otros contextos clínicos (147). En la cohorte qPCR1 un 42% de

los pacientes presentaron FI, lo cual representa un porcentaje sensiblemente mayor al reportado en otros estudios, que ronda el 25% (99). La cohorte qPCR2, extraída de los diferentes centros españoles, presentaba una proporción de pacientes con FI del 13%, lo que se encuentra algo por debajo de lo descrito en publicaciones de otros países. La mejor evolución de los pacientes diagnosticados en España ya ha sido descrita previamente y quizás se deba a un mayor número de determinaciones analíticas de hemograma realizadas en España, lo que podría condicionar un más temprano diagnóstico de la enfermedad (148).

En la cohorte qPCR2, debido a los datos recopilados y proporcionados por el grupo español de leucemia mieloide crónica, se pudieron analizar las probabilidades de alcanzar RMM y la proporción de pacientes con BCR-ABL1 \leq 10% a los tres meses, además de las variables analizadas en las cohortes previas. En función de la expresión de *PTCH1*, los pacientes se clasificaron en grupos con probabilidades estadísticamente significativas de presentar BCR-ABL1 \leq 10% a los tres meses, FI y RMM. Las tasas de RCC de los grupos con alta y baja expresión de *PTCH1* (93% vs 91% al año) no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La muy buena evolución de los pacientes, con una mediana de consecución de RCC de 6 meses en el total de la cohorte, puede ser la causa de la ausencia de significación, ya que sería necesaria una cohorte mucho mayor para detectar diferencias significativas. La SLP no pudo ser analizada mediante Kaplan-Meier, pero el test exacto de Fisher, comparando las proporciones, mostró una tendencia a la significación ($p= 0,076$), y es que los 3 pacientes que evolucionaron a FA o CB presentaban baja expresión de *PTCH1*. La SG-LMC tampoco mostró diferencias significativas, pero los 2 pacientes que murieron por causas relacionadas con la LMC estaban en el grupo de baja expresión de *PTCH1*. Por lo tanto, la falta de significación estadística de SG-LMC y de SLP parece deberse al escaso número de eventos sufridos por los pacientes, y no a la falta de potencia pronóstica de la expresión de *PTCH1*.

Un aspecto que hubiera sido mejorable es la distinta metodología aplicada a la hora de llevar a cabo el seguimiento molecular de los pacientes incluidos en la cohorte qPCR2. De los 7 laboratorios españoles donde se había realizado el seguimiento de los pacientes, en 5 se usaba la qPCR convencional y se instauró la IS, pero en 2 centros se usó la plataforma Genexpert. Esta diferencia en el seguimiento molecular pudo alterar la determinación del nivel de *BCR-ABL1* a los 3 meses y de la RMM. Varios estudios han demostrado la aplicabilidad del sistema Genexpert para la definición de RMM (135). Sin embargo, hay estudios que afirman que se producen discordancias al medir niveles de *BCR-ABL1* en torno al 10%, lo que podría distorsionar la medición del valor de *BCR-ABL1* a los 3 meses de estos pacientes (149). En este estudio encuentran como predictivo un punto de corte de *BCR-ABL1* a los 3 meses de 1,6% medido por Genexpert. Se llevó a cabo el análisis a los 3 meses en la cohorte qPCR2, aplicando ese punto de corte a los pacientes procedentes del Hospital Gregorio Marañón y Doctor Negrín, ya que habían sido analizados con esta tecnología, y el clásico del 10% de *BCR-ABL1* al resto de pacientes, y también se encontraron diferencias significativas (Chi-cuadrado de Pearson, $p=0,012$).

En la cohorte qPCR2 también se analizó la expresión de *SMO*, que es otro integrante de la vía del erizo, y se calculó otro índice pronóstico mediante la división de la expresión de ambos genes para ver si podían mejorar la potencia pronóstica de *PTCH1*, tal y como había sido descrito (140). La capacidad pronóstica de las 3 medidas se comparó mediante el AUC de la curva ROC. La curva ROC representa en el eje de abscisas (1- especificidad) y en el eje de ordenadas la sensibilidad. De este modo, el área bajo la curva es un valor comprendido entre 0,5 y 1. El valor del AUC representa las probabilidades que tiene un sujeto cualquiera de uno de los grupos de presentar un valor mayor o menor comparado con un sujeto del otro grupo. En nuestro caso, el AUC representaría la probabilidad que tiene un paciente que presenta FI durante su seguimiento, de tener una menor expresión de *PTCH1*, comparado con un

paciente con adecuada respuesta al fármaco. En caso de presentar un AUC de 0,5, la prueba diagnóstica no tiene valor, es decir, acierta el 50% de las veces. Si el AUC es de 1, la prueba diagnóstica es perfecta, ya que todos los sujetos de un grupo tienen valores mayores o menores que los sujetos del otro grupo, es decir, la sensibilidad y especificidad son del 100%. De este modo, el AUC de la curva ROC se puede usar para comparar pruebas diagnósticas o pronósticas (142).

El AUC de *SMO* para la predicción de SLFI era mucho menor que el de *PTCH1* (0,55 vs 0,72). En el caso de la ratio *PTCH1/SMO*, pese a otros resultados reportados que indicaban la mejora de la potencia pronóstica, también mostró un AUC ligeramente menor (0,71) (140). Dada la escasa diferencia entre las AUC de *PTCH1* y *PTCH1/SMO*, quizás se podría haber intentado establecer un punto de corte y ver su potencia pronóstica, pero uno de los objetivos del análisis de la cohorte qPCR2 fue testar si se podía reducir el número de genes control de 3 a 1 para simplificar el análisis, por lo que no consideramos adecuado aumentar la complejidad mediante la adición de otro gen.

Repasando todos los resultados descritos, parece que la medición de la expresión de *PTCH1* al diagnóstico predice FI y el resto de variables descritas; sin embargo, es necesario descartar que la diferente expresión génica de los pacientes no refleje diferencias en otras variables conocidas relacionadas con el pronóstico de los pacientes. Por ello, se realizó una regresión de Cox para la predicción de SLFI que demostró que la expresión categorizada de *PTCH1* era un factor pronóstico independiente para la predicción de SLFI en las 4 cohortes. Además, en 3 de las 4 cohortes representaba el único factor pronóstico incluido en el modelo en el proceso condicional hacia delante por pasos.

Como último paso del análisis estadístico, se calculó la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para la predicción de SLFI en las 4 cohortes. Hay que precisar que la terminología usada es de pruebas diagnósticas, pero se puede aplicar también para

factores pronósticos. Es decir, estaríamos midiendo un rasgo molecular de la enfermedad en el momento del diagnóstico que origina una diferente respuesta al tratamiento. El *gold standard* para la valoración de nuestra prueba lo proporciona el seguimiento, durante el cual se determina la buena o mala respuesta a imatinib que presenta el paciente. El evento que se quiere predecir midiendo la expresión de *PTCH1* es la falta de respuesta a imatinib. De este modo, el valor predictivo negativo (VPN) valora la proporción de sujetos que no presentan fallo al tratamiento entre los que presentan un test negativo, es decir, una alta expresión de *PTCH1*. En las dos cohortes analizadas mediante qPCR la Se era alta (88% y 85%), la Sp fue más alta en la cohorte qPCR1 (80% vs 55%). Los VPN fueron claramente más altos que los positivos (qPCR1: 89 % y qPCR2: 96% vs qPCR1:79% y qPCR2:22%), especialmente en el caso del VPP de la cohorte qPCR2. Los puntos de corte de la expresión de *PTCH1* para el establecimiento de los grupos se fijaron tras el trazado una curva ROC y atendiendo a la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cada posible punto de corte proporcionados.

Es conveniente aclarar que, cuando se establece un punto de corte, excepto si se trata de una prueba perfecta con sensibilidad y especificidad de uno, siempre se prima una de las características de la prueba en función de la aplicación posterior de la misma. De este modo, la mayor sensibilidad y VPN observados, en comparación con la especificidad y VPP, en todas las cohortes fueron en parte intencionadas, al primar el establecimiento de un punto de corte que tuviera pocos falsos negativos. Sensibilidad y VPN suelen correlacionarse de manera positiva, ya que, si la prueba es sensible, detecta correctamente a casi todos los enfermos, por lo que en pocas ocasiones clasifica a un enfermo como sano, lo que supondría un falso negativo. De este modo, al presentar pocos falsos negativos, el VPN de la prueba es alto. En resumen: se establecieron puntos de corte con una alta sensibilidad y VPN, con lo que, si el paciente era clasificado como buen respondedor a imatinib, hubiera altas posibilidades

de que lo fuera en realidad. Así, en la cohorte qPCR2 los pacientes con alta expresión de *PTCH1* presentaban una SLFI del 95% a los 12 años de iniciado el tratamiento, mostrando significación estadística la comparación con los pacientes con baja expresión.

Pese a la estrategia seguida, y previamente explicada, de potenciar sensibilidad y VPN frente a especificidad y VPP, quizás el valor de 22% de VPP observado en la cohorte qPCR2 pudiera parecer demasiado reducido. Sin embargo, el score EUTOS, el cual es el único de los 3 índices clínicos desarrollado en la era de imatinib, presenta una sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos para la predicción de no alcanzar RCC a los 18 meses en los pacientes tratados con Imatinib 400mg de 15%, 95%, 31% y 87%. Por lo que vemos que valores similares, e incluso más bajos, son los que presentan scores pronósticos usados de manera rutinaria en la actualidad.

Desde los planteamientos de la medicina basada en la evidencia recomiendan que en este tipo de estudios se tenga especial precaución con diferentes aspectos (150). El primero de ellos es la representatividad de la muestra analizada, que en nuestro caso es representativa de pacientes diagnosticados de LMC en FC, incluso de distintos países, y cubre todo el espectro en cuanto al pronóstico de los pacientes. La selección de los pacientes en todas las cohortes se hizo en función de la disponibilidad de muestra biológica y datos clínicos de seguimiento. El pronóstico de la cohorte TLDA1, y sobre todo de la qPCR1, es más sombrío de lo habitual, con una altísima incidencia de FI, progresión a fases avanzadas y muerte, y en el caso de la cohorte qPCR2 ocurre lo contrario. Quizás hubiera sido deseable analizar una cohorte con una evolución más parecida a lo descrito (99). En cualquier caso, si el test predice FI adecuadamente en cohortes con pronósticos tan dispares y a ambos extremos de la normalidad, presumiblemente lo haga en una cohorte de pronóstico intermedio. La segunda de las cuestiones con la que recomiendan ser especialmente cauto en estos estudios es con la longitud adecuada del seguimiento para que se produzca el evento

a predecir. La mediana de seguimiento iba de 2,8 a 4,3 años en las diferentes cohortes, por lo que parece adecuado. La tercera cuestión es si la valoración del evento en cuestión fue correcta y no fue influenciado por la cohorte de pertenencia del paciente. En este estudio la clasificación en una u otra cohorte se produjo a posteriori, por lo que no tiene sentido plantear el posible incumplimiento de este supuesto. El cuarto supuesto es el ajuste por otros factores pronósticos relevantes, lo cual se llevó a cabo; y el quinto, la validación de los resultados, que se llevó a cabo 3 veces por diferentes técnicas y en pacientes procedentes de distintos contextos clínicos y distintos países.

Por lo expuesto hasta este punto, parece que se puede afirmar, sin estar aparentemente equivocado por la presencia de sesgos no controlados, que la medición de la expresión de *PTCH1* al diagnóstico sirve para clasificar a los pacientes en 2 grupos con diferentes niveles de expresión génica y diferentes probabilidades de presentar FI y el resto de variables clínicas analizadas. Derivado de esto, se podría pensar que una posibilidad sería administrar imatinib a los pacientes con alta expresión de *PTCH1*, y los ITK de segunda generación a aquellos con baja expresión y por lo tanto pronosticados como pobres respondedores a imatinib. Nosotros no hemos evaluado la posible relación de la alta expresión de *PTCH1* con el fallo a ITK de segunda generación. El grupo del HH llevó a cabo este estudio en 190 pacientes tratados con dasatinib y no encontró relación de la expresión de *PTCH1* con la respuesta al fármaco, quizás por la mayor potencia de este ITK (140). Este hallazgo apoyaría la estrategia de reservar los ITK de segunda generación para los pacientes con baja expresión de *PTCH1*, ya que aquellos con alta expresión responderán adecuadamente a imatinib.

6.2. Objetivo 4

Como ya ha sido explicado en la introducción, la vía del erizo parece tener un importante papel en la patogenia de la LMC. A diferencia de lo descrito en otras neoplasias hematológicas, se ha sugerido que la activación de la vía en la LMC se produce de manera autónoma en las células progenitoras (151). Se ha detectado un aumento de la expresión de Gli2, que es uno de los factores de transcripción efectores de la vía, en fases avanzadas de la LMC (124). También se ha relacionado el aumento de expresión de Gli2 con una mayor quiescencia de las células madre de la LMC (54).

Las células madre leucémicas, al igual que las células madre no leucémicas, tienen la capacidad de auto-replicarse y de diferenciarse en progenitores más diferenciados (152). Esta subpoblación de células madre leucémicas puede dividirse o permanecer sin división celular, es decir, quiescentes, lo que les confiere la propiedad de ser insensibles al tratamiento con imatinib, dasatinib, nilotinib y bosutinib (153–156). Esta resistencia al tratamiento con ITK ha convertido a las células madre leucémicas quiescentes (CMLQ) en el foco de estudio de numerosas investigaciones, bajo la premisa de que sin la erradicación de esta población no sería posible la cura de la LMC (152).

En nuestro estudio hemos detectado que la mayor expresión de *PTCH1* se asocia a una mayor SLFI. Al ser *PTCH1* un inhibidor de la vía, este mayor nivel de expresión de *PTCH1* podría suponer una menor activación de la vía del erizo. Otra opción es que, al ser *PTCH1* uno de los genes cuya expresión es aumentada por la vía como mecanismo de feed-back negativo, la expresión aumentada de *PTCH1* reflejara una actividad aumentada de la vía. Sin embargo, la expresión de *SMO*, aunque tenía una capacidad predictiva baja (AUC=0,55), indicaba que a menor expresión de *SMO*, lo que significa una expresión de la vía del erizo disminuida, mejor respuesta a imatinib del paciente. Por lo tanto, habría que interpretar la expresión aumentada de *PTCH1*

como reflejo de su papel inhibidor de la vía del erizo, y no como consecuencia de la actividad aumentada de la misma.

Por otra parte, la mayor expresión de *PTCH1* hallada en sangre periférica total quizás refleje una mayor expresión en la subpoblación de CMLQ. En nuestro estudio, si bien es cierto que el número de muestras era únicamente de 4, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *PTCH1* entre la fracción CD34+ y CD34- de muestras primarias de MO de pacientes diagnosticados de LMC. En otro estudio, en el que realizaron el mismo ensayo, tampoco encontraron grandes diferencias, pese a que sí observaron marcadas diferencias significativas en la expresión de *SHH*, *SMO* y *GLI1* entre la fracción CD34- y CD34+ (151). Teniendo en cuenta el conjunto de los datos, no podemos descartar que los niveles de expresión detectados en sangre periférica total quizás sean reflejo de la expresión en la subpoblación de CMLQ. Hemos de ser muy cautos a la hora de realizar esta afirmación, ya que, por un lado, el no encontrar diferencias significativas no equivale a que las muestras que se comparan sean iguales, y, por el otro, la población de CMLQ se engloba dentro de la fracción CD34+, pero esta contiene otras células madre no quiescentes y otras células progenitoras.

En cualquier caso, si los niveles detectados en SP fueran reflejo de los niveles en la subpoblación de CMLQ, se podría explicar el buen pronóstico detectado en los pacientes con alta expresión de *PTCH1*. En ellos la vía del erizo, al ser reprimida por *PTCH1*, estaría no activada, lo que disminuiría la quiescencia y el número de CMLQ que son insensibles al tratamiento con ITK (54,67,68).

En nuestros experimentos de modificación de la expresión de *PTCH1* mediante el tratamiento con imatinib, nilotinib y dasatinib, sobre la fracción de células CD34+ de muestras primarias de MO no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. El escaso número de células disponibles tras la selección inmunomagnética de las muestras redujo el número de muestras analizables, lo que

quizás sea la causa de la falta de significación estadística. A las 3 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de nilotinib no se ve ni siquiera una tendencia a la significación. Sin embargo, cuando el tratamiento se realizó durante la noche, se observa una tendencia al aumento de expresión de *PTCH1* con los 3 ITK. En un estudio previo realizado en modelos murinos se detectó una modificación de la expresión de *SMO* de tan sólo el 20% al ser tratada la muestra en cultivo con imatinib o nilotinib (68). Otro estudio demostró que la vía del erizo regulaba la acción de *BCR-ABL1*, lo que orientaba a su situación *upstream* de *BCR-ABL1*(157). Teniendo en cuenta los resultados de nuestro estudio, junto con la evidencia previa, parece que la vía del erizo, y *PTCH1* como integrante de ella, o no es regulada por *BCR-ABL1* o lo es solo residualmente.

En los experimentos in-vitro tratando la línea celular K562, que expresa *BCR-ABL1*, con ciclopamina se trató de esclarecer las vías moleculares a través de las cuales actuaba la vía del erizo en la LMC. La ciclopamina es un fármaco antagonista de *SMO* por lo que hace a priori una función similar a la llevada a cabo por la proteína *PTCH1*, es decir inhibe a *SMO* y, por consiguiente, inhibe la vía del erizo. Hay que aclarar que se aplicó el test de ANOVA sobre las medidas de la intensidad de los 2 spot que median cada proteína, ya que únicamente se trató y estudió un cultivo de K562. Con ello usamos una estrategia conservadora, al no usar la media de las medidas de cada proteína y tener en cuenta la variabilidad de la medición en el análisis. Los resultados encontrados parecen confirmar que la vía del erizo ejerce parte de su acción a través de la proteína anti-apoptótica *BCL-2*. Hasta donde llega nuestro conocimiento, esto ya había sido demostrado en otras patologías, y en la línea celular K562 se había observado que, tras el tratamiento con el anticuerpo 5E1, que bloquea a *SHH*, se reducía la transcripción de *BCL2*, pero no se había estudiado a nivel proteico. En resumen, hemos comprobado que se produce la disminución a nivel proteico de *BCL2* inhibiendo la vía con ciclopamina, que es un fármaco que inhibe a *SMO* (64,151).

Los resultados de nuestro estudio vienen a remarcar la importancia de la vía del erizo en la LMC, la cual ya está siendo ampliamente estudiada. El hecho de que la vía no parece fundamental para el mantenimiento de la hematopoyesis del adulto, unido al efecto mostrado por la inhibición de la vía en modelos murinos, ha hecho que compuestos dirigidos contra SMO hayan sido investigados en el tratamiento de la LMC (67,68). Inhibidores de SMO, similares a la ciplopamina, cuya acción sería similar a la llevada a cabo de manera fisiológica por *PTCH1*, están siendo testados en ensayos clínicos en fase temprana. Los resultados hasta el momento han sido pobres y han tenido importantes efectos secundarios, lo que ha provocado que no se llevara a cabo ningún ensayo en fases avanzadas para LMC hasta el momento (158).

El descubrimiento del mayor poder predictivo de la expresión de *PTCH1*, comparada con la de *SMO*, puede ser debido al más importante papel de este gen en la resistencia a imatinib o a la existencia de mecanismos reguladores post-transcripcionales, que regularían a *SMO* a nivel proteico, lo que causaría ausencia de correlación entre los niveles de ARNm y su actividad proteica. En cualquier caso, este hecho, unido al fracaso de los inhibidores de *SMO* testados en fases clínicas hasta el momento, quizás debiera hacernos pensar que el uso de agonistas de *PTCH1* podría ser una opción terapéutica merecedora de ser investigada en combinación con los ITK.

7. CONCLUSIONES

1. De un total de 24 genes estudiados, ya relacionados con la respuesta a imatinib o la patogenia de la enfermedad, solo la expresión de *PTCH1* ha mostrado significación pronóstica en las 4 cohortes analizadas.
2. La medición de la expresión de *PTCH1* al diagnóstico en pacientes con LMC en fase crónica identifica un grupo de pacientes con alta expresión del gen que presentan bajas probabilidades de discontinuar imatinib por falta de eficacia.
3. Los pacientes con alta expresión de *PTCH1* también presentan mayores probabilidades de alcanzar un nivel de BCR-ABL1 < 10% a los 3 meses y de presentar en cualquier momento respuesta citogenética completa y respuesta molecular mayor. Asimismo, presentan menores posibilidades de progresión a fases avanzadas y de muerte asociada a LMC.
4. La aplicabilidad de la medición de *PTCH1*, al diagnóstico, como predictor de respuesta a imatinib ha sido probada en cohortes procedentes de distintos países y aplicando la tecnología TLDA y la qPCR convencional.
5. La expresión categorizada de *PTCH1* ha demostrado ser un factor pronóstico independiente, de la edad y los índices de Sokal y EUTOS, para la predicción de FI en todas las cohortes analizadas.
6. No se han obtenido resultados concluyentes sobre la relación o independencia de la expresión de *PTCH1* y la actividad tirosinkinasa aumentada de BCR-ABL1.
7. La expresión proteica de BCL2 en la línea celular K562 parece que se reduce al inhibir la vía del erizo mediante ciclopamina.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. NOWELL PC, HUNGERFORD DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 1960 Jul;25:85–109.
2. Rowley JD. Absence of the 9q plus chromosome in Ph1 negative chronic myelogenous leukaemia. *J Med Genet.* 1974 Jun;11(2):166–70.
3. 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 Jul 25;122(4):515–22.
4. Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bernasconi P, et al. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol.* 1995 Feb;70(2):79–82.
5. Huang X, Cortes J, Kantarjian H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer.* 2012 Jun 15;118(12):3123–7.
6. Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006 Jul;81(7):973–88.
7. Mendizabal AM, Garcia-Gonzalez P, Levine PH. Regional variations in age at diagnosis and overall survival among patients with chronic myeloid leukemia from low and middle income countries. *Cancer Epidemiol.* 2013 Jun;37(3):247–54.
8. Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol.* 1995 Aug;7(4):255–66.
9. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet (London, England).* 2015 Apr 11;385(9976):1447–59.
10. Score J, Calasanz MJ, Ottman O, Pane F, Yeh RF, Sobrinho-Simões MA, et al. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. *Leukemia.* 2010 Oct;24(10):1742–50.
11. Melo J V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood.* 1996 Oct 1;88(7):2375–84.
12. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood.* 1996 Oct 1;88(7):2410–4.

13. Melo J V, Myint H, Galton DA, Goldman JM. P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia? *Leukemia*. 1994 Jan;8(1):208–11.
14. Verma D, Kantarjian HM, Jones D, Luthra R, Borthakur G, Verstovsek S, et al. Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood*. 2009 Sep 10;114(11):2232–5.
15. Chereda B, Melo J V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*. 2015 Apr;94 Suppl 2:S107–21.
16. Chu S, Li L, Singh H, Bhatia R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):7045–53.
17. Hantschel O. Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer. *Genes Cancer*. 2012 May;3(5-6):436–46.
18. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993 Oct 8;75(1):175–85.
19. Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(3):840–53.
20. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990 Feb 16;247(4944):824–30.
21. Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*. 1990 Mar 15;344(6263):251–3.
22. Szczylik C, Skorski T, Nicolaidis NC, Manzella L, Malaguarnera L, Venturelli D, et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science*. 1991 Aug 2;253(5019):562–5.
23. Birge RB, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Commun Signal*. 2009 Jan;7:13.
24. Schafranek L, Nievergall E, Powell JA, Hiwase DK, Leclercq T, Hughes TP, et al. Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 Jan;29(1):76–85.

25. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997 Oct 15;16(20):6151–61.
26. Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, Skorski T. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene.* 2002 Aug 29;21(38):5868–76.
27. Baum KJ, Ren R. Effect of Ras inhibition in hematopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *J Hematol Oncol.* 2008 Jan;1:5.
28. Hsieh M-Y, Van Etten RA. IKK-dependent activation of NF- κ B contributes to myeloid and lymphoid leukemogenesis by BCR-ABL1. *Blood.* 2014 Apr 10;123(15):2401–11.
29. Lionberger JM, Wilson MB, Smithgall TE. Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck. *J Biol Chem.* 2000 Jun 16;275(24):18581–5.
30. Wilson MB, Schreiner SJ, Choi H-J, Kamens J, Smithgall TE. Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. *Oncogene.* 2002 Nov 21;21(53):8075–88.
31. Guo G, Kang Q, Zhu X, Chen Q, Wang X, Chen Y, et al. A long noncoding RNA critically regulates Bcr-Abl-mediated cellular transformation by acting as a competitive endogenous RNA. *Oncogene.* 2015 Apr 2;34(14):1768–79.
32. Salomoni P, Condorelli F, Sweeney SM, Calabretta B. Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood.* 2000 Jul 15;96(2):676–84.
33. Neshat MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol.* 2000 Feb;20(4):1179–86.
34. Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, Congdon KL, Blum J, Lento WE, et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature.* 2010 Aug 5;466(7307):765–8.
35. Huang X-F, Luo S-K, Xu J, Li J, Xu D-R, Wang L-H, et al. Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008 Mar 1;111(5):2854–65.
36. Walsby E, Walsh V, Pepper C, Burnett A, Mills K. Effects of the aurora kinase

- inhibitors AZD1152-HQPA and ZM447439 on growth arrest and polyploidy in acute myeloid leukemia cell lines and primary blasts. *Haematologica*. 2008 May;93(5):662–9.
37. Landen CN, Lin YG, Immaneni A, Deavers MT, Merritt WM, Spannuth WA, et al. Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 15;13(14):4098–104.
 38. Ochi T, Fujiwara H, Suemori K, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, et al. Aurora-A kinase: a novel target of cellular immunotherapy for leukemia. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):66–74.
 39. Mohty M, Yong ASM, Szydlo RM, Apperley JF, Melo J V. The polycomb group BMI1 gene is a molecular marker for predicting prognosis of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):380–3.
 40. Uehara E, Takeuchi S, Yang Y, Fukumoto T, Matsushashi Y, Tamura T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Oncol Lett*. 2012 Jan;3(1):190–2.
 41. Menssen HD, Renkl HJ, Entezami M, Thiel E. Wilms' tumor gene expression in human CD34+ hematopoietic progenitors during fetal development and early clonogenic growth. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3486–7.
 42. Ujj Z, Buglyó G, Udvardy M, Beyer D, Vargha G, Biró S, et al. WT1 Expression in Adult Acute Myeloid Leukemia: Assessing its Presence, Magnitude and Temporal Changes as Prognostic Factors. *Pathol Oncol Res*. 2015 Nov 4;
 43. Alonso-Dominguez JM, Tenorio M, Velasco D, Abalo L, Lozano S, Villarrubia J, et al. Correlation of WT1 expression with the burden of total and residual leukemic blasts in bone marrow samples of acute myeloid leukemia patients. *Cancer Genet*. 2012 Apr;205(4):190–1.
 44. Otahalova E, Ullmannova-Benson V, Klamova H, Haskovec C. WT1 expression in peripheral leukocytes of patients with chronic myeloid leukemia serves for the prediction of Imatinib resistance. *Neoplasma*. 2009 Jan;56(5):393–7.
 45. Alberts Bruce, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith WP, editor. *Molecular Biology of the Cell*. 5th editio. Garland Science;
 46. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). *Int J Mol Med*. 2008 Sep;22(3):271–5.
 47. Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*. 2004 Jun 18;304(5678):1755–9.

48. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*. 2008 Sep 18;455(7211):406–10.
49. Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, et al. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12125–8.
50. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol*. 2007 Sep;17(9):438–47.
51. Katoh Y, Katoh M. Integrative genomic analyses on GLI2: mechanism of Hedgehog priming through basal GLI2 expression, and interaction map of stem cell signaling network with P53. *Int J Oncol*. 2008 Oct;33(4):881–6.
52. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol*. 1990 Feb;10(2):634–42.
53. Matisse MP, Joyner AL. Gli genes in development and cancer. *Oncogene*. 1999 Dec 20;18(55):7852–9.
54. Sadarangani A, Pineda G, Lennon KM, Chun H-J, Shih A, Schairer AE, et al. GLI2 inhibition abrogates human leukemia stem cell dormancy. *J Transl Med*. 2015 Jan;13:98.
55. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*. 2009 Sep;9(7):873–86.
56. Zhulyn O, Nieuwenhuis E, Liu YC, Angers S, Hui C. Ptch2 shares overlapping functions with Ptch1 in Smo regulation and limb development. *Dev Biol*. 2015 Jan 15;397(2):191–202.
57. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich L V, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996 Jun 14;272(5268):1668–71.
58. Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR, Birch JM. The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer*. 1991 Nov;64(5):959–61.
59. Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A. Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med*. 1998 May;4(5):619–22.

60. Goodrich L V, Milenković L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 1997 Aug 22;277(5329):1109–13.
61. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):846–51.
62. Park K-S, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, et al. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med*. 2011 Jan;17(11):1504–8.
63. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):851–6.
64. Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Philpott MP, et al. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res*. 2004 Nov 1;64(21):7724–31.
65. Cretnik M, Musani V, Oreskovic S, Leovic D, Levanat S. The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. *Int J Mol Med*. 2007 Jun;19(6):875–83.
66. Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo G-R, et al. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*. 2007 Aug;13(8):944–51.
67. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*. 2009 May 9;458(7239):776–9.
68. Dierks C, Beigi R, Guo G-R, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell*. 2008 Sep 9;14(3):238–49.
69. Woessner Casas S FBL. *La Citología óptica en el diagnóstico Hematológico*. 5^a Edición. Madrid: Acción Médica, Fundación de Hematología y Hemoterapia; 2006.
70. Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, et al. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med*. 1987 Sep;83(3):445–54.
71. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia:

- recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1809–20.
72. Baccharani 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 Dec 10;27(35):6041–51.
 73. Porkka K, Khoury HJ, Paquette RL, Matloub Y, Sinha R, Cortes JE. Dasatinib 100 mg once daily minimizes the occurrence of pleural effusion in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase and efficacy is unaffected in patients who develop pleural effusion. *Cancer*. 2010 Jan 15;116(2):377–86.
 74. Baccharani 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 Aug 8;122(6):872–84.
 75. Marzocchi G, Castagnetti F, Luatti S, Baldazzi C, Stacchini M, Gugliotta G, et al. Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6793–800.
 76. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6760–8.
 77. Vardiman J, Bennett J, Bain B, Brunning R TJ. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Swerdlow Steven, Campo Elias, Harris Nancy, Jaffe Elaine, Pileri Stefano, Stein Harald, Thiele Jurgen VJ, editor. Lyon: IARC; 2008. 80-81 p.
 78. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2013 Jan;45(1):18–24.
 79. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med*. 2013 May 9;368(19):1781–90.
 80. Cross NCP, Hochhaus A, Müller MC. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: principles and interlaboratory standardization. *Ann Hematol*. 2015 Mar 27;94(S2):219–25.
 81. Vardiman J, Melo J, Baccharani M TJ. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth. Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al., editors. Lyon: International Agency for

Research on Cancer (IARC); 2008. 32-38 p.

82. Deininger MWN, Cortes J, Paquette R, Park B, Hochhaus A, Baccarani M, et al. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in philadelphia chromosome-negative cells. *Cancer*. 2007 Oct 1;110(7):1509–19.
83. Lee S-E, Choi SY, Bang J-H, Kim S-H, Jang E-J, Byeun J-Y, et al. The long-term clinical implications of clonal chromosomal abnormalities in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Cancer Genet*. 2012 Nov;205(11):563–71.
84. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006 Dec 15;12(24):7374–9.
85. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Talpaz M, Bekele N, O'Brien S, et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2006 Oct;20(10):1767–73.
86. 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 Jan 20;30(3):232–8.
87. Marin D, Hedgley C, Clark RE, Apperley J, Foroni L, Milojkovic D, et al. Predictive value of early molecular response in patients with chronic myeloid leukemia treated with first-line dasatinib. *Blood*. 2012 Jul 12;120(2):291–4.
88. Jain P, Kantarjian H, Nazha A, O'Brien S, Jabbour E, Romo CG, et al. Early responses predict better outcomes in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results with four tyrosine kinase inhibitor modalities. *Blood*. 2013 Jun 13;121(24):4867–74.
89. Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, Guilhot F, Guilhot J, Trabacchi E, et al. Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):3074–81.
90. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 1994 Mar 24;330(12):820–5.
91. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Harousseau JL, Maloisel F, et al. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N Engl*

J Med. 1997 Jul 24;337(4):223–9.

92. Goldman JM, Baughan AS, McCarthy DM, Worsley AM, Hows JM, Gordon-Smith EC, et al. Marrow transplantation for patients in the chronic phase of chronic granulocytic leukaemia. *Lancet* (London, England). 1982 Sep 18;2(8299):623–5.
93. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996 May;2(5):561–6.
94. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1031–7.
95. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002 Feb 28;346(9):645–52.
96. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Mar 13;348(11):994–1004.
97. Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood*. 2009 Oct 5;114(22):1126.
98. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Rios MB, Shan J, et al. Imatinib mesylate therapy improves survival in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in the chronic phase: comparison with historic data. *Cancer*. 2003 Dec 15;98(12):2636–42.
99. 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 Jul 10;26(20):3358–63.
100. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia*. 2008 Jun;22(6):1200–6.
101. Kantarjian H, Shah NP, 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 Jun 17;362(24):2260–70.

102. Cortes J, Saglio G, Baccarani M, Kantarjian HM, Mayer J, Boqué C, et al. Final Study Results of the Phase 3 Dasatinib Versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Trial (DASISION, CA180-056). *Blood*. 2014;124(21):Abstract 152.
103. Giles FJ, le Coutre PD, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N, Ottmann OG, et al. Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study. *Leukemia*. 2013 Jan;27(1):107–12.
104. Saglio G, Kim D-W, 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 Jun 17;362(24):2251–9.
105. Larson RA, Kim D-W, Issaragrisil S, le Coutre P, Dorlhiac Llacer PE, Etienne G, et al. Efficacy and Safety of Nilotinib (NIL) vs Imatinib (IM) in Patients (pts) With Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP): Long-Term Follow-Up (f/u) of ENESTnd. *Blood*. 2014 Dec 5;124(21):4541.
106. Keller G, Schafhausen P, Brummendorf TH. Bosutinib: a dual SRC/ABL kinase inhibitor for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2009 Oct;2(5):489–97.
107. Cortes JE, Kim D-W, Kantarjian HM, Brummendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 1;30(28):3486–92.
108. 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 Feb 10;32(5):424–30.
109. Pfirrmann M, Lauseker M, Hoffmann VS, Hasford J. Prognostic scores for patients with chronic myeloid leukemia under particular consideration of competing causes of death. *Ann Hematol*. 2015 Apr;94 Suppl 2:S209–18.
110. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984 Apr;63(4):789–99.
111. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative

CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jun 3;90(11):850–8.

112. Hasford J, Baccarani 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 Jul 21;118(3):686–92.
113. Hoffmann VS, Baccarani M, Lindoerfer D, Castagnetti F, Turkina A, Zaritsky A, et al. The EUTOS prognostic score: review and validation in 1288 patients with CML treated frontline with imatinib. *Leukemia.* 2013 Jun 11;
114. Marin D, Ibrahim AR, Goldman JM. European Treatment and Outcome Study (EUTOS) score for chronic myeloid leukemia still requires more confirmation. *J Clin Oncol.* 2011 Oct 10;29(29):3944–5.
115. Jabbour E, Cortes J, Nazha A, O'Brien S, Quintas-Cardama A, Pierce S, et al. EUTOS score is not predictive for survival and outcome in patients with early chronic phase chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors: a single institution experience. *Blood.* 2012 May 10;119(19):4524–6.
116. Lucas CM, Harris RJ, Giannoudis A, Davies A, Knight K, Watmough SJ, et al. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Haematologica.* 2009 Oct;94(10):1362–7.
117. Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica.* 2014 Sep;99(9):1441–7.
118. Oehler VG, Yeung KY, Choi YE, Bumgarner RE, Raftery AE, Radich JP. The derivation of diagnostic markers of chronic myeloid leukemia progression from microarray data. *Blood.* 2009 Oct 8;114(15):3292–8.
119. McWeeney SK, Pemberton LC, Loriaux MM, Vartanian K, Willis SG, Yochum G, et al. A gene expression signature of CD34+ cells to predict major cytogenetic response in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Blood.* 2010 Jan 14;115(2):315–25.
120. Zheng C, Li L, Haak M, Brors B, Frank O, Giehl M, et al. Gene expression profiling of CD34+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK.* 2006 Jun;20(6):1028–34.
121. Yong ASM, Szydlo RM, Goldman JM, Apperley JF, Melo J V. Molecular profiling of CD34+ cells identifies low expression of CD7, along with high expression of

- proteinase 3 or elastase, as predictors of longer survival in patients with CML. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):205–12.
122. de Lavallade H, Finetti P, Carbuccia N, Khorashad JS, Charbonnier A, Foroni L, et al. A gene expression signature of primary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2010 Mar;34(2):254–7.
 123. Villuendas R, Steegmann JL, Pollán M, Tracey L, Granda a, Fernández-Ruiz E, et al. Identification of genes involved in imatinib resistance in CML: a gene-expression profiling approach. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK*. 2006 Jun;20(6):1047–54.
 124. Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2794–9.
 125. Oehler VG, Guthrie KA, Cummings CL, Sabo K, Wood BL, Gooley T, et al. The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3299–308.
 126. Zhang WW, Cortes JE, Yao H, Zhang L, Reddy NG, Jabbour E, et al. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Aug;27(22):3642–9.
 127. 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 Jan 24;121(4):628–37.
 128. Grinfeld J, Gerrard G, Alikian M, Alonso-Dominguez J, Ale S, Valgañon M, et al. A common novel splice variant of SLC22A1 (OCT1) is associated with impaired responses to imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2013 Dec;163(5):631–9.
 129. Huang Y, Zheng J, Hu JD, Wu YA, Zheng XY, Liu TB, et al. Discovery of somatic mutations in the progression of chronic myeloid leukemia by whole-exome sequencing. *Genet Mol Res*. 2014 Jan;13(1):945–53.
 130. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2408–17.
 131. O'Brien SG, Deininger MWN. Imatinib in patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2003 May;40(2 Suppl 2):26–30.

132. Foroni L, Wilson G, Gerrard G, Mason J, Grimwade D, White HE, et al. Guidelines for the measurement of BCR-ABL1 transcripts in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2011 Apr;153(2):179–90.
133. Foroni L, Gerrard G, Nna E, Khorashad JS, Stevens D, Swale B, et al. Technical aspects and clinical applications of measuring BCR-ABL1 transcripts number in chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2009 Aug;84(8):517–22.
134. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2318–57.
135. López-Jorge CE, Gómez-Casares MT, Jiménez-Velasco A, García-Bello MA, Barrios M, Lopez J, et al. Comparative study of BCR-ABL1 quantification: Xpert assay, a feasible solution to standardization concerns. *Ann Hematol*. 2012 Aug;91(8):1245–50.
136. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2474–86.
137. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
138. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.
139. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611–22.
140. Gerrard G, Hagkarim NC, Szydlo R, Alikian M, Alonso-Dominguez JM, Grinfeld J, et al. Transcript levels of the Hedgehog Pathway Members PTCH1 and SMO Are Predictive of Imatinib Failure in Pre-Treatment Chronic Myeloid Leukaemia. *Haematologica*. 2014;(s1):abstract.
141. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248–54.

142. M. DMJ. Fundamentos de Diseño y Estadística: Teoría y cálculo de probabilidades. Pruebas diagnósticas. 13ª edición. Signo, editor. Barcelona; 2012.
143. Domenech Massons Jose M NPJ. Análisis de la supervivencia y modelo de riesgos proporcionales de Cox. 6ª edición. Signo; 2011.
144. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Ellis JJ, et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest*. 2013 Oct;123(10):4144–57.
145. Domenech Massons JM. Fundamentos de Diseño y Estadística. Comparación de Varias medias: Análisis de la Variancia. Barcelona: Signo; 2012.
146. Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet*. 2000 Dec;67(5):1047–54.
147. Delgado Rodríguez Miguel, Llorca Díza Javier DMJM. Estudios para pruebas diagnósticas y factores pronósticos. Signo, editor. Barcelona; 2012.
148. Casado L-F, García-Gutiérrez J-V, Massagué I, Giraldo P, Pérez-Encinas M, de Paz R, et al. Switching to second-generation tyrosine kinase inhibitor improves the response and outcome of frontline imatinib-treated patients with chronic myeloid leukemia with more than 10% of BCR-ABL/ABL ratio at 3 months. *Cancer Med*. 2015;4(7):995–1002.
149. V, García Gutiérrez MT, Gómez Casares A, Jimenez Velasco JM, Alonso JC, Hernandez Boluda S, Osorio JM, Puerta R, Collado Ibáñez F MJ, Ramirez ML, Martín Mateos A, Rodríguez Fernández JD RG, D, Fiallo Suarez C, Martínez Laperche M, Gómez C R, S R, JL S. Valor de la Respuesta Molecular a los 3 Meses de Tratamiento en Pacientes con LMC Medido Mediante Plataforma Genexpert. *Haematologica*. 2015;100(S4):Abstract PC – 240.
150. Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W HR. Medicina Basada en la Evidencia. Cómo ejercer y enseñar la MBE. Livingston C, editor. Madrid; 1997.
151. Su W, Meng F, Huang L, Zheng M, Liu W, Sun H. Sonic hedgehog maintains survival and growth of chronic myeloid leukemia progenitor cells through β -catenin signaling. *Exp Hematol*. 2012 May;40(5):418–27.
152. Chomel J-C, Turhan AG. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncotarget*. 2011 Sep;2(9):713–27.

153. 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 Jan 1;99(1):319–25.
154. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, Baird JW, Allan EK, Jordanides N, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4532–9.
155. Jørgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, Mountford JC, Holyoake TL. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood*. 2007 May 1;109(9):4016–9.
156. König H, Holyoake TL, Bhatia R. Effective and selective inhibition of chronic myeloid leukemia primitive hematopoietic progenitors by the dual Src/Abl kinase inhibitor SKI-606. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2329–38.
157. Liao H-F, Su Y-C, Zheng Z-Y, Jhih Cai C, Hou M-H, Chao KSC, et al. Sonic hedgehog signaling regulates Bcr-Abl expression in human chronic myeloid leukemia cells. *Biomed Pharmacother*. 2012 Jul;66(5):378–83.
158. Shah NP, Cortes JE, Martinelli G, Smith BD, Clarke E, Copland M, et al. Dasatinib Plus Smoothed (SMO) Inhibitor BMS-833923 in Chronic Myeloid Leukemia (CML) with Resistance or Suboptimal Response to a Prior Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI): Phase I Study CA180323. *Blood*. 2014 Dec 5;124(21):4539.

ANEXOS

Hoja de información y Consentimiento informado para recogida prospectiva de muestras para estudios in-vitro

HOJA INFORMACIÓN AL PACIENTE (ADULTOS)

Título del Estudio: Medición de la expresión del gen PTCH1 para predecir la respuesta al tratamiento de la leucemia mieloide crónica en fase crónica

Investigadores Principales: Joaquín Martínez-López- Juan Manuel Alonso.

Teléfono de contacto 917792787.

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal consistirá en determinar marcadores genéticos para predecir la respuesta al tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica.

En este estudio participarán los Servicios de Hematología del Hospital 12 de Octubre así como otros servicios de hematología de otros hospitales españoles. Se estima que participen un total de 120 pacientes.

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo la identificación de posibles factores genéticos relacionados con esta podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que la padecen y contribuir a una mejor selección del tratamiento.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que Ud. precise y la relación con el Equipo Médico que le atiende no va a verse afectada.

Se le pedirá su consentimiento para la extracción de muestras de médula ósea y su posterior cultivo in vitro y tratamiento con los inhibidores de trosinquinasa imatinib,

dasatinib y nilotinib. Se medirá el grado de respuesta a éstos fármacos y se relacionará con la expresión de un gen llamado PTCH1.

Las muestras serán almacenadas utilizando códigos numéricos sin que en el registro conste el nombre u otros datos personales del enfermo. El responsable de dicho registro será el Dr. Joaquín Martínez López. A estos datos sólo tendrán acceso el equipo investigador manteniendo la confidencialidad de los datos (Ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal).

El paciente puede solicitar la destrucción de los mismos así como de las muestras almacenadas cuando lo desee dirigiéndose al centro de almacenamiento (Hospital Universitario 12 de Octubre): Tfno 913098495.

Si con posterioridad a haber dado el consentimiento para la realización de la prueba, el paciente desea revocarlo, podría hacerlo libremente en cualquier momento y en ningún momento ni bajo ningún concepto dicha información o dichas muestras biológicas serán empleadas con otros fines diferentes a los aquí expuestos. En caso de que así fuera, sería informado, y se solicitaría un nuevo consentimiento para los mismos.

La cesión de tejidos para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la Medicina en beneficio de la Sociedad, y el saber que ha colaborado en este proceso. El tejido así recogido no podrá ser objeto directo de actividad con ánimo de lucro.

También contempla la ley que al concluir la investigación usted tendrá derecho a ser informado de sus datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la misma, si usted no renuncia a este derecho.

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial. Cada una de las muestras del estudio recibirá un número y nunca el equipo investigador que lleve a cabo el análisis genético conocerá su identidad. Se le ha dicho a su médico que

guarde esta Hoja de información y la Hoja de su Consentimiento otorgado con su firma en un archivo especial seguro que no forma parte de su historia clínica. Su historia clínica no contiene ninguno de los resultados genéticos. Representantes del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital y de las Autoridades Sanitarias Españolas podrán tener acceso a sus registros médicos con el fin de controlar y garantizar la correcta realización del estudio.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, Congresos Médicos o publicaciones científicas, sin embargo se mantendrá una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

Los resultados de las investigaciones serán públicos y bajo ningún concepto las muestras serán motivo de lucro directo.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, (Nombre y apellidos),

He sido informado por el médico abajo mencionado:

- Sobre que mi participación en este proyecto es totalmente voluntaria y sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Sobre el fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales (estudios genéticos, de salud pública o estadísticos, que cumplan todos los requisitos que exige la ley).
- Que mis muestras y datos serán proporcionados de forma codificada (sin que se me pueda identificar) a los investigadores que trabajen con ellas.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación de mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas en el Hospital U. 12 de Octubre.
- Que en cualquier momento puedo solicitar información sobre los estudios para los que se han utilizado mis muestras de sangre y médula ósea.
- Que tengo derecho de acceso a los datos asociados a mis muestras.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

Accedo a que los médicos del Servicio de Hematología del Hospital
me contacten en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.

Sí No

Fecha: Firma del paciente:

Fecha: Firma del médico:

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo,revoco el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado.

Fecha de la revocación.....

Firma:

Proteínas Incluidas en el Array

Bcl-2

Bad

Bax

Bcl-x

Pro-Caspase-3

Cleaved Caspase-3

Catalase

cIAP-1

cIAP-2

Claspin

Clusterin

Cytochrome c

TRAIL R1 / DR4

TRAIL R2 / DR5

FADD

Fas / TNFRSF6 / CD95

HIF-1 α

HO-1 / HMOX1 / HSP32

HO-2 / HMOX2

HSP27

HSP60

HSP70

HTRA2 / Omi

Livin

PON2

p21 / CIP1 / CDKN1A

p27 / Kip1

Phospho-p53 (S15)

Phospho-p53 (S46)

Phospho-p53 (S392)

Phospho-Rad17 (S635)

SMAC / Diablo

Survivin

TNF RI / TNFRSF1A

XIAP

Publicaciones y reconocimientos derivados del estudio

Sobre el estudio expuesto en esta tesis doctoral se han enviado dos comunicaciones al congreso americano de Hematología (ASH) en los años 2012 y 2015.

La del año 2012 (<https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper53994.html>) fue aceptada como comunicación oral en la sesión "*Leukemias - Biology, Cytogenetics and Molecular Markers in Diagnosis and Prognosis: Chronic Lymphoid and Myeloid Leukemias and Biological studies on acute leukemia* " que fue moderada por el doctorando.

La del año 2015 ha sido aceptada como póster (<https://ash.confex.com/ash/2015/webprogram/Paper85599.html>).

Además, un artículo fue publicado en el año 2014 en la revista American Journal of Hematology (puede verse a continuación). Derivado de esta publicación el doctorando ha sido nominado para el premio Young Researcher Award 2015 de la citada revista, el cual se entregará en ASH 2015.

PTCH1 expression at diagnosis predicts imatinib failure in chronic myeloid leukaemia patients in chronic phase

Juan M. Alonso-Dominguez,¹ Jacob Grinfeld,^{1,2} Mary Alikian,¹ David Marin,^{1,2} Alistair Reid,^{1,2} Mustafa Daghistani,¹ Corinne Hedgley,³ Stephen O'Brien,³ Richard E. Clark,⁴ Jane Apperley,^{1,2} Letizia Foroni,^{1,2} and Gareth Gerrard^{1*}



The tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib has revolutionized the management of chronic myeloid leukaemia (CML). However, around 25% of patients fail to sustain an adequate response. We sought to identify gene-expression biomarkers that could be used to predict imatinib response. The expression of 29 genes, previously implicated in CML pathogenesis, were measured by TaqMan Low Density Array in 73 CML patient samples. Patients were divided into low and high expression for each gene and imatinib failure (IF), probability of achieving CCyR, progression free survival and CML related OS were compared by Kaplan–Meier and log-rank. Results were validated in a second cohort of 56 patients, with a further technical validation using custom gene-expression assays in a conventional RT-qPCR in a sub-cohort of 37 patients. Patients with low *PTCH1* expression showed a worse clinical response for all variables in all cohorts. *PTCH1* was the most significant predictor in the multivariate analysis compared with Sokal, age and EUTOS. *PTCH1* expression assay showed the adequate sensitivity, specificity and predictive values to predict for IF. Given the different treatments available for CML, measuring *PTCH1* expression at diagnosis may help establish who will benefit best from imatinib and who is better selected for second generation TKI.

Am. J. Hematol. 90:20–26, 2015. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Introduction

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a clonal disorder of the pluripotent hematopoietic stem cell compartment, characterized by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, giving rise to the *BCR-ABL1* oncogene. The resulting BCR-ABL1 fusion protein has a constitutive tyrosine kinase activity with multiple downstream targets, affecting proliferation, apoptosis, adhesion and DNA repair pathways, and driving leukemogenesis. This aberrant tyrosine kinase activity was identified as a putative therapeutic target, leading to the development of imatinib mesylate, the first-in-clinic tyrosine kinase inhibitor (TKI), which revolutionized the treatment of CML [1].

However, ~25% of patients will discontinue imatinib for lack of efficacy due to the development of primary or secondary (acquired) resistance [2]. It is hypothesized that as yet unidentified genetic markers are associated with failure to achieve an optimal response in patients otherwise presenting with *BCR-ABL1* as the sole identifiable molecular abnormality. The ability to identify this subgroup of patients using a simple test at diagnosis could guide the upfront use of more potent second and third generation TKI drugs (or other agents) with the aim to induce response, prevent resistance and improve overall outcome.

Over the last decade, several gene expression profile (GEP) studies using microarray gene-expression platforms have attempted to identify a signature capable of distinguishing imatinib responders and non-responders (historically judged by achievement of CCyR at 12–18 months) or the different phases of the disease [3–5]. However, there has been a low degree of gene-of-interest concordance between the studies, probably in part due to confounding factors such as the heterogeneity of starting material (CD34⁺ cells, peripheral blood mononuclear cells, total whole blood cells) and the variety of chemotherapeutic agents received by the patients preceding imatinib [6–9]. In addition, there are clinical risk scores, including Sokal and EUTOS, which have been used to predict response to imatinib [10,11]. In spite of the good results obtained when applied to large cohorts of patients they seem less useful in decision making for individual patients. Because of these factors, neither clinical nor gene-expression markers are currently being applied to predict imatinib response at diagnosis [12].

In this study, we employed TaqMan Low Density Array (TLDA) technology (Life Technology, Carlsbad, USA) to measure the relative expression of 29 genes (plus three control genes) selected from published GEP studies with a focus on those markers that have been identified by more than one study. The primary endpoint was to predict for imatinib failure (IF) as defined previously [2]. A pilot cohort was analyzed and those genes with prognostic significance, for IF or other secondary endpoints, were validated in a second, independent cohort composed of patients enrolled in the SPIRIT I (phase III UK multi-centre) clinical trial. The top candidate genes were then taken forward for a technical validation by

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

¹Centre for Haematology, Department of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom; ²Department of Medicine, Imperial College Healthcare NHS Trust, Hammersmith Hospital, London, United Kingdom; ³Academic Haematology, Northern Institute for Cancer Research, Newcastle University Medical School, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom; ⁴Department of Haematology, Royal Liverpool University Hospital, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom.

Conflict of interest: The authors can confirm no conflict of interests associated with this study.

***Correspondence to:** Dr. Gareth Gerrard, Imperial Molecular Pathology, 2nd Floor G-Block, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London, UK, W12 0NN. E-mail: g.gerrard@imperial.ac.uk

Contract grant sponsor: Fundación Leucemia y Linfoma and Fundación Vistare; Leuka Pilot Grant; NIHR Biochemical Research Centre Funding Scheme.

Received for publication: 17 September 2014; **Accepted:** 17 September 2014

Am. J. Hematol. 90:20–26, 2015.

Published online: 22 September 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/ajh.23857

