

VNIVERSITAT ID VALÈNCIA



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
Departamento de Medicina
Programa de Doctorado Medicina 260S

INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Tesis doctoral presentada por Paula Amat Martínez

Tutor de tesis: Dr. D. Carlos Solano Vercet

Directores de tesis:

Dr. D. Juan Carlos Hernández Boluda

Dr. D. Vicent Guillem Primo

Valencia, 2015

D. Juan Carlos Hernández Boluda, Doctor en Medicina Y Cirugía por la Universidad Autónoma de Barcelona, Colaborador docente del Departamento Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

D. Vicent. Guillem Primo, Doctor en Ciencias Químicas Universidad de Valencia. Investigador postdoctoral INCLIVA, Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA”, presentado por Dña. Paula Amat Martínez para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos establecidos por la legislación vigente para su presentación y defensa frente al Tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, Septiembre 2015.

Fdo. Juan Carlos Hernández Boluda

Fdo. Vicent Guillem Primo

D. Carlos Solano Vercet, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia , Profesor titular del Departamento Medicina de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, Jefe de Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA”, presentado por Dña. Paula Amat Martínez para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado bajo su tutoría y reúne los requisitos establecidos por la legislación vigente para su presentación y defensa frente al Tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, Septiembre 2015.

Fdo. Carlos Solano Vercet

“...si no fuera por la gran variabilidad entre los pacientes la medicina podría ser considerada como ciencia y no como arte”

“The Principles and Practice of Medicine” William Osler, 1892

Als meus pares i al meu fill

Espere poder donar-li tot el que vosaltres ens heu donat a nosaltres

AGRADECIMIENTOS

A Juan Carlos, porqué sin tu ayuda este trabajo no hubiera sido posible, gracias por tus críticas y por cada palabra de ánimo. Gracias siempre, por tus consejos.

A Carlos, por ser mi tutor, y por darme la oportunidad de formar parte del Servicio de Hematología del Hospital Clínico con tu inestimable ayuda en la solicitud de proyectos y tu confianza en mí.

A Vicent, por tu formación y ayuda en el aprendizaje de la parte técnica de este proyecto, el año en tu laboratorio pasó volando. Gracias por tus correcciones.

A mis compañeras del laboratorio, Blanca, María José, Montse da gusto trabajar con vosotras, de todas tengo que aprender. Sin olvidar a Isana y a Maribel, todo un referente. A Blanca y Ariadna, por estar siempre dispuestas.

A mis “adjuntos”, ahora compañeros, porqué de todos aprendí y de todos quiero seguir aprendiendo. Anabel, Cristina, Mar, María José, Marisa, Rosa, José Luis.

A Ana y Andrés por vuestras lecciones, vuestra dedicación y confianza. A todos mis compañeros de Oncología y a todo el equipo de técnicos y enfermería que colaboran en este y en muchos otros proyectos.

A todos los pacientes, para que este trabajo no sea sólo un esfuerzo académico, sino un esfuerzo por intentar mejorar la atención y cuidado de su enfermedad.

A Andrés mi padre por todo lo que aprendimos de ti y por estar siempre intercediendo por nosotros. A Carmen, mi madre, por ser la mujer más valiente que conozco, imposible agradecerte todo lo que eres para mí.

A Andrés, mi hermano, por tu generosidad y bondad, siempre estás ahí.

A Juanma, por tu apoyo, tu paciencia, tus consejos y correcciones, por aguantar mi humor estos últimos meses.

A mi Juanmeta, el meu amoret.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	XI
ÍNDICE	1
ABREVIATURAS.....	5
INDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
II INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA FILADELFIA POSITIVA	15
1.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	15
1.2 ETIOLOGIA.....	16
1.3 PRESENTACIÓN CLÍNICA.....	17
1.4 PATOGENÉISIS DE FASE CRÓNICA	19
1.5 PATOGENÉISIS DE LA PROGRESIÓN A CRISIS BLÁSTICA	39
1.6 TRATAMIENTO	45
2. VARIABILIDAD GENÉTICA HUMANA Y SU INFLUENCIA EN LA LMC.....	55
2.1 POLIMORFISMOS GENÉTICOS	56
2.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN HEMATOLOGÍA	66
3. POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNPS) EN LA LMC.....	82
3.1 SNPs Y SUSCEPTIBILIDAD A LMC	82
3.2 SNPs Y FARMACOGENÓMICA EN LA LMC	84
3.3 SNPs Y SUPERVIVENCIA EN LA LMC	88

Índice

I.II HIPÓTESIS DE TRABAJO:	92
I.III OBJETIVOS CONCRETOS:	92
II. SUJETOS A ESTUDIO Y METODOLOGÍA	97
1. SUJETOS A ESTUDIO.....	97
2. METODOLOGÍA:	98
2.1 ESTUDIOS DIAGNÓSTICOS Y DE SEGUIMIENTO.....	98
2.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA.....	99
2.3 EXTRACCIÓN DEL ADN.....	102
2.4 GENOTIPADO DE LOS SNPs.....	103
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	114
III. RESULTADOS	121
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	121
2. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO CON IMATINIB.....	123
3. INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR UNA LMC.	126
4. RELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	130
5. INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IMATINIB	133
6. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS Y ASOCIACIONES	172
7. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DEL EFECTO DE LOS FACTORES CLINICOS Y GENETICOS EN LOS RESULTADOS DEL TRATAMIENTO CON IMATINIB	180

Índice

IV. DISCUSIÓN	189
V. CONCLUSIONES	209
VI. BIBLIOGRAFÍA	215

Índice

Abreviaturas

Abreviaturas

LMC	Leucemia Mieloide Crónica
Ph	Philadelphia
Gy	Gray
ADN	Ácido desoxiribonucleico
FC	Fase crónica
CB	Crisis blástica
FA	Fase acelerada
OMS	Organización Mundial de la Salud
LA	Leucemia aguda
t	Traslocación
SLP	Síndromes linfoproliferativos
ABL	Abelson
BCR	Breakpoint cluster region
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
M-BCR	Major break point cluster region
q	Brazo largo del cromosoma
kDa	Kilodalton
ARN	Ácido ribonucleico
IFN	Interferón
PTP	Proteínas tirosin fosfatasas
SOCS	Proteínas inhibidoras de la señalización de citocinas
CD	Cluster de diferenciación
GM-CSF	Colonia estimuladora de granulocito-macrófago
NER	Reparación por escisión de nucleotidos
Il	Interleucina
Pk	Proteincinasa
Uv	Ultravioleta

Abreviaturas

DSB	Double strand break
TKI	Inhibidores de tirosina cinasa
HSC	Células stem hematopoyéticas
LSC	Células stem leucémicas
ROS	Radicales libres de oxígeno
Hh	Hedgehog
Smo	Smoothened
RCC	Respuesta Citogenética Completa
ATP	Adenosin Trifosfato
Ara-C	Arabinósido de Citosina
RMM	Respuesta Molecular Mayor
RCM	Respuesta Citogenética Mayor
PETHEMA	Fundación para el Tratamiento de la Leucemia y Linfoma
AGP	Alfa 1-glicoproteína ácida
SNP	Polimorfismos de nucleotido único
rs	Reference SNP
IDP	Polimorfismos de inserción-delección
ELN	European Leukemia Net
PTC	Codones de terminación temprana
pb	Pares de bases
HLA	Antígeno leucocitario humano
C	Citosina
T	Timina
A	Adenina
U	Uracilo
dbSNP	Base de datos de SNP
kb	Kilobases
SSA	single-strand annealing

Abreviaturas

NHEJ	nonhomologous end joining
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
STR	Repeticiones cortas en tándem
GWAS	Asociación para el estudio del genoma completo
CYP	Citocromo P 450
GST	Glutation -S transferasa
LMA	Leucemia mieloide aguda
DSB	Ruptura de doble cadena
LS	Leucemias secundarias
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NER	Reparación de escisión de nucleótidos
TS	Timidilato sintetasa
TCR	Reparación de la transcripción
UTR	Región no traducida
UMP	Uridin monofosfato
TMP	Timidilato
OR	Odds ratio
Cds	Coding sequence
IC	Intervalo de confianza
EICH	Enfermedad injerto contra huesped
Hb	Hemoglobina
AIC	Akaike
BIC	Bayesiano
Cmin	Concentración mínima
mg	Miligramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	PCR en tiempo real
FISH	Hibridación in situ fluorescente

Abreviaturas

SLF (TFS)	Supervivencia libre de fallo
RHC	Respuesta hematológica completa
RCP	Respuesta citogenética parcial
SLF (FFS)	Supervivencia libre de fallo
SLT	Supervivencia libre de transformación a fases avanzadas
LD	Desequilibrio de ligamiento
mg	miligramos
ACC/Ph+	Anomalías cromosómicas clonales en células Ph+
HR	Hazard ratio
CBI	Crisis blástica inicial

Índice de tablas

Tabla 1. Evaluación de respuesta según la European Leukemia Net 2009.....	100
Tabla 2. Valoración de la respuesta al tratamiento con imatinib.....	101
Tabla 3. SNPs a estudio de genes involucrados en las vías reparadoras del ADN, detoxificadores y GAB2.....	105
Tabla 4. SNPs a estudio de genes de la vía de señalización de BCR/ABL.....	107
Tabla 5. SNPs estudiados implicados en la respuesta al tratamiento y BCL2.....	109
Tabla 6. Características clínicas de los 190 pacientes incluidos en el estudio de predisposición a desarrollar una LMC.....	122
Tabla 7. Características clínicas de la serie de pacientes tratados con imatinib incluidos en el estudio de asociación entre SNPs y respuesta a imatinib.....	122
Tabla 8. Frecuencia acumulada de respuesta subóptima y fallo al tratamiento con imatinib.....	125
Tabla 9. Influencia de la variabilidad genética en la susceptibilidad a desarrollar LMC.....	126
Tabla 10. Análisis univariante de asociación entre los SNPS de BCL2 y la susceptibilidad a desarrollar una LMC ajustados por sexo y edad.....	129
Tabla 11. Asociación entre SNPS de BCL2 e índice de Sokal.....	131
Tabla 12. Asociación entre SNPS de BCL2 y el riesgo de crisis blástica inicial.....	132
Tabla 13. Resultados del análisis de asociación de haplotipos de BCL2 con el índice de Sokal.....	132
Tabla 14. SNPs y probabilidad de obtener RHC a los 3 meses.....	134
Tabla 15 SNPs y probabilidad de obtener RCC.....	136
Tabla 16. SNPs y riesgo de pérdida de respuesta hematológica.....	138
Tabla 17. SNPs y riesgo de pérdida de respuesta citogenética.....	141
Tabla 18. SNPs y riesgo de pérdida de respuesta molecular.....	144

Índice de tablas

Tabla 19. SNPs y riesgo de transformación a fases avanzadas de la LMC.....	146
Tabla 20. SNPs y probabilidad de respuesta subóptima a los 12 meses.....	149
Tabla 21. SNPs y probabilidad de fallo a los 12 meses.....	151
Tabla 22. SNPs y probabilidad de respuesta subóptima y el fallo a los 12 meses.....	154
Tabla 23. SNPs y probabilidad de respuesta subóptima a los 18 meses.....	156
Tabla 24. SNPS y probabilidad de fallo a los 18 meses.....	159
Tabla 25. SNPs y probabilidad de respuesta subóptima y fallo a los 18 meses.....	162
Tabla 26. SNPS y probabilidad de respuesta subóptima en cualquier momento del tratamiento.....	164
Tabla 27. SNPS y probabilidad de fallo al tratamiento en cualquier momento evolutivo.....	167
Tabla 28. SNPS y probabilidad de respuesta inadecuada en cualquier momento evolutivo.....	170
Tabla 29. Análisis de asociación de haplotipos del gen XPC con la respuesta a imatinib.....	172
Tabla 30. Análisis de asociación de haplotipos del gen XPC vs respuesta a imatinib..	173
Tabla 31. Análisis de regresión logarítmica considerando todas las combinaciones de haplotipos de XPC.....	174
Tabla 32. Impacto del haplotipo CA en la respuesta al tratamiento con imatinib.....	174
Tabla 33. Resumen de la asociación entre el genotipo y la respuesta a imatinib.....	177
Tabla 34. Análisis de los factores asociados con el fallo al tratamiento con imatinib a los 18 meses.....	181
Tabla 35. Análisis de los factores clínicos y genéticos asociados con la supervivencia libre de fallo al tratamiento con imatinib.....	182
Tabla 36. Factores y grupos de riesgo del modelo predictivo de la supervivencia libre de fallo.....	183

Índice de figuras

Figura 1. Cromosoma Filadelfia (Ph).....	21
Figura 2. Esquema de las proteínas Bcr, Abl y de fusión BCR-ABL.....	22
Figura 3. Formas de la oncoproteína BCR-ABL.....	25
Figura 4. Vías de transducción de señal implicadas en la LMC.....	29
Figura 5. Patogénesis de la progresión a crisis blástica.....	40
Figura 6. Modo de acción de imatinib.....	47
Figura 7. Factores que influyen en la resistencia a imatinib.....	51
Figura 8. Esquema de los polimorfismos genéticos de un único nucleótido.....	60
Figura 9. Nomenclatura de SNP en función de la localización en el gen.....	62
Figura 10: Discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman.....	110
Figura 11. Genotipado por sondas Taqman.....	112
Figura 12. Diseño de la placa de 384 pocillos.....	113
Figura 13. Procedimiento de la PCR con sondas Taqman.....	114
Figura 14. Relación entre genotipo de XPC y supervivencia.....	176
Figura 15. Supervivencia libre de fallo según el grupo de riesgo.....	185

Índice de figuras

INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Introducción

I. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I.I INTRODUCCIÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA FILADELFIA POSITIVA

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa crónica de carácter clonal con origen en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas. Aunque se caracteriza fenotípicamente por la proliferación de la línea mieloide, puede considerarse una verdadera panmielopatía de naturaleza clonal en la que se ven afectados tanto monocitos, eritroblastos y megacariocitos, como linfocitos B y T. Este clon proviene de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, que conduce a un brazo largo claramente acortado de uno de los cromosomas 22, conocido como cromosoma *Filadelfia* (Ph), que se adquiere en una célula troncal hematopoyética dada su presencia en células tanto de la serie mieloide como de la serie linfoide [1]. Dicho cromosoma genera el oncogén *BCR/ABL*, que da lugar a la síntesis de una proteína con actividad tirosinacinasasa aumentada, la proteína BCR/ABL[2].

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La LMC representa el 10% del total de leucemias en los individuos adultos y su incidencia se estima en 0,7-1 casos por 100.000 habitantes y año. Sin embargo, su prevalencia se cifra en torno a 10-12 casos por 100.000 habitantes, debido al incremento en la supervivencia de los pacientes registrado en la última década. La edad mediana en el momento del diagnóstico se sitúa alrededor de los 50 años pero puede aparecer a

Introducción

cualquier edad, con un ligero predominio en varones (ratio hombre/mujer 1,2-1,7) [3, 4].

1.2 ETIOLOGIA

El agente etiológico que más claramente se ha relacionado con el desarrollo de la LMC es la exposición a dosis altas de radiación ionizante. Dicho hecho se ha objetivado en los estudios de japoneses expuestos a la radiación liberada por las detonaciones de las bombas atómicas en Hiroshima y Nagasaki, en británicos con espondilitis anquilosante tratados con irradiación espinal y en mujeres con carcinoma cervical uterino que precisaron de radioterapia, dado que la incidencia de LMC en estas poblaciones fue significativamente mayor a la esperada. La mediana de período de latencia fue de 4 años en los espondiloartrósicos irradiados, 9 años en los pacientes con cáncer cervical y 11 años en los japoneses supervivientes a las bombas atómicas. Algunos autores han calculado que la probabilidad de inducir una t(9;22) puede ser de 7×10^{-12} por Gy de radiación y célula expuesta [5-8].

Por otro lado, recientemente se ha descrito la asociación entre el tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II del ADN y el riesgo de leucemia aguda Ph positiva [9-11]. Asimismo, en un metaanálisis realizado por Vlaanderen y cols se objetivó que la exposición ocupacional al benceno se acompañaba de un mayor riesgo de desarrollar LMC, de forma análoga a lo observado con la leucemia aguda (LA) y los síndromes linfoproliferativos (SLP) [12].

Introducción

De cualquier forma, cabe decir que en la mayoría de los pacientes con LMC no existe ninguna causa predisponente.

1.3 PRESENTACIÓN CLÍNICA

En la actualidad, la LMC se diagnostica de forma casual en muchos pacientes, tras una analítica de control realizada por otros motivos.

Desde el punto de vista clínico, la LMC sigue típicamente un curso evolutivo bifásico. La mayoría de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica (FC) de la enfermedad, en la que las manifestaciones derivadas de la mieloproliferación (sintomatología constitucional, leucocitosis, esplenomegalia) son fácilmente controlables con diferentes agentes terapéuticos, permitiendo que los enfermos lleven una vida prácticamente normal [1]. Sin embargo, la evolución natural de la enfermedad conduce a la aparición, tras un período variable de entre 3 y 6 años, de la fase terminal o crisis blástica (CB), caracterizada por un cuadro de insuficiencia medular, similar al de las leucemias agudas y generalmente refractario al tratamiento [13, 14].

En alrededor de la mitad de los casos la transición de la LMC de la FC a la CB no es brusca, intercalándose entre ambas fases un período intermedio, la fase de aceleración (FA), cuya duración rara vez sobrepasa el año. En ella, los pacientes presentan un deterioro progresivo de su estado general, con aparición de sintomatología constitucional, dolores óseos persistentes y crecimiento progresivo del bazo a pesar del

Introducción

tratamiento. El paso de una fase a otra se define mediante la evolución de los parámetros clínicos y analíticos [14-19].

En la FC de la LMC los pacientes presentan leucocitosis intensa, con mielema, basofilia y un porcentaje variable de blastos circulantes. El recuento de plaquetas también está elevado en aproximadamente el 50% de los pacientes. La sintomatología clínica, cuando la hay, consiste en astenia, anorexia, sudoración, fiebre, dolores óseos y síntomas secundarios a la esplenomegalia. Ocasionalmente la enfermedad puede debutar con una crisis de artritis gotosa, priapismo, acúfenos o dolor secundario a infartos esplénicos.

En cuanto a la FA de la LMC, se consideran criterios de progresión el incremento de blastos circulantes o de basófilos, las citopenias no atribuibles al tratamiento y el deterioro clínico del paciente, por aparición de fiebre, sudoración, dolores óseos, dolor abdominal, púrpura o aumento de infecciones y aparición de anomalías cromosómicas asociadas (ACA) [14, 17].

En aproximadamente un 5% de los casos la LMC se encuentra en fase de CB en el momento del diagnóstico, lo que sugiere la existencia de una fase crónica subclínica que ha pasado desapercibida. La CB de la LMC se define por la presencia de más de 20% de blastos en sangre periférica o en médula ósea (OMS 2008). Desde el punto de vista fenotípico, las células blásticas pueden expresar marcadores de cualquier línea

Introducción

hematopoyética, lo que indica que la clona que da origen a la CB deriva de una célula madre pluripotencial muy indiferenciada [20, 21]. Así, en la mayoría de los casos los blastos presentan un fenotipo mieloide, asociándose frecuentemente un componente minoritario de estirpe megacarioblástica, cerca de una cuarta parte presentan un fenotipo linfoide, mientras que son mucho más raras las CB de estirpe eritroide. Esta variabilidad fenotípica de la CB tiene importantes implicaciones clínicas, terapéuticas y pronósticas. Las CB linfoides suelen tener un inicio brusco, habitualmente sin fase de aceleración previa, y presentan con menor frecuencia basofilia en sangre periférica, esplenomegalia y hepatomegalia que las de estirpe no linfoide, por el contrario, la infiltración blástica de la médula ósea suele ser mayor.

Los pacientes en CB tienen mal pronóstico, con una mediana de supervivencia de 3 a 6 meses [14]. Históricamente, la elevada tasa de respuestas en las CB linfoides a esquemas de tratamiento que incluyen vincristina y prednisona ha prolongado la supervivencia de este subgrupo de respecto al resto de enfermos (12 y 3-5 meses, respectivamente)[22-24]. Sin embargo, el tratamiento con los inhibidores de la proteína tirosinacinasasa BCR-ABL, han sido capaces de inducir respuestas mantenidas en una cierta proporción de enfermos con CB de fenotipo mieloide, siendo menor su eficacia en aquellos con CB linfoide [25, 26].

1.4 PATOGENÉISIS DE FASE CRÓNICA

1.4.1 ALTERACIONES GENÉTICAS DE LA LMC

Introducción

La LMC es la primera enfermedad neoplásica para la que se describió una alteración genética característica. Su descripción clínica se remonta a mediados del siglo XIX [27-29], si bien no fue hasta 1960 cuando Nowell y Hungerford describieron un pequeño cromosoma en los cultivos celulares de sangre de pacientes con LMC, cromosoma que era similar al cromosoma Y pero estaba presente en el cariotipo de mujeres afectas [29-31]. En 1973, Rowley demostró que el cromosoma Ph era en realidad el resultado de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)]. No obstante, tuvieron que transcurrir 10 años más para que se descubriera que los genes implicados en dicha translocación eran el protooncogén *ABL* y el gen *BCR*, localizados en los cromosomas 9 y 22, respectivamente [32]. En 1980 se describió que el homólogo humano del gen murino Abelson (*Abl*) se localizaba normalmente en el cromosoma 9, pero era translocado al cromosoma Ph en la LMC. En 1984, Groffen y cols describieron 17 casos de LMC en los que el punto de rotura se localizaba en una región de 5,8 kb en el cromosoma 22 al que denominaron “breakpoint cluster region”. Se mostró a posteriori que dicha región constituía parte del gen conocido ahora como *BCR* [33]. El cromosoma Ph no es exclusivo de la LMC, dado que se encuentra presente en un 5% de leucemias agudas linfoblásticas (LLA) de los niños y en un 25% de las de los adultos.

Al diagnóstico de la LMC Ph+ casi la totalidad de las metafases de médula ósea son positivas para el cromosoma Ph. Un pequeño porcentaje de pacientes, entre un 5 y un 10% del total, tienen otras alteraciones citogenéticas además del cromosoma Ph. Sin

Introducción

embargo, hasta un 50-80% de los pacientes con CB adquieren alteraciones citogenéticas adicionales en la clona proliferante Ph-positiva, fenómeno conocido como evolución clonal. A este respecto, las alteraciones más frecuentes son la trisomía 8 y la duplicación del cromosoma Ph, seguidas del isocromosoma 17q y la trisomía 19.

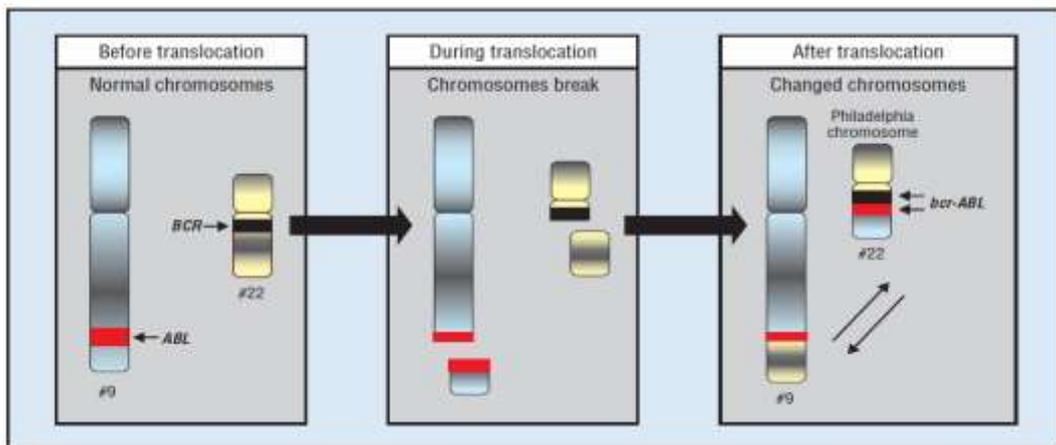


Figura 1: Cromosoma Filadelfia (Ph). Figura tomada de Lori A. Hazlehurst et al [34]

1.4.2 ALTERACIONES MOLECULARES DE LA LMC

Actualmente se conocen los puntos de ruptura donde se produce la translocación de los cromosomas 9 y 22. Esta ocurre en el brazo largo del cromosoma 9 (banda 9q34), entre los exones Ia y Ib del gen *ABL*, y en la mitad más alta del brazo largo del cromosoma 22 (banda 22q11), en la gran mayoría de los casos en la región específica denominada *major break point cluster region* (M-BCR) [35]. El gen *ABL* humano, situado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34), comprende 11 exones y codifica la

Introducción

alrededor de los cromosomas en células en mitosis sugiere su posible implicación en la regulación del ciclo celular [41].

Con la formación del cromosoma Ph el segmento 3' del gen *ABL* (9q34) se yuxtapone a la región 5' del gen *BCR* (22q11), dando origen al gen híbrido *BCR-ABL*[42, 43]. Existen tres formas de oncoproteína BCR-ABL en función del punto de ruptura dentro del gen *BCR*. La más común es la proteína p210kDa (transcritos b2a2 y b3a2) que se encuentra en la mayoría de los casos de LMC y en un tercio de las LLA Ph positivas[44-47]. La proteína p190 kDa (transcrito e1a2) se expresa en el resto de las LLA y rara vez en pacientes con LMC, se asocia a monocitosis y a una enfermedad de curso agresivo. Por último, la proteína de fusión p230 kDa (transcrito e19a2) se asocia a la denominada variante neutrofilica de la LMC, caracterizada por escasa mieleemia y frecuente trombocitosis.

Por otro lado, el diferente tamaño de las secuencias de BCR presentes en la translocación *BCR-ABL* parece dictar el perfil fenotípico de la LMC. En este sentido, los estudios realizados en modelos animales han evidenciado que, si bien las tres proteínas quiméricas BCR-ABL (p190, p210, p230) son capaces de inducir un cuadro clínico similar a la LMC, difieren entre sí en su capacidad de provocar una LAL [48]. Así, p190 es el oncogén más potente, mientras que la capacidad de p230 para inducir independencia a los factores de crecimiento es incompleta. En el caso de la proteína p190 da lugar a una enfermedad con menor tiempo de latencia y los ratones afectos

Introducción

desarrollan LAL B. En el caso de p210 los ratones transgénicos desarrollan leucemias B, T y de origen mieloide, y aquellos que expresan la proteína p230 presentan un mayor período de latencia y desarrollan procesos menos agresivos.

A este respecto, se ha sugerido que las diferencias en la capacidad transformadora podrían derivar de los sustratos específicos activados por cada una de las oncoproteínas.

De lo anteriormente expuesto cabe destacar que, mientras la región ABL del gen *BCR-ABL* se mantiene casi invariablemente constante, el tamaño de la región BCR difiere de unos enfermos a otros, lo que sugiere que sea posiblemente ABL el principio transformante de la molécula. En apoyo de esta hipótesis iría el hecho de que existen leucemias en las que el gen *ABL* se fusiona con genes distintos a *BCR*, como ocurre en la translocación *TEL-ABL*, descrita en pacientes con LMA [49].

Introducción

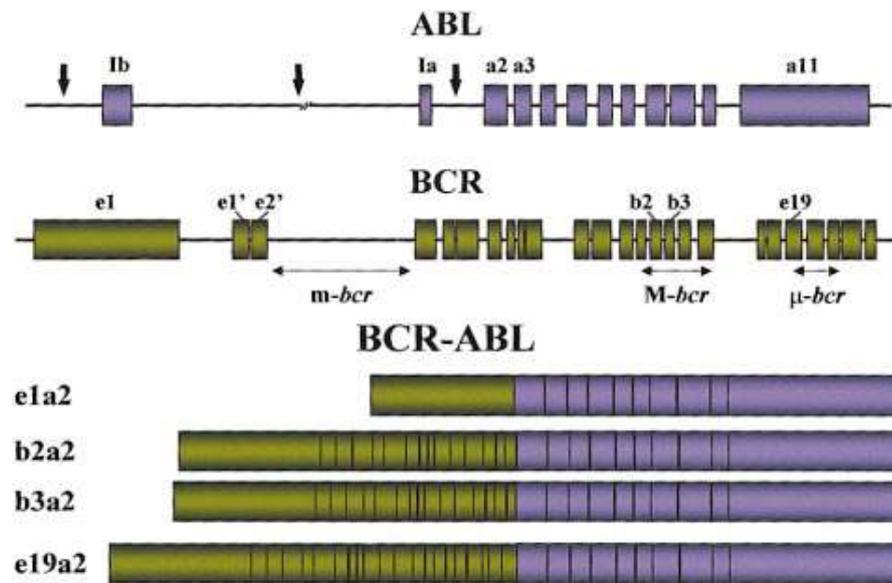


Figura 3. Formas de la oncoproteína BCR-ABL. Figura tomada de Deininger et al[50]

Por otra parte, la translocación recíproca $t(9;22)$ da origen también a un gen quimérico de tipo *ABL-BCR* en el cromosoma 9 derivativo (9q+) [42]. Cabe destacar, no obstante, que aunque es posible detectar ARNm *ABL-BCR* en un 60% de los casos de LMC, no se ha demostrado hasta el momento la existencia de ninguna proteína *ABL-BCR* viable, por lo que se desconoce el papel de estos transcritos en la patogénesis de la enfermedad [35].

Existen datos que apoyan la hipótesis de que la formación del gen híbrido *BCR-ABL* pueda no ser la alteración inicial o única responsable de la aparición de la LMC. En este sentido, diversos estudios han demostrado la existencia de células clonales Ph-negativas en la sangre periférica de pacientes con LMC Ph-positiva mediante el análisis

Introducción

de expresión de los isoenzimas de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa [51-53]. Además, se ha descrito la adquisición del cromosoma Ph en el curso evolutivo de enfermos con LMC Ph-negativa [54]. Más recientemente, diversos autores han referido la aparición de alteraciones citogenéticas en los progenitores Ph-negativos de enfermos en respuesta citogenética completa obtenida tras tratamiento con interferón (IFN) [55] o imatinib [56-58]. Como explicación a esto último se ha postulado la coexistencia desde el inicio del tratamiento de dos poblaciones, una correspondiente a la LMC y otra distinta mielodisplásica, esta última minoritaria al diagnóstico de la LMC pero que podría adquirir una ventaja proliferativa tras la inhibición farmacológica de los progenitores Ph-positivos. Con todo, no es posible descartar otras hipótesis, como la de que en la LMC existirían precursores leucémicos Ph-negativos cuya inestabilidad genética facilitarían la eventual adquisición de alteraciones citogenéticas, entre ellas el cromosoma Ph o, en el caso concreto del imatinib, que sea este fármaco el responsable de inducir dichas alteraciones en los progenitores hematopoyéticos sanos. Por otra parte, la expresión del gen *BCR-ABL* puede no ser suficiente para el desarrollo de la LMC, dado que en aproximadamente un 30% de las personas adultas sanas es posible detectar transcritos *BCR-ABL* en sangre periférica si se utilizan técnicas moleculares de alta sensibilidad [59, 60].

Con respecto a este punto, cabe recordar que para que una alteración molecular tenga potencial transformante es necesario que produzca una proteína oncogénica funcional en un progenitor inmaduro con capacidad de autorrenovación. Así, los

Introducción

tránscritos BCR-ABL detectados en los leucocitos circulantes de los individuos sanos podrían haberse generado en células maduras, incapaces de autopropagarse, de forma que eventualmente acabarían desapareciendo de la sangre como consecuencia de los procesos normales de diferenciación y muerte celular. Por otra parte, se ha descrito que los tránscrios BCR-ABL detectados en la sangre de sujetos sanos tienen con frecuencia estructuras anómalas que probablemente impiden la formación de proteínas BCR-ABL funcionales [60].

También cabe considerar el papel que podría desempeñar el sistema inmune, mediante su capacidad de eliminar precozmente las células BCR-ABL positivas que aparecen ocasionalmente en las personas sanas. Por último, podría suceder que fuera imprescindible la adquisición de mutaciones adicionales en la clona BCR-ABL para que pudiera producirse su expansión clonal efectiva, si bien en modelos animales la expresión de BCR-ABL es suficiente para la transformación leucémica [61, 62]

En la LMC es posible distinguir dos poblaciones de células madre Ph-positivas en función de su actividad mitótica [63]. Un primer subgrupo de progenitores tendría alterados los mecanismos de control del ciclo celular en favor de una intensa proliferación y diferenciación en células más maduras. En cambio, existiría un segundo grupo que estaría constituido por progenitores Ph-positivos quiescentes, en fase G₀, que podrían ser los responsables del mantenimiento de la LMC a largo plazo. De hecho, se

Introducción

ha comprobado la capacidad de los progenitores CD34+ Ph-positivos en fase G0 de reproducir la leucemia a las 6-8 semanas de ser trasplantados a ratones irradiados [64].

1.4.3 CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA TRANSLOCACIÓN BCR-ABL

Las alteraciones estructurales derivadas de la formación de la proteína BCR-ABL tienen como consecuencia una desregulación del efecto tirosinacinasasa, de forma que la enzima está activada continuamente [65]. El resultado de ello es la activación anómala de una serie de vías de transmisión intracelular de señales en los progenitores Ph positivos, que conduce a un incremento de su actividad proliferativa, a una alteración de su adhesión al estroma medular, y a una disminución de la apoptosis celular, siendo estos procesos la base de la patogénesis de la LMC [50].

Son muchas las vías de señalización que están activadas de forma mantenida por la oncoproteína BCR-ABL. Sin embargo, es difícil relacionar una vía específica de señales con un efecto biológico concreto.

A continuación, se describen los efectos biológicos secundarios a la activación de BCR-ABL y las principales vías comprometidas:

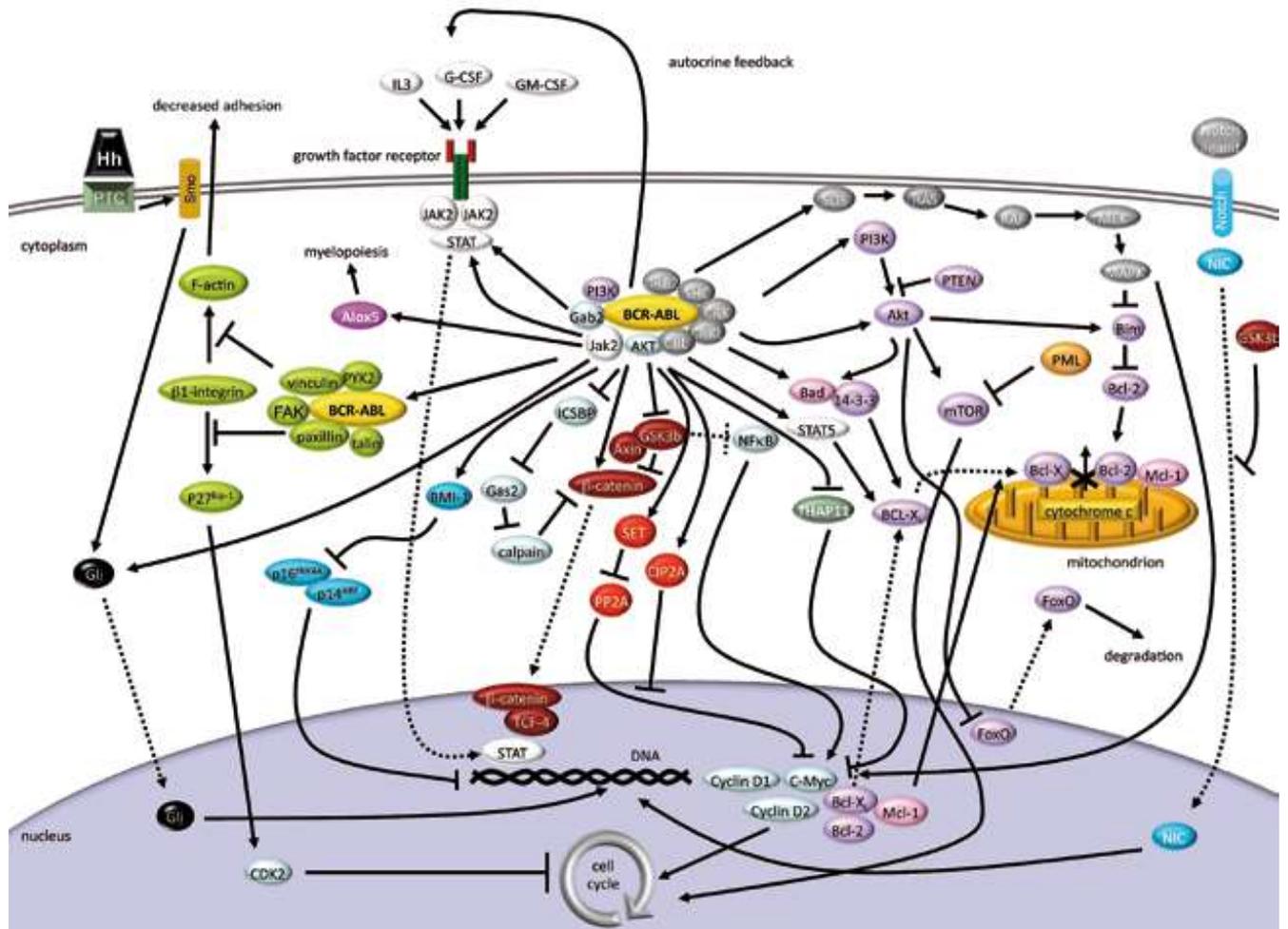


Figura 4. Vías de transducción de señal implicadas en la LMC. Imagen tomada de Thielen et al, New insights into the pathogenesis of chronic myeloid leukaemia: towards a path to cure [66].

a. Incremento de la proliferación celular

BCR-ABL juega un papel preponderante en la inducción de la proliferación neoplásica de la LMC. Dos de las vías a través de las cuales se cree que BCR-ABL

Introducción

estimula la proliferación celular son: 1) La activación de rutas de transducción de señal estimuladoras de la proliferación celular; 2) La inducción de inestabilidad genómica, por interferencia con los mecanismos de reparación del ADN, que puede promover la supervivencia de clonas con alteraciones genéticas secundarias.

a.1. Rutas de transducción de señal activadas por BCR-ABL. Función de las proteínas tirosinafosfatasas (PTPs), proteínas inhibidoras de la señalización por citocinas (SOCS) y papel de MYC.

BCR-ABL activa diversas rutas de transducción de señal, entre ellas las rutas de JAK/STAT, Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt, lo que resulta en un aumento de la proliferación celular [67].

En los mamíferos, la ruta JAK/STAT es el principal mecanismo de señalización para una amplia variedad de citocinas y factores de crecimiento e interviene en la proliferación celular, la diferenciación, la migración celular y la apoptosis. Estos eventos celulares son esenciales, entre otros procesos, para la hematopoyesis y el desarrollo inmunológico. En este sentido, es bien conocido que las mutaciones que activan de forma constitutiva o provocan la pérdida de regulación de la ruta de transducción de señal JAK/STAT pueden causar una gran variedad de leucemias [68].

Introducción

En la LMC, JAK2 y STAT5 están activados de forma mantenida. Si bien, la producción de IL-3 y G/GM-CSF es escasa en los progenitores leucémicos quiescentes, estos pueden entrar en ciclo celular e iniciar la producción autocrina de dicha citocina y factor de crecimiento, activando de esa forma la vía de JAK-STAT. Además, BCR-ABL puede activar directamente dicha vía. Por otro lado, la inhibición de JAK2 disminuye notablemente los niveles de BCR-ABL, reduciendo con ello la señal oncogénica. Así, se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de JAK2 supera la resistencia a imatinib en líneas celulares resistentes, incluyendo aquellas con la mutación T315I o en fase de CB [66].

De forma fisiológica, esta ruta está regulada por las proteínas tirosinafosfatasa (PTP) y las proteínas SOCS (en inglés, Suppressor Of Cytokine Signaling)[69]. Las PTPs eliminan los grupos fosfato de los receptores de citocinas, así como de los factores de transcripción STAT activados, inhibiendo de esta forma la señal de proliferación [70]. Datos experimentales sugieren que para la transformación leucémica sería necesario, no sólo la existencia de una actividad desregulada de BCR-ABL, sino también la pérdida de función de algunas PTPs inhibitoras [71]. De hecho, varias PTPs inhiben la actividad de la enzima ABL normal y de la proteína de fusión BCR-ABL, mediante la defosforilación de ABL y de sus sustratos [72-74]. Concretamente, se ha observado que la sobreexpresión del gen de la proteína tirosinafosfatasa PTP1B (PTPN1) antagoniza la señal de la tirosinacinasasa p210 BCR/ABL e inhibe la transformación de fibroblastos que expresan BCR-ABL [75], al parecer por defosforilación directa de la proteína BCR-

Introducción

ABL [71]. Mientras que la inhibición de PTP1B (PTPN1) se acompaña de la aparición de resistencia a imatinib en células leucémicas BCR-ABL positivas [76]. De forma análoga a PTP1B, la PTP-SHP1 (SHPTP1) puede interactuar e inhibir parcialmente la función de ABL [77] y de BCR/ABL [78]. Otros autores han observado que la actividad de la tirosinafosfatasa 2A (PP2A) está marcadamente inhibida en la fase de CB de la LMC [79]. PP2A es una serín/treonín fosfatasa que actúa como supresor tumoral revirtiendo la fosforilación de proteínas que intervienen en las vías de regulación y progresión del ciclo celular, replicación del DNA, transcripción de genes y traducción de proteínas. BCR-ABL indirectamente inhibe PP2A, al estimular la producción de la proteína SET que inhibe fisiológicamente PP2A. El tratamiento con imatinib restablece los niveles de PP2A [79, 80].

Las proteínas SOCS también actúan en la regulación de las rutas de transducción de señal mediada por citocinas, desempeñando así múltiples funciones en el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis [81]. Entre otras funciones, impiden la fosforilación de STAT a través de la inhibición directa de JAK o por competición con STAT por los sitios de unión fosfotirosina de los receptores de citocinas [82]. El papel que juegan las proteínas SOCS en la LMC no está claro. Se ha observado que las proteínas SOCS pueden inhibir la señalización inducida por diversos oncogenes como *Tel-JAK2* y *BCR-ABL*, mientras que al mismo tiempo BCR-ABL induce su expresión. *SOCS1* [83] y *SOCS3* [84] se expresan constitutivamente en las células de la LMC y se correlacionan además con la respuesta al tratamiento con interferón. *SOCS2* se sobreexpresa en las

Introducción

fases avanzadas de la LMC y parece jugar un papel en el fracaso al tratamiento con imatinib [85].

Por otro lado, la activación del protooncogén *C-MYC* juega un papel central en la señalización de la LMC [86] y en la transformación celular mediada por BCR-ABL [87], estimulando la proliferación celular por la activación de enzimas del ciclo celular. Este gen se encuentra con frecuencia sobreexpresado en la transformación a crisis blástica[88-90].

a.2 Inestabilidad genómica. Interacción con los mecanismos de reparación del ADN.

Existe evidencia de que la actividad BCR-ABL interfiere con los mecanismos de reparación del ADN y facilita la inestabilidad genómica de la clona proliferante, mediante su efecto promotor de la supervivencia de clonas con alteraciones genéticas secundarias [91]. BCR-ABL aumenta los niveles de radicales libres de oxígeno (ROS) que causan daño oxidativo en el ADN que, en caso de que no se repare correctamente, podría dar lugar a mutaciones de BCR-ABL y al desarrollo de resistencia a imatinib [92-94]. De hecho, se ha observado que la sobreexpresión de BCR-ABL aumenta la tasa de roturas de ADN de doble cadena [en inglés, *double strand breaks* (DSB)] en líneas celulares hematopoyéticas y en células CD34+ de pacientes con LMC, tanto normales como leucémicas [95]. Por otra parte, BCR-ABL interfiere con los mecanismos

Introducción

reguladores de la reparación de las rupturas de doble hebra [96-99]. Por ejemplo, BCR-ABL estimula específicamente la reparación de rupturas de doble hebra a través del mecanismo de reparación por recombinación homóloga no conservativa [en inglés, *single-strand annealing* (SSA)], una vía de reparación del ADN que es mutagénica, ya que introduce secuencias de ADN repetitivas y elimina la secuencia entre las repeticiones [97]. Además BCR-ABL inhibe la subunidad catalítica de la ADN polimerasa (ADN PKcs) [98], implicada en la reparación por recombinación no homóloga [en inglés, *nonhomologous end-joining* (NHEJ)], así como en la actividad de reparación por mismatch, lo cual inhibe la apoptosis e incrementa la tasa de mutaciones [99]. Por otra parte, BCR-ABL regula la reparación por escisión de nucleótido (NER), una vía que juega un papel importante en la reparación de DSBs y una amplia gama de otros tipos de lesiones del ADN [100, 101], aunque su efecto parece ser diferente en función del tipo celular implicado. Por ejemplo, mientras que p210 BCR-ABL reduce la actividad de NER en las células linfoides, lo que lleva a la hipersensibilidad a los rayos UV y mutagénesis, la expresión de p210 BCR-ABL en células mieloides facilita la reparación NER e induce la resistencia a los rayos UV [96]. Concretamente, BCR-ABL interactúa con la proteína ERCC3 (XPB), formando un complejo esencial en la activación de las primeras etapas de la NER [96]. Esta interacción de BCR-ABL con la ruta de reparación NER también tiene consecuencias en la respuesta al tratamiento, ya que recientemente se ha demostrado que imatinib disminuye la eficacia de NER en las células leucémicas que expresan BCR-ABL [102].

Introducción

De todos estos datos se desprende que el funcionamiento normal de los mecanismos de reparación del ADN es perturbado por la actividad BCR-ABL, hecho que podría provocar un incremento de la mutagénesis y de la inestabilidad genómica de las células leucémicas[103].

b. Alteración de la adhesión al estroma medular

El proceso de adhesión y anidamiento de los progenitores hematopoyéticos en el microambiente medular está mediado por una serie de receptores transmembrana denominados integrinas (fundamentalmente de tipo $\beta 1$) y diversas proteínas estructurales y del citoesqueleto, tales como la paxilina, la talina y la actina [104]. A su vez, la proliferación y diferenciación de dichos progenitores está regulada en condiciones normales por las señales emitidas desde las células del estroma medular [105, 106]. Los progenitores Ph-positivos de la LMC presentan una disminución de su adhesión al estroma medular, lo que les permite migrar desde la médula ósea a los capilares sanguíneos en estadios precoces de maduración, escapando así de los mecanismos inhibitorios de la proliferación celular ejercidos habitualmente a nivel medular [107, 108]. Datos recientes demuestran que la expresión de BCR/ABL en los progenitores mieloides incrementa la adhesión a las células del estroma mediada por beta1-integrinas [109]. En este sentido, el efecto terapéutico del interferón (IFN) en la LMC parece deberse, al menos en parte, a su capacidad de revertir los defectos de

Introducción

adhesión al estroma medular de los progenitores Ph-positivos, restableciendo de esta forma los mecanismos regulatorios de la proliferación celular[110].

c. Inhibición de la apoptosis celular. Influencia de la actividad de la proteína antiapoptótica BCL-2.

La apoptosis es la muerte celular genéticamente controlada en respuesta a la desregulación de oncogenes, al estrés celular o al daño en el ADN. Diversos estudios de laboratorio han evidenciado una falta de apoptosis en las líneas celulares que expresan BCR-ABL tras la retirada de los factores de crecimiento [111] o la inducción de daño en el ADN[112] [113].

Aunque originalmente descubierto por ser el oncogén responsable del linfoma folicular B [284], *BCL-2* codifica la síntesis de una proteína antiapoptótica implicada en la patogénesis de numerosas neoplasias hematológicas. En la LMC se ha descrito un aumento significativo de la expresión de *BCL-2* en las fases acelerada y blástica de la LMC, con respecto a su expresión en FC [114, 115]. Además, se ha observado que los ratones transgénicos que expresan *BCR-ABL* difícilmente presentan evolución a CB, mientras que aquellos que además coexpresan *BCL-2* en los progenitores mieloides desarrollan una leucemia mieloide aguda con facilidad [116, 117]. Varios estudios han mostrado el aumento de la expresión del gen antiapoptótico *BCL2* en las fases avanzadas de la LMC comparados con los niveles objetivados durante la fase crónica [114] [118]. En principio, la expresión de *BCL2* podría facilitar la progresión de la

Introducción

LMC inhibiendo la apoptosis, y con ello promoviendo la supervivencia de las clonas leucémicas con aberrancias genéticas[116].

El gen *BCL2* codifica dos proteínas distintas, BCL2- α (26kDa) y BCL2- β (22kDa). La proteína más larga contiene un dominio hidrofóbico transmembrana, mientras que BCL2- β no posee dicho dominio y por ello se encuentra principalmente en el citoplasma. La actividad antiapoptótica parece estar restringida a la isoforma BCL2- α [119]. Se han identificado varios SNPs en el gen *BCL2* que podrían dar lugar a cambios en la función de la proteína o en la expresión o splicing del gen. El potencial efecto de dichos SNPs en el balance intranuclear de señales proapoptóticas y antiapoptóticas es desconocido. Recientemente, los SNPs de *BCL2* se han asociado con la susceptibilidad a desarrollar LMC, así como con la supervivencia de los pacientes con diversas enfermedades hematológicas malignas [120-122].

d. Vías que intervienen en el mantenimiento de la célula madre hematopoyética: Hedgehog, BMI-1, Wnt/B-catenina.

La vía Hedgehog (Hh) juega un papel primordial en el desarrollo embrionario, en la regeneración tisular y en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas.

La pérdida de Smoothened (Smo), un componente esencial de la vía Hh, se ha correlacionado con una depleción de las células madre de la LMC en modelos experimentales[123, 124]. La inhibición farmacológica de la señalización de Hh afecta

Introducción

no sólo a la propagación de la LMC, sino también al desarrollo de clonas resistentes a imatinib [125]. Estos datos indican que la vía Hh es importante en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas sanas y leucémicas y plantean la posibilidad de que la resistencia al tratamiento de la LMC podría evitarse interfiriendo en la actividad de esta vía [126]

BMI-1, miembro del grupo Polycomb, es un gen implicado en la renovación celular y en la actividad proliferativa de las células madre hematopoyéticas, tanto normales como leucémicas, actuando como represor del complejo supresor tumoral p16ink/p14arf. En la LMC, el nivel de expresión de *BMI-1* tiene significado pronóstico y parece correlacionarse con la transformación a CB [127]. Por otro lado, se ha descrito que la expresión elevada de *BMI-1* previo al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos se asocia a una mejor supervivencia, derivada de una baja incidencia de enfermedad injerto contra huésped, sin influir en el riesgo de recaída leucémica [128, 129]

La vía Wnt/B-catenina es también crucial para la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas. En condiciones normales, B-catenina se une a la axina y a GSK3B, y tras su fosforilación es degradada en el proteosoma. BCR-ABL facilita la activación de B-catenina fosforilando sus residuos Y86 e Y654, estabilizando su estructura y evitando su degradación en el proteosoma. La forma activada de B-catenina pasa al núcleo donde interacciona con el factor de transcripción LEF/TCF, regulando la

Introducción

transcripción de genes como *C-MYC* y *CICLINA D1*. En la LMC, la sobreexpresión de B-catenina en los progenitores granulomonocíticos se ha implicado en la patogénesis de la transformación a la CB mieloide, al conferir capacidad de autorrenovación a dichos progenitores [130]. Por último, se ha demostrado que el tratamiento con imatinib disminuye la fosforilación de los residuos tirosina de la B-catenina y facilita su degradación por el proteosoma [131, 132].

1.5 PATOGÉNESIS DE LA PROGRESIÓN A CRISIS BLÁSTICA

Mientras que la patogénesis de la fase crónica de la LMC está bien establecida, los mecanismos implicados en la transformación de la enfermedad son desconocidos en muchos casos. Con todo, parece evidente que la progresión de la LMC es consecuencia de la inestabilidad genética de la clona proliferante y que ésta depende en gran medida de la actividad de la proteína BCR-ABL.

Así, las líneas celulares que poseen proteínas tirosinacinasas activadas, como BCR-ABL, acumulan más daño en el ADN que si dichas enzimas están inactivas, a pesar de que su capacidad para reparar el ADN parece ser mayor [133, 134]. La combinación de más daño de ADN y más actividad reparadora podría resultar en una reparación menos exacta. BCR-ABL regula de forma positiva los genes antiapoptóticos *BCL-2* y *BCL-X*, lo que promueve la supervivencia de clonas con alteraciones genéticas secundarias. Por otro lado, BCR-ABL es capaz por sí mismo de causar daños en el ADN al incrementar los radicales libres de oxígeno (ROS) [135], dado que estos pueden

Introducción

inducir transversiones y transiciones de pares de bases de ADN. Recientemente, se ha demostrado que el nivel de expresión de *BCR-ABL* en los progenitores leucémicos CD34+ aumenta con la progresión de la enfermedad[136-138] [103].

Todo lo anterior puede sentar las bases para la adquisición de nuevas aberraciones cromosómicas, mutaciones y cambios en la expresión génica que caracterizarán la progresión de la LMC a la CB.

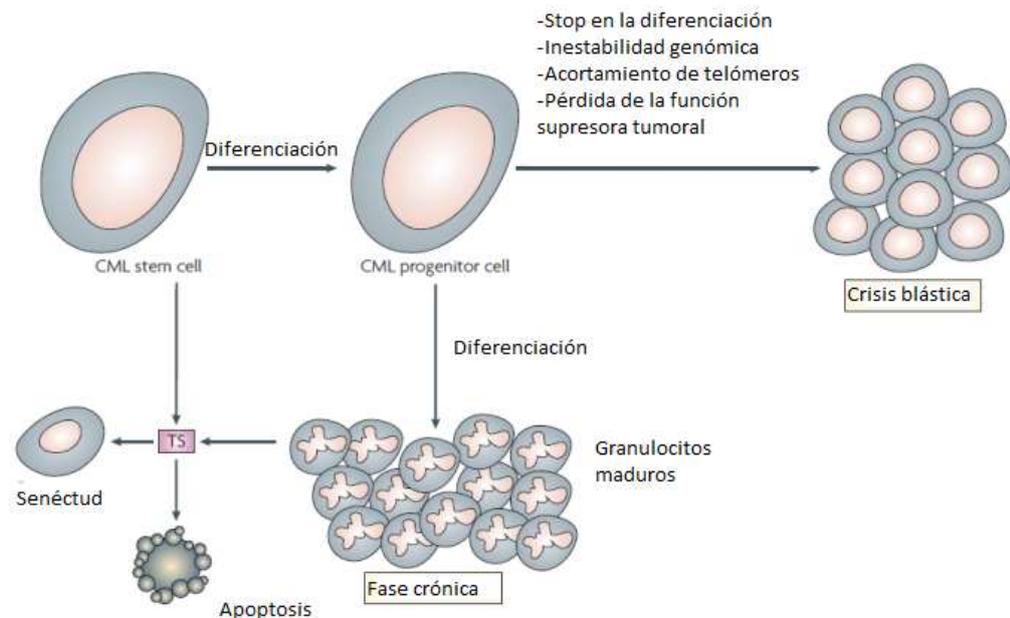


Figura 5. Patogénesis de la progresión a crisis blástica. Figura tomada de Melo et al, Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nat Rev Cancer [103]

Introducción

1.5.1 BLOQUEO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

Una diferenciación deficiente o anómala es común en las enfermedades hematológicas malignas y tumores sólidos con mal pronóstico. Esta diferenciación alterada implica una interferencia patológica con los programas de diferenciación que comprometen la activación de genes específicos por factores de transcripción. Dicha interferencia puede venir instigada por productos de oncogenes, como ha sido demostrado por la supresión del factor de transcripción CEBP α por BCR-ABL. CEBP α activa la transcripción del receptor del factor estimulador de colonias granulocíticas y del gen ID1 en las células mieloides. CEBP α se expresa en la médula ósea normal y en muestras de pacientes con LMC en fase crónica, siendo indetectable en la LMC en CB. BCR-ABL suprime la traducción de CEBP α aumentando la estabilidad del regulador de la traducción HNRPE2[139]. La unión de HNRPE2 con el ARNm de CEBP α inhibe la traducción del factor de transcripción. La expresión de HNRPE2 está inversamente correlacionada con CEBP α en las células que expresan BCR-ABL. La suspensión de la traducción de CEBP α por la inducción de HNRPE2 por BCR-ABL puede llegar a ser un evento clave responsable de la detención de la diferenciación que se produce en la LMC [79, 140].

Otros mecanismos de diferenciación bloqueados en la CB de la LMC son el efecto de las mutaciones o translocaciones de genes, resultando en la formación de factores de transcripción como AML-EV11 o NUP98-HOXA9, genes de fusión que

Introducción

han sido descritos en casos aislados de CB mieloide [141]. Aunque el mecanismo preciso del stop madurativo es desconocido, podría deberse al mal funcionamiento de ambos factores de transcripción que al actuar de forma cooperativa con BCR-ABL, interferirían en la señalización precisa para la correcta activación de diferentes programas. Tanto EVI-1 como HOXA9 son factores de transcripción y su expresión aberrante en el contexto de estas proteínas de fusión causa interrupción de la diferenciación en el caso de AML-1/EVI-1 e incremento de la proliferación en el caso de NUP98/HOXA9 [141, 142]

1.5.2 INESTABILIDAD GENÓMICA

Los mecanismos de reparación del daño en el ADN se encuentran comprometidos en la LMC, lo que contribuye a la inestabilidad genómica de las clonas proliferantes [91]. Se ha propuesto que BCR-ABL induce mutaciones en genes responsables de mantener la integridad genómica y que tales mutaciones funcionan como amplificadores del fenotipo inestable. De hecho, hasta un 50-80% de los pacientes con CB presentan alteraciones cromosómicas no aleatorias además del cromosoma Ph. Las más frecuentes son la trisomía 8 y la duplicación del cromosoma Ph, seguidas del isocromosoma 17q y la trisomía 19, entre otras. Estos cambios genéticos son marcadores de la progresión de enfermedad, pero no necesariamente son agentes causales de la transformación, a pesar de poder involucrar genes críticos (*MYC*, *p53*) en la biología celular [87, 143].

Introducción

1.5.3 ACORTAMIENTO DE TELOMEROS

El envejecimiento celular se ha asociado con un acortamiento progresivo de la porción distal de los cromosomas, los telómeros. Los telómeros son esenciales para la estabilidad genómica ya que protegen a los cromosomas de recombinaciones y fusiones. Están constituidos por una secuencia hexámerica repetida TTAGGG y un número de proteínas asociadas protectoras y reguladoras con una forma de t-loop. La incapacidad de la ADN polimerasa de replicar el fin de un cromosoma durante la síntesis final de la hebra, resulta en una pérdida de las repeticiones teloméricas cada vez que una célula se divide. Como consecuencia de ello, las células que no dispongan de un mecanismo compensatorio que contrarreste esta pérdida progresiva, presentarán un progresivo acortamiento telomérico. Como resultado, los telómeros críticamente cortos son reconocidos como roturas de cadena doble que consecuentemente producen paradas del ciclo celular o la muerte celular por apoptosis. Por otro lado, los telómeros disfuncionales pueden producir fusiones de región terminal con región terminal que dan lugar a inestabilidad genómica a través de la transición a la anafase y posterior rotura durante la mitosis dando lugar a aneuploidía. Ciclos repetidos de fusiones rotas, dan lugar a una pérdida de la heterocigosidad y amplificación de los genes que puede causar activación de oncogenes e inactivación de genes supresores tumorales, facilitando la transformación maligna [144]. El elevado recambio de los progenitores hematopoyéticos BCR-ABL positivos puede resultar en un acortamiento telomérico acelerado [145]. Así, se ha objetivado un menor tamaño telomérico en las células

Introducción

leucémicas de pacientes con LMC de alto riesgo de Hasford que en las de los pacientes de bajo riesgo. A su vez, la longitud telomérica se correlaciona con el tiempo restante antes de la progresión de la enfermedad [145], de forma que los telómeros en la crisis blástica y en la fase acelerada son significativamente más cortos que en la fase crónica [146, 147]. Se ha objetivado un aumento de hasta 50 veces en la actividad de la telomerasa durante la crisis blástica, lo que va íntimamente asociado con la adquisición de aberraciones citogenéticas.

Todo ello sugiere que los mecanismos subyacentes a la inestabilidad genética en la LMC como la amplificación genética, la aneuploidia y la pérdida de heterocigosidad podrían resultar de unos telómeros disfuncionales que parecen ir asociados a un aumento de la actividad de la telomerasa. Esto último se ha correlacionado con una menor supervivencia de los pacientes [148-150]. Por todo ello, la inhibición de la telomerasa podría representar una nueva diana terapéutica para el manejo de las neoplasias mieloproliferativas [151].

1.5.4 PÉRDIDA DE LA FUNCIÓN SUPRESORA DE TUMORES

El gen supresor de tumores *TP53* se encuentra inactivado en más de un 30% de casos de CB de estirpe mieloide y raramente en la CB linfoide o en la FC de la LMC. La pérdida funcional de p53 podría ser consecuencia del aumento de la degradación de la proteína debido a la estimulación BCR-ABL dependiente de su inhibidor MDM2, a nivel postraslacional y/o traslacional [152]. Por otra parte, alrededor de la mitad de los

Introducción

pacientes con CB de línea linfoide presentan deleciones del exón 2 de INK4A/ARF, que involucran tanto a p16 como a p19, dos proteínas que controlan la progresión del ciclo celular G1/S y regulan positivamente p53 [153]. No se conoce la razón por la que determinados genes supresores de tumores están afectados de forma preferente en función de la estirpe celular de la CB.

Recientemente, se ha descrito que la actividad del supresor de tumores PP2A podría estar implicada en la patogénesis de la progresión de LMC. Así, el aumento en los niveles de BCR-ABL incrementa la expresión de la fosfoproteína SET, un regulador negativo de PP2A [79, 154]. De este modo, la sobreexpresión de BCR-ABL que se produce durante las fases avanzadas de la LMC podría incrementar la actividad de SET y disminuye así la del supresor tumoral PP2A. En estudios *in vitro* y en modelos murinos, la restauración de la actividad PP2A por parte del activador forskolina, parece disminuir el potencial leucémico de BCR-ABL, lo que sugiere una posible diana para frenar o remitir la progresión de LMC.

1.6 TRATAMIENTO

1.6.1 DESDE EL ARSÉNICO HASTA IMATINIB

La primera descripción de un tratamiento frente a la LMC data de principios del siglo XX, con la aplicación de la solución de Fowler's, que contenía arsénico como componente activo principal [155]. Posteriormente, se utilizó la radioterapia esplénica,

Introducción

con pobres resultados. En 1953, la introducción del busulfán permitió un mejor control sintomático de la enfermedad, pero algunos pacientes fallecían como consecuencia de la aplasia prolongada que puede provocar este fármaco[1]. La hidroxiurea permitió soslayar este problema debido a su mejor perfil de toxicidad, pero no modificó el curso natural de la LMC hacia la CB [156] . En este sentido, el primer tratamiento capaz de prolongar la FC de la LMC fue el interferón alfa (IFN), introducido en la clínica en los años 80. Este fármaco permitía inducir respuestas citogenéticas completas (RCC: desaparición de las metafases Ph-positivas) en una pequeña proporción de pacientes, los cuales se beneficiaban de una supervivencia prolongada. Desde el punto de vista biológico, el IFN puede generar toxicidad selectiva contra la clona leucémica, incrementar la regulación inmune y/o modular la hematopoyesis a través del microambiente hematopoyético [157].

El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la LMC condujo al desarrollo de imatinib mesilato, el primer inhibidor selectivo de la proteína tirosinacinasasa BCR-ABL. Esta molécula es capaz de inhibir la autofosforilación de Abl, del receptor de PDGF y del receptor c-Kit, al ocupar específicamente el sitio de unión al ATP en la región catalítica de estas cinasas [158].

Introducción

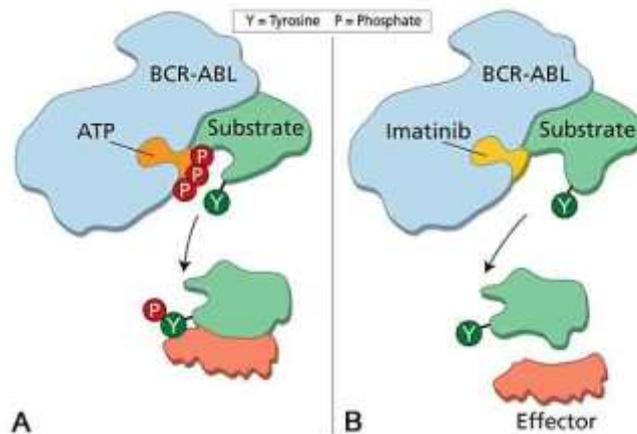


Figura 6. Modo de acción de imatinib. Figura tomada de Hoffbrand, Tuttonham y Catovsky, Blackwell Science, Oxford (2005) [159]

En 1998 se inició un estudio fase 1 de tratamiento con imatinib en pacientes con LMC en FC resistentes o intolerantes a IFN. Un total de 83 pacientes recibieron dosis escalonadas de imatinib, de 25 a 1000 mg/día, por vía oral. Un 98% de los que recibieron una dosis ≥ 300 mg/día alcanzaron la respuesta hematológica, habitualmente en las primeras 4 semanas de tratamiento [160, 161]. Los efectos secundarios fueron moderados y consistieron fundamentalmente en la aparición de edema periorbitario o superficial, calambres musculares o mialgias, náuseas, diarrea, dolores óseos y, con menor frecuencia, erupciones cutáneas. Si bien no se alcanzó la dosis máxima tolerable de imatinib, se observó un aumento significativo en la frecuencia de efectos secundarios, tanto hematológicos como no-hematológicos, al administrar dosis superiores a 750 mg/día. Posteriormente, en un ensayo clínico fase 2 se trataron 454

Introducción

enfermos con LMC en FC intolerantes o resistentes a IFN con una dosis de 400 mg/día de imatinib. En este estudio se registró una tasa de respuesta citogenética completa (RCC) del 41%, con un excelente perfil de toxicidad. El ensayo multicéntrico internacional IRIS aleatorizó 1106 pacientes con LMC en FC de nuevo diagnóstico a recibir imatinib (400 mg/día) o la combinación de IFN y citarabina a dosis bajas. Los resultados a los 18 meses de seguimiento mostraron diferencias altamente significativas a favor de imatinib, tanto en eficacia como en tolerancia. Así, la tasa de RCC fue del 76% en los enfermos tratados con imatinib frente al 14% en los que recibieron IFN y Ara-C. Además, los pacientes tratados con imatinib presentaron una menor tasa de progresión a las fases de aceleración y crisis blástica. Por otra parte, en menos del 3% de los pacientes asignados a imatinib fue preciso suspenderlo por intolerancia, frente a un 31% de los tratados con IFN y Ara-C. Estos resultados sirvieron como base para la aprobación de imatinib como tratamiento de primera línea en la LMC. El seguimiento a largo plazo del brazo de imatinib del estudio IRIS ha puesto de manifiesto la obtención de una RCC en el 83% de los pacientes. Por ello, para poder definir de manera más precisa la profundidad de la respuesta, se introdujo el concepto de respuesta molecular mayor (RMM), correspondiente a una reducción de 3 logaritmos de la carga leucémica inicial. Dicho grado de respuesta se alcanza a largo plazo en más de la mitad de los pacientes y en una tercera parte de los casos la enfermedad llega a hacerse indetectable con los métodos convencionales de análisis molecular, situación que se conoce como respuesta molecular completa (RMC). En el estudio IRIS, la supervivencia global de los pacientes tratados con imatinib en primera línea es del 85% a los 8 años, alcanzando el

Introducción

93% si se consideran únicamente las muertes debidas a progresión de la LMC. Un hallazgo particularmente interesante ha sido comprobar cómo la mayoría de eventos de progresión a las fases avanzadas de la enfermedad ocurren dentro de los tres primeros años de tratamiento, siendo infrecuentes a partir de entonces. Así, en la actualización más reciente del estudio se evidencia que en los últimos años de seguimiento se han registrado más muertes por causas no relacionadas con la LMC que por la enfermedad en sí. La obtención de una RMM dentro de los primeros 18 meses del tratamiento se asocia a una supervivencia global cercana al 100% a los 8 años y a una supervivencia libre de progresión del 95%. Por ello, el logro de una RMM en los primeros 18 meses de tratamiento constituye un objetivo primordial del tratamiento con imatinib de la LMC.

En el año 2006, un grupo de expertos internacionales, bajo el patrocinio de la *European LeukemiaNet*, estableció los criterios de respuesta a imatinib en los pacientes con LMC en FC de nuevo diagnóstico tratados con la dosis estándar del fármaco (400 mg/día). Dichos criterios fueron actualizados en el año 2009 tras recoger los datos proporcionados por el seguimiento más prolongado del estudio IRIS y la información procedente de otras fuentes [162]. En esencia, se tiene en cuenta el grado de respuesta obtenido a los 3, 6, 12 y 18 meses desde el inicio del tratamiento, así como la pérdida de una respuesta previamente obtenida o la aparición de mutaciones, para considerar la respuesta como óptima, subóptima o fracaso. En el caso de fracaso el cambio de tratamiento es obligado. Por su parte, cuando la respuesta es subóptima se aconseja el

Introducción

aumento de dosis de imatinib o el cambio de tratamiento. Los resultados del estudio IRIS se han visto corroborados en otras series, como la del hospital Hammersmith [163] o la del grupo español PETHEMA [164]. Como contrapartida, se ha confirmado que a largo plazo, ya sea por respuesta inadecuada o por intolerancia, un tercio de los pacientes deben abandonar definitivamente imatinib para recibir otros tratamientos, habitualmente inhibidores de segunda generación como dasatinib o nilotinib.

1.6.2 RESISTENCIA A IMATINIB

La introducción de imatinib modificó radicalmente la historia natural de la LMC, pero existe un grupo de pacientes con respuesta inadecuada a dicho tratamiento. La progresión a fases más avanzadas de la enfermedad representa aún una de las causas importantes de mortalidad en los pacientes con LMC, dado que esta situación es incurable en la mayoría de casos [165]. Los enfermos resistentes a imatinib pueden serlo de entrada (resistencia primaria) o tras presentar una respuesta transitoria (resistencia secundaria). En un estudio de 300 pacientes con LMC tratados con imatinib en un único centro alemán el porcentaje de pacientes en FC, FA y CB que no alcanzaron remisión hematológica completa fue del 3%, 9% y 51%, respectivamente. A su vez, el porcentaje de pacientes que presentaron una recaída hematológica después de la respuesta inicial (resistencia secundaria) fue del 22%, 32% y 41%, respectivamente [166].

Introducción

En los últimos años se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos de resistencia a imatinib, destacando en este sentido el papel primordial de las mutaciones en el dominio cinasa del gen *BCR-ABL*.

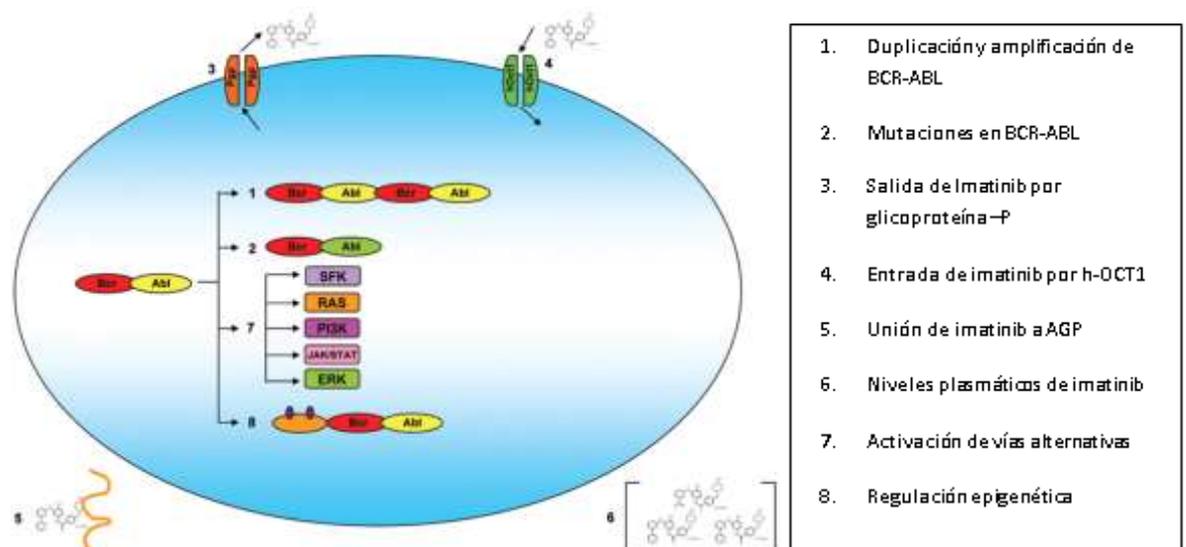


Figura 7. Factores que influyen en la resistencia a imatinib. Figura tomada de Bixby et al, Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance [167]

La frecuencia de mutaciones de *BCR-ABL* varía en función de la fase evolutiva de la LMC y de si la resistencia es primaria o secundaria. Así, en los pacientes en FC con resistencia primaria a imatinib pocas veces se detectan mutaciones, siendo éstas más frecuentes en las resistencias secundarias y, sobre todo, en las fases avanzadas de la enfermedad. Las mutaciones más relevantes en *BCR-ABL* alteran los puntos de contacto entre imatinib y la proteína BCR-ABL o inducen alteraciones estructurales que impiden

Introducción

la unión con imatinib, induciendo el paso de la forma inactiva a la forma activa de la proteína. Algunas mutaciones dan lugar a un fenotipo de resistencia completa al fármaco *in vitro*, mientras que otras son relativamente sensibles siendo posible vencer la resistencia con aumento de la dosis de imatinib. [168-170].

Otros mecanismos de resistencia a imatinib son la amplificación de BCR-ABL, la activación de vías de señalización independientes de BCR-ABL y las variaciones en los mecanismos de distribución y transporte transcelular del fármaco. La amplificación de BCR-ABL se observa fundamentalmente en las fases avanzadas de la LMC, detectándose muy ocasionalmente en la FC. La activación de vías de señalización alternativas como las de Ras/RAf/Mek, MAP cinasa, JAK/STAT o de las Src cinasas, así como la desregulación epigenética[171, 172] pueden inducir resistencia a los inhibidores de tirosina cinasa por mecanismos independientes a BCR-ABL [173, 174].

Por otro lado, los mecanismos de distribución y transporte transcelular de los inhibidores de tirosinacinas pueden influir en la eficacia al tratamiento. Así, diversos estudios han correlacionado los niveles plasmáticos de imatinib con la respuesta al mismo[175-178]. Además la capacidad de imatinib para penetrar con éxito en el interior de las células leucémicas puede depender de diferencias en la expresión y actividad de los transportadores del fármaco [179-187]. La expresión aumentada del gen de resistencia a múltiples drogas (MDR1) causa un incremento en la glicoproteína P que va asociado a un aumento de resistencias [188]. Los pacientes con menor actividad

Introducción

funcional de hOCT1, molécula implicada en el transporte intracelular de imatinib, tuvieron una menor tasa de respuesta molecular mayor cuando se trataron con la dosis estándar de imatinib [189]. Por otro lado, el secuestro de imatinib en el plasma por la proteína sérica alfa-1 ácido glicoproteína (AGP) puede reducir la concentración intracelular activa capaz de bloquear a BCR-ABL.

En la actualidad se dispone de inhibidores de BCR-ABL más potentes para el tratamiento de los pacientes que fracasan a imatinib, capaces de soslayar algunos de los mecanismos de resistencia anteriormente mencionados. Dasatinib es una molécula inhibidora dual capaz de bloquear de forma potente la actividad de numerosas cinasas, entre ellas Abl y Src. Estudios *in vitro* han demostrado que dasatinib es capaz de inhibir hasta 300 veces más la proliferación de diversas líneas celulares transfectadas con las formas no mutadas de BCR-ABL, siendo activo frente a la mayoría de las formas mutadas de BCR-ABL [190, 191]. Nilotinib es entre 20 y 50 veces más potente que imatinib a la hora de inhibir la proliferación de células que expresan la proteína BCR-ABL no mutada y además permite bloquear la mayoría de las mutaciones de BCR-ABL que confieren resistencia a imatinib [192, 193]. A diferencia de imatinib ni dasatinib, ni nilotinib son sustratos de OCT-1 [194, 195]. Sin embargo, ambos inhibidores son ineficaces para los casos con mutación T315I de Bcr-Abl [160, 196]. En este sentido, cabe destacar que existe un nuevo fármaco, ponatinib, que es muy activo frente a esta mutación [197]. Además de ser ineficaces para dicha mutación, estudios *in vitro* en los que se utilizan células troncales hematopoyéticas han demostrado que ninguno de los

Introducción

dos inhibidores antes mencionados era capaz de eliminar la fracción leucémica quiescente presente en LMC [190].

Imatinib puede inhibir células mononucleares de LMC, obtenidas tanto en fase crónica como en crisis blástica, así como reducir el número de colonias provenientes de sangre periférica y médula ósea de pacientes con LMC en fase crónica e inhibir la proliferación y el ciclo celular de progenitores primitivos CD34+CD38- y células comprometidas CD34+CD38+, sin alterar el comportamiento de células normales. Cabe mencionar los estudios realizados por el grupo de Holyoake, en los que se demuestra que en pacientes con LMC existe una subpoblación CD34+ altamente quiescente en donde la mayoría de las células son Ph+ capaces de entrar a un estado proliferante [198, 199]. Dichas células son insensibles al efecto de imatinib e incluso permanecen viables y quiescentes en presencia de factores de crecimiento, lo que indica resistencia de la población leucémica al efecto inhibitor de imatinib. Otros grupos han confirmado estas observaciones al demostrar la persistencia de células stem leucémicas con capacidad proliferativa en pacientes con respuestas citogenéticas completas mantenida durante años [200, 201]. Por último, los estudios de discontinuación de imatinib han evidenciado que más de la mitad de los pacientes en respuesta molecular profunda recaen poco después de la suspensión del fármaco, lo que sugiere que este agente no es capaz de curar la LMC en la mayoría de casos [202, 203].

Introducción

2. VARIABILIDAD GENÉTICA HUMANA Y SU INFLUENCIA EN LA LMC

La variabilidad genética interindividual es uno de los factores que podrían influir en la susceptibilidad a desarrollar una LMC y en la respuesta al tratamiento, a pesar de lo cual la información disponible al respecto es muy limitada. La variabilidad genética es una medida de las diferencias que existen a nivel genético entre unos individuos u otros y entre poblaciones de la misma especie. Se basa en el hecho de que dentro de los individuos de una misma especie existen variaciones naturales en el genoma que producen diferencias a nivel genotípico y fenotípico. Las variaciones naturales del genoma que constituyen modificaciones de la secuencia del ADN en los individuos de una especie se denominan polimorfismos.

Formalmente se define la variabilidad genética como la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse, entendiendo el genotipo como la información genética contenida en su genoma. Existen tres fuentes primarias de variabilidad genética: la recombinación genética que se produce durante la formación de los gametos, el flujo génico (o transferencia de genes de una población a otra) y las mutaciones genéticas.

2.1 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Formalmente los polimorfismos genéticos se definen como aquellas posiciones del genoma en las que se producen variaciones de la secuencia del ADN, en las que existen al menos dos variantes o alelos, y en los cuales el alelo más común tiene una frecuencia poblacional menor del 99% [204].

La mayor parte de los polimorfismos genéticos en humanos se pueden dividir en dos grupos: los que derivan de la sustitución de un nucleótido por otro, llamados comúnmente SNP (siglas de su nombre en inglés, single nucleotide polymorphism) y los que derivan de la inserción o eliminación de uno o más nucleótidos, llamados IDP (insertion deletion polymorphism) o, más frecuentemente, «indels»[205]

2.1.1 INDELS

Un polimorfismo de inserción/supresión (indel) es un tipo de variación genética en la que una secuencia nucleotídica específica está presente (insertion) o ausente (deletion). Inicialmente hacía referencia a los dos tipos de mutaciones genéticas donde existía una ganancia o una pérdida de una secuencia de ADN, lo que podía generar algún tipo de alteración funcional con consecuencias patológicas. No obstante, se cree que la mayoría de indels no son causantes de enfermedades por sí mismos, dada su enorme frecuencia en el genoma (alrededor de 3 millones de los 15 millones de polimorfismos genéticos conocidos [206]). Los indels pueden ser dialélicos o

Introducción

multialélicos, implicar desde 1 pb hasta 10000 pb y estar localizados tanto en regiones codificantes como no codificantes [207].

Mills y colaboradores estudiaron 1,96 millones de indels, de los que 2123(0,1%) afectaban a exones codificantes de genes humanos, con potencial efecto en la secuencia y funcionalidad de las proteínas resultantes. En total, se localizaron indels codificantes en 1300 exones y 1205 genes, lo que supone el 5,8% de los genes en el genoma humano. Estos datos indican que los humanos sanos son portadores de una importante carga genética de indels codificantes. [207] [208].

Alrededor del 10% de los indels codificantes están superpuestos a uno o más exones y de estas variantes se esperaría la suspensión de la función del gen. El 90% restante se localiza entre exones codificantes y de ellos más de la mitad se espera que causen codones de terminación temprana (PTC). Los PTC que ocurren en el exón final 3' pueden producir mRNA que codifique nuevas proteínas que tengan una ganancia de la función o efectos negativos dominantes. Por último, algo menos de la mitad de indels codificantes mantienen los marcos de lectura abierta de la proteína original.

Por otro lado, cuando los indels se encuentran en regiones no codificantes pueden generar cambios en los niveles de expresión y/o en el proceso de splicing alternativo del ARN. Los indels también poseen la capacidad de alterar la fusión y el espaciado de las secuencias de ADN dentro de las regiones promotoras e introducir

Introducción

codones de parada prematuros obteniéndose proteínas truncadas de estructura y función diferente. Por ejemplo un indel de 5pb puede rotar un factor de transcripción de un sitio de unión hacia el extremo opuesto de la hélice de ADN y un indel de 100pb podría aumentar el espaciado entre dos sitios de unión por lo que determinadas interacciones se verían interrumpidas. Estos indels en regiones promotoras son los que explicarían las diferencias entre la expresión genética objetivada en diversos humanos.

Un indel que no es un múltiplo de 3 nucleótidos da como resultado un cambio en la pauta de lectura y, por tanto resultará en la traducción de una cadena diferente de aminoácidos. Las variantes indel que son múltiplos de 3 nucleótidos dan como resultado una proteína con aminoácidos adicionales (inserción) o la pérdida de aminoácidos (supresión), sin que el resto de la cadena de aminoácidos se vea afectada.

Un ejemplo de enfermedad ocasionada por indels sería la fibrosis quística, originada por una supresión de 3 pb en uno de los alelos del gen *CFTR* que resulta en una proteína con un aminoácido menos[209]. Otro ejemplo sería el del síndrome del cromosoma X frágil, causado por la inserción de material genético en la región promotora del gen *FMRI* [210]. Finalmente, se ha implicado a los indels codificantes en la variabilidad biológica humana de numerosos genes como los la dentición, de la queratina, del colágeno o del sistema HLA, entre otros [205].

Introducción

2.1.2 *SNP*

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (siglas de su nombre en inglés Single Nucleotide Polymorphism) es una variación de la secuencia de ADN que consiste en un cambio de nucleótido. En la mayoría de los casos un SNP posee dos formas alternativas (alelos), aunque pueden haber SNPs trialélicos e incluso tetraalélicos (combinaciones de las 4 bases A, T, C, G). Dos de cada tres SNPs consisten en un cambio de citosina (C) por timina (T) [211, 212]. Los alelos se pueden clasificar, según su frecuencia observada en las poblaciones, en alelo principal o mayor (major allele) y alelo/s raro/s o menor/es (minor allele). Dado que los humanos son diploides, un individuo puede tener para un SNP bialélico uno de tres genotipos posibles: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto u homocigoto para el alelo menos frecuente. También se pueden clasificar los alelos, desde un punto de vista filogenético, en alelos salvaje (en inglés, wild type) o mutante (mutant allele). Se cree que los alelos mutantes surgen en algún momento de la historia evolutiva de la especie como mutaciones a partir del alelo ancestral (o salvaje) que fueron transmitidas de una generación a otra y que se estabilizaron en el genoma humano por conferir algún tipo de ventaja adaptativa al medio, generándose de este modo el polimorfismo. El alelo mutante es por tanto, desde un punto de vista filogenético, de aparición más reciente y por ello suele ser menos frecuente, aunque no siempre ocurre de este modo.

Introducción

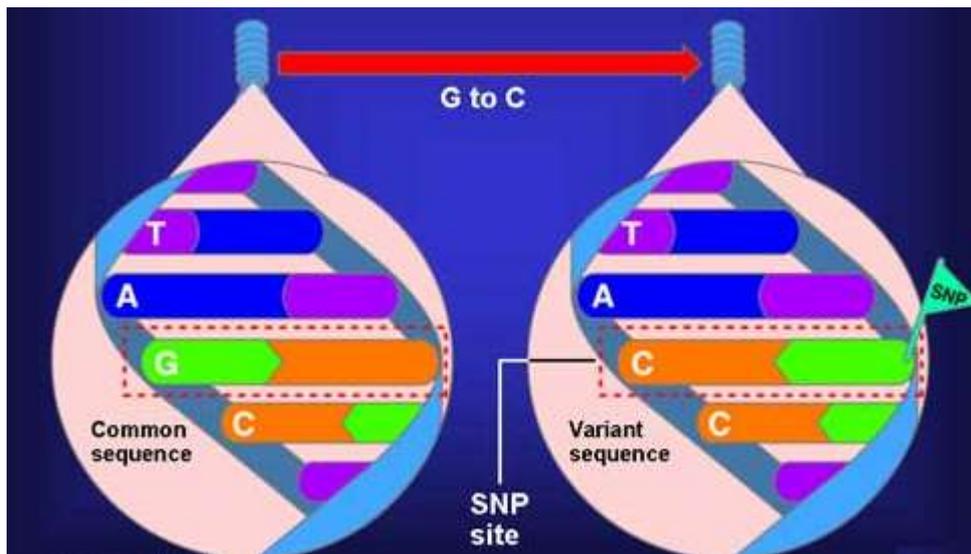


Figura 8. Esquema de los polimorfismos genéticos de un único nucleótido.

Tomada de National Cancer Institute

Aunque filogenéticamente puedan tener el mismo origen, es importante remarcar que los SNPs se diferencian de las mutaciones puntuales en que siempre son variantes constitutivas y no se consideran patogénicas *per se*, ya que si lo fueran no se habrían estabilizado en el genoma. Sin embargo, sí pueden producir susceptibilidad a desarrollar determinadas enfermedades o favorecer la aparición de efectos adversos al tratamiento, habitualmente en combinación con otros factores. Por definición, para que un cambio de nucleótido sea considerado un SNP y no una mutación puntual debe existir una frecuencia mínima (del 1%) del alelo o alelos menores en la población (el alelo principal debe tener una frecuencia menor del 99%). Los SNPs constituyen hasta el 90%

Introducción

de todas las variaciones genéticas humanas, estimándose que uno de cada 200-300 nucleótidos varía entre los distintos individuos.

La relevancia funcional del polimorfismo depende de su localización en el genoma [211]. Según su localización en el genoma, los SNPs se clasifican en: iSNP (localizados en regiones intrónicas), cSNP (en regiones codificantes, exones), rSNP (en regiones reguladoras) y gSNP (en regiones intergenómicas). Los cSNP pueden estar representados por SNPs sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) [213]. Aunque la mayoría de los SNPs se encuentran en regiones no funcionales del ADN o son sinónimos (se produce un cambio de nucleótido que genera el mismo aminoácido, sin alterar por tanto la cadena de ADN), también los hay que afectan a regiones codificantes o funcionales del genoma, pudiendo modificar el sentido de un codón o alterar la expresión de un gen. Por todo ello los polimorfismos genéticos en general, y los SNPs en particular, por ser los más numerosos, tienen una gran importancia biológica, ya que determinan la mayor parte de la variabilidad genética entre individuos y son responsables de la mayoría de las diferencias fenotípicas (observables) entre ellos.

Introducción

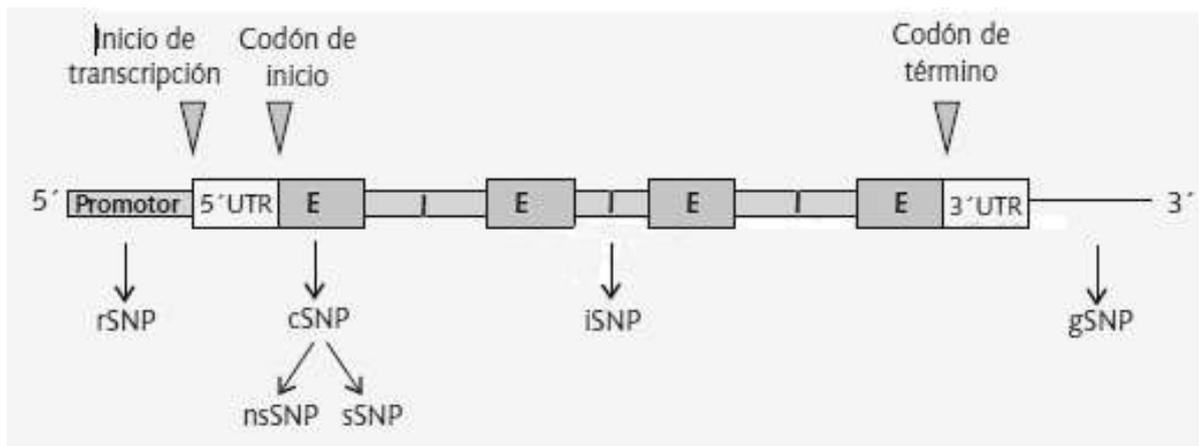


Figura 9. Nomenclatura de SNP en función de la localización en el gen. I: intrón; E: exón; UTR: región no codificante

Desde un punto de vista clínico los SNP pueden determinar, por ejemplo, la diferente predisposición a desarrollar una enfermedad, una mayor agresividad clínica de la misma o diferencias en la forma de responder a un tratamiento.

Los SNPs se encuentran catalogados en la base pública dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Actualmente, en el “dbSNP” se han catalogado más de 10 millones de variantes en la secuencia de ADN[214, 215].

2.1.3 EL ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Un nivel adicional de análisis de la variabilidad genética y su influencia a diferentes niveles, como la predisposición a una enfermedad o la respuesta a un

Introducción

tratamiento farmacológico, lo constituyen los análisis por haplotipos. Cuando los polimorfismos no están en el mismo cromosoma su transmisión a la descendencia se produce de forma independiente. En este caso, la probabilidad de que dos alelos de diferentes polimorfismos sean heredados conjuntamente sería del 50% y su influencia conjunta puede ser analizada como si se tratara de una contribución de variables no dependientes entre sí. Sin embargo, los polimorfismos localizados en el mismo cromosoma no segregan de forma independiente. Si no existiera ningún evento recombinante en un cromosoma durante la meiosis, todos los alelos de los polimorfismos de un mismo cromosoma se heredarían conjuntamente. Incluso produciéndose la recombinación, habrá muchos fragmentos del genoma que se van a transmitir a la descendencia conjuntamente.

Un análisis de haplotipos se realiza para analizar la influencia conjunta de diferentes combinaciones de alelos de diferentes polimorfismos que no son independientes, sino que tienen tendencia a segregarse conjuntamente debido a que su localización física en el genoma es próxima. Se define un haplotipo como un conjunto de variaciones en el ADN que tienen tendencia a ser heredados conjuntamente. Si el estudio está relacionado específicamente con SNPs, un haplotipo se define como una combinación de alelos de diferentes SNPs que se encuentran en el mismo cromosoma y que son heredados como una unidad, la cual se denomina bloque de haplotipo (en inglés, haplotype block) [216].

Introducción

De acuerdo con esta definición, un haplotipo puede englobar un locus, varios loci o un cromosoma entero, en función del número de eventos de recombinación que se han producido durante la meiosis entre un determinado conjunto de loci. Debido a que los humanos son diploides, para cada bloque un individuo hereda dos haplotipos, uno de origen paterno y otro de origen materno. Los fragmentos de genoma que se heredan en bloque tienen una longitud media de entre 11 y 22 Kb, lo que supone una densidad media entre 30 y 100 SNPs por bloque [217]. Se estima que entre el 65-85% del genoma humano puede estar contenido en los bloques de haplotipos. El desequilibrio del ligamiento es un parámetro que cuantifica el grado de segregación independiente entre dos polimorfismos. El desequilibrio de ligamiento define la proximidad física existente entre loci. Y se ha utilizado para definir el tamaño de un bloque de haplotipo.

Por ello, el análisis de haplotipos, a través del análisis del desequilibrio del ligamiento, proporciona también información acerca de los niveles de recombinación génica (el intercambio físico del ADN durante la meiosis) que existe en regiones del genoma que pertenecen a un mismo cromosoma, mientras que en los estudios de ligamiento en individuos emparentados permite localizar en qué región del genoma se localiza una determinada variación genética que puede estar implicada en la predisposición a una enfermedad hereditaria [218].

2.1.4. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS POLIMORFISMOS

Antes de reconocerse la importancia de los polimorfismos en lo que se refiere a su función biológica éstos ya eran utilizados como marcadores genéticos, fundamentalmente en los tests de identificación de individuos y en el diagnóstico genético de enfermedades. Los VNTR minisatélites se empezaron a utilizar en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial. Sin embargo, a partir de 1990 fueron sustituidos progresivamente por los STR, también muy informativos, que al ser de secuencia más corta eran técnicamente más fáciles de manejar y mantenían mejor su integridad respecto a la degradación ambiental. En la actualidad, los SNPs también se utilizan como marcadores debido a su elevada densidad en el genoma, principalmente en los estudios de ligamiento. El objetivo de estos estudios es delimitar una región del genoma donde se encuentra un gen funcionalmente relevante respecto a una enfermedad y analizar la frecuencia de determinados haplotipos (conjunto de alelos en varios polimorfismos) en individuos emparentados que padecen o no dicha enfermedad. Asimismo, los SNPs son los polimorfismos más exhaustivamente analizados en los estudios de asociación, que buscan una relación funcional entre polimorfismo y enfermedad u otra condición clínica, como puede ser la evolución del paciente tras un determinado tratamiento o su toxicidad. El desarrollo de las técnicas de genotipado de SNPs a gran escala (como los microarrays, que permiten la caracterización simultánea de hasta 500.000 SNPs) ha servido para que aumenten las posibilidades de los estudios genéticos, tanto a la hora de

Introducción

localizar genes de interés (ligamiento) como para identificar alelos relacionados con la enfermedad (asociación).

Esta información puede ser utilizada para profundizar en el conocimiento de los mecanismos biológicos subyacentes en las enfermedades, evaluar la predisposición genética de desarrollar una determinada patología , predecir la evolución clínica de una enfermedad y los efectos adversos del tratamiento, desarrollar nuevos métodos diagnósticos, así como diseñar fármacos frente a dianas de interés [127].

2.2 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN HEMATOLOGÍA

Antes de que se iniciara la secuenciación del genoma humano y de que se extendieran las técnicas de genotipado a gran escala, ya se conocía que la variabilidad genética interindividual era la responsable de los problemas de incompatibilidad que se producían en las transferencias de células y tejidos entre individuos. Los polimorfismos son los responsables de la incompatibilidad entre grupos sanguíneos y se puede considerar que la determinación del grupo sanguíneo es el inicio de la aplicación clínica de las técnicas de discriminación de las variaciones interindividuales. Por otra parte, desde la utilización del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos como tratamiento de diversas enfermedades hematológicas se hizo evidente la necesidad de desarrollar procedimientos de tipaje más precisos y exhaustivos que permitieran evitar al máximo los problemas de histocompatibilidad entre donante y receptor. Por ello, una de las aplicaciones inmediatas de las técnicas de genotipado modernas en hematología

Introducción

es la caracterización de polimorfismos relacionados con el reconocimiento antigénico. Pero, sin duda, el campo que mayores expectativas ha despertado es la determinación de la influencia de los polimorfismos en la predisposición genética a desarrollar neoplasias hematológicas. Adicionalmente, se trabaja en la determinación de su valor pronóstico de cara a anticipar los resultados de un procedimiento terapéutico concreto, como puede ser un determinado esquema de quimioterapia o el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Las aplicaciones de los polimorfismos en hematología se abordan con mayor detalle en los siguientes apartados.

2.2.1 INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS EN LA PREDISPOSICIÓN A ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS.

La búsqueda de polimorfismos relacionados con la predisposición a desarrollar enfermedades hematológicas está siendo el objetivo de numerosos proyectos de investigación y, aunque existen estudios en los que se rastrea todo el genoma (estudios GWAS), lo más habitual es que esta búsqueda se restrinja a los genes para los que se sospecha una implicación funcional en los mecanismos relacionados con la patogénesis de la enfermedad. Las neoplasias hematológicas se caracterizan por la presencia de alteraciones cromosómicas, estrechamente relacionadas con la pérdida de la capacidad de mantener la integridad del genoma. Es por ello que los polimorfismos en genes relacionados directa o indirectamente con este proceso podrían influir en la predisposición genética a dichas enfermedades.

Introducción

Dentro de las funciones relacionadas con el mantenimiento de la integridad del genoma están la detoxificación de agentes mutagénicos, la reparación del ADN y la síntesis de nucleótidos

Otro grupo lo conformarían los genes que alteran la supervivencia y el crecimiento de las células hematopoyéticas, incluyendo genes proinflamatorios y reguladores de citocinas, así como genes implicados en la inmunidad natural [219].

- ***2.2.1.1 SNPs en genes detoxificadores de agentes mutagénicos***

Las enzimas metabolizadoras de drogas, carcinógenos y tóxicos ambientales constituyen la primera línea de defensa para evitar que los agentes potencialmente nocivos lesionen el organismo, dañando el ADN. Dichas enzimas se caracterizan por su amplia especificidad de sustrato y por ser fácilmente inducibles o inhibibles por los propios xenobióticos. Los polimorfismos genéticos en los genes de estas enzimas pueden modificar su actividad enzimática, bien por alteración funcional del propio enzima o por alterar sus niveles de expresión. Si la presencia de un determinado alelo de un polimorfismo de un gen de detoxificación genera una disminución de la función detoxificadora, por cualquiera de los mecanismos posibles, esto puede aumentar la exposición del ADN a los agentes genotóxicos y aumentar el número de lesiones en el

Introducción

ADN potencialmente carcinogénicas. Ello podría conferir un mayor riesgo de desarrollar procesos neoplásicos, especialmente en aquellos individuos que han estado intensamente expuestos a agentes genotóxicos, por exposición ambiental a contaminantes o porque han recibido tratamientos citotóxicos [220].

Se han descrito polimorfismos en los genes que codifican la superfamilia de citocromos implicados en la fase I del metabolismo, la quinona óxido-reductasa, que actúa en el metabolismo de los radicales libres, y en la familia de enzimas glutatión-S-transferasas que influyen en el riesgo de desarrollar leucemias agudas y en la respuesta al tratamiento[221, 222].

Una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de drogas es el citocromo P450 (CYP). Aunque la principal función del CYP es participar en reacciones de detoxificación transformando un compuesto farmacológicamente activo en inactivo, excretándolo por la orina, también participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo [223]. Los polimorfismos en los citocromos *CYP1A1*, *CYP3A4* y *CYP3A5* se han estudiado en relación con su posible participación en el desarrollo leucemias agudas. Así, en un estudio de casos y controles realizado en adultos con LMA se observó que el alelo *CYP1A1*4* confería un mayor riesgo de leucemia, que era más evidente cuando el genotipo *CYP1A1*4* estaba combinado con los alelos *CYP1A1*2B* y *delGSTT1*. A su

Introducción

vez, el polimorfismo *CYP1A1*2B* era más frecuente en pacientes con LMA que presentaban mutación de *NRAS* que en el resto de casos. Por su parte, Krajinovic y cols. [224] describieron una mayor incidencia del alelo *CYP1A1*2A* en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) en comparación con los controles, observación que ha sido confirmada posteriormente en el metaanálisis realizado por Vijayakrishnan y cols [225].

La quinona óxido-reductasa (NQO1) es una proteína flavina que convierte las quinonas en hidroquinonas, actúa como antioxidante y protege a las células frente a sustancias tóxicas, al evitar la generación de intermediarios que podrían reaccionar con el oxígeno dando lugar a radicales superóxido. Se han descrito dos polimorfismos, *NQO1*2* (C609T) y *NQO1*3* (C465T), que producen el cambio de los aminoácidos P187S y R139W, respectivamente. Ambas variantes afectan a la función de la enzima: *NQO1*3* causa una disminución de la actividad enzimática, mientras que *NQO1*2* causa una pérdida completa de la actividad enzimática, truncando su actividad citoprotectora [226, 227].

Las glutatión-S-transferasas (GST) constituyen una familia de enzimas implicadas en la detoxificación de varios compuestos, incluyendo xenobióticos, agentes cancerígenos ambientales y agentes quimioterápicos. Se han observado polimorfismos en al menos tres genes de la familia GST: *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*. Los genes *GSTM1* y *GSTT1* presentan un polimorfismo que consiste en la supresión completa del gen que causa la pérdida de la actividad enzimática. El polimorfismo *GSTP1*B* causa la susti-

Introducción

tución de una isoleucina por una valina en el sitio activo de unión electrofílico del péptido GST- π y afecta a la actividad catalítica y la estabilidad térmica de la enzima. En la leucemia *de novo* se ha descrito una débil asociación entre los genotipos *delGSTM1* o *delGSTT1* y el riesgo de LMA y LLA, con un efecto aditivo sobre el riesgo si *delGSTM1* se combina con *delGSTT1*, debido a la ausencia total de actividad de las dos enzimas[228].

- **2.2.1.2 SNPs en genes reparadores del ADN**

La inestabilidad genómica causada por la gran variedad de agentes tóxicos representaría un problema mayor para las células y los organismos en caso de que no existieran los mecanismos de reparación del ADN. Las enzimas reparadoras de ADN supervisan continuamente los cromosomas para corregir los daños en residuos de nucleótidos generados por la exposición a carcinógenos, compuestos citotóxicos y mutágenos endógenos. Estos daños en general causan una desestabilización en el ADN incluso en células que no proliferan. Actualmente se están identificando continuamente polimorfismos en genes reparadores del ADN que tienen un papel principal en la carcinogénesis esporádica [229]. En mamíferos, las células han desarrollado en general cuatro mecanismos de reparación, que poseen una actividad directa en la reparación del daño en el DNA y es posible encontrar influencia de SNPs en cada una de ellas[103].

Introducción

I. MMR (mismatch repair pathway)

Corrige principalmente nucleótidos que han sido erróneamente incorporados y que se generan durante la replicación del ADN primordialmente por la vía de recombinación no homóloga. Sin embargo, su papel en la reparación de daños causados por exposición es limitada. Si estas lesiones no son reparadas se generan estructuras aberrantes, generalmente bases únicas o en tándem, que llegan a ser externas a la doble hélice debido al mal alineamiento de las cadenas del ADN, causando incrementos o disminuciones hereditarias en la longitud de una determinada secuencia repetitiva. Cuando se localizan en genes de expresión, estos daños resultan en cambios en la fase de lectura y en la síntesis de proteínas inactivas y truncadas [230, 231].

II.- Mecanismo de reparación por escisión de bases (BER).

Implica genes que procesan bases alteradas, pérdidas de bases y otros daños en su mayoría causados por radicales libres. En general, las lesiones en el ADN causadas por agentes endógenos son mayormente reparadas por esta ruta. XRCC1 actúa como proteína estabilizadora permitiendo la unión de la polimerasa y la ligasa al sitio de reparación [232-234].

III.- Reparación de lesiones por ruptura de doble cadena (DBS).

Estas lesiones son probablemente las más nocivas para la célula; surgen tras la acción de agentes exógenos como la radiación ionizante, ciertas drogas quimioterápicas, agentes endógenos como moléculas de oxígeno reactivas y el estrés mecánico en los cromosomas. Asimismo, pueden producirse cuando las horquillas de replicación del ADN encuentran rupturas en una cadena o en el extremo terminal de los cromosomas, debido a un metabolismo defectuoso de los telómeros. Una vez el daño en el ADN es detectado, el ciclo celular se detiene y se inicia la formación de complejos de ciertos factores de reparación, entre ellos la proteína quinasa ATM, que controla los reguladores del ciclo celular. Otros factores adicionales están representados por BRCA1 y BRCA2 que se encuentran mutados en el 15-20% de los cánceres de mama familiares y cuya función reside en la coordinación de la maquinaria de precombinación homóloga. Existe otro factor XRCC3 (de la familia de proteínas de RAD51) relacionado con polimorfismos asociados a un incremento en el riesgo de melanoma maligno y cáncer de vejiga. Existen dos mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena, nonhomologous end joining (NHEJ) y recombinación homóloga (HRR), que incluyen numerosos genes que codifican las proteínas de RAD50-55, RAD57, y RAD59, MRE11, XRCC2, XRCC3 y XRS2, que reparan las rupturas de cadena producidas directamente por la exposición a radiación ionizante IR o indirectamente por reparación incompleta de otros daños. Polimorfismos de estos genes se han asociado con el riesgo de desarrollar leucemias secundarias (LS)[235] [236].

IV.- Reparación por escisión de nucleótidos (NER).

Este mecanismo remueve lesiones inducidas por UV y daños de DNA asociados a exposiciones a químicos que distorsionan las hélices de DNA e interfieren en la unión normal de bases, pudiendo bloquear la replicación y transcripción normales. Existen dos mecanismos de reparación NER, uno general GG- NER que escanea el genoma entero y depende del complejo de reparación XPC–hHR23B, y otro sistema de reparación durante la transcripción TCR (transcription coupled repair), que reconoce daños que bloquean la actividad de la RNA polimerasa II en sitios transcripcionalmente activos [237, 238].

- ***2.2.1.3 SNPs en genes de síntesis de nucleótidos y ruta del folato***

El folato está implicado en reacciones que incluyen la síntesis de purinas y pirimidinas, así como la provisión de grupos metilo para la metilación de ADN, ARN y proteínas. Se han propuesto dos mecanismos por los que la deficiencia de folato podría causar malignidad: la hipometilación del ADN, que provocaría la activación de protooncogenes, y la incorporación de uracilo durante la síntesis de ADN.

La metilentetrahidrofolato-reductasa (MTHFR) convierte el 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato, el cual dona un grupo metilo a la homocisteína para que se transforme en metionina durante la síntesis de proteínas. La

Introducción

timidilato-sintetasa (TS) cataliza la conversión de uracilo a timina, en la síntesis de ADN. En el gen *MTHFR*, el polimorfismo *C677T* supone la sustitución A222V que produce una enzima termolábil que causa hiperhomocisteinemia en portadores con bajos niveles plasmáticos de ácido fólico. Un segundo polimorfismo en *A1298C* conduce a una sustitución E439A. Los individuos homocigotos para este polimorfismo muestran una reducción del 61% en la actividad de MTHFR. Los dobles heterocigotos (*A1298C* y *C677T*) presentan una reducción de actividad de la enzima en un 50-61%. La TS posee un único sitio de repetición interna en tándem en 5' UTR. Este polimorfismo consta de repeticiones en tándem de 28pb en múltiplos de dos (2R) o tres (3R). El polimorfismo 3R aumenta la expresión del gen. Esta hiperexpresión aumentaría la conversión de dUMP en dTMP, disminuyendo los niveles de uracilo.

En los estudios realizados en LMA no se ha visto que los polimorfismos *MTHFR C677T* y *A1298AC* predispongan a desarrollar esta enfermedad[239]. Sin embargo, varios estudios han descrito una menor incidencia de estos polimorfismos en los pacientes con LLA que en los controles, lo que sugiere que confieren una reducción en el riesgo de LLA [240, 241]. El polimorfismo *TS3R* también se ha asociado con un menor riesgo de LLA. De la misma forma, otras variantes genéticas parece que podrían reducir la susceptibilidad al cáncer y aumentar el riesgo de toxicidad derivada al uso de fármacos antagonistas del folato[242] [243].

Introducción

- **2.2.1.4 Otros SNP asociados a la predisposición de enfermedades hematológicas**

El gen *JAK2* influye en la señalización de una amplia variedad de citocinas y factores de crecimiento e interviene en la proliferación, diferenciación, migración celular y apoptosis. La mutación del gen *JAK2* está directamente implicada en la patogénesis de las neoplasias mieloproliferativas crónicas, más del 95% de los casos de policitemia vera y casi la mitad de los casos de trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria adquieren la mutación somática 1849G>T *JAK2* (V617F). Jones et al describen el papel de los polimorfismos en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedad en la relación objetivada entre el haplotipo 46/1 *JAK2* y la predisposición al desarrollo de neoplasias mieloproliferativas crónicas asociadas a *JAK2* (V617F) OR =3.7; IC (3.1-4.3) proporcionando un modelo donde un factor genético constitucional está asociado a un aumento del riesgo de adquirir una determinada mutación[244, 245].

En la búsqueda de variaciones interindividuales que se asocien con el desarrollo de síndromes mieloproliferativos está el artículo de Oddsson et al, en el que se analiza una población de 2230 individuos, en dicho trabajo se validó la asociación entre rs10974944_G y rs1034072_A en el gen *JAK2* y el desarrollo de síndromes mieloproliferativos y se descubrió la nueva asociación entre dichos síndromes y la variante rs2736100_C localizado en el segundo intrón del gen *TERT* en el locus TERT-CRPTM1L. Dicho SNP es una de las variantes asociada a los telómeros largos, por lo

Introducción

que podría actuar sobre el gen *TERT* codificando la transcriptasa del complejo telomerasa, fundamental para mantener la longitud de los telómeros[246]. Si bien, los síndromes mieloproliferativos se han asociado con telómeros cortos no queda muy claro el porqué de la relación con telómeros largos de este SNP de no ser por el papel de *TERT* en la reparación del ADN, en la regulación del ciclo celular y en las señales de la célula. Dicha hipótesis estaría justificada por la falta de relación de rs10936599_C en el gen *TERC* (parte del complejo telomerasa) con los síndromes mieloproliferativos.

2.2.2 INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS EN LA EVOLUCIÓN CLINICA DE LA ENFERMEDAD

Existe también una intensa investigación en determinar la influencia de los polimorfismos en la evolución de los pacientes hematológicos. A continuación se describen una serie de ejemplos en donde se ha observado la influencia de los polimorfismos en el curso clínico de la enfermedad.

Así, las variantes del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa C677T y A1298C, además de influir en la predisposición a desarrollar neoplasias, podrían influir en la evolución y el desarrollo de complicaciones durante el tratamiento [247]. En un estudio donde se incluyeron un total de 110 pacientes con linfoma no Hodgkin, se observó que el riesgo de desarrollar mucositis, toxicidad hepática y trombopenia era mucho mayor en los pacientes tratados con metotrexato (n=68). Pero, además, el riesgo de desarrollar mucositis grado 3-4 estaba aumentado en los individuos del grupo 677TT,

Introducción

especialmente en los pacientes que recibieron tratamiento con metotrexato (OR=24.6; 95% CI 2.49-87.41; P valor: 0.001). Resultados similares se objetivaron para el SNP 1298CC, con un significativo aumento del riesgo de mucositis de grado 3-4, más marcado en pacientes expuestos a metotrexato. Además, la supervivencia libre de evento a los 5 años fue inferior en los portadores de la variante 677T [242].

La regulación de las caspasas es fundamental para el mantenimiento de la apoptosis. En un estudio reciente se examinaron 5 SNPs en 4 genes de la vía de las caspasas [CASP3 Ex8-280 C > A (rs6948), CASP3 Ex8 + 567 T > C (rs1049216), CASP8 Ex14-271 A > T (rs13113), CASP9 Ex5 + 32 G > A (rs1052576), CASP10 Ex3-171 A > G (rs39001150)] a fin de objetivar su posible influencia en el riesgo de desarrollar mieloma múltiple. Comparando individuos con el genotipo TT de CASP3 Ex8 + 567 T > C con aquellos sujetos con genotipo CC, estos últimos tenían un riesgo 5 veces mayor de desarrollar mieloma múltiple. En cambio los individuos con los genotipos AG y AA de CASP9 Ex5 + 32 G > A mostraron un menor riesgo de desarrollar mieloma múltiple (OR(AG) = 0.8, 95% CI = 0.5-1.3; OR(AA) = 0.5, 95% CI = 0.3-0.9; p = 0.02) [248].

Recientemente se han identificado varios SNPs en el gen *BCL-2* [249]. Uno de ellos (rs1801018), provoca cambios en la expresión del gen [121]. Este polimorfismo se ha asociado al riesgo de progresión de enfermedad y a la supervivencia de los pacientes

Introducción

con leucemia linfocítica crónica[121], así como a la predisposición a desarrollar LMC [120].

El receptor P2X7 es una pieza clave en el procesamiento y emisión de la interleucina 1, por lo que alteraciones en su función podrían tener un papel importante sobre la interleucina 1 y sus múltiples funciones, como los efectos proinflamatorios y su actividad inmunoreguladora. A fin de evaluar la relación entre los polimorfismos de A1513C del gen *P2X7* con la supervivencia del trasplante alogénico, en un estudio se genotiparon 145 receptores y 150 donantes. En el análisis multivariante donde se incluyeron variables clínicas y genéticas, la supervivencia global fue significativamente menor en los receptores cuyo donante tenía un genotipo CC. De hecho, la incidencia de infecciones bacterianas, fue del 67% en los receptores con donante CC y del 18% en los receptores de donantes con genotipo AA o AC (P valor: 0.014). Por tanto, el polimorfismo A1513C del gen *P2X7R* está relacionado con el riesgo de infecciones y la supervivencia después de un trasplante alogénico. Esta información podría ser útil a la hora de seleccionar el mejor donante [250]

Las infecciones son una de las principales causas de morbi-mortalidad en niños y adultos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda. El grado de neutropenia es un factor importante que determina el riesgo de desarrollar infecciones. El Toll-like receptor 4 (TLR4) ha mostrado tener un papel relevante en la inhibición de la apoptosis de los neutrófilos. Recientemente, se ha publicado que las variaciones genéticas en

Introducción

genes codificantes de los Toll-like receptors (TLRs) se asocian al riesgo de desarrollar infecciones tras trasplante alogénico. En concreto, se objetivó una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo T-1237C (TLR9) y la susceptibilidad a presentar una neumonía viral, no existiendo relación con el riesgo de infecciones fúngicas [251].

2.2.3 POLIMORFISMOS Y SU PAPEL EN LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y LA TOXICIDAD

El fin de la farmacogenómica es identificar el componente hereditario que influye en las diferencias interindividuales en la respuesta al tratamiento. Uno de los retos es la identificación de los polimorfismos que determinan o pueden predecir la evolución de cada sujeto expuesto a un determinado tratamiento, en términos de eficacia y toxicidad, con el objetivo de mejorar los resultados mediante una terapéutica ajustada al perfil genético.

Uno de los descubrimientos más importantes en farmacogenómica es la identificación y las aplicaciones clínicas de las variaciones genéticas en el gen de la tiopurina-metiltransferasa (codificado por el gen *TMPT* en el cromosoma 6p22.3). El producto del gen *TMPT* cataliza la S-metilación de un determinado grupo de medicamentos usados habitualmente en enfermedades hematológicas malignas y autoinmunes, como son la azatioprina, la 6-mercaptopurina y la tioguanina. Las tioguaninas son administradas como un pro-fármaco que requiere la conversión de

Introducción

nucleótidos de tioguanina por el producto del gen *TMPT*. La droga activa es un antileucémico que en exceso o en casos de actividad prolongada puede dar lugar a toxicidades hematológicas. Diferencias en la actividad enzimática se correlacionaron con variaciones en el gen *TMPT*. Los individuos heterocigotos tenían una actividad intermedia mientras que los homocigotos presentaban una actividad baja o indetectable. Los individuos con una actividad disminuida presentaban toxicidad hematológica, por lo que estos fármacos se evitaban como tratamiento antileucémico[252]. Está descrito que niños con variantes inactivas de *TMPT* presentan un alto riesgo de recaída de la leucemia, probablemente como consecuencia de no poder administrar unas dosis adecuadas de tiopurinas. El grado de variación del gen es relativamente alto, lo que sugiere un alta presión de selección sobre *TMPT* [253].

Recientemente, nuestro grupo ha publicado la relación entre los polimorfismos de *TYMP* (timidina fosforilasa), enzima relacionada con la síntesis de nucleótidos, y los resultados del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. La enzima *TYMP* contribuye a la recuperación de las células tras el daño por diversos agentes. Se han descrito polimorfismos en este gen que pueden afectar a su función, influyendo con ello en la reparación del ADN. Así, en nuestra serie de pacientes trasplantados que recibieron metotrexato se observó que los portadores del alelo infrecuente A del polimorfismo rs112723255 tenían una menor supervivencia que el resto. Asimismo, se objetivó una mayor incidencia de EICH en los pacientes con donante portador del alelo infrecuente. El subgrupo con mayor riesgo de EICH estuvo constituido por pacientes

Introducción

homocigotos para el alelo mayor trasplantados de donante portador del alelo menor [254]. En caso de confirmarse estos datos en otras series, dicha información sería útil en la selección de donantes previo al trasplante

3. POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNPS) EN LA LMC

Diversos estudios han analizado el papel de SNPs en la patogenia, evolución clínica y respuesta al tratamiento de la leucemia mieloide crónica. Sin embargo, los resultados deben tomarse aún con cautela, porque proceden de series relativamente pequeñas con heterogeneidad metodológica y en muchos casos no han sido validados en estudios independientes. Debe tenerse en cuenta que en los estudios de SNPs es imprescindible confirmar la reproductibilidad de los resultados antes de poder trasladarlos a la práctica clínica.

3.1 SNPs Y SUSCEPTIBILIDAD A LMC

A diferencia de en otras neoplasias, en la LMC es limitada la información disponible acerca de la influencia de los SNPs en la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad.

El estudio más importante en este campo es, sin duda, el publicado por Kim y cols [120]. En este trabajo se estudiaron un total de 80 SNPs de genes implicados en diferentes vías involucradas en la patogenia de la LMC (apoptosis, angiogénesis,

Introducción

proliferación celular) y en la resistencia a fármacos. En total se incluyó 170 pacientes diagnosticados de LMC y 182 controles. En el análisis multivariante, únicamente *BCL2* rs1801018 estaba significativamente asociado con la susceptibilidad a LMC tanto en el estudio individual como en el de haplotipos. Aquellos pacientes con el alelo de riesgo de *BCL2* presentaban de 1,3 a 1,7 veces mayor riesgo de desarrollar LMC. A fin de considerar el efecto genotípico en la progresión de la enfermedad, se comparó el genotipo y la frecuencia de los alelos para todos los SNPs entre el grupo de LMC de novo y el grupo de LMC que ya había recibido tratamiento, sin que se objetivaran diferencias significativas entre ambos [120]. Como explicación se postuló que la influencia de este polimorfismo en *BCL2* podría derivar de su efecto promotor de la supervivencia de las células leucémicas, facilitando la adquisición de lesiones genéticas adicionales, tal y como se pudo demostrar en un modelo animal[116].

En un trabajo posterior del mismo grupo donde se estudiaron un total de 2744 pacientes (671 casos, 2073 controles), se identificaron 2 loci cromosómicos, 6q25.1 y 17p11.1, asociados a la susceptibilidad a LMC. En el análisis inicial se incluyeron 201 casos y 497 controles, evaluando 456,522 SNPs. Un total de 56 SNPs y 5 loci cromosómicos (5q33.3, 6p24.1, 6q25.1, 10q21.3 y 17p11.1) se asociaron de forma significativa con la predisposición a LMC. En estas asociaciones involucraban a 18 genes relacionados con el cáncer, como *RMND1*, *AKAP12*, *ZBTB2*, *EBF1*, *CTNNA3* y *WSB*. Estos resultados fueron posteriormente evaluados en dos series independientes, una procedente de Corea y otra de Canadá. Los SNPs en 6q25.1 se asociaron al riesgo

Introducción

de LMC en las dos cohortes de pacientes, mientras que los SNPs en 17p11.1 lo hicieron únicamente en en pacientes coreano[255]. Se han publicado otros artículos tratando de identificar SNPs de predisposición a LMC, pero en ningún caso se han validado los resultados en series independientes.

3.2 SNPs Y FARMACOGENÓMICA EN LA LMC

Como se ha descrito anteriormente, entre un 25-30% de los pacientes con LMC no alcanzan una respuesta óptima al tratamiento con imatinib. Una de las causas potenciales de resistencia incluye las variaciones en los mecanismos de distribución del imatinib desde su ingesta oral al interior de las células leucémicas. En este sentido, se han publicado varios trabajos donde se analiza el impacto de la variabilidad interindividual en genes que intervienen en el metabolismo del fármaco y por tanto en los resultados del tratamiento y que pretenden identificar potenciales marcadores en la farmacocinética y farmacodinámica de imatinib. Dichos marcadores podrían por tanto predecir para cada individuo la falta de eficacia del fármaco o exceso de toxicidad al mismo, desarrollando guías de tratamiento personalizado.

La mayoría de estudios de farmacogenómica se han realizado sobre el "Human organic cation transporter 1 transporter" *OCT-1*, que internaliza imatinib en la célula diana BCR-ABL+ [256] y sobre "adenosine triphosphate binding cassette" (ABC) transporters *ABCB1* que expulsa el imatinib del interior de las células hematopoyéticas[257] [258]. Muchos han sido los polimorfismos en estos genes que

Introducción

influyen en la farmacocinética de imatinib, pero la información derivada de ellos no es suficiente para realizar un tratamiento individualizado, ya que en muchos de los estudios las conclusiones son discrepantes, bien por diferentes tamaño muestral, criterios de respuesta, protocolos de tratamiento y dosis de imatinib.

Con respecto a los polimorfismos en el gen *OCT-1* varios estudios han demostrado que los pacientes con baja actividad OCT-1 presentan una menor probabilidad de respuesta a imatinib a las dosis estándar que el resto. [189, 259, 260]. Sin embargo, los trabajos centrados en la posible asociación entre los SNPs del gen *OCT1* y la respuesta a imatinib muestran resultados contradictorios. Así, Bazeos y cols [261] observaron en una cohorte de 132 pacientes con LMC que el SNP G401S (rs34130495) del gen *OCT-1* estaba asociado significativamente con una mayor tasa de RMM. En contraste, el grupo de Adelaida no encontró ninguna relación entre dicho SNP y la probabilidad de RMM. Por otro lado, en un trabajo de Maffioli y cols [186], en el que participaron pacientes de nuestra serie, no se objetivó una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo de rs628031 del gen *hOCT1* y la respuesta a imatinib, si bien el SNP rs6935207 se correlacionó con la respuesta inadecuada al tratamiento. Takayasshi y cols [267] describen que el polimorfismo *OCT-1* 1022A_G va asociado a una mayor RMM, aunque dicha variante no afecte a la farmacocinética de imatinib. En un otro estudio con una serie de 229 pacientes diagnosticados de LMC en tratamiento con imatinib se observó que el fallo del tratamiento estaba asociado con el SNP de *OCT1* (rs683369) [263].

Introducción

Con respecto a *ABCB1* (*MDR1*), imatinib es un sustrato del eflujo mediado por la proteína P, que a su vez se encuentra codificada por dicho gen. La variación de la función de dicho gen podría explicar la variabilidad de respuestas al tratamiento, tal y como ocurre en otras neoplasias, dado que los SNPs en *ABCB1* podrían alterar la función de la proteína e influir con ello en la absorción y eliminación de la droga [262]. En un trabajo reciente se estudiaron los 3 polimorfismos más relevantes de *MDR1*: 1236C>T, 2677G>T y 3435C>T, observándose una correlación entre el número de alelos T en el locus 1236 y la RMM [263]. En concreto, la tasa de RMM fue del 85%, 53% y 40% para los pacientes de genotipo TT, CT y CC, respectivamente, lo que sugiere un efecto aditivo de cada uno de los alelos T. Además, los pacientes homocigotos. Para el alelo T del SNP 1236C>T tenían una C_{min} de imatinib mayor que el resto. En el estudio de Maffioli y cols. se objetivó que el ser portador del alelo T en el SNP rs2032582 *ABCB1* confería protección frente al fallo inicial al tratamiento con imatinib [186]. En contraste, Vivona y cols no encontraron correlación entre estos 3 SNPs de *ABCB1* (1236C>T (rs1128503), 3435C>T (rs1045642) y 2677G>T/A (rs2032582) y la respuesta a imatinib en una serie de 118 pacientes con LMC. [264].

En otro estudio, realizado por Ni et al se estudiaron 3 polimorfismos genéticos de *ABCB1* T1236C, G2677T/A y C3435T en un total de 52 pacientes diagnosticados de LMC en tratamiento con imatinib, la distribución de los tres genotipos fue diferente según si los pacientes eran resistentes o sensibles al tratamiento. La incidencia de la resistencia se correlacionaba con el número de alelos T en el locus 1236 y 3435. Para el

Introducción

polimorfismo G2677T/A se observó que los pacientes alcanzaban mayores remisiones completas en los pacientes AG/AT/AA, cuando se comparaba con TT/GT/GG. Los pacientes con 3435TT/CT presentaban una mayor incidencia de resistencias cuando se comparaban con los pacientes con el genotipo CC. Por ello la determinación de 1236T, C3435T y G2677T podría ser útil, en la predicción de la respuesta al tratamiento con imatinib en pacientes con LMC [265].

Otro de los genes tratado en los estudios de farmacogenómica de imatinib es *SLCO1B3*[185] , que al igual que *OCT-1* regula la internalización de imatinib en la célula[257] [258]. En el estudio realizado por Widmer y cols el SNP *SLCO1B3* 334TG/GG podría afectar los niveles leucocitarios de imatinib modulando su transporte y/o su afinidad frente a imatinib, si bien en este estudio no se objetivaron diferencias en la respuesta clínica a imatinib entre los pacientes con genotipo *SLCO1B3* 334TT y aquellos con *SLCO1B3* TG/GG, en otro estudio realizado por Takeru et al el polimorfismo *SLCO1B3* 334T_G se pudo asociar con los niveles leucocitarios de imatinib en los pacientes con LMC[266] pero no hubo variabilidad de la concentración entre los pacientes que alcanzaron una RCC frente a los que no, a diferencia de lo que ocurría en el estudio realizado por Bazeos et al en el que el polimorfismo *SLCO1B3* 334T_G se asociaba con los niveles leucocitarios de imatinib, así como con la respuesta al tratamiento [261] . Por lo que relación entre la variabilidad, concentración del fármaco y la respuesta alcanzada debería validarse en otros estudios.

3.3 SNPs Y SUPERVIVENCIA EN LA LMC

En una serie de 229 pacientes se analizó el impacto pronóstico de 79 SNPs de genes de vías influyentes en la apoptosis, en la angiogénesis, en las vías de señalización de IFN-alfa, en el transporte de fármacos y en el metabolismo de imatinib. Se observó que los SNPs de los genes *IFNG* (rs1861494, rs2069705), *FASL* (rs763110), *FAS* (rs2234767, rs2234978), *VEGFR2* (rs1531289) y *WT1* (rs2234590) se correlacionaron con la probabilidad de respuesta citogenética completa; los SNPs de los genes *IFNG* (rs1861494, rs2069705), *BIRC5* (rs9904341), *FAS* (rs2234978) y *ABCG2* (rs2231142) con la RMM; de los genes *IFNG* (rs2069705), *JAK3* (rs3212713) y *ORM* (rs3182041) con el fallo al tratamiento. La validación externa confirmó que el genotipo de *IFNG* (rs2069705) era predictivo de la respuesta citogenética completa y de la respuesta molecular mayor [267]. *IFNG* está implicado en las vías de señalización de interferón y afecta la proliferación y supervivencia de las células hematopoyéticas.

El receptor tipo 1 IFN es una estructura heterodimérica con dos subunidades codificadas por los genes *IFNAR1* y *IFNAR2*. La unión del IFN con el receptor induce la activación de JAK1 y de TYK2, que posteriormente fosforilan las proteínas STAT. Los dímeros STAT fosforilados migran al núcleo donde activan la transcripción de los genes diana. Polimorfismos en los genes codificantes de los distintos componentes de la cascada de transducción de IFN se han asociado con múltiples enfermedades como el lupus sistémico, asma, enfermedad de Crohn. Con respecto a su papel en la respuesta al

Introducción

tratamiento de la LMC con interferón Kreil y cols estudiaron un total de 17 SNPs localizados dentro y cerca de genes codificantes que influyen en la cascada de transducción de señal del IFN: *IFNAR1*, *IFNAR2*, *JAK1*, *TYK2*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5a/b*. De todos los SNPs estudiados únicamente rs6503691 en el exón 1 de *STAT5b* mostró una diferencia significativa en los no respondedores frente a los respondedores. Sin embargo, en el análisis multivariado donde se incluyeron factores clínicos rs6503691 perdió la significación estadística. En el estudio del HAP MAP rs650691 se encuentra en una región con un gran desequilibrio de ligamiento de 17q21, donde se incluye *STAT5A*, el extremo 5' de *STAT5B* y el extremo 3' de *STAT3*. Por ello, este SNP podría ir ligado a la expresión de estos 3 genes. La expresión de *STAT3* va íntimamente ligada al genotipo de rs6503691, con lo que diferencias polimórficas en *STAT3* pueden ser determinantes en la respuesta a IFN, si bien estos resultados no han sido validados por el momento en otras series[268].

En la actualidad, no es posible anticipar qué pacientes en respuesta molecular profunda recaerán en caso de suspender el tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa. De forma llamativa, un trabajo reciente ha encontrado una asociación entre los polimorfismos del gen *BCL2L1* (BIM) y el riesgo de recaída tras la suspensión de imatinib [202]. Así, los pacientes en respuesta molecular profunda portadores del polimorfismo de delección *BCL2L1* tenían un mayor riesgo de recaída que el resto de casos. La confirmación de estos resultados en otras series podría tener un elevado interés clínico. [269]

Introducción

Existe evidencia de que la actividad BCR-ABL interfiere con los mecanismos de reparación del ADN y facilita la inestabilidad genómica de la clona proliferante, mediante su efecto promotor de la supervivencia de clonas con alteraciones genéticas secundarias [103]. Estas alteraciones genéticas adicionales podrían conferir resistencia al tratamiento con imatinib por vías independientes a BCR-ABL. Por ello, puede ser de interés valorar la relación entre la variabilidad interindividual en genes encargados del mantenimiento de la integridad del ADN y respuesta al tratamiento de la LMC. En este sentido, se estudiaron un total de 19 SNPs de genes relevantes en la reparación del ADN, entre los cuales se encontraban *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC4*, *ERCC5*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC4* y *XRCC5*. Entre ellos, sólo los polimorfismos del gen *ERCC1* se asociaron de forma significativa con la respuesta al tratamiento con imatinib. Así, se registró una mayor tasa de RCC y de RMM en aquellos pacientes con genotipo TT frente a los CT y CC[270]

Por último, un estudio reciente se centró en el impacto de la variabilidad interindividual mediada por SNPs en los resultados del trasplante alogénico en pacientes con LMC. Así, se evaluaron SNPs de los genes del antagonista del receptor de la interleucina 1 (*IL1RN*), interleucina 4 (*IL4*), interleucina 6 (*IL6*), interleucina 10 (*IL10*), interferón (*IFNG*), factor de necrosis tumoral (*TNF*), receptores de superficie del receptor del factor de necrosis tumoral II, receptor de la vitamina D (*VDR*) y el receptor alfa de los estrógenos (*ESR1*). La presencia en el donante del alelo *IL1RN*, la ausencia en el paciente de *TNFRSF1B* 196R, la ausencia en el donante de *IL10*

Introducción

ATA/ACC y la presencia en el donante del alelo *ILIRN* se asociaron con un aumento de la mortalidad relacionada con el TPH y una disminución de la supervivencia global. Los autores concluyeron que esta información podría mejorar la capacidad de predicción de los índices de riesgo del trasplante disponibles en la actualidad [271].

I.II HIPÓTESIS DE TRABAJO:

-Imatinib es un potente inhibidor de BCR-ABL que permite obtener respuestas moleculares en la mayoría de pacientes con LMC. Sin embargo, alrededor de un tercio de los enfermos fracasan al tratamiento. Conocer de antemano aquellos pacientes con mayor probabilidad de presentar fallo a esta terapéutica podría ser útil para individualizar el tratamiento.

-La variabilidad interindividual mediada por polimorfismos genéticos se ha implicado en la predisposición a desarrollar neoplasias y en la respuesta al tratamiento en otros contextos clínicos.

-Por tanto, cabría esperar que los polimorfismos genéticos de los distintos componentes implicados en la vía de señalización de BCR-ABL y en la distribución del imatinib influyesen en la susceptibilidad a desarrollar una LMC, y en la respuesta al tratamiento.

I.III OBJETIVOS CONCRETOS:

Objetivo principal

- Estudiar el papel de los polimorfismos genéticos en la respuesta al tratamiento de primera línea con imatinib en una serie de pacientes diagnosticados de LMC en fase crónica. En concreto, se estudiarán SNPs en los siguientes genes:

- Genes de la vía NER, vía con importante papel en la reparación de lesiones del ADN y genes detoxificadores

Introducción

- Genes de las proteínas PTPs y SOCS, que participan en la regulación de las rutas de transducción de señal activados por BCR-ABL.
- Genes implicados en el metabolismo de imatinib
- Gen de la proteína antiapoptótica BCL-2.

Objetivos secundarios

- Estudiar el papel de los SNPs en la susceptibilidad heredada a desarrollar una LMC, así como su relación con el perfil clínico de la enfermedad.

Introducción

SUJETOS A ESTUDIO Y
METODOLOGÍA

Material y métodos

II. SUJETOS A ESTUDIO Y METODOLOGÍA

1. SUJETOS A ESTUDIO

La población total a estudio incluye una serie de 190 pacientes diagnosticados de LMC (BCR-ABL positivos) en 4 instituciones españolas (Hospital Clínic de Barcelona, Hospital del Mar de Barcelona, Hospital La Fe de Valencia y Hospital Clínico Universitario de Valencia). Además, para el estudio de la predisposición genética a desarrollar una LMC se ha incluido un grupo control compuesto por 370 individuos sanos.

Para el estudio de la respuesta al tratamiento con imatinib se seleccionaron 105 pacientes que cumplían los siguientes criterios:

a) Sujetos afectos de LMC en fase crónica inicial o de menos de un año de evolución, en tratamiento con imatinib, a las dosis de 400 mg/día, durante un período mínimo de seis meses; b) disponibilidad de los datos clínicos, hematológicos iniciales y evolutivos (edad, sexo, tamaño del bazo, cifra de hemoglobina, leucocitos, plaquetas, porcentaje de basófilos y eosinófilos, porcentaje de blastos en sangre periférica, porcentaje de blastos en médula ósea, índice de Sokal [272], presencia o no de alteraciones citogenéticas adicionales al cromosoma Ph y tipo de transcrito BCR/ABL), y c) disponibilidad de muestras de ADN genómico para realizar los estudios de genotipado. Todos estos pacientes fueron diagnosticados de LMC entre Mayo de 2000 y Septiembre de 2009.

Material y métodos

El estudio fue aprobado por el comité ético local (de acuerdo con la Declaración de Helsinki) y el consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes.

2. METODOLOGÍA:

2.1 ESTUDIOS DIAGNÓSTICOS Y DE SEGUIMIENTO

Los estudios citogenéticos se realizaron en médula ósea mediante análisis de bandas cromosómicas después de cultivo con técnicas estándar de bandeado G, con un mínimo de 20 metafases analizadas. La respuesta citogenética valorada con los resultados del análisis de bandas se categorizó de la siguiente manera: completa (RCC), 0% metafases Ph +; parcial (RCP), 1-35% de metafases Ph+; mayor (RCM), 0-35% de metafases Ph+; menor, 35-65% de metafases Ph+; mínima, 66-95% de metafases Ph+; ausencia de respuesta, >95% de metafases Ph+. En el caso de obtener menos de 20 metafases se consideró RCC cuando <1% de los núcleos eran positivos para *BCR-ABL* tras el estudio por FISH de 200 células.

Los niveles del transcrito BCR-ABL se analizaron cada tres meses por estudio en sangre periférica tanto prospectiva como retrospectivamente (dependiendo del año en que se inició el tratamiento con imatinib) por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). La respuesta molecular mayor se define como el ratio BCR-ABL/gen control <0,1% siendo *ABL* el gen control.

2.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA

La respuesta a imatinib se valoró utilizando los criterios de la European Leukemia Net (ELN) 2009. La respuesta subóptima se definió de la siguiente manera: no haber alcanzado respuesta citogenética (Ph+ >95%) a los tres meses de iniciado el tratamiento, no haber alcanzado la RCP a los 6 meses, falta de RCC a los 12 meses, ausencia de RMM a los 18 meses, pérdida de la RMM en cualquier momento durante el tratamiento y detección de mutaciones del dominio cinasa de BCR-ABL sensibles a imatinib. Se definió como fallo de tratamiento: no haber alcanzado la respuesta hematológica completa a los 3 meses, falta de respuesta citogenética a los 6 meses, no haber alcanzado la RCP a los 12 meses y ausencia de RCC a los 18 meses, pérdida de RHC o RCC, detección de mutaciones en el dominio cinasa de BCR-ABL poco sensibles a imatinib y evolución clonal citogenética. Para el presente análisis, la respuesta subóptima y la resistencia se agruparon como respuesta inadecuada. Los pacientes intolerantes a imatinib fueron censurados cuando suspendieron el tratamiento con imatinib. En pacientes con resistencia a imatinib se realizó la secuenciación directa del dominio cinasa de BCR-ABL con el fin de excluir la presencia de mutaciones.

Material y métodos

	Remisión	Prueba
Hematológica Completa (RHC)	<p>Recuento de plaquetas < 450 x 10⁹/L</p> <p>Recuento de leucocitos < 10 x 10⁹/L</p> <p>Diferencial: sin granulocitos inmaduros</p> <p>Basófilos < 5%</p> <p>Sin bazo palpable</p>	<p>Hemograma y exploración física al diagnóstico. Posteriormente, cada 15 días hasta que se haya alcanzado y confirmado la RHC.</p> <p>Análisis al menos cada 3 meses o según sea necesario.</p>
Citogenética Completa (RCC) Parcial (RCP) Menor Mínima Inexistente	<p>Sin metafases</p> <p>1-35% de metafases Ph+</p> <p>36-65% de metafases Ph+</p> <p>66-95% de metafases Ph+</p> <p>95% de metafases Ph+</p>	<p>Análisis citogenético en médula ósea al diagnóstico y cada 3 meses hasta obtención de RCC confirmada .</p> <p>Posteriormente, realizar análisis citogenético cada 6 meses si no puede realizar la monitorización molecular.</p> <p>Comprobar en casos de fracaso o resistencia al tratamiento, y en casos de anemia, leucopenia o trombopenia inexplicables.</p>
Molecular Completa (RMC) Mayor (RMM)	<p>La PCR no detecta ningún tránsito BCR-ABL en sangre</p> <p>Ratio ≤ 0,1% de BCR-ABL en la escala internacional</p>	<p>RT-PCR: cada 3 meses, hasta que se haya alcanzado y confirmado la RMM.</p> <p>Posteriormente, al menos cada 6 meses.</p> <p>Análisis mutacional antes de cambios de tto</p>

Tabla 1. Evaluación de respuesta según la European Leukemia Net 2009

Material y métodos

Tiempo	Respuesta óptima	Respuesta subóptima	Fallo	Avisos
Al diagnóstico	N/A (no aplica en esta fase)	N/A (no aplica en esta fase)	N/A (no aplica en esta fase)	Alto riesgo ACC/Ph+
3 meses	RHC y Ph+ <66%	Ph+ >95%	Inferior a RHC	N/A (no aplica en esta fase)
6 meses	Ph+ <36%	Ph+ >35%	Ph+ >95%	N/A (no aplica en esta fase)
12 meses	RCC	Ph+ entre 1 y 35%	Ph+ >35%	Inferior a RMM
18 meses	RMM	Inferior a RMM	Inferior a RCC	N/A (no aplica en esta fase)
Cualquier momento durante el tratamiento	RMM estable o mejorando	Pérdida de RMM o aparición de mutaciones	Pérdida de RHC Pérdida de RCC Mutaciones ACC/Ph+	Aumento en los niveles de transcripción de ACC/Ph-

Tabla 2. Valoración de la respuesta al tratamiento con imatinib

2.3 EXTRACCIÓN DEL ADN

Las muestras de ADN que se utilizaron para el análisis de los polimorfismos procedían de extracciones de células mononucleadas de sangre periférica obtenidas en cualquier momento del curso evolutivo de la LMC. Se utilizaron los protocolos habituales de recogida (gradiente de Ficoll-Hipaque) y conservación (criopreservación a -80°). La extracción de ADN a partir de muestras celulares criopreservadas, necesaria para el estudio de los SNPs, se realizó mediante la utilización del kit Dneasy tissue de Qiagen (Izasa, Madrid, España), de acuerdo con el protocolo del fabricante. En los casos en los que no se disponía de muestra sangre, se utilizó como material de partida para obtención del ADN muestras de tejido fijado en portas. Específicamente, se utilizó kit de extracción para muestras fijadas con formalina, el Qiamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen).

El ADN se cuantificó por espectrofotometría, mediante la medición de la absorbancia a 260 nm. En aquellos casos en que la cantidad de DNA genómico extraído resultaba insuficiente para la realización de los estudios, se amplificó el ADN genómico mediante el uso del kit de amplificación de ADN genómico Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare), en el caso de muestras de sangre o tejido no fijado, o el kit REPLI-g FFPE Kit (Qiagen), para la amplificación específica del ADN de muestras procedentes de tejido fijado.

Material y métodos

2.4 GENOTIPADO DE LOS SNPs

Los genes seleccionados para el estudio se pueden clasificar en tres grupos:

a) Genes involucrados en la reparación del ADN y genes detoxificadores:

ERCC2 (XPD), ERCC3 (XPB), ERCC4 (XPF), ERCC5 (XPG), ERCC6 (CSB), ERCC8 (CKN1), XRCC1, RPA1, RPA2, RPA3, RAD23B (HR23B), LIG1, XPA y XPC (499C>T y 939A>C), GSTP1

b) Genes implicados en la señalización de BCR-ABL:

PTPN1, PTPN2, PTPN13, PTPN14, PTPN22, PPP2R2A, PTPRG, SOCS1, SOCS2, STAT5B, BCL2

c) Otros genes potencialmente implicados en la respuesta al tratamiento:

IFNG, SLCO1B3, SH2B3

Los criterios para la selección de los polimorfismos de estos genes fueron:

1) La región genética y el grado de heterocigosidad. Se seleccionaron preferentemente:

Material y métodos

1.1) SNPs exónicos con heterocigosidad de más del 9,5% (en población caucásica)

1.2) SNPs intronicos, de regiones 5' near gene y 3' near gene con heterocigosidad alta, del 40% (en población caucásica)

2) Su funcionalidad

Se seleccionaron con preferencia aquellos SNPs que introdujeran cambios en la secuencia codificante (non synonymous SNPs), sobre todo aquellos que implican cambios de aminoácido en la secuencia proteica y otros SNPs localizados en regiones reguladoras que pudieran modular la expresión del gen, la estabilidad del ARNm o el splicing, con el siguiente orden de preferencia (regiones codificantes >5'-3' UTR o cerca de regiones del gen >intrón).

3) Estudios previos

Se seleccionaron con preferencia aquellos polimorfismos de los cuales había trabajos previos que mostraban algún tipo de asociación, bien con variables clínicas y/o con alguna implicación a nivel funcional.

A continuación se muestran las características principales de los SNPs incluidos en el estudio. La frecuencia del alelo menor, se obtuvo de la base de datos del NCBI para la población global.

Material y métodos

Gen	SNP ID	Familia del gen	Cr	Alelos A/B	Frecuencia alelo menor	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoácido
<i>ERCC2 (XPD)</i>	rs13181	Excision repair cross-complementation group 2	19	A/C	0.23	Cds-missense	AAG/CAG	Lys/Gln
<i>ERCC3 (XPB)</i>	rs4662717	Excision repair cross-complementation group 3	2	C/T	0.48	NA	-	-
<i>ERCC4 (XPF)</i>	rs3136155	Excision repair cross-complementation group 4	16	C/T	0.39	Intron	-	-
<i>ERCC5 (XPG)</i>	rs17655	Excision repair cross-complementation group 5	13	G/C	0.26	Cds-missense	GAT/CAT	Asp/His
<i>ERCC6 (CSB)</i>	rs3793784	Excision repair cross-complementation group 6	10	C/G	0.4	Near gene 5	-	-
<i>ERCC8 (CKN1)</i>	rs3117	Excision repair cross-complementation group 8	5	T/C	0.31	UTR 3	-	-
<i>XRCC1</i>	rs25487	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	19	A/G	0.26	Cds-missense	CAG/CGG	Gln/Arg
<i>RPA1</i>	rs2287321	Replication protein A3	17	T/C	0.66	Intron	-	-
<i>RPA2</i>	rs7356	Replication protein A2	1	A/G	0.36	UTR-3	-	-
<i>RPA3</i>	rs6945447	Replication protein A3	7	G/A	0.39	NA	-	-
<i>RAD23B</i>	rs2147072	RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein	9	A/G	0.44	Intron	-	-

Material y métodos

Gen	SNP ID	Familia del gen	Cr	Alelos A/B	Frecuencia alelo menor	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoácido
<i>LIG1</i>	rs251692	Ligase I, DNA, ATP-dependent	19	C/T	0.45	UTR-3	-	-
<i>XPA</i>	rs2808668	Xeroderma pigmentosum, complementation group A	9	T/C	0.36	Intron	-	-
<i>XPC499</i>	rs2228000	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	3	C/T	0.23	Cds-missense	GCG/GTG	Ala/Val
<i>XPC939</i>	rs2228001	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	3	A/C	0.31	Cds-missense	AAG/CAG	Lys/Gln
<i>GSTP1</i>	rs1695	Glutathione S-transferase pi 1	11	A/G	0.40	Cds-missense	ATC/GTC	Ile/Val
<i>GAB2</i>	rs2373115	GRB2-associated binding protein 2	11	G/T	0.13	Intron	-	-

Tabla 3. SNPs a estudio de genes involucrados en las vías reparadoras del ADN, detoxificadores y GAB2.

Material y métodos

Gen	SNP ID	Genes de la familia PTP	Cr	Alelos A/B	Frecuencia alelo menor	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoácido
<i>PTPN1 (PTP1B)</i>	<i>rs941798</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	20	A/G	0.42	Intron	-	-
<i>PTPN2 (TCPTP)</i>	<i>rs3737361</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	18	A/G	0.35	Intron	-	-
<i>PTPN22 (LYP)</i>	<i>rs2476601</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	1	C/T	0.11	Cds-missense	CGG/ TGG	Arg/Trp
<i>PPP2R2A (PR55A)</i>	<i>rs2046226</i>	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	8	A/G	0.41	Intron	-	-
<i>PTPN13</i>	<i>rs10033029</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	4	G/T	0.05	Cds-synon	TTT/TTC	Phe/Phe
<i>PTPN14</i>	<i>rs1135352</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14	1	A/G	0.21	Cds-synon	GAA/GAG	Glu/Glu
<i>PTPRG</i>	<i>rs62620047</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	3	C/T	0.08	Cds-missense	TAT/CAT	Tyr/His

Tabla 4. SNPs a estudio de genes de la vía de señalización de BCR/ABL

Material y métodos

Gen	SNP ID	Genes de la familia STAT	Cr	Alelos A/B	Frecuencia alelo menor	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoácido
<i>STAT5B</i>	<i>rs809451</i>	Signal transducer and activator of transcription 5B	17	C/G	0.13	Intron	-	-

Gen	SNP ID	Genes de la familia SOCS	Cr	Alelos A/B	Frecuencia alelo menor	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoácido
<i>SOCS1</i>	<i>rs243327</i>	Suppressor of cytokine signaling	16	T/C	0.39	NA	-	-
<i>SOCS1</i>	<i>rs181582</i>	Suppressor of cytokine signaling	16	C/T	0.15	NA	-	-
<i>SOCS2</i>	<i>rs768775</i>	Suppressor of cytokine signaling	12	C/T	0.21	Intron	-	-
<i>SOCS2</i>	<i>rs3869308</i>	Suppressor of cytokine signaling	12	T/C	0.18	Intron	-	-

Tabla 4. SNPs estudiados de los genes dependientes de BCR/ABL

Material y métodos

Gen	SNP ID	Genes de la familia	Cr	AlelosA/B	Frecuencia alelo menor	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoácido
<i>SH2B3</i>	<i>rs3184504</i>	SH2B adaptor protein 3	12	C/T	0.45	Cds-missense	TGG/CGG	Trp/Arg
<i>IFNG</i>	<i>rs2069705</i>	Interferon gamma	12	C/T	0.47	Near Gene-5	-	-
<i>SLCO1B3</i>	<i>rs7311358</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	12	A/G	0.29	Cds-missense	ATG/ATA	Met/Ile
<i>BCL2</i>	<i>rs2279115</i>	B-cell Lymphoma 2	18	A/C	0.43	UTR-5	-	-
<i>BCL2</i>	<i>rs1801018</i>	B-cell Lymphoma 2	18	A/G	0.24	Cds-synon	ACA/ACG	Thr/Thr
<i>BCL2</i>	<i>rs3943258</i>	B-cell Lymphoma 2	18	G/A	0.44	Intron	-	-
<i>BCL2</i>	<i>rs1564483</i>	B-cell Lymphoma 2	18	G/A	0.22	UTR 3	-	-

Tabla 5. SNPs estudiados implicados en la respuesta al tratamiento y BCL2

Material y métodos

El genotipado de los polimorfismos se realizó mediante la utilización de la PCR alelo específica con sondas Taqman (Applied Biosystems).

La técnica se basa en la amplificación mediante PCR de la región adyacente al SNP en presencia de dos oligonucleótidos marcados fluorescentemente que reconocen específicamente cada uno de los alelos posibles del SNP (sondas Taqman alelo-específicas).

En la siguiente figura se representa esquemáticamente el fundamento de la discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman.

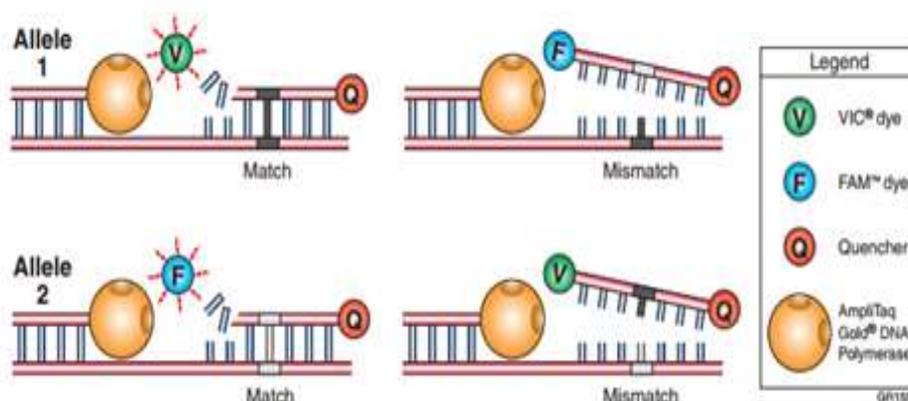


Figura 10. Discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman. Figura tomada de www.dnalink.com

Material y métodos

Cada sonda Taqman consta de un oligonucleótido que hibrida en la región que contiene el SNP. La secuencia de cada sonda se diferencia pues sólo en el último nucleótido, y cada uno de ellos hibrida con cada uno de los posibles alelos del SNP. Cada oligonucleótido tiene unido un fluoróforo que emite a una longitud de onda distinta (fluoróforos FAM (longitud de onda de emisión $\lambda_e=518$ nm) y VIC ($\lambda_e=554$ nm)). Cada fluoróforo está unido al extremo 5' del oligonucleótido y en el extremo 3' tiene unida una molécula "quencher" que apantalla la emisión de la fluorescencia mientras la sonda está intacta. Durante la etapa de amplificación PCR, si la sonda alelo-específica es complementaria al alelo del SNP, se unirá a su cadena complementaria. Cuando la Taq polimerasa que sintetiza la cadena complementaria desde los cebadores llega a la región donde se encuentra hibridada la sonda, la degrada con su actividad nucleasa. La degradación de la sonda hibridada libera el fluoróforo, de forma que la fluorescencia aumenta según aumenta la cantidad de producto de PCR alelo específico. Si un determinado alelo no se encuentra presente, la sonda específica de ese alelo no es perfectamente complementaria, y no se une a la secuencia que contiene el SNP. Esto evita que la nucleasa degrade la sonda y se libere el fluoróforo. Si ambos alelos se encuentran presentes, ambos fluoróforos darán señal, mientras que en el caso de muestras de individuos homocigotos para cada uno de los alelos solo observaremos sólo un tipo de señal fluorescente de uno u otro tipo (FAM o VIC). Por tanto el patrón de fluorescencias después de la PCR, cuantificado con un equipo de detección de fluorescencia, determina el genotipo [273], según se indica en la siguiente figura.

Material y métodos

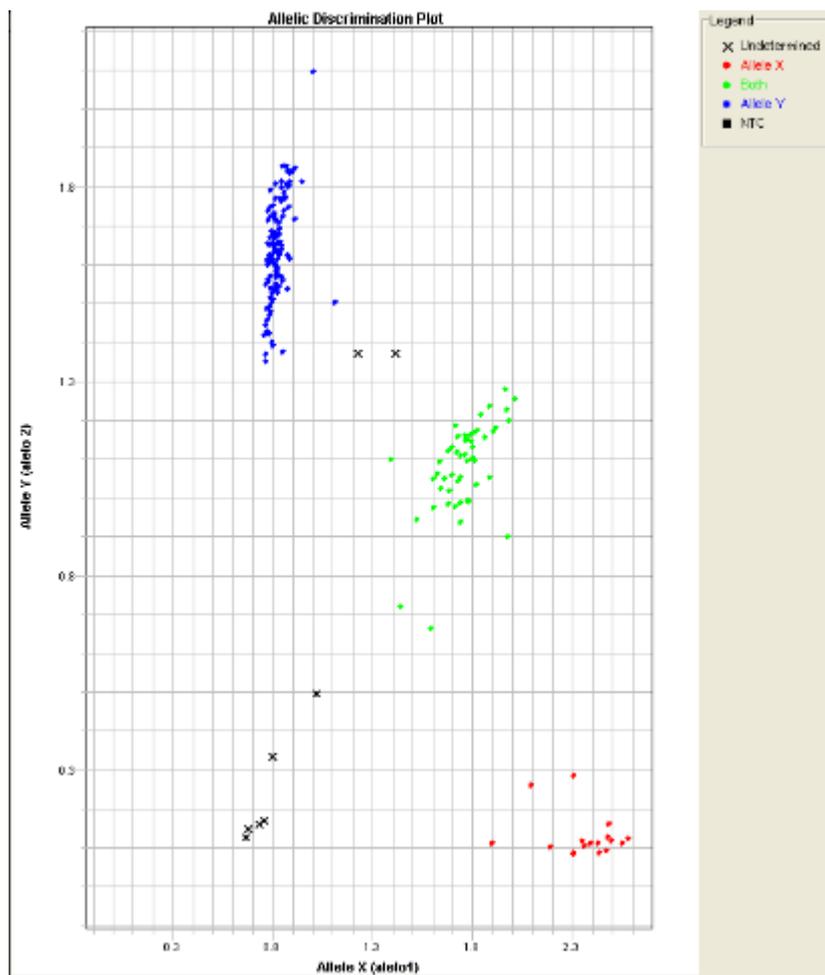


Figura 11. Genotipado por sondas Taqman.

Se prepararon placas de 384 pocillos, cada reacción de PCR se preparó con 2,5 μ l de Taqman Genotyping Master Mix 2X (mezcla de reacción que incluye la Taq polimerasa), 0,12 μ l de Taqman probe assay 40x (mezcla que incluye los cebadores y las sondas taqman) y 2,5 μ l de DNA de la muestra a una concentración de 5 μ g/ml. El termociclado y la detección se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real 7900T de

Material y métodos

Applied Biosystems (Barcelona, España). Las condiciones del termociclador fueron, una primera fase a 50° durante 2 minutos, una segunda fase a 95° durante 10 minutos y una tercera fase que consistía en 45 ciclos de 95° durante 15 segundos y 60° durante 1 minuto. La fluorescencia se detecta en un equipo Real Time ABI PRISM® 7900 Sequence Detector. En las siguientes figuras se describe esquemáticamente el diseño de la placa y el procedimiento.

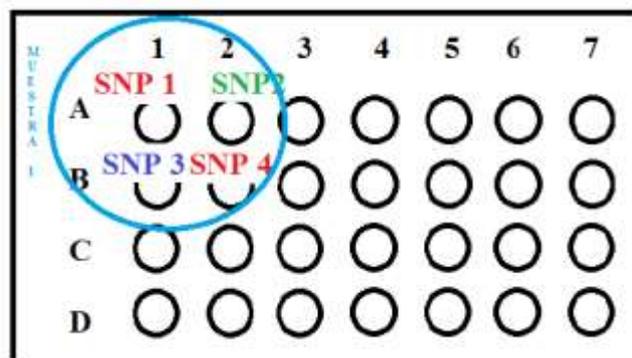


Figura 12. Diseño de la placa de 384 pocillos

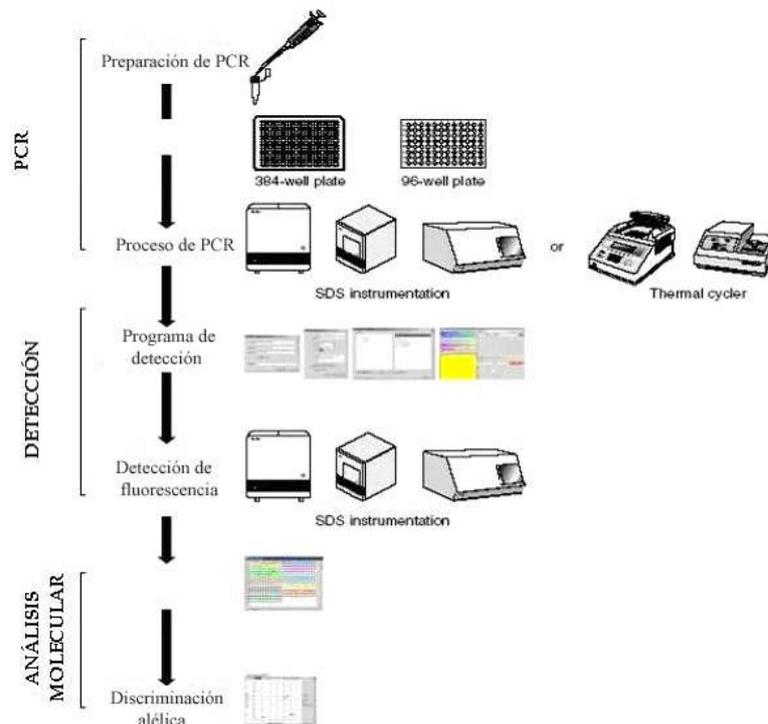


Figura 13. Procedimiento de la PCR con sondas Taqman. Imagen tomada de Estudio de los polimorfismos de genes reparadores en población fumadora con y sin cáncer de pulmón. Universidad de Salamanca.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las herramientas estadísticas para el análisis del genotipado de los SNPs (equilibrio Hardy-Weinberg, distribución alélica y de genotipo y test de asociación) fueron proporcionados por SNPstats <http://bioinfo.iconcologia.net/> SNPstats. Esta aplicación web genera odds ratio (OR), intervalos de confianza (IC) y P valores para múltiples modelos de herencia (co-dominante, dominante, recesiva, sobredominante y

Material y métodos

log-aditivo). El modelo de logaritmo aditivo corresponde a la prueba de tendencia calculada asignando una puntuación lineal a cada genotipo (0 para el homocigoto al alelo común, 1 para el heterocigoto y 2 para el homocigoto al alelo poco común). Los criterios de información Akaike (AIC) y los criterios de información Bayesiano (BIC) se calcularon a fin de seleccionar el mejor modelo de herencia para cada polimorfismo, el modelo seleccionado fue aquel con un menor valor AIC y BIC. Los métodos de regresión logística se utilizaron para buscar asociaciones entre los SNPs candidatos y el riesgo de desarrollar LMC, ajustados por edad y sexo, y la respuesta a imatinib a los 18 meses de iniciado el tratamiento. Teniendo en cuenta el riesgo de obtener resultados falsos positivos por las múltiples comparaciones entre los genes estudiados, se ajustó el P valor por la corrección de Bonferroni. En los resultados se muestra el P valor corregido por Bonferroni marcado con * y el P valor marginal no corregido marcado con **, dicho valor tendría menor potencia estadística. Por último, se evaluó el desequilibrio de ligamiento (LD) para los diferentes pares de SNPs mediante el coeficiente estandarizado de Lewontin D' . El valor de D' se encuentra entre 0 y 1, un valor de 0 indica que los SNP analizados son independientes el uno del otro, mientras que un valor de 1 indica que ambos están en un completo LD.

La supervivencia libre de transformación (SLT) (TFS) se definió como el tiempo desde el inicio de imatinib hasta el desarrollo de una fase acelerada o crisis blástica o el éxitus por cualquier causa. La supervivencia libre de fallo (SLF)(FFS) se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento con imatinib hasta el fallo, incluyendo la

Material y métodos

muerte, la progresión a fase acelerada o crisis blástica y no haber alcanzado o haber perdido la RHC o la RCC. Para el análisis de SLT y el SLF los pacientes fueron sustraídos del estudio cuando se suspendió el tratamiento con imatinib.

Se estudió la posible asociación entre las siguientes características clínicas de los pacientes al diagnóstico de LMC y su respuesta al tratamiento con imatinib: edad, sexo, grupo de riesgo de Sokal, cifra de hemoglobina, y la presencia de alteraciones citogenéticas adicionales. Los factores clínicos que resultaron significativos en el análisis univariado se incluyeron junto a las variables genéticas en el modelo multivariante para evaluar el efecto independiente de cada covariable controlado por el resto. Los métodos de regresión logística binaria o de regresión de Cox se utilizaron para analizar las asociaciones entre las características basales clínicas y genéticas de los pacientes y su evolución al tratamiento. Las curvas tiempo hasta el evento fueron estimadas utilizando el método de Kaplan-Meier. En todos los análisis, el valor P menor o igual a 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS versión 15 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Material y métodos

- Variables de estudio

-Frecuencias de cada uno de los alelos de cada SNP en cada grupo (expresado como porcentaje de la base menos frecuente) y/o como porcentaje de homocigotos y heterocigotos.

- Riesgo relativo para cada uno de los polimorfismos.

- Asociación de los polimorfismos con predisposición a la enfermedad.

- Perfil clínico de la LMC según el polimorfismo.

-Respuesta a imatinib en relación a un polimorfismo determinado.

Material y métodos

RESULTADOS

Resultados

III. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

El grupo de pacientes a estudio para el análisis de valoración de respuesta a imatinib estaba constituido por 105 pacientes diagnosticados de LMC en fase crónica. Los criterios de inclusión de los pacientes fueron: a) Sujetos afectos de LMC en fase crónica inicial o de menos de un año de evolución, en tratamiento con imatinib, a las dosis de 400 mg/día, durante un período mínimo de seis meses; b) disponibilidad de los datos clínicos, hematológicos iniciales y evolutivos (edad, sexo, tamaño del bazo, cifra de hemoglobina, leucocitos, plaquetas, porcentaje de basófilos y eosinófilos, porcentaje de blastos en sangre periférica, porcentaje de blastos en médula ósea, índice de Sokal, presencia o no de alteraciones citogenéticas adicionales al cromosoma Ph y tipo de transcrito BCR/ABL), y c) disponibilidad de muestras de ADN genómico para realizar los estudios de genotipado.

Para el análisis de predisposición genética a la LMC se añadieron 85 pacientes adicionales (total 190 pacientes) que no recibieron tratamiento con imatinib o no cumplían alguno del resto de criterios de inclusión para el estudio de la evaluación de respuesta a imatinib. En este análisis se utilizó un grupo de 370 controles sanos. Las características de los pacientes se resumen a continuación:

Resultados

Edad (años), mediana (rango)	47.5 (15-75)
Varones/Mujeres	106/84
Grupo de riesgo de Sokal	
Bajo	83 (49%)
Intermedio	51 (30%)
Alto	37 (21%)
Crisis Blástica inicial	6

Tabla 6. Características clínicas de los 190 pacientes incluidos en el estudio de predisposición a desarrollar una LMC.

Edad (años), mediana (rango)	45 (15-75)
Varones/Mujeres	59/46
Dx. LMC hasta inicio imatinib, meses (rango)	0.7 (0-10.7)
Hemoglobina (g/L), mediana (rango)	125 (76-166)
< 110 g/L	20
Grupo de riesgo de Sokal	
Bajo	53 (51%)
Intermedio	37 (35%)
Alto	15 (14%)
Evolución clonal al diagnóstico	4

Tabla 7. Características clínicas de la serie de pacientes tratados con imatinib incluidos en el estudio de asociación entre SNPs y respuesta a imatinib

Resultados

2. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO CON IMATINIB.

La mediana de seguimiento de los pacientes desde el inicio del tratamiento con imatinib fue de 60 meses (rango 9-119 meses). La tasa de RCM fue del 96% a los 6 meses, la de RCC del 88% a los 12 meses y la de RMM del 66% a los 18 meses. De los 99 pacientes que alcanzaron una RCC en los primeros 18 meses de tratamiento con imatinib, 10 (10,1%) perdieron dicha respuesta durante el seguimiento, con pérdida adicional de la RHC en tres casos. De los 67 pacientes que alcanzaron la RMM durante los primeros 18 meses de tratamiento, 10 (14,9%) perdieron dicha respuesta posteriormente, con pérdida de la RCC en cinco casos. Se registraron tres transformaciones a crisis blástica a los 5, 12 y 12 meses del inicio de imatinib, respectivamente. Así, la probabilidad de SLT y de SLF a los 5 años fue del 97% (95% CI: 94-100) y del 86% (95% CI: 79-93), respectivamente.

A continuación se detalla la respuesta al tratamiento en los distintos momentos evolutivos, de acuerdo a los criterios de la European LeukemiaNet 2009:

- A los 3 meses: Todos los pacientes alcanzaron la RHC en los primeros 3 meses de tratamiento, pero uno de ellos fue catalogado de respuesta subóptima debido a la persistencia de 100% de metafases Ph-positivas en el estudio citogenético de médula ósea.

Resultados

- A los 6 meses: Tres pacientes cumplieron criterios de fallo, por tener un 100% de las metafases Ph positivas, y otro de respuesta subóptima, por persistencia de un 50% de células Ph positivas. El resto de pacientes alcanzó la RCM.

- A los 12 meses: Cinco pacientes presentaron fallo al tratamiento por presencia del 100% de metafases Ph positivas en médula ósea (n=3) o pérdida de la RCC previa (n=2). Cuatro enfermos lograron una respuesta subóptima por obtención de una RCP.

- A los 18 meses: Tres fallos al tratamiento y veinticinco casos de respuesta subóptima por no alcanzar la RMM.

Por tanto, 25 pacientes (23,8%) tuvieron una respuesta subóptima y 11 (10,5%) fueron resistentes a imatinib de entrada, lo que constituye un 34% de respuestas inadecuadas primarias. Posteriormente, 10 pacientes cumplieron criterios de respuesta subóptima (n=5) o de fallo (n=5). Así, la tasa global de respuesta inadecuada durante el seguimiento del estudio fue del 44%. Se detectaron mutaciones en el dominio cinasa de BCR/ABL en 4 pacientes (M244V, A412D, M351T, M351V), en dos de ellos coincidiendo con el desarrollo de resistencia primaria.

En el momento del análisis únicamente dos pacientes habían fallecido, uno por complicaciones relacionadas con el trasplante y otro por causas no relacionadas con la LMC. Un total de 84 pacientes (80%) continuaban tratamiento con imatinib en el último

Resultados

control, 18 de ellos con dosis de 600-800 mg/día debido a la respuesta inadecuada a imatinib con dosis estándar. Cinco enfermos recibieron un trasplante alogénico por resistencia primaria, en tres casos tras evolución a crisis blástica. Catorce pacientes recibían tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa de segunda generación debido a respuesta inadecuada (n=5) o intolerancia (n=9) a imatinib. Por último, un paciente suspendió definitivamente el imatinib en situación de respuesta molecular completa debido a una aplasia medular grave de origen no clarificado, mientras en otro caso se retiró por presencia de una segunda neoplasia.

Tiempo de evaluación	Respuesta subóptima (n)	Fallo al tratamiento (n)
3 meses	1	0
6 meses	1	3
12 meses	5	8
18 meses	25	11
Fin del estudio	30	16

Tabla 8. Frecuencia acumulada de respuesta subóptima y fallo al tratamiento con imatinib

Resultados

3. INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR UNA LMC.

Para el estudio de la influencia entre la variabilidad genética y la susceptibilidad de desarrollar LMC se compararon las frecuencias de los genotipos en los genes estudiados entre 190 casos de LMC (mediana de edad 47.5 años, rango 15-75) y una población de 370 donantes sanos caucásicos (mediana de edad 39 años).

Como muestra la tabla 9, el riesgo de desarrollar una LMC se asoció con la expresión del alelo infrecuente en cuatro de los genes estudiados. En los genes *ERCC5* y *RPA2* podía objetivarse un efecto protector en aquellos individuos que presentaban el alelo infrecuente de los SNPs candidatos, mientras que en los genes *PTPN22* y *STAT5B* se objetivaba un discreto incremento del riesgo de LMC en los individuos que poseían el alelo infrecuente. Si bien la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa, la magnitud de las diferencias fue limitada

Gen	SNP	Alelos	% sanos con alelo infrecuente	% LMC Con alelo infrecuente	Mejor Modelo	OR CI 95%	P
<i>XPCE8</i>	rs2228000	C/T	0.29	0.33	Dominante	1.28 (0.90-1.83)	0.17
<i>XPCE16</i>	rs2228001	A/C	0.4	0.4	Sobredominante	1.35 (0.95-1.92)	0.098

Resultados

Gen	SNP	Alelos	% sanos con el alelo infrecuente	% LMC Con alelo infrecuente	Mejor Modelo	OR CI95%	p
<i>ERCC5 (XPG)</i>	rs17655	G/C	0.28	0.21	Log aditivo	0.66 (0.48-0.91)	0.01**
<i>ERCC2 (XPD)</i>	rs13181	A/C (T/G)	0.36	0.37	Recesivo	1.27 (0.77-2.09)	0.34
<i>XPA</i>	rs2808668	T/C	0.29	0.29	Recesivo	1.12 (0.59-2.11)	0.74
<i>RAD23B</i>	rs2147072	A/G	0.43	0.47	Log aditivo	1.14 (0.88-1.47)	0.31
<i>RPA1</i>	rs2287321	T/C (A/G)	0.43	0.45	Log aditivo	1.08 (0.84-1.37)	0.55
<i>RPA2</i>	rs7356	A/G (T/C)	0.44	0.36	Log aditivo	0.71 (0.55-0.92)	0.008**
<i>RPA3</i>	rs6945447	G/A	0.38	0.37	Sobredominante	0.73 (0.51-1.04)	0.078
<i>ERCC3 (XPB)</i>	rs4662717	C/T (G/A)	0.45	0.5	Log-aditivo	1.22 (0.95-1.57)	0.12
<i>ERCC4 (XPF)</i>	rs3136155	C/T	0.33	0.33	Sobredominante	0.72 (0.50-1.03)	0.069
<i>LIG1</i>	rs251692	C/T (G/A)	0.46	0.47	Log-aditivo	1.03 (0.82-1.31)	0.78
<i>ERCC8 (CKN1)</i>	rs3117	T/C (A/G)	0.41	0.39	Recesivo	0.70 (0.42-1.19)	0.18
<i>ERCC6 (CSB)</i>	rs3793784	C/G (G/C)	0.39	0.42	Overdomiant	1.30 (0.91-1.86)	0.15
<i>PTPN1</i>	rs941798	A/G	0.48	0.51	CoDominante	1.15 (0.79-1.68)	0.59
<i>XRCC1</i>	rs25487	A/G	0.37	0.33	Recesivo	1	0.28
<i>PTPN2</i>	rs3737361	A/G	0.09	0.1	Recesivo	1.23 (0.9-2.17)	0.59

Resultados

Gen	SNP	Alelos	% sanos con el alelo infrecuente	% LMC con el alelo infrecuente	Mejor Modelo	OR CI95%	p
<i>PTPN13</i>	rs10033029	G/T	SNP no valorable (no se cumple el equilibrio Hardy Weinberg)				
<i>PTPN14</i>	rs1135352	A/G	0.47	0.42	Dominante	0.84 (0.57-1.23)	0.38
<i>PTPN22</i>	rs2476601	C/T	1	0.98	Recesivo	1	0.013**
<i>PPP2R2A</i>	rs2046226	A/G	0.67	0.62	Dominante	0.78 (0.53-1.14)	0.34
<i>PTPRG</i>	rs62620047	C/T	0.05	0.5	Recesivo	2.57 (0.23-28)	0.43
<i>SOCS1</i>	rs243327	T/C	0.79	0.72	Recesivo	1	0.061
	rs181582	C/T	0.35	0.32	Sobredominante	0.86 (0.58-1.20)	0.48
<i>SOCS2</i>	rs768775	C/T	0.65	0.68	Sobredominante	1	0.38
	rs3869308	T/C	0.41	0.34	Dominante	0.76 (0.52-1.1)	0.15
<i>STAT5B</i>	rs809451	C/G	0.16	0.19	Recesivo	1	0.009**
<i>IFNG</i>	rs2069705	C/T	0.43	0.38	Sobredominante	0.82 (0.56-1.21)	0.32
<i>SLCO1B3</i>	rs7311358	A/G	0.48	0.45	Sobredominante	0.8 (0.53-1.20)	0.28
<i>SH2B3</i>	rs3184504	C/T	0.17	0.24	CoDominante	1.8 (1.02-3.2)	0.13
<i>GSTP1</i>	rs1695	A/G	0.33	0.34	Recesivo	1	0,4
<i>GAB2</i>	rs2373115	G/T (C/A)	0.16	0.12	Recesivo	1	0,19

Tabla 9. Influencia de la variabilidad genética en la susceptibilidad a desarrollar

LMC

Resultados

Asimismo, se evaluó si las variaciones en el gen *BCL2* suponían un factor predisponente a desarrollar LMC. Los resultados no apoyaron una relación entre los SNPs candidatos y el riesgo de desarrollar LMC, tal y como se muestra en la siguiente tabla[274].

<i>BCL2</i> SNP	Genotipo	Donantes sanos N (%)	LMC N (%)	Mejor modelo	OR (95%CI)	P
rs2279115	A/A	126 (34%)	59 (31.2%)	A	1.05 (0.82-1.35)	0.69
	A/C	166 (44.9%)	87 (46%)			
	C/C	78 (21.1%)	43 (22.8%)			
rs1801018	A/A	124 (33.5%)	73 (38.6%)	A	0.88 (0.69-1.14)	0.34
	A/G	166 (44.9%)	82 (43.4%)			
	G/G	80 (21.6%)	34 (18%)			
rs3943258	G/G	124 (33.5%)	61 (32.5%)	R	1.11 (0.70-1.75)	0.66
	G/A	176 (47.6%)	88 (46.8%)			
	A/A	70 (18.9%)	39 (20.7%)			
rs1564483	G/G	217 (58.6%)	119 (62.6%)	O	0.76 (0.51-1.13)	0.18
	G/A	130 (35.1%)	54 (28.4%)			
	A/A	23 (6.2%)	17 (8.9%)			

Tabla 10. Análisis univariante de asociación entre los SNPS de *BCL2* y la susceptibilidad a desarrollar una LMC ajustados por sexo y edad.

Resultados

4. RELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

En el estudio de correlación entre el patrón de polimorfismos en los genes candidatos y las principales características clínicas de los pacientes al diagnóstico de la LMC. La única asociación estadísticamente significativa fue la de los SNPs de *BCL2* rs2279115 4777C>A y rs1801018 5735A>G con el índice de riesgo de Sokal[274].

Por lo que respecta al SNP 4777C>A, el mayor grado de significación estadística se alcanzaba con el modelo dominante, donde los portadores del alelo C (CC/CA) tenían un riesgo casi 3 veces mayor de ser diagnosticados con un índice de Sokal intermedio o alto, comparados con los homocigotos para el alelo A (OR=2.80, P valor: 0.0024). Con respecto a 5735A>G SNP, el mejor modelo predictivo era el recesivo, con el que los pacientes homocigotos para el alelo G tenían 3 veces menor riesgo de presentar al diagnóstico un índice de Sokal intermedio o alto que los portadores del alelo A (AA/AG)(OR=0.34, P valor: 0.0098).

Resultados

<i>BCL2</i> SNP	Mejor modelo	Genotipo	Sokal = 1 N (%)	Sokal = 2+3 N (%)	OR (95% CI)	<i>P</i>
rs2279115	D	A/A	35 (42.2%)	18 (20.7%)	2.80 (1.42-5.50)	0.0024
		A/C-C/C	48 (57.8%)	69 (79.3%)		
rs1801018	R	A/A-A/G	62 (74.7%)	78 (89.7%)	0.34 (0.15-0.80)	0.0098
		G/G	21 (25.3%)	9 (10.3%)		
rs3943258	O	G/G-A/A	47(58%)	46 (52.3%)	1.26 (0.69-2.32)	0.45
		G/A	34 (42%)	42(47.7%)		
rs1564483	O	G/G-A/A	57 (68.7%)	67 (76.1%)	0.69 (0.35-1.35)	0.27
		G/A	26 (31.3%)	21 (23.9%)		

Tabla 11. Asociación entre SNPS de BCL2 e índice de Sokal

Además, el SNP en la región intrónica 177978A>G (rs3943258) estaba marginalmente asociado con la mayor probabilidad de ser diagnosticado de crisis blástica inicial. Así, en el modelo aditivo cada copia del alelo menor A confería un riesgo 4 veces mayor en comparación al riesgo basal de los pacientes homocigotos para el alelo G (OR =3.77, P valor: 0.031).

Resultados

<i>BCL2</i> SNP	Mejor modelo	Genotipo	No CBI N (%)	CBI N (%)	OR (95%CI)	P
rs2279115	R	A/A-A/C	141 (77%)	5 (83.3%)	0.67 (0.08-5.91)	0.71
		C/C	42 (22.9%)	1 (16.7%)		
rs1801018	O	A/A-G/G	102 (55.7%)	5 (83.3%)	0.25 (0.03-2.20)	0.16
		A/G	81 (44.3%)	1 (16.7%)		
rs3943258 177978A>G	A	G/G	61 (33.5%)	0 (0%)	3.77 (1.01-14.03)	0.031
		G/A	85 (46.7%)	3 (50%)		
		A/A	36 (19.8%)	3 (50%)		
rs1564483	O	G/G-A/A	133 (72.3%)	3 (50%)	2.61 (0.51-13.34)	0.26
		G/A	51 (27.7%)	3 (50%)		

Tabla 12. Asociación entre los SNPs del gen *BCL2* y el riesgo de crisis blástica

El análisis de haplotipos de los SNPs 4777 y 5735 reveló que los haplotipos más frecuentes eran 4777C-5735A (45%) y 4777A-5735G (39%). El test de asociación de haplotipos mostró que el haplotipo 4777A-5735G se asociaba a un menor riesgo de desarrollar LMC con un Sokal intermedio o alto comparado con el 4777C-5735A (OR=0.56, P valor: 0.016).

Haplotipos		Frecuencia haplotipos (%)			OR (95% CI)	P
rs2279115	rs1801018	Total casos	Sokal 1	Sokal 2+3		
C	A	44.9	39.1	50.3	1.00	---
A	G	39.0	46.3	31.9	0.56 (0.35 - 0.89)	0.016
A	A	15.2	13.9	16.3	0.90 (0.48 - 1.67)	0.73
C	G	1.0	0.7	1.4	1.23 (0.10 - 14.65)	0.87

Tabla 13. Resultados del análisis de asociación de haplotipos del gen *BCL2* con el índice de Sokal al diagnóstico de la LMC

Resultados

5. INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON IMATINIB

Para el estudio de la influencia entre la variabilidad genética y la respuesta al tratamiento con LMC, se estudiaron las frecuencias de los distintos genotipos en 105 pacientes con LMC de novo. En las tablas de resultados se muestra la frecuencia del genotipo para cada gen, la OR objetivada y su significación, con el P valor corregido por Bonferroni marcado con * y el P valor marginal no corregido marcado con **.

- **5.1 Asociación de los SNPs estudiados con la obtención de RHC a los 3 meses**

Se observó una potencial influencia del genotipo de *PTPN14* en la respuesta hematológica (p no corregida de 0.024, modelo recesivo), pero dicha asociación no alcanzó la significación estadística tras el ajuste de la p por el método de Bonferroni. Con todo, cabe decir que el análisis estuvo limitado por el reducido número de pacientes sin RHC a los 3 meses, un único paciente, por lo que los resultados obtenidos no presentan valor alguno.

Resultados

	Modelo	Genotipo	RHC	no RHC	OR (95% CI)	P-valor
XPCE8 rs2228000	Sobredominante	C/C-T/T	53 (58.2%)	0 (0%)	1.00	0.19
		C/T	38 (41.8%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
XPCE16 rs2228001	Sobredominante	A/A-C/C	46 (50.5%)	0 (0%)	1.00	0.24
		A/C	45 (49.5%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
XRCC1 rs25487	Dominante	G/G	40 (44.4%)	1 (100%)	1.00	0.2
		G/A-A/A	50 (55.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
XPD rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	46 (51.1%)	0 (0%)	1.00	0.23
		T/G	44 (48.9%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
ERCC5 rs17655	Dominante	G/G	57 (64%)	1 (100%)	1.00	0.35
		G/C-C/C	32 (36%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN1 rs941798	Recesivo	A/A-A/G	77 (85.6%)	0 (0%)	1.00	0.051
		G/G	13 (14.4%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
PTPN2 rs3737361	Sobredominante	T/T-C/C	43 (47.8%)	0 (0%)	1.00	0.26
		T/C	47 (52.2%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	88 (85.4%)	1 (100%)	1.00	0.58
		C/T	15 (14.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PPP2R2A rs2046226	Sobredominante	A/A-G/G	44 (48.4%)	0 (0%)	1.00	0.25
		A/G	47 (51.6%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
PTPN14 rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	78 (92.9%)	0 (0%)	1.00	0.024** 0.28*(B)
		A/A	6 (7.1%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	RH	No RH	OR (95% CI)	P-valor
<i>PTPRG</i> rs62620047	Dominante	T/T	63 (71.6%)	1 (100%)	1.00	0.42
		C/T-C/C	25 (28.4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	56 (81.2%)	1 (100%)	1.00	0.52
		C/G	13 (18.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Recesivo	T/T-T/C	68 (75.6%)	0 (0%)	1.00	0.095
		C/C	22 (24.4%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Dominante	T/T	56 (61.5%)	1 (100%)	1.00	0.33
		T/C-C/C	35 (38.5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Dominante	C/C	54 (65.1%)	1 (100%)	1.00	0.36
		C/T-T/T	29 (34.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Dominante	T/T	52 (63.4%)	1 (100%)	1.00	0.34
		T/C-C/C	30 (36.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SH2B3</i> rs3184504	Dominante	C/C	24 (30.4%)	1 (100%)	1.00	0.12
		C/T-T/T	55 (69.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Recesivo	T/T-C/T	69 (86.2%)	0 (0%)	1.00	0.048** 0.56* (B)
		C/C	11 (13.8%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Sobredominante	A/A-G/G	45 (54.9%)	0 (0%)	1.00	0.21
		G/A	37 (45.1%)	1 (100%)	NA (0.00-NA)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Dominante	A/A	42 (46.1%)	1 (100%)	1.00	0.22
		A/G-G/G	49 (53.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Dominante	C/C	66 (75%)	1 (100%)	1.00	0.45
		C/A-A/A	22 (25%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Tabla 14. SNPs y probabilidad de obtener RHC a los 3 meses

Resultados

- **5.2 Asociación de los SNPs candidatos con la respuesta citogenética completa.**

Se observó una asociación de los SNPs de *PPP2R2A* y *SOCS1* con la respuesta citogenética. Sin embargo, tras la corrección, solo mantuvo la significación estadística la del SNP rs243327 (*SOCS1*), de forma que la homocigosis del alelo infrecuente C confería 7,5 veces más riesgo de no alcanzar la RCC.

	Modelo	Genotipo	RCC	No RCC	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	74 (90.2%)	6 (66.7%)	1.00	0.073
		T/T	8 (9.8%)	3 (33.3%)	4.62 (0.97-22.15)	
<i>XPCE16</i> rs2228001	Sobredominante	A/A-C/C	39 (47.6%)	7 (77.8%)	1.00	0.077
		A/C	43 (52.4%)	2 (22.2%)	0.26 (0.05-1.32)	
<i>XRCC1</i> rs25487	Recesivo	G/G-G/A	72 (88.9%)	9 (100%)	1.00	0.16
		A/A	9 (11.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>XPD</i> rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	44 (54.3%)	2 (22.2%)	1.00	0.061
		T/G	37 (45.7%)	7 (77.8%)	4.16 (0.81-21.26)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Recesivo	G/G-G/C	76 (95%)	9 (100%)	1.00	0.35
		C/C	4 (5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>PTPN1</i> rs941798	Recesivo	A/A-A/G	69 (85.2%)	7 (77.8%)	1.00	0.58
		G/G	12 (14.8%)	2 (22.2%)	1.64 (0.30-8.88)	
<i>PTPN2</i> rs3737361	Recesivo	T/T-T/C	73 (90.1%)	9 (100%)	1.00	0.18
		C/C	8 (9.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	RCC	No RCC	OR (95% CI)	P-valor
<i>PTPN22</i> rs2476601	---	C/C	80 (87.9%)	3 (100%)	1.00	0.38
		C/T	11 (12.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>PPP2R2A</i> rs2046226	Dominante	A/A	24 (29.3%)	6 (66.7%)	1.00	0.029** 0.17* B)
		A/G-G/G	58 (70.7%)	3 (33.3%)	0.21 (0.05-0.90)	
<i>PTPN14</i> rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	71 (92.2%)	6 (85.7%)	1.00	0.58
		A/A	6 (7.8%)	1 (14.3%)	1.97 (0.20-19.19)	
<i>PTPRG</i> rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	77 (97.5%)	8 (88.9%)	1.00	0.27
		C/C	2 (2.5%)	1 (11.1%)	4.81 (0.39-59.13)	
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	51 (82.3%)	6 (85.7%)	1.00	0.82
		C/G	11 (17.7%)	1 (14.3%)	0.77 (0.08-7.08)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Recesivo	T/T-T/C	64 (79%)	3 (33.3%)	1.00	0.0058** 0.03*(B)
		C/C	17 (21%)	6 (66.7%)	7.53 (1.70-33.26)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Recesivo	T/T-T/C	78 (95.1%)	9 (100%)	1.00	0.36
		C/C	4 (4.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Dominante	C/C	46 (62.2%)	8 (88.9%)	1.00	0.085
		C/T-T/T	28 (37.8%)	1 (11.1%)	0.21 (0.02-1.73)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	69 (94.5%)	9 (100%)	1.00	0.33
		C/C	4 (5.5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SH2B3</i> rs3184504	Recesivo	C/C-C/T	56 (76.7%)	6 (100%)	1.00	0.081
		T/T	17 (23.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	RCC	No RCC	OR (95% CI)	P-valor
<i>IFNG</i> rs2069705	Recesivo	T/T-C/T	64 (87.7%)	4 (57.1%)	1.00	0.059
		C/C	9 (12.3%)	3 (42.9%)	5.33 (1.02-27.81)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Dominante	A/A	31 (41.3%)	2 (28.6%)	1.00	0.5
		G/A-G/G	44 (58.7%)	5 (71.4%)	1.76 (0.32-9.67)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Dominante	A/A	38 (46.3%)	5 (55.6%)	1.00	0.6
		A/G-G/G	44 (53.7%)	4 (44.4%)	0.69 (0.17-2.76)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Recesivo	C/C-C/A	78 (98.7%)	9 (100%)	1.00	0.64
		A/A	1 (1.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Tabla 15. SNPS y probabilidad de obtener RCC

- **5.3 Pacientes con pérdida de respuesta hematológica**

En la tabla se muestran los resultados del análisis, pero dado el reducido número de pacientes que perdieron la RHC no pueden extraerse conclusiones definitivas.

	Modelo	Genotipo	No pérdida RHC	Pérdida de RHC	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	78 (88.6%)	3 (75%)	1.00	0.46
		T/T	10 (11.4%)	1 (25%)	2.60 (0.25-27.45)	
<i>XPCE16</i> rs2228001	Recesivo	A/A-A/C	78 (88.6%)	2 (50%)	1.00	0.066
		C/C	10 (11.4%)	2 (50%)	7.80 (0.99-61.67)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No pérdida RH	Pérdida de RH	OR (95% CI)	P-valor
XRCC1 rs25487	Recesivo	G/G-G/A	78 (89.7%)	4 (100%)	1.00	0.36
		A/A	9 (10.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
XPD rs13181	Recesivo	T/T-T/G	73 (83.9%)	4 (100%)	1.00	0.24
		G/G	14 (16.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
ERCC5 rs17655	Sobredominante	G/G-C/C	60 (69.8%)	2 (50%)	1.00	0.42
		G/C	26 (30.2%)	2 (50%)	2.31 (0.31-17.28)	
PTPN1 rs941798	Dominante	A/A	34 (39.1%)	0 (0%)	1.00	0.05
		A/G-G/G	53 (60.9%)	4 (100%)	NA (0.00-NA)	
PTPN2 rs3737361	Recesivo	T/T-T/C	79 (90.8%)	4 (100%)	1.00	0.39
		C/C	8 (9.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	86 (86.9%)	3 (60%)	1.00	0.15
		C/T	13 (13.1%)	2 (40%)	4.41 (0.67-28.96)	
PPP2R2A rs2046226	Dominante	A/A	27 (30.7%)	4 (100%)	1.00	0.0026** 0.01*(B)
		A/G-G/G	61 (69.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN14 rs1135352	Dominante	G/G	35 (42.7%)	2 (66.7%)	1.00	0.41
		A/G-A/A	47 (57.3%)	1 (33.3%)	0.37 (0.03-4.27)	
PTPRG rs62620047	Dominante	T/T	60 (70.6%)	4 (100%)	1.00	0.1
		C/T-C/C	25 (29.4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
STAT5B rs809451	---	G/G	54 (80.6%)	3 (100%)	1.00	0.26
		C/G	13 (19.4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No pérdida RH	Pérdida de RH	OR (95% CI)	P-valor
<i>SOCS1</i> rs243327	Dominante	T/T	22 (25.3%)	0 (0%)	1.00	0.13
		T/C-C/C	65 (74.7%)	4 (100%)	NA (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Recesivo	T/T-T/C	84 (95.5%)	4 (100%)	1.00	0.55
		C/C	4 (4.5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Recesivo	C/C-C/T	77 (96.2%)	4 (100%)	1.00	0.58
		T/T	3 (3.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	75 (94.9%)	4 (100%)	1.00	0.52
		C/C	4 (5.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SH2B3</i> rs3184504	Dominante	C/C	23 (29.9%)	2 (66.7%)	1.00	0.2
		C/T-T/T	54 (70.1%)	1 (33.3%)	0.21 (0.02-2.47)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Recesivo	T/T-C/T	68 (87.2%)	1 (33.3%)	1.00	0.03** 0.21*(B)
		C/C	10 (12.8%)	2 (66.7%)	13.60 (1.13-164.13)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Recesivo	A/A-G/A	68 (85%)	3 (100%)	1.00	0.33
		G/G	12 (15%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Recesivo	A/A-A/G	74 (84.1%)	4 (100%)	1.00	0.24
		G/G	14 (15.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Dominante	C/C	63 (74.1%)	4 (100%)	1.00	0.13
		C/A-A/A	22 (25.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Tabla 16. SNPS y riesgo de pérdida de respuesta hematológica

Resultados

• 5.4 Pacientes con pérdida de respuesta citogenética

Cabe destacar, la asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo de ERCC5 y la estabilidad de la respuesta citogenética. Así, los pacientes homocigotos para el alelo variante CC en el modelo recesivo experimentaron un riesgo 38,5 mayor de pérdida de respuesta citogenética.

	Modelo	Genotipo	No pérdida	Pérdida de resp	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	71 (88.8%)	7 (77.8%)	1.00	0.38
		T/T	9 (11.2%)	2 (22.2%)	2.25 (0.40-12.56)	
<i>XPCE16</i> rs2228001	Recesivo	A/A-A/C	70 (87.5%)	7 (77.8%)	1.00	0.45
		C/C	10 (12.5%)	2 (22.2%)	2.00 (0.36-11.01)	
<i>XRCC1</i> rs25487	Dominante	G/G	34 (42.5%)	6 (75%)	1.00	0.075
		G/A-A/A	46 (57.5%)	2 (25%)	0.25 (0.05-1.30)	
<i>XPD</i> rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	41 (51.9%)	4 (44.4%)	1.00	0.67
		T/G	38 (48.1%)	5 (55.6%)	1.35 (0.34-5.40)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Recesivo	G/G-G/C	77 (98.7%)	6 (66.7%)	1.00	0.0013** 0.01*(B)
		C/C	1 (1.3%)	3 (33.3%)	38.50 (3.45-429.03)	
<i>PTPN1</i> rs941798	Sobredominante	A/A-G/G	43 (54.4%)	4 (44.4%)	1.00	0.57
		A/G	36 (45.6%)	5 (55.6%)	1.49 (0.37-5.98)	
<i>PTPN2</i> rs3737361	Recesivo	T/T-T/C	71 (89.9%)	9 (100%)	1.00	0.18
		C/C	8 (10.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No pérdida	Pérdida de resp	OR (95% CI)	P-valor
<i>PTPN22</i> rs2476601	---	C/C	79 (87.8%)	8 (72.7%)	1.00	0.21
		C/T	11 (12.2%)	3 (27.3%)	2.69 (0.62-11.70)	
<i>PPP2R2A</i> rs2046226	Sobredominante	A/A-G/G	35 (43.8%)	8 (88.9%)	1.00	0.0067** 0.04*(B)
		A/G	45 (56.2%)	1 (11.1%)	0.10 (0.01-0.81)	
<i>PTPN14</i> rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	71 (94.7%)	6 (75%)	1.00	0.091
		A/A	4 (5.3%)	2 (25%)	5.92 (0.89-39.20)	
<i>PTPRG</i> rs62620047	Sobredominante	T/T-C/C	59 (76.6%)	6 (66.7%)	1.00	0.52
		C/T	18 (23.4%)	3 (33.3%)	1.64 (0.37-7.22)	
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	47 (78.3%)	7 (100%)	1.00	0.073
		C/G	13 (21.7%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Recesivo	T/T-T/C	63 (79.8%)	5 (55.6%)	1.00	0.13
		C/C	16 (20.2%)	4 (44.4%)	3.15 (0.76-13.09)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Recesivo	T/T-T/C	76 (95%)	9 (100%)	1.00	0.35
		C/C	4 (5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Recesivo	C/C-C/T	70 (95.9%)	8 (100%)	1.00	0.42
		T/T	3 (4.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	67 (94.4%)	9 (100%)	1.00	0.32
		C/C	4 (5.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No pérdida	Pérdida de resp	OR (95% CI)	P-valor
<i>SH2B3</i> rs3184504	Recesivo	C/C-C/T	56 (76.7%)	5 (100%)	1.00	0.11
		T/T	17 (23.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Dominante	T/T	33 (45.8%)	1 (14.3%)	1.00	0.087
		C/T-C/C	39 (54.2%)	6 (85.7%)	5.08 (0.58-44.34)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Recesivo	A/A-G/A	62 (83.8%)	7 (100%)	1.00	0.12
		G/G	12 (16.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Dominante	A/A	36 (45%)	5 (55.6%)	1.00	0.55
		A/G-G/G	44 (55%)	4 (44.4%)	0.65 (0.16-2.62)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Dominante	C/C	56 (72.7%)	8 (88.9%)	1.00	0.26
		C/A-A/A	21 (27.3%)	1 (11.1%)	0.33 (0.04-2.83)	

Tabla 17. SNPs y riesgo de pérdida de respuesta citogenética

- **5.5 Pacientes con pérdida de respuesta molecular mayor**

Tras corrección de Bonferroni, se objetivó un mayor riesgo de pérdida de respuesta molecular en aquellos pacientes portadores del alelo variante C del gen *ERCC5*. En el modelo logarítmico aditivo cada una de las copias del alelo infrecuente C confería 6.24 veces incremento del riesgo.

Resultados

	Modelo	Genotipo	No pérdida de RMM	Pérdida de RMM	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	64 (85.3%)	12 (100%)	1.00	0.061
		T/T	11 (14.7%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>XPCE16</i> rs2228001	Sobredominante	A/A-C/C	38 (50.7%)	5 (41.7%)	1.00	0.56
		A/C	37 (49.3%)	7 (58.3%)	1.44 (0.42-4.94)	
<i>XRCC1</i> rs25487	Dominante	G/G	29 (38.7%)	9 (81.8%)	1.00	0.006** 0.07*(B)
		G/A-A/A	46 (61.3%)	2 (18.2%)	0.14 (0.03-0.69)	
<i>XPD</i> rs13181	Recesivo	T/T-T/G	63 (84%)	9 (81.8%)	1.00	0.86
		G/G	12 (16%)	2 (18.2%)	1.17 (0.22-6.09)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Log-aditivo	Existe un incremento del riesgo por cada copia del alelo menor C			6.24 (2.05-18.98)	0.004** 0.03*(B)
<i>PTPN1</i> rs941798	Dominante	A/A	30 (40.5%)	3 (25%)	1.00	0.29
		A/G-G/G	44 (59.5%)	9 (75%)	2.05 (0.51-8.18)	
<i>PTPN2</i> rs3737361	Dominante	T/T	30 (40.5%)	4 (33.3%)	1.00	0.63
		T/C-C/C	44 (59.5%)	8 (66.7%)	1.36 (0.38-4.94)	
<i>PTPN22</i> rs2476601	---	C/C	76 (87.4%)	10 (83.3%)	1.00	0.71
		C/T	11 (12.6%)	2 (16.7%)	1.38 (0.27-7.16)	
<i>PPP2R2A</i> rs2046226	Recesivo	A/A-A/G	67 (89.3%)	7 (58.3%)	1.00	0.013** 0.07*(B)
		G/G	8 (10.7%)	5 (41.7%)	5.98 (1.53-23.35)	
<i>PTPN14</i> rs1135352	CoDominante	G/G	33 (47.8%)	2 (16.7%)	1.00	0.066
		A/G	33 (47.8%)	8 (66.7%)	4.00 (0.79-20.27)	
		A/A	3 (4.3%)	2 (16.7%)	11.00 (1.12-108.49)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No pérdida de resp	Pérdida de resp	OR (95% CI)	P-valor
<i>PTPRG</i> rs62620047	Sobredominante	T/T-C/C	56 (76.7%)	7 (63.6%)	1.00	0.37
		C/T	17 (23.3%)	4 (36.4%)	1.88 (0.49-7.21)	
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	47 (82.5%)	6 (75%)	1.00	0.62
		C/G	10 (17.5%)	2 (25%)	1.57 (0.28-8.92)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Recesivo	T/T-T/C	61 (82.4%)	6 (50%)	1.00	0.02** 0.12*(B)
		C/C	13 (17.6%)	6 (50%)	4.69 (1.30-16.88)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Recesivo	T/T-T/C	72 (96%)	11 (91.7%)	1.00	0.54
		C/C	3 (4%)	1 (8.3%)	2.18 (0.21-22.89)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Recesivo	C/C-C/T	67 (95.7%)	9 (100%)	1.00	0.39
		T/T	3 (4.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Sobredominante	T/T-C/C	44 (64.7%)	8 (80%)	1.00	0.32
		T/C	24 (35.3%)	2 (20%)	0.46 (0.09-2.33)	
<i>SH2B3</i> rs3184504	Recesivo	C/C-C/T	50 (75.8%)	9 (90%)	1.00	0.28
		T/T	16 (24.2%)	1 (10%)	0.35 (0.04-2.96)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Dominante	T/T	29 (43.9%)	5 (45.5%)	1.00	0.93
		C/T-C/C	37 (56.1%)	6 (54.5%)	0.94 (0.26-3.39)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Sobredominante	A/A-G/G	38 (55.9%)	7 (63.6%)	1.00	0.63
		G/A	30 (44.1%)	4 (36.4%)	0.72 (0.19-2.71)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Sobredominante	A/A-G/G	46 (61.3%)	8 (66.7%)	1.00	0.72
		A/G	29 (38.7%)	4 (33.3%)	0.79 (0.22-2.87)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No pérdida de resp	Pérdida de resp	OR (95% CI)	P-valor
GAB2 rs2373115	Dominante	C/C	53 (72.6%)	9 (81.8%)	1.00	0.5
		C/A-A/A	20 (27.4%)	2 (18.2%)	0.59 (0.12-2.96)	

Tabla 18. SNPs y riesgo de pérdida de respuesta molecular

- **5.6 Pacientes con transformación a fases avanzadas de la LMC**

Ningún SNP se asoció de forma significativa con un mayor riesgo o protección frente a la transformación a estadios más avanzados de la enfermedad.

	Modelo	Genotipo	No transf	Trasform	OR (95% CI)	P-valor
XPCE8 rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	78 (87.6%)	3 (100%)	1.00	0.38
		T/T	11 (12.4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
XPCE16 rs2228001	Recesivo	A/A-A/C	79 (88.8%)	1 (33.3%)	1.00	0.027** 0.35*(B)
		C/C	10 (11.2%)	2 (66.7%)	15.80 (1.31-190.38)	
XRCC1 rs25487	Recesivo	G/G-G/A	79 (89.8%)	3 (100%)	1.00	0.43
		A/A	9 (10.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
XPD rs13181	Recesivo	T/T-T/G	74 (84.1%)	3 (100%)	1.00	0.31
		G/G	14 (15.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No transf	Trasform	OR (95% CI)	P-valor
ERCC5 rs17655	Recesivo	G/G-G/C	83 (95.4%)	3 (100%)	1.00	0.6
		C/C	4 (4.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN1 rs941798	Recesivo	A/A-A/G	75 (85.2%)	2 (66.7%)	1.00	0.43
		G/G	13 (14.8%)	1 (33.3%)	2.88 (0.24-34.16)	
PTPN2 rs3737361	Sobredominante	T/T-C/C	43 (48.9%)	0 (0%)	1.00	0.047** 0.28*(B)
		T/C	45 (51.1%)	3 (100%)	NA (0.00-NA)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	87 (87%)	2 (50%)	1.00	0.084
		C/T	13 (13%)	2 (50%)	6.69 (0.87-51.72)	
PPP2R2A rs2046226	Dominante	A/A	29 (32.6%)	2 (66.7%)	1.00	0.24
		A/G-G/G	60 (67.4%)	1 (33.3%)	0.24 (0.02-2.77)	
PTPN14 rs1135352	Dominante	G/G	35 (42.7%)	2 (66.7%)	1.00	0.41
		A/G-A/A	47 (57.3%)	1 (33.3%)	0.37 (0.03-4.27)	
PTPRG rs62620047	Dominante	T/T	61 (70.9%)	3 (100%)	1.00	0.16
		C/T-C/C	25 (29.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
STAT5B rs809451	---	G/G	55 (82.1%)	2 (66.7%)	1.00	0.53
		C/G	12 (17.9%)	1 (33.3%)	2.29 (0.19-27.38)	
SOCS1 rs243327	Dominante	T/T	22 (25%)	0 (0%)	1.00	0.19
		T/C-C/C	66 (75%)	3 (100%)	NA (0.00-NA)	
SOCS2 rs768775	Dominante	T/T	54 (60.7%)	3 (100%)	1.00	0.087
		T/C-C/C	35 (39.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No transf	Trasform	OR (95% CI)	P-valor
<i>SOCS1</i> <i>rs181582</i>	Recesivo	C/C-C/T	78 (96.3%)	3 (100%)	1.00	0.64
		T/T	3 (3.7%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> <i>rs3869308</i>	Dominante	T/T	50 (62.5%)	3 (100%)	1.00	0.097
		T/C-C/C	30 (37.5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SH2B3</i> <i>rs3184504</i>	Dominante	C/C	23 (29.9%)	2 (66.7%)	1.00	0.2
		C/T-T/T	54 (70.1%)	1 (33.3%)	0.21 (0.02-2.47)	
<i>IFNG</i> <i>rs2069705</i>	Recesivo	T/T-C/T	67 (85.9%)	2 (66.7%)	1.00	0.41
		C/C	11 (14.1%)	1 (33.3%)	3.05 (0.25-36.50)	
<i>SLCO1b3</i> <i>rs7311358</i>	Recesivo	A/A-G/A	69 (86.2%)	2 (66.7%)	1.00	0.4
		G/G	11 (13.8%)	1 (33.3%)	3.14 (0.26-37.58)	
<i>GSTP1</i> <i>rs1695</i>	Sobredominante	A/A-G/G	56 (62.9%)	1 (33.3%)	1.00	0.31
		A/G	33 (37.1%)	2 (66.7%)	3.39 (0.30-38.88)	
<i>GAB2</i> <i>rs2373115</i>	Dominante	C/C	64 (74.4%)	3 (100%)	1.00	0.19
		C/A-A/A	22 (25.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Tabla 19. SNPs y riesgo de transformación a fases avanzadas de la LMC

- **5.7 Asociación de los SNPs candidatos con la respuesta subóptima a los 12 meses**

No se objetivaron resultados estadísticamente significativos para ninguno de los SNPs estudiados en relación a su efecto sobre la respuesta subóptima a los 12 meses de seguimiento.

Resultados

	Modelo	Genotipo	No respuesta subóptima	Respuesta subóptima	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	79 (89.8%)	2 (50%)	1.00	0.049** 0.7*(B)
		T/T	9 (10.2%)	2 (50%)	8.78 (1.10-70.10)	
<i>XPCE16</i> rs2228001	Sobredominante	A/A-C/C	42 (47.7%)	4 (100%)	1.00	0.017** 0.22*(B)
		A/C	46 (52.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>XRCC1</i> rs25487	Dominante	G/G	41 (47.1%)	0 (0%)	1.00	0.026** 0.33*(B)
		G/A-A/A	46 (52.9%)	4 (100%)	NA (0.00-NA)	
<i>XPD</i> rs13181	Recesivo	T/T-T/G	73 (83.9%)	4 (100%)	1.00	0.24
		G/G	14 (16.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Dominante	G/G	54 (62.8%)	4 (100%)	1.00	0.057
		G/C-C/C	32 (37.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>PTPN1</i> rs941798	Dominante	A/A	31 (35.6%)	3 (75%)	1.00	0.12
		A/G-G/G	56 (64.4%)	1 (25%)	0.18 (0.02-1.85)	
<i>PTPN2</i> rs3737361	Dominante	T/T	32 (36.8%)	3 (75%)	1.00	0.13
		T/C-C/C	55 (63.2%)	1 (25%)	0.19 (0.02-1.94)	
<i>PTPN22</i> rs2476601	---	C/C	84 (84.8%)	5 (100%)	1.00	0.21
		C/T	15 (15.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>PPP2R2A</i> rs2046226	Dominante	A/A	28 (31.8%)	3 (75%)	1.00	0.084
		A/G-G/G	60 (68.2%)	1 (25%)	0.16 (0.02-1.56)	
<i>PTPN14</i> rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	74 (91.4%)	4 (100%)	1.00	0.4
		A/A	7 (8.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No respuesta subóptima	Respuesta subóptima	OR (95% CI)	P-valor
<i>PTPRG</i> rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	83 (97.7%)	3 (75%)	1.00	0.095
		C/C	2 (2.4%)	1 (25%)	13.83 (0.97-198.27)	
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	56 (82.3%)	1 (50%)	1.00	0.31
		C/G	12 (17.6%)	1 (50%)	4.67 (0.27-79.95)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Recesivo	T/T-T/C	66 (75.9%)	2 (50%)	1.00	0.28
		C/C	21 (24.1%)	2 (50%)	3.14 (0.42-23.71)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Sobredominante	T/T-C/C	60 (68.2%)	1 (25%)	1.00	0.084
		T/C	28 (31.8%)	3 (75%)	6.43 (0.64-64.56)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Dominante	C/C	52 (65%)	3 (75%)	1.00	0.67
		C/T-T/T	28 (35%)	1 (25%)	0.62 (0.06-6.23)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Sobredominante	T/T-C/C	56 (70.9%)	1 (25%)	1.00	0.065
		T/C	23 (29.1%)	3 (75%)	7.30 (0.72-73.91)	
<i>SH2B3</i> rs3184504	Sobredominante	C/C-T/T	42 (54.5%)	0 (0%)	1.00	0.032** 0.38* (B)
		C/T	35 (45.5%)	3 (100%)	NA (0.00-NA)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Sobredominante	T/T-C/C	45 (58.4%)	1 (25%)	1.00	0.19
		C/T	32 (41.6%)	3 (75%)	4.22 (0.42-42.42)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Recesivo	A/A-G/A	68 (86.1%)	3 (75%)	1.00	0.57
		G/G	11 (13.9%)	1 (25%)	2.06 (0.20-21.63)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Sobredominante	A/A-G/G	54 (61.4%)	3 (75%)	1.00	0.57
		A/G	34 (38.6%)	1 (25%)	0.53 (0.05-5.30)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No respuesta subóptima	Respuesta subóptima	OR (95% CI)	P-valor
GAB2 rs2373115	Sobredominante	C/C-A/A	66 (77.7%)	2 (50%)	1.00	0.24
		C/A	19 (22.4%)	2 (50%)	3.47 (0.46-26.33)	

Tabla 20. SNPS y probabilidad de respuesta subóptima a los 12 meses

- **5.8 Asociación de los SNPs candidatos con el fallo al tratamiento a los 12 meses**

En este análisis, el alelo variante C del gen *IFNG* para en el gen IFNG se asoció a 13.4 veces más riesgo de fallo para cada una de las copias del mismo, en el modelo de logaritmo aditivo. Asimismo, el alelo variante C del SNP rs243327 de *SOCS1* y el alelo T del gen *PTPN22* se asociaron de forma significativa con un mayor riesgo de fallo al tratamiento a los 12 meses.

	Modelo	Genotipo	Ausencia de fallo	Fallo a los 12 meses	OR (95% CI)	P-valor
XPCE8 rs2228000	Codominante	C/C	39 (44.8%)	3 (60%)	1.00	0.48
		C/T	37 (42.5%)	2 (40%)	0.70 (0.11-4.45)	
		T/T	11 (12.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
XPCE16 rs2228001	Recesivo	A/A-A/C	77 (88.5%)	3 (60%)	1.00	0.12
		C/C	10 (11.5%)	2 (40%)	5.13 (0.76-34.55)	
XRCC1 rs25487	Recesivo	G/G-G/A	77 (89.5%)	5 (100%)	1.00	0.3
		A/A	9 (10.5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	Ausencia de fallo	Fallo a los 12 meses	OR (95% CI)	P-valor
XPD rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	45 (52.3%)	1 (20%)	1.00	0.15
		T/G	41 (47.7%)	4 (80%)	4.39 (0.47-40.90)	
ERCC5 rs17655	Recesivo	G/G-G/C	81 (95.3%)	5 (100%)	1.00	0.49
		C/C	4 (4.7%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN1 rs941798	Dominante	A/A	34 (39.5%)	0 (0%)	1.00	0.028** 0.33*(B)
		A/G-G/G	52 (60.5%)	5 (100%)	NA (0.00-NA)	
PTPN2 rs3737361	Sobredominante	T/T-C/C	42 (48.8%)	1 (20%)	1.00	0.19
		T/C	44 (51.2%)	4 (80%)	3.82 (0.41-35.57)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	86 (89.6%)	3 (37.5%)	1.00	9,00E-04
		C/T	10 (10.4%)	5 (62.5%)	14.33 (2.97-69.18)	
PPP2R2A rs2046226	Recesivo	A/A-A/G	74 (85.1%)	5 (100%)	1.00	0.21
		G/G	13 (14.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN14 rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	75 (92.6%)	3 (75%)	1.00	0.3
		A/A	6 (7.4%)	1 (25%)	4.17 (0.37-46.44)	
PTPRG rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	81 (96.4%)	5 (100%)	1.00	0.55
		C/C	3 (3.6%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
STAT5B rs809451	---	G/G	52 (80%)	5 (100%)	1.00	0.14
		C/G	13 (20%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SOCS1 rs243327	Recesivo	T/T-T/C	67 (77.9%)	1 (20%)	1.00	0.0079** 0.04*(B)
		C/C	19 (22.1%)	4 (80%)	14.11 (1.49-133.80)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	Ausencia de fallo	Fallo a los 12 meses	OR (95% CI)	P-valor
SOCS2 rs768775	Dominante	T/T	52 (59.8%)	5 (100%)	1.00	0.026** 0.31*(B)
		T/C-C/C	35 (40.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SOCS1 rs181582	Dominante	C/C	51 (64.6%)	4 (80%)	1.00	0.46
		C/T-T/T	28 (35.4%)	1 (20%)	0.46 (0.05-4.27)	
SOCS2 rs3869308	Dominante	T/T	48 (61.5%)	5 (100%)	1.00	0.031** 0.37*(B)
		T/C-C/C	30 (38.5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SH2B3 rs3184504	Dominante	C/C	22 (28.9%)	3 (75%)	1.00	0.064
		C/T-T/T	54 (71%)	1 (25%)	0.14 (0.01-1.38)	
IFNG rs2069705	Log-aditivo	Existe un incremento del riesgo por cada copia del alelo menor C			13.44 (1.52-119)	0.0025** 0.01*(B)
SLCO1b3 rs7311358	Sobredominante	A/A-G/G	44 (55.7%)	1 (25%)	1.00	0.22
		G/A	35 (44.3%)	3 (75%)	3.77 (0.38-37.85)	
GSTP1 rs1695	Dominante	A/A	41 (47.1%)	2 (40%)	1.00	0.76
		A/G-G/G	46 (52.9%)	3 (60%)	1.34 (0.21-8.40)	
GAB2 rs2373115	Dominante	C/C	62 (73.8%)	5 (100%)	1.00	0.087
		C/A-A/A	22 (26.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Tabla 21. SNPs y probabilidad de fallo a los 12 meses

Resultados

- **5.9 Asociación de los SNPs candidatos con la respuesta subóptima y el fallo a los 12 meses**

Cabe destacar, que el alelo variante C en homocigosis del SNP rs243327 del gen *SOCS1* se asoció con 7,65 veces más riesgo de respuesta inadecuada a los 12 meses.

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	74 (89.2%)	7 (77.8%)	1.00	0.36
		T/T	9 (10.8%)	2 (22.2%)	2.35 (0.42-13.08)	
<i>XPCE16</i> rs2228001	Sobredominante	A/A-C/C	39 (47%)	7 (77.8%)	1.00	0.072
		A/C	44 (53%)	2 (22.2%)	0.25 (0.05-1.29)	
<i>XRCC1</i> rs25487	Sobredominante	G/G-A/A	48 (58.5%)	2 (22.2%)	1.00	0.035** 0.45*(B)
		G/A	34 (41.5%)	7 (77.8%)	4.94 (0.97-25.26)	
<i>XPB</i> rs13181	Recesivo	T/T-T/G	68 (82.9%)	9 (100%)	1.00	0.074
		G/G	14 (17.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Recesivo	G/G-G/C	77 (95.1%)	9 (100%)	1.00	0.35
		C/C	4 (4.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>PTPN1</i> rs941798	Recesivo	A/A-A/G	70 (85.4%)	7 (77.8%)	1.00	0.57
		G/G	12 (14.6%)	2 (22.2%)	1.67 (0.31-9.00)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
PTPN2 rs3737361	Recesivo	T/T-T/C	74 (90.2%)	9 (100%)	1.00	0.19
		C/C	8 (9.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	81 (89%)	8 (61.5%)	1.00	0.019** 0.1*(B)
		C/T	10 (11%)	5 (38.5%)	5.06 (1.38-18.51)	
PPP2R2A rs2046226	Dominante	A/A	25 (30.1%)	6 (66.7%)	1.00	0.033** 0.19*(B)
		A/G-G/G	58 (69.9%)	3 (33.3%)	0.22 (0.05-0.93)	
PTPN14 rs1135352	Sobredominante	G/G-A/A	39 (50.6%)	5 (62.5%)	1.00	0.52
		A/G	38 (49.4%)	3 (37.5%)	0.62 (0.14-2.76)	
PTPRG rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	78 (97.5%)	8 (88.9%)	1.00	0.26
		C/C	2 (2.5%)	1 (11.1%)	4.88 (0.40-59.89)	
STAT5B rs809451	---	G/G	51 (81%)	6 (85.7%)	1.00	0.75
		C/G	12 (19.1%)	1 (14.3%)	0.71 (0.08-6.45)	
SOCS1 rs243327	Recesivo	T/T-T/C	65 (79.3%)	3 (33.3%)	1.00	0.0054** 0.03*(B)
		C/C	17 (20.7%)	6 (66.7%)	7.65 (1.73-33.76)	
SOCS2 rs768775	Recesivo	T/T-T/C	79 (95.2%)	9 (100%)	1.00	0.36
		C/C	4 (4.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SOCS1 rs181582	Recesivo	C/C-C/T	72 (96%)	9 (100%)	1.00	0.41
		T/T	3 (4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SOCS2 rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	70 (94.6%)	9 (100%)	1.00	0.33
		C/C	4 (5.4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SH2B3 rs3184504	Recesivo	C/C-C/T	56 (76.7%)	7 (100%)	1.00	0.061
		T/T	17 (23.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
<i>IFNG</i> rs2069705	Codominante	T/T	33 (45.2%)	1 (12.5%)	1.00	0.09
		C/T	31 (42.5%)	4 (50%)	4.26 (0.45-40.22)	
		C/C	9 (12.3%)	3 (37.5%)	11.00 (1.02-118.88)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Recesivo	A/A-G/A	64 (85.3%)	7 (87.5%)	1.00	0.87
		G/G	11 (14.7%)	1 (12.5%)	0.83 (0.09-7.43)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Sobredominante	A/A-G/G	51 (61.5%)	6 (66.7%)	1.00	0.76
		A/G	32 (38.5%)	3 (33.3%)	0.80 (0.19-3.41)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Recesivo	C/C-C/A	79 (98.8%)	9 (100%)	1.00	0.64
		A/A	1 (1.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Tabla 22. SNPs y probabilidad de respuesta subóptima y el fallo a los 12 meses

- **5.10 Asociación de los SNPs candidatos con la respuesta subóptima a los 18 meses**

En este análisis, no se objetivó ninguna correlación entre los polimorfismos y la respuesta subóptima a los 18 meses de seguimiento.

	Modelo	Genotipo	No resp subop	Resp subop	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Sobredominante	C/C-T/T	45 (66.2%)	8 (33.3%)	1.00	0.0051** 0.06*(B)
		C/T	23 (33.8%)	16 (66.7%)	3.91 (1.46-10.49)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp subop	Resp subop	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE16</i> rs2228001	Dominante	A/A	28 (41.2%)	6 (25%)	1.00	0.15
		A/C-C/C	40 (58.8%)	18 (75%)	2.10 (0.74-5.96)	
<i>XRCC1</i> rs25487	Dominante	G/G	33 (49.2%)	8 (33.3%)	1.00	0.17
		G/A-A/A	34 (50.8%)	16 (66.7%)	1.94 (0.73-5.14)	
<i>XPD</i> rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	32 (47.1%)	14 (60.9%)	1.00	0.25
		T/G	36 (52.9%)	9 (39.1%)	0.57 (0.22-1.50)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Sobredominante	G/G-C/C	43 (65.2%)	19 (79.2%)	1.00	0.19
		G/C	23 (34.9%)	5 (20.8%)	0.49 (0.16-1.49)	
<i>PTPN1</i> rs941798	Recesivo	A/A-A/G	59 (88.1%)	18 (75%)	1.00	0.14
		G/G	8 (11.9%)	6 (25%)	2.46 (0.75-8.02)	
<i>PTPN2</i> rs3737361	Recesivo	T/T-T/C	63 (92.7%)	20 (87%)	1.00	0.42
		C/C	5 (7.3%)	3 (13%)	1.89 (0.41-8.62)	
<i>PTPN22</i> rs2476601	---	C/C	68 (86.1%)	21 (84%)	1.00	0.8
		C/T	11 (13.9%)	4 (16%)	1.18 (0.34-4.09)	
<i>PPP2R2A</i> rs2046226	Recesivo	A/A-A/G	56 (82.3%)	23 (95.8%)	1.00	0.071
		G/G	12 (17.6%)	1 (4.2%)	0.20 (0.02-1.65)	
<i>PTPN14</i> rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	56 (90.3%)	22 (95.7%)	1.00	0.4
		A/A	6 (9.7%)	1 (4.3%)	0.42 (0.05-3.73)	
<i>PTPRG</i> rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	63 (96.9%)	23 (95.8%)	1.00	0.8
		C/C	2 (3.1%)	1 (4.2%)	1.37 (0.12-15.83)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp subop	Resp suubop	OR (95% CI)	P-valor
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	44 (84.6%)	13 (72.2%)	1.00	0.26
		C/G	8 (15.4%)	5 (27.8%)	2.12 (0.59-7.59)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Dominante	T/T-T/C	47 (70.2%)	21 (87.5%)	1.00	0.077
		C/C	20 (29.9%)	3 (12.5%)	0.34 (0.09-1.25)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Recesivo	T/T-T/C	64 (94.1%)	24 (100%)	1.00	0.12
		C/C	4 (5.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Recesivo	C/C-C/T	58 (95.1%)	23 (100%)	1.00	0.16
		T/T	3 (4.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	60 (93.8%)	19 (100%)	1.00	0.14
		C/C	4 (6.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SH2B3</i> rs3184504	Dominante	C/C	16 (28.1%)	9 (39.1%)	1.00	0.34
		C/T-T/T	41 (71.9%)	14 (60.9%)	0.61 (0.22-1.68)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Recesivo	T/T-C/T	49 (83%)	20 (90.9%)	1.00	0.36
		C/C	10 (16.9%)	2 (9.1%)	0.49 (0.10-2.44)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Dominante	A/A	25 (42.4%)	8 (33.3%)	1.00	0.44
		G/A-G/G	34 (57.6%)	16 (66.7%)	1.47 (0.54-3.97)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Recesivo	A/A-A/G	59 (86.8%)	19 (79.2%)	1.00	0.39
		G/G	9 (13.2%)	5 (20.8%)	1.73 (0.51-5.78)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Recesivo	C/C-C/A	67 (100%)	21 (95.5%)	1.00	0.092
		A/A	0 (0%)	1 (4.5%)	NA (0.00-NA)	

Tabla 23. SNPs y probabilidad de respuesta subóptima a los 18 meses

Resultados

• 5.11 Asociación de los SNPs candidatos con el fallo a los 18 meses

De forma llamativa, la homocigosidad para el alelo variante C del gen *SOCS1* (rs243327) confería 6 veces más riesgo de fallo a los 18 meses. A su vez, se observó un aumento del riesgo de fallo para los portadores del alelo T en el SNP del gen *PTPN22*.

	Modelo	Genotipo	No fallo	Fallo a los 18 meses	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	76 (90.5%)	5 (62.5%)	1.00	0.047** 0.6*(B)
		T/T	8 (9.5%)	3 (37.5%)	5.70 (1.14-28.41)	
<i>XPCE16</i> rs2228001	Sobredominante	A/A-C/C	40 (47.6%)	6 (75%)	1.00	0.13
		A/C	44 (52.4%)	2 (25%)	0.30 (0.06-1.59)	
<i>XRCC1</i> rs25487	Recesivo	G/G-G/A	74 (89.2%)	8 (100%)	1.00	0.19
		A/A	9 (10.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>XPD</i> rs13181	Recesivo	T/T-T/G	69 (83.1%)	8 (100%)	1.00	0.094
		G/G	14 (16.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Recesivo	G/G-G/C	78 (95.1%)	8 (100%)	1.00	0.38
		C/C	4 (4.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>PTPN1</i> rs941798	Dominante	A/A	32 (38.5%)	2 (25%)	1.00	0.44
		A/G-G/G	51 (61.5%)	6 (75%)	1.88 (0.36-9.90)	
<i>PTPN2</i> rs3737361	Sobredominante	T/T-C/C	41 (49.4%)	2 (25%)	1.00	0.18
		T/C	42 (50.6%)	6 (75%)	2.93 (0.56-15.36)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No fallo	Fallo a los 18 meses	OR (95% CI)	P-valor
<i>PTPN22</i> rs2476601	---	C/C	83 (89.2%)	6 (54.5%)	1.00	0.0074** 0.04*(B)
		C/T	10 (10.8%)	5 (45.5%)	6.92 (1.78-26.84)	
<i>PPP2R2A</i> rs2046226	Dominante	A/A	25 (29.8%)	6 (75%)	1.00	0.012** 0.07*(B)
		A/G-G/G	59 (70.2%)	2 (25%)	0.14 (0.03-0.75)	
<i>PTPN14</i> rs1135352	Sobredominante	G/G-A/A	40 (50.6%)	4 (66.7%)	1.00	0.44
		A/G	39 (49.4%)	2 (33.3%)	0.51 (0.09-2.96)	
<i>PTPRG</i> rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	79 (97.5%)	7 (87.5%)	1.00	0.23
		C/C	2 (2.5%)	1 (12.5%)	5.64 (0.45-70.26)	
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	51 (81%)	6 (85.7%)	1.00	0.75
		C/G	12 (19.1%)	1 (14.3%)	0.71 (0.08-6.45)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Aditivo	T/T	28(30.1%)	0(0)	5.9 (1.8-19.2)	<0.001** 0.004*(B)
		T/C	47(50.5%)	4(36.4%)		
		C/C	18(19.4%)	7(63.6%)		
<i>SOCS2</i> rs768775	Recesivo	T/T-T/C	80 (95.2%)	8 (100%)	1.00	0.39
		C/C	4 (4.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Dominante	C/C	48 (63.2%)	7 (87.5%)	1.00	0.14
		C/T-T/T	28 (36.8%)	1 (12.5%)	0.24 (0.03-2.10)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	71 (94.7%)	8 (100%)	1.00	0.36
		C/C	4 (5.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No fallo	Fallo a los 18 meses	OR (95% CI)	P-valor
<i>SH2B3</i> rs3184504	Recesivo	C/C-C/T	58 (77.3%)	5 (100%)	1.00	0.12
		T/T	17 (22.7%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Recesivo	T/T-C/T	66 (88%)	3 (50%)	1.00	0.032** 0.38*(B)
		C/C	9 (12%)	3 (50%)	7.33 (1.28-42.00)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Dominante	A/A	31 (40.3%)	2 (33.3%)	1.00	0.74
		G/A-G/G	46 (59.7%)	4 (66.7%)	1.35 (0.23-7.81)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Recesivo	A/A-A/G	71 (84.5%)	7 (87.5%)	1.00	0.82
		G/G	13 (15.5%)	1 (12.5%)	0.78 (0.09-6.88)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Recesivo	C/C-C/A	80 (98.8%)	8 (100%)	1.00	0.66
		A/A	1 (1.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Tabla 24. SNPS y probabilidad de fallo a los 18 meses

- **5.12 Asociación de los SNPs candidatos con la respuesta subóptima y el fallo a los 18 meses**

No se objetivaron resultados estadísticamente significativos para ninguno de los SNPs estudiados en relación a su potencial influencia con la respuesta inadecuada a los 18 meses de seguimiento.

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
XPCE8 rs2228000	Dominante	C/C	33 (55%)	9 (28.1%)	1.00	0.012** 0.15*(B)
		C/T-T/T	27 (45%)	23 (71.9%)	3.12 (1.24-7.86)	
XPCE16 rs2228001	Dominante	A/A	24 (40%)	10 (31.2%)	1.00	0.4
		A/C-C/C	36 (60%)	22 (68.8%)	1.47 (0.59-3.64)	
		A/C-C/C	36 (60%)	22 (68.8%)	1.47 (0.59-3.64)	
XRCC1 rs25487	Sobredominante	G/G-A/A	37 (62.7%)	13 (40.6%)	1.00	0.043** 0.55*(B)
		G/A	22 (37.3%)	19 (59.4%)	2.46 (1.02-5.93)	
XPD rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	30 (50%)	16 (51.6%)	1.00	0.88
		T/G	30 (50%)	15 (48.4%)	0.94 (0.39-2.23)	
ERCC5 rs17655	Dominante	G/G	34 (58.6%)	24 (75%)	1.00	0.11
		G/C-C/C	24 (41.4%)	8 (25%)	0.47 (0.18-1.23)	
PTPN1 rs941798	Recesivo	A/A-A/G	53 (89.8%)	24 (75%)	1.00	0.067
		G/G	6 (10.2%)	8 (25%)	2.94 (0.92-9.42)	
PTPN2 rs3737361	Dominante	T/T	24 (40%)	11 (35.5%)	1.00	0.67
		T/C-C/C	36 (60%)	20 (64.5%)	1.21 (0.49-2.98)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	62 (91.2%)	27 (75%)	1.00	0.03** 0.17*(B)
		C/T	6 (8.8%)	9 (25%)	3.44 (1.12-10.64)	
PPP2R2A rs2046226	Recesivo	A/A-A/G	48 (80%)	31 (96.9%)	1.00	0.014** 0.08*(B)
		G/G	12 (20%)	1 (3.1%)	0.13 (0.02-1.04)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
<i>PTPN14</i> rs1135352	Sobredominante	G/G-A/A	28 (50%)	16 (55.2%)	1.00	0.65
		A/G	28 (50%)	13 (44.8%)	0.81 (0.33-2.00)	
<i>PTPRG</i> rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	56 (98.2%)	30 (93.8%)	1.00	0.27
		C/C	1 (1.8%)	2 (6.2%)	3.73 (0.33-42.88)	
<i>STAT5B</i> rs809451	---	G/G	38 (84.4%)	19 (76%)	1.00	0.39
		C/G	7 (15.6%)	6 (24%)	1.71 (0.51-5.82)	
<i>SOCS1</i> rs243327	Recesivo	T/T-T/C	45 (76.3%)	23 (71.9%)	1.00	0.65
		C/C	14 (23.7%)	9 (28.1%)	1.26 (0.47-3.34)	
<i>SOCS2</i> rs768775	Recesivo	T/T-T/C	56 (93.3%)	32 (100%)	1.00	0.061
		C/C	4 (6.7%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS1</i> rs181582	Codominante	C/C	31 (58.5%)	24 (77.4%)	1.00	0.083
		C/T	19 (35.9%)	7 (22.6%)	0.48 (0.17-1.32)	
		T/T	3 (5.7%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SOCS2</i> rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	52 (92.9%)	27 (100%)	1.00	0.072
		C/C	4 (7.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>SH2B3</i> rs3184504	Dominante	C/C	13 (25%)	12 (42.9%)	1.00	0.1
		C/T-T/T	39 (75%)	16 (57.1%)	0.44 (0.17-1.18)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Dominante	T/T	25 (47.2%)	9 (32.1%)	1.00	0.19
		C/T-C/C	28 (52.8%)	19 (67.9%)	1.88 (0.72-4.92)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Dominante	A/A	23 (43.4%)	10 (33.3%)	1.00	0.37
		G/A-G/G	30 (56.6%)	20 (66.7%)	1.53 (0.60-3.90)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
<i>GSTP1</i> <i>rs1695</i>	Recesivo	A/A-A/G	52 (86.7%)	26 (81.2%)	1.00	0.5
		G/G	8 (13.3%)	6 (18.8%)	1.50 (0.47-4.78)	
<i>GAB2</i> <i>rs2373115</i>	Recesivo	C/C-C/A	59 (100%)	29 (96.7%)	1.00	0.14
		A/A	0 (0%)	1 (3.3%)	NA (0.00-NA)	

Tabla 25. SNPs y probabilidad de respuesta subóptima y fallo a los 18 meses

- **5.13 Asociación con la respuesta subóptima en cualquier momento del tratamiento**

No se objetivó ninguna asociación estadísticamente significativa entre el genotipo de los SNP estudiados y la respuesta subóptima en cualquier momento del seguimiento.

	Modelo	Genotipo	No R subop	Si R subop	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPCE8</i> <i>rs2228000</i>	Sobredominante	C/C-T/T	42 (66.7%)	11 (37.9%)	1.00	0.0096** 0.12*(B)
		C/T	21 (33.3%)	18 (62.1%)	3.27 (1.31-8.17)	
<i>XPCE16</i> <i>rs2228001</i>	Dominante	A/A	26 (41.3%)	8 (27.6%)	1.00	0.2
		A/C-C/C	37 (58.7%)	21 (72.4%)	1.84 (0.71-4.80)	
<i>XRCC1</i> <i>rs25487</i>	Dominante	G/G	29 (46.8%)	12 (41.4%)	1.00	0.63
		G/A-A/A	33 (53.2%)	17 (58.6%)	1.24 (0.51-3.04)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No R subop	Si R subop	OR (95% CI)	P-valor
<i>XPD</i> rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	29 (46%)	17 (60.7%)	1.00	0.19
		T/G	34 (54%)	11 (39.3%)	0.55 (0.22-1.37)	
<i>ERCC5</i> rs17655	Dominante	G/G	38 (62.3%)	20 (69%)	1.00	0.53
		G/C-C/C	23 (37.7%)	9 (31%)	0.74 (0.29-1.91)	
<i>PTPN1</i> rs941798	Dominante	A/A	26 (41.9%)	8 (27.6%)	1.00	0.18
		A/G-G/G	36 (58.1%)	21 (72.4%)	1.90 (0.73-4.94)	
<i>PTPN2</i> rs3737361	Recesivo	T/T-T/C	58 (92.1%)	25 (89.3%)	1.00	0.67
		C/C	5 (7.9%)	3 (10.7%)	1.39 (0.31-6.28)	
<i>PTPN22</i> rs2476601	---	C/C	65 (87.8%)	24 (80%)	1.00	0.32
		C/T	9 (12.2%)	6 (20%)	1.81 (0.58-5.61)	
<i>PPP2R2A</i> rs2046226	Sobredominante	A/A-G/G	33 (52.4%)	11 (37.9%)	1.00	0.2
		A/G	30 (47.6%)	18 (62.1%)	1.80 (0.73-4.42)	
<i>PTPN14</i> rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	51 (89.5%)	27 (96.4%)	1.00	0.24
		A/A	6 (10.5%)	1 (3.6%)	0.31 (0.04-2.75)	
<i>PTPRG</i> rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	59 (96.7%)	27 (96.4%)	1.00	0.94
		C/C	2 (3.3%)	1 (3.6%)	1.09 (0.09-12.58)	
<i>STAT5B</i> rs809451	--	G/G	43 (86%)	14 (70%)	1.00	0.13
		C/G	7 (14%)	6 (30%)	2.63 (0.76-9.15)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No R subop	Si R subop	OR (95% CI)	P-valor
SOCS1 rs243327	Recesivo	T/T-T/C	47 (70.2%)	21 (87.5%)	1.00	0.077
		C/C	20 (29.9%)	3 (12.5%)	0.34 (0.09-1.25)	
SOCS2 rs768775	Dominante	T/T	38 (60.3%)	19 (65.5%)	1.00	0.63
		T/C-C/C	25 (39.7%)	10 (34.5%)	0.80 (0.32-2.00)	
SOCS1 rs181582	Recesivo	C/C-C/T	55 (94.8%)	26 (100%)	1.00	0.13
		T/T	3 (5.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SOCS2 rs3869308	Dominante	T/T	36 (60%)	17 (73.9%)	1.00	0.23
		T/C-C/C	24 (40%)	6 (26.1%)	0.53 (0.18-1.53)	
SH2B3 rs3184504	Dominante	C/C	13 (25%)	12 (42.9%)	1.00	0.1
		C/T-T/T	39 (75%)	16 (57.1%)	0.44 (0.17-1.18)	
IFNG rs2069705	Recesivo	T/T-C/T	45 (83.3%)	24 (88.9%)	1.00	0.5
		C/C	9 (16.7%)	3 (11.1%)	0.63 (0.15-2.53)	
SLCO1b3 rs7311358	Recesivo	A/A-G/A	48 (88.9%)	23 (79.3%)	1.00	0.25
		G/G	6 (11.1%)	6 (20.7%)	2.09 (0.61-7.18)	
GSTP1 rs1695	Recesivo	A/A-A/G	55 (87.3%)	23 (79.3%)	1.00	0.33
		G/G	8 (12.7%)	6 (20.7%)	1.79 (0.56-5.75)	
GAB2 rs2373115	Recesivo	C/C-C/A	62 (100%)	26 (96.3%)	1.00	0.12
		A/A	0 (0%)	1 (3.7%)	NA (0.00-NA)	

Tabla 26. SNPS y probabilidad de respuesta subóptima en cualquier momento del tratamiento

Resultados

- **5.14 Asociación de los SNPs candidatos con el fallo al tratamiento en cualquier momento del seguimiento**

El único SNP que mostró una asociación estadísticamente significativa (con corrección de Bonferroni) con el fallo al tratamiento fue el rs243327 de *SOCS1*. Así, en el modelo recesivo se comprobó que el alelo variante C en homocigosis confería un incremento 6,7 veces mayor del riesgo de fallo.

	Modelo	Genotipo	No Fallo	Fallo	OR (95% CI)	P-valor
XPCE8 rs2228000	Recesivo	C/C-C/T	70 (89.7%)	11 (78.6%)	1.00	0.27
		T/T	8 (10.3%)	3 (21.4%)	2.39 (0.55-10.39)	
XPCE16 rs2228001	Recesivo	A/A-A/C	68 (87.2%)	12 (85.7%)	1.00	0.88
		C/C	10 (12.8%)	2 (14.3%)	1.13 (0.22-5.83)	
XRCC1 rs25487	Recesivo	G/G-G/A	69 (88.5%)	13 (100%)	1.00	0.087
		A/A	9 (11.5%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
XPD rs13181	Recesivo	T/T-T/G	64 (83.1%)	13 (92.9%)	1.00	0.31
		G/G	13 (16.9%)	1 (7.1%)	0.38 (0.05-3.15)	
ERCC5 rs17655	Recesivo	G/G-G/C	75 (98.7%)	11 (78.6%)	1.00	0.0061** 0.07*(B)
		C/C	1 (1.3%)	3 (21.4%)	20.45 (1.95-214.48)	
PTPN1 rs941798	Sobredominante	A/A-G/G	41 (53.2%)	7 (50%)	1.00	0.82
		A/G	36 (46.8%)	7 (50%)	1.14 (0.36-3.56)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No Fallo	Fallo	OR (95% CI)	P-valor
PTPN2 rs3737361	Recesivo	T/T-T/C	69 (89.6%)	14 (100%)	1.00	0.094
		C/C	8 (10.4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	78 (88.6%)	11 (68.8%)	1.00	0.057
		C/T	10 (11.4%)	5 (31.2%)	3.55 (1.02-12.32)	
PPP2R2A rs2046226	Sobredominante	A/A-G/G	34 (43.6%)	10 (71.4%)	1.00	0.052
		A/G	44 (56.4%)	4 (28.6%)	0.31 (0.09-1.07)	
PTPN14 rs1135352	Recesivo	G/G-A/G	69 (94.5%)	9 (75%)	1.00	0.05
		A/A	4 (5.5%)	3 (25%)	5.75 (1.10-29.95)	
PTPRG rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	73 (97.3%)	13 (92.9%)	1.00	0.44
		C/C	2 (2.7%)	1 (7.1%)	2.81 (0.24-33.26)	
STAT5B rs809451	---	G/G	47 (81%)	10 (83.3%)	1.00	0.85
		C/G	11 (19%)	2 (16.7%)	0.85 (0.16-4.47)	
SOCS1 rs243327	Recesivo	T/T-T/C	63 (80.8%)	5 (38.5%)	1.00	0.0024** 0.01*(B)
		C/C	15 (19.2%)	8 (61.5%)	6.72 (1.92-23.48)	
SOCS2 rs768775	Recesivo	T/T-T/C	74 (94.9%)	14 (100%)	1.00	0.24
		C/C	4 (5.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SOCS1 rs181582	Recesivo	C/C-C/T	68 (95.8%)	13 (100%)	1.00	0.31
		T/T	3 (4.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
SOCS2 rs3869308	Recesivo	T/T-T/C	65 (94.2%)	14 (100%)	1.00	0.22
		C/C	4 (5.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No Fallo	Fallo	OR (95% CI)	P-valor
<i>SH2B3</i> rs3184504	Recesivo	C/C-C/T	54 (76.1%)	9 (100%)	1.00	0.032** 0.38*(B)
		T/T	17 (23.9%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)	
<i>IFNG</i> rs2069705	Dominante	T/T	32 (45.7%)	2 (18.2%)	1.00	0.072
		C/T-C/C	38 (54.3%)	9 (81.8%)	3.79 (0.76-18.82)	
<i>SLCO1b3</i> rs7311358	Recesivo	A/A-G/A	62 (86.1%)	9 (81.8%)	1.00	0.71
		G/G	10 (13.9%)	2 (18.2%)	1.38 (0.26-7.33)	
<i>GSTP1</i> rs1695	Dominante	A/A	35 (44.9%)	8 (57.1%)	1.00	0.4
		A/G-G/G	43 (55.1%)	6 (42.9%)	0.61 (0.19-1.93)	
<i>GAB2</i> rs2373115	Dominante	C/C	55 (73.3%)	12 (85.7%)	1.00	0.3
		C/A-A/A	20 (26.7%)	2 (14.3%)	0.46 (0.09-2.23)	

Tabla 27. SNPS y probabilidad de fallo al tratamiento en cualquier momento evolutivo

- **5.15 Asociación de los SNPs candidatos con la respuesta inadecuada en cualquier momento del seguimiento**

Como refleja la tabla, el único SNP que se asoció con la respuesta inadecuada (fallo + respuesta subóptima) fue rs243327. Así, en el modelo aditivo, los pacientes que presentaban el alelo variante C en homocigosis tuvieron un riesgo de respuesta inadecuada casi nueve veces mayor que el resto de casos.

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Si resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
XPCE8 rs2228000	Sobredominante	C/C-T/T	34 (68%)	19 (45.2%)	1.00	0.027** 0.35*(B)
		C/T	16 (32%)	23 (54.8%)	2.57 (1.10-6.02)	
XPCE16 rs2228001	Dominante	A/A	21 (42%)	13 (30.9%)	1.00	0.27
		A/C-C/C	29 (58%)	29 (69%)	1.62 (0.68-3.83)	
XPD rs13181	Sobredominante	T/T-G/G	24 (48%)	22 (53.7%)	1.00	0.59
		T/G	26 (52%)	19 (46.3%)	0.80 (0.35-1.82)	
XRCC1 rs25487	Recesivo	G/G-G/A	44 (88%)	38 (92.7%)	1.00	0.45
		A/A	6 (12%)	3 (7.3%)	0.58 (0.14-2.47)	
ERCC5 rs17655	Recesivo	G/G-G/C	48 (100%)	38 (90.5%)	1.00	0.012** 0.156*(B)
		C/C	0 (0%)	4 (9.5%)	NA (0.00-NA)	
PTPN1 rs941798	Dominante	A/A	22 (44.9%)	12 (28.6%)	1.00	0.11
		A/G-G/G	27 (55.1%)	30 (71.4%)	2.04 (0.85-4.89)	
PTPN2 rs3737361	Sobredominante	T/T-C/C	26 (52%)	17 (41.5%)	1.00	0.32
		T/C	24 (48%)	24 (58.5%)	1.53 (0.66-3.52)	
PPP2R2A rs2046226	Dominante	A/A	15 (30%)	16 (38.1%)	1.00	0.41
		A/G-G/G	35 (70%)	26 (61.9%)	0.70 (0.29-1.66)	
PTPN22 rs2476601	---	C/C	54 (93.1%)	35 (76.1%)	1.00	0.014** 0.17*(B)
		C/T	4 (6.9%)	11 (23.9%)	4.24 (1.25-14.38)	
PTPN14 rs1135352	Dominante	G/G	22 (47.8%)	15 (38.5%)	1.00	0.38
		A/G-A/A	24 (52.2%)	24 (61.5%)	1.47 (0.62-3.49)	
PTPRG rs62620047	Recesivo	T/T-C/T	47 (97.9%)	39 (95.1%)	1.00	0.46
		C/C	1 (2.1%)	2 (4.9%)	2.41 (0.21-27.59)	

Resultados

	Modelo	Genotipo	No resp inadec	Si resp inadec	OR (95% CI)	P-valor
STAT5B rs809451	---	G/G	33 (84.6%)	24 (77.4%)	1.00	0.44
		C/G	6 (15.4%)	7 (22.6%)	1.60 (0.48-5.38)	
SOCS1 rs243327	Log aditivo	T/T	22 (26.5%)	0 (0%)	8.87 (1.83-43.04)	0.0035** 0.02*(B)
		T/C	44 (53%)	2 (25%)		
		C/C	17 (20.5%)	6 (75%)		
SOCS2 rs768775	Recesivo	T/T-T/C	47 (94%)	41 (97.6%)	1.00	0.38
		C/C	3 (6%)	1 (2.4%)	0.38 (0.04-3.82)	
SOCS1 rs181582	Recesivo	C/C-C/T	43 (93.5%)	38 (100%)	1.00	0.054
		T/T	3 (6.5%)	0 (0%)		
SOCS2 rs3869308	Dominante	T/T	28 (59.6%)	25 (69.4%)	1.00	0.35
		T/C-C/C	19 (40.4%)	11 (30.6%)	0.65 (0.26-1.62)	
SH2B3 rs3184504	Dominante	C/C	10 (22.7%)	15 (41.7%)	1.00	0.069
		C/T-T/T	34 (77.3%)	21 (58.3%)	0.41 (0.16-1.08)	
IFNG rs2069705	Dominante	T/T	21 (47.7%)	13 (35.1%)	1.00	0.25
		C/T-C/C	23 (52.3%)	24 (64.9%)	1.69 (0.69-4.14)	
SLCO1b3 rs7311358	Recesivo	A/A-G/A	39 (88.6%)	32 (82%)	1.00	0.39
		G/G	5 (11.4%)	7 (17.9%)	1.71 (0.49-5.89)	
GSTP1 rs1695	Recesivo	A/A-A/G	44 (88%)	34 (81%)	1.00	0.35
		G/G	6 (12%)	8 (19.1%)	1.73 (0.55-5.45)	
GAB2 rs2373115	Recesivo	C/C-C/A	49 (100%)	39 (97.5%)	1.00	0.2
		A/A	0 (0%)	1 (2.5%)	NA (0.00-NA)	

Tabla 28. SNPS y probabilidad de respuesta inadecuada en cualquier momento evolutivo

Resultados

6. ANALISIS DE HAPLOTIPOS Y ASOCIACIONES

A continuación, se procedió al cálculo del desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium, LD) entre los dos SNPs estudiados en el gen *XPC* (*XPC*499 rs2228000 y *XPC*939 rs2228001), comprobándose que presentaban un alto desequilibrio de ligamiento entre ellos ($D'=0,94$). Así, se realizó un análisis de haplotipos en los individuos sanos y en los pacientes con LMC. Las frecuencias observadas de los haplotipos del gen *XPC* en los donantes sanos fueron de 31%, 29,5% y 39,5% para las variantes CA, TA y CC, respectivamente. El haplotipo constituido por los alelos infrecuentes (499T-939C) se observó en menos de un 1% de los individuos. Por consiguiente, para los análisis de asociación con la respuesta a imatinib (óptima vs no óptima) únicamente se consideraron 3 haplotipos: el haplotipo salvaje (499C939A) o wild-type (CA), el 499T939A (TA) y el 499C-939C (CC). Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Análisis de asociación de haplotipos					
XPC499	XPC939	Total	Resp óptima	Resp subop/Fallo	p
C	A	0.30	0.39	0.18	0.005
C	C	0.37	0.34	0.42	0.22
T	A	0.32	0.28	0.38	0.13
T	C	0.008	0	0.017	NA

Tabla 29 Análisis de asociación de haplotipos del gen *XPC* con la respuesta a imatinib

Resultados

Por tanto, se observó que la frecuencia del haplotipo CA en el grupo de pacientes con una respuesta óptima a imatinib fue significativamente mayor que en aquellos que no la alcanzaron (39% vs 18%, P valor: 0.0005). Los resultados del análisis del riesgo relativo de respuesta subóptima/fallo asociado a cada uno de los haplotipos en relación al riesgo basal del haplotipo CA se muestra a continuación:

XPC499	XPC939	Haplo base CA		Haplo base CC		Haplo base TA	
		OR (95% CI)	P-valor	OR (95% CI)	P-valor	OR (95% CI)	P-valor
C	A	1	NA	0.40 (0.18-0.86)	0.020	0.38 (0.18-0.81)	0.013
C	C	2.30 (1.07-4.93)	0.03	1.00	NA	0.92 (0.45-1.91)	0.83
T	A	2.46 (1.15 - 5.27)	0.02	1.01 (0.48-2.13)	0.97	1.00	NA
T	C	-	-	-	-	-	-
Global haplotype association p-valor 0.03							

Tabla 30. Análisis de asociación de haplotipos del gen XPC vs respuesta a imatinib

Adicionalmente, se realizaron análisis adicionales entre el genotipo de XPC y la respuesta a imatinib, considerando que el genotipo de cada paciente es la combinación de dos haplotipos. Debido a la baja frecuencia del haplotipo TC, es posible asignar cuál es el genotipo de cada paciente sin que existan indeterminaciones. En el análisis de regresión logarítmica (ver tabla siguiente) considerando todas las combinaciones de

Resultados

haplotipos, se objetiva que la combinación formada por los haplotipos TA/CC fue más prevalente en los pacientes con respuesta inadecuada que en los respondedores óptimos (45% vs 15% P: 0.002 OR= 4.5 95% CI=1.7-12)

Genotipo	Grupo de respuesta completa n(%)	Grupo de respuesta subóptima/Fallo n(%)	p	OR(95% IC)
CA/CA	9 (17%)	2 (7,5%)	0,219	0,387 (0,098-1,538)
CA/CC	14 (26,4%)	4(10%)	0,063	0,302 (0,091-1,002)
CA/TA	9 (17,31%)	4(10%)	0,378	0,531(0,151-1,868)
TA/TA	6(11%)	4(10%)	1	0,852 (0,223-3,247)
CC/TA	8(15%)	18 (45%)	0,002	4,5 (1,70-11,96)
CC/CC	6(11%)	6 (15%)	0,757	1,353 (0,40-4,561)
TA/TC	0(0)	1(2,5%)	-	NA

Tabla 31. Análisis de regresión logarítmica considerando todas las combinaciones de haplotipos de XPC

Cuando se evaluó únicamente la influencia del haplotipo protector CA, agrupando el resto de haplotipos (CC y TA) en una misma categoría (X) se obtuvieron los siguientes resultados:

Modelo	Genotipo	Grupo RC n(%)	Grupo resp subópt/Fallo n(%)	OR (95% CI)	P-valor
Codom	X/X	20 (38.5%)	29 (72.5%)	1.00	0.0045
	CA/X	23 (44.2%)	8 (20%)	0.24 (0.09-0.64)	
	CA/CA	9 (17.3%)	3 (7.5%)	0.23 (0.06-0.96)	

Resultados

Modelo	Genotipo	Grupo RC n(%)	Grupo resp subópt/Fallo n(%)	OR (95% CI)	P- valor
Dominante	X/X	20 (38.5%)	29 (72.5%)	1.00	0.001
	CA/X- CA/CA	32 (61.5%)	11 (27.5%)	0.24 (0.10- 0.58)	
Recesivo	X/X-CA/X	43 (82.7%)	37 (92.5%)	1.00	0.16
	CA/CA	9 (17.3%)	3 (7.5%)	0.39 (0.10- 1.54)	
Sobredom	X/X- CA/CA	29 (55.8%)	32 (80%)	1.00	0.013
	CA/X	23 (44.2%)	8 (20%)	0.32 (0.12- 0.81)	
Log-aditivo	---	---	---	0.37 (0.19- 0.74)	0.0024

Tabla 32. Impacto del haplotipo CA en la respuesta al tratamiento con Imatinib. *X=haplotipo CC o TA

El mejor modelo estadístico para describir dichas diferencias fue el modelo dominante, en el que los portadores CA (tanto en homocigosis como en heterocigosis) presentaron cuatro veces menor riesgo de alcanzar una respuesta subóptima o fallo al tratamiento con imatinib que los no portadores (P valor: 0.001, OR =0.24 95% CI= 0.10-0.58). La frecuencia de los individuos con una o dos copias del haplotipo CA es más de dos veces mayor en los pacientes con respuesta óptima a imatinib que en aquellos con respuesta subóptima o fallo de tratamiento (61% vs 27.5%).

Por último, se calculó la supervivencia libre de fallo (SLF) a los 5 años en función de la presencia del haplotipo CA del gen XPC. La SLF de los pacientes

Resultados

portadores de haplotipo CA fue significativamente mejor que la del resto (98% vs 73%, P valor: 0.02), como se muestra en la figura siguiente:

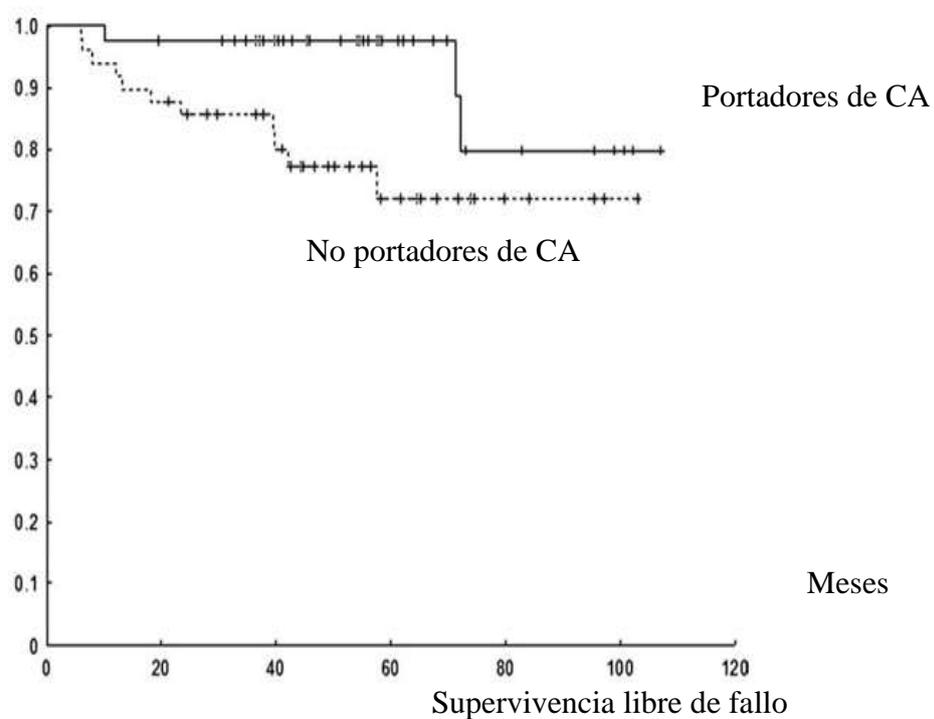


Figura 14. Relación entre genotipo de XPC y supervivencia

A continuación se muestra una tabla resumen con los resultados de los análisis de asociación entre los SNPs candidatos y la respuesta al tratamiento con imatinib.

Tabla 33. Resumen de la asociación entre el genotipo y la respuesta a imatinib

	GEN	SNP	Modelo	Genotipo			OR (95% CI)	P-valor	P-valor
Asociación con la RCC	<i>SOCS1</i>	rs243327	Recesivo	T/T-T/C	64 (79%)	3 (33.3%)	1.00	0.0058	0.03(B)
Asociación con la pérdida de RHC	<i>PPP2R2A</i>	rs2046226	Dominante	A/A	27 (30.7%)	4 (100%)	1.00	0.0026	0.01 (B)
				A/G-G/G	61 (69.3%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)		
Asociación con la pérdida de RCC	<i>ERCC5</i>	rs17655	Recesivo	G/G-G/C	77 (98.7%)	6 (66.7%)	1.00	0.0013	0.01 (B)
				C/C	1 (1.3%)	3 (33.3%)	38.50 (3.45-429.03)		
	<i>PPP2R2A</i>	rs2046226	Sobredominante	A/A-G/G	35 (43.8%)	8 (88.9%)	1.00	0.0067	0.04 (B)
				A/G	45 (56.2%)	1 (11.1%)	0.10 (0.01-0.81)		
Asociación con la pérdida de RMM	<i>ERCC5</i>	rs17655	Log Aditivo	Existe un incremento del riesgo por cada copia del alelo menor C			6.24 (2.05-18.98)	0.04(B)* 0.0004**	0.02 (B)

Resultados

	GEN	SNP	Modelo	Genotipo			OR (95% CI)	P-valor	P-valor
Asociación con fallo a los 12 meses	<i>IFNG</i>	rs2069705	Log Aditivo	Existe un incremento del riesgo por cada copia del alelo menor C			13.44 (1.52-119)	0.0025**	0.01 (B)
	<i>SOCSI</i>	rs243327	Recesivo	T/T-T/C	67 (77.9%)	1 (20%)	1.00	0.0079	0.04 (B)
				C/C	19 (22.1%)	4 (80%)	14.11 (1.49-133.80)		
	<i>PTPN22</i>	rs2476601	---	C/C	86 (89.6%)	3 (37.5%)	1.00	9,00E-04	
				C/T	10 (10.4%)	5 (62.5%)	14.33 (2.97-69.18)		
Asociación con respuesta inadecuada a los 12 meses	<i>SOCSI</i>	rs243327	Recesivo	T/T-T/C	65 (79.3%)	3 (33.3%)	1.00	0.0054	0.03 (B)
				C/C	17 (20.7%)	6 (66.7%)	7.65 (1.73-33.76)		
Asociación con fallo a los 18 meses	<i>SOCSI</i>	rs243327	Aditivo	T/T	28(30.1%)	0(0)	5.9 (1.8-19.2)	<0.001	0.004 (B)
				T/C	47(50.5%)	4(36.4%)			
				C/C	18(19.4%)	7(63.6%)			
	<i>PTPN22</i>	rs2476601	Dominante	C/C	83 (89.2%)	6 (54.5%)	6.9 (1.8-26.8)	0.007	0.04(B)
				C/T	10 (10.8%)	5(45.5%)			

Resultados

	GEN	SNP	Modelo	Genotipo			OR (95% CI)	P-valor	P-valor
Asociación con fallo en cualquier momento	<i>SOCSI</i>	rs243327	Recesivo	T/T-T/C	63 (80.8%)	5 (38.5%)	1.00	0.0024	0.01 (B)
				C/C	15 (19.2%)	8 (61.5%)	6.72 (1.92-23.48)		
Asociación con respuesta inadecuada en cualquier momento	<i>SOCSI</i>	rs243327	Log aditivo	T/T	22 (26.5%)	0 (0%)	8.87 (1.83-43.04)	0.0035	0.02 (B)
				T/C	44 (53%)	2 (25%)			
				C/C	17 (20.5%)	6 (75%)			

Resultados

7. ANALISIS MULTIVARIANTE DEL EFECTO DE LOS FACTORES CLINICOS Y GENETICOS EN LOS RESULTADOS DEL TRATAMIENTO CON IMATINIB

- **7.1. Análisis del riesgo de fallo a los 18 meses de tratamiento con imatinib:**

Como se ha visto anteriormente, sólo dos SNPs candidatos se correlacionaron con la variable fallo a los 18 meses de tratamiento: rs243327 del gen *SOCS1* (OR: 5.9, 95% CI 1.8-19.2, P-valor ajustada: 0.004 en modelo aditivo) y rs2476601 del gen *PTPN22* (OR: 6.9, 95% CI: 1.8-26.8, P-valor ajustado: 0.04 en modelo dominante). Estos SNPs se incluyeron en un análisis de regresión binario junto con las principales características clínicas de los pacientes al diagnóstico de la LMC. Como puede verse en la tabla 34, ambos SNPs mantuvieron la significación estadística en el análisis multivariado, mientras que ningún factor clínico basal mostró tener valor pronóstico independiente.

Resultados

Factor	Fallo a los 18 meses	P valor	Odds ratio (IC95%)	P valor	Odds ratio (IC95%)
Edad		0.66			
< 60 años	13.3%		1		
≥ 60 años	10%		1.4 (0.3-7.1)		
Sexo		0.75			
Mujer	8.7%		1		
Hombre	11.9%		1.4 (0.4-5.1)		
Nivel de Hb		0.43			
≥ 110 g/L	9.5%		1		
< 110 g/L	17.6%		1.7 (0.4-7.0)		
Índice de Sokal		0.19			
Bajo/Intermedio	8.9%		1		
Alto	25%		2.6 (0.6-11.0)		
Evolución clonal		1.0			
No	12.3%		1		
Si	0%		0.95 (0.9-1.0)		
Genotipo <i>PTPN22</i>		0.007		0.009	1 7.8 (1.7-37.0)
C/C	6.7%		1		
C/T	33.3%		6.9 (1.8-26.8)		
Genotipo <i>SOCS1</i>		<0.001		0.004	6.1 (1.8-21.0)
T/T	0%		5.9		
C/T	7.8%		(1.8-19.2)		
C/C	28%				

Tabla 34. Análisis de los factores asociados con el fallo al tratamiento con imatinib a los 18 meses.

Resultados

• 7.2 Análisis de la supervivencia libre de fallo al tratamiento con imatinib:

A continuación, se realizó un análisis multivariante incluyendo factores clínicos y genéticos mediante el método de regresión de Cox. Como puede verse en la tabla siguiente, los tres factores asociados de forma independiente con la SLF fueron el índice de Sokal y el genotipo de *SOCS1* (modelo aditivo) y *PTPN22* (modelo dominante).

Factor	SLF a los 5 años	Univariante		Multivariante	
		P valor	Hazard ratio (95% CI)	P valor	Hazard ratio (95% CI)
Edad	86.1%	0.53	1		
< 60 años					
≥ 60 años	85.7%		1.5 (0.4-5.2)		
Sexo	91.2%	0.42	1		
Mujer					
Hombre	81.9%		1.5 (0.6-4.1)		
Nivel de Hb	87.6%	0.21	1		
≥ 110 g/L					
< 110 g/L	79.2%		2.0 (0.7-5.7)		
Índice de Sokal	88.5%	0.04	1	0.05	1 2.9 (1.0-8.3)
Bajo/Intermedio					
Alto	71.5%		3.0 (1.1-8.8)		
Evolución clonal	86.5%	0.88	1		
No					
Si	75.0%		1.2 (0.2-8.9)		
<i>PTPN22</i> genotipo	89.2%	0.03	1	0.03	1 3.2 (1.1-9.1)
C/C					
C/T	66.7%		3.0 (1.1-8.6)		

Resultados

Factor	SLF a los 5 años	P valor	Hazard ratio (95% CI)	P valor	Hazard ratio (95% CI)
<i>SOCS1</i> genotipo					
T/T	100%	0.002	3.4 (1.6-7.5)	0.002	3.4 (1.6-7.5)
T/C	87.6%				
C/C	67.6%				

Tabla 35. Análisis de los factores clínicos y genéticos asociados con la supervivencia libre de fallo al tratamiento con imatinib

En base a los resultados del análisis multivariante se pudo construir un modelo predictivo para la SLF. Dado que no se objetivaron marcadas diferencias en el hazard ratio de los 4 factores pronósticos estudiados, se asignó un valor de uno a cada uno de ellos: 1 para el índice de Sokal de alto riesgo, 1 por ser portador del alelo menos frecuente T en *PTPN22*, y 1 para cada una de las copias del alelo infrecuente C del SNPs del gen *SOCS1*.

Factores de riesgo	Puntuación
Sokal alto riesgo	1 pto
Portador de alelo T en <i>PTPN22</i>	1 pto
Copias de C en <i>SOCS1</i>	1 pto/copia

Tabla 36. Factores y grupos de riesgo del modelo predictivo de la supervivencia libre de fallo

Resultados

Grupo de riesgo	Fact de riesgo
Bajo riesgo	0-1
Riesgo intermedio	2
Alto riesgo	3-4

Tabla 36. Factores y grupos de riesgo del modelo predictivo de la supervivencia libre de fallo

Con este modelo, se obtuvieron tres grupos de pacientes con diferencias significativas en cuanto a la supervivencia: grupo de bajo riesgo (ninguno o uno de los factores de riesgo: n=69), riesgo intermedio (dos factores de riesgo adverso: n=25) y alto riesgo (tres o cuatro factores de riesgo: n=10). Así, la supervivencia SLF a los 5 años fue del 95%, 75% y 50% para los grupos de riesgo bajo, intermedio y alto respectivamente ($p < 0.001$). Utilizando el grupo de bajo riesgo como referencia, los grupos de riesgo intermedio y alto riesgo poseían una hazard ratio para el fallo del tratamiento de 3.5 (95% CI: 1,1-11,4) y de 13,5 (95% CI: 4,1-44,9) respectivamente.

Resultados

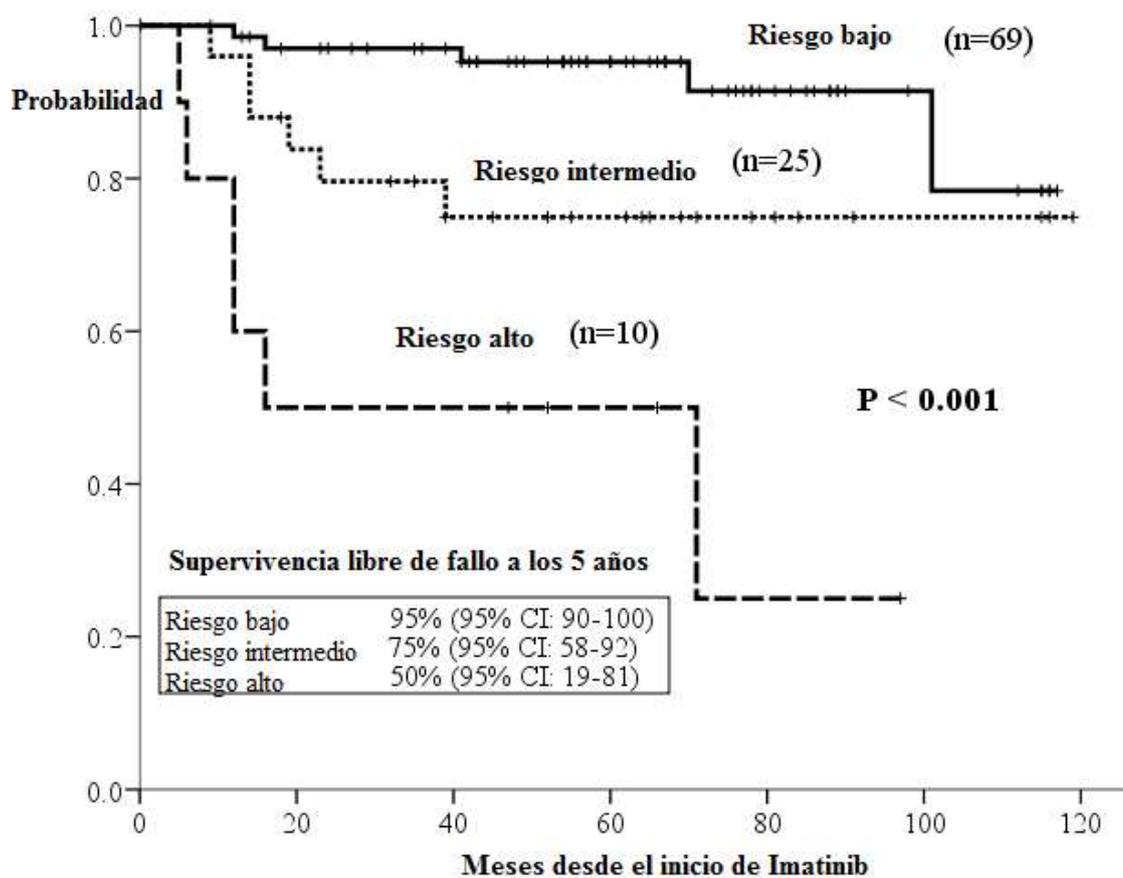


Figura 15. Supervivencia libre de fallo según el grupo de riesgo

Resultados

Discusión

Discusión

IV. DISCUSIÓN

La introducción en la práctica clínica del imatinib y, más recientemente, de los nuevos inhibidores de BCR-ABL, ha modificado radicalmente la historia natural de la LMC. En la actualidad, hasta un 85% de los pacientes con LMC están vivos a los 10 años del diagnóstico, con una baja tasa de transformación a fases avanzadas de la enfermedad, lo que se aproxima cada vez más a la esperanza de vida de la población general control [4]. Con todo, existe un subgrupo de pacientes con respuesta inadecuada al tratamiento, bien por resistencia franca o respuesta subóptima, que presenta un elevado riesgo de progresión a crisis blástica [154, 275]. Desafortunadamente, todavía no es posible identificar con precisión estos pacientes de alto riesgo antes de iniciar el tratamiento, por lo que la monitorización estrecha durante los primeros años resulta crucial [276]. Por otro lado, la erradicación completa de la clona leucémica se logra en una minoría de enfermos, como demuestra el hecho de que la suspensión del imatinib en pacientes con respuesta molecular profunda, incluso en ausencia de transcritos de BCR-ABL en sangre durante años, se acompaña de recaída de la enfermedad en más de la mitad de los casos [277]. En los últimos años, se han dilucidado los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia al tratamiento, como son la adquisición de mutaciones en el dominio cinasa de ABL, la amplificación de *BCR-ABL*, la activación de vías de señalización alternativas, la variabilidad en la distribución del fármaco hasta su diana intracelular o la falta de adicción oncogénica de las células madre leucémicas quiescentes [66, 167]. Sin embargo, existe poca información acerca del posible papel de

Discusión

la variabilidad interindividual mediada por polimorfismos genéticos en la respuesta al tratamiento de la LMC con inhibidores de BCR-ABL [278, 279].

La farmacogenómica estudia la forma en que las variaciones del genoma influyen en la respuesta a los medicamentos [280]. Su objetivo es encontrar biomarcadores que permitan optimizar la elección del tratamiento y su dosificación en cada caso, a fin de maximizar la eficacia terapéutica y minimizar los efectos tóxicos. Identificar de antemano en qué pacientes un determinado fármaco será eficaz puede tener gran relevancia clínica, de cara a evitar toxicidades innecesarias en los individuos con poca probabilidad de respuesta, así como demoras en la aplicación de un tratamiento más efectivo. En el caso concreto de la LMC, donde se dispone de varios fármacos activos junto con otras modalidades terapéuticas más agresivas, como el trasplante, este tipo de información podría ser útil a la hora de seleccionar el tratamiento inicial de los pacientes. Por otro lado, otra contribución importante de los estudios de farmacogenómica es la posibilidad de identificar nuevas dianas moleculares susceptibles de ser intervenidas con fármacos, lo que puede redundar en un progreso en el conocimiento y tratamiento de la enfermedad. Por todo ello, esta disciplina permite sentar las bases de una medicina más personalizada, donde la información acerca de la constitución genética individual sea de utilidad en la elección de la terapia farmacológica más adecuada [280].

Discusión

En nuestro servicio hemos realizado durante los últimos años diversos estudios de farmacogenómica para valorar la posible asociación entre SNPs de genes críticos en las rutas de señalización de *BCR-ABL* y de reparación del ADN y la respuesta al tratamiento de la LMC con imatinib [281, 282]. La mayoría de los SNPs seleccionados no habían sido estudiados previamente en este contexto clínico, pero de algunos sí existía información publicada, generalmente pendiente de confirmación en series independientes [120, 186, 262, 267, 268, 271, 283, 284]. La presente tesis pretende revisar el estado actual del tema, a partir de los datos de la bibliografía y las recientes aportaciones de nuestro grupo. En conjunto, se puede afirmar que existen datos a favor de la influencia de los polimorfismos genéticos en la respuesta al tratamiento de la LMC, pero el grado de evidencia es aún insuficiente para tomar en consideración esta información en la práctica clínica habitual.

En el análisis de la respuesta al tratamiento con imatinib en los pacientes de nuestra serie, el SNP (rs243327) del gen *SOCS1* fue el único que presentó una asociación estadísticamente significativa con el grado de respuesta, de forma que la homocigosis del alelo infrecuente C confería 7,5 veces más riesgo de no alcanzar la RCC. De forma llamativa, no se registró ningún caso de resistencia primaria a imatinib entre los 28 pacientes homocigotos para el alelo T de dicho SNP. A su vez, varios polimorfismos se correlacionaron con la estabilidad de la respuesta. Así, el SNP rs2046226 del gen *PPP2R2A* se asoció con la pérdida de RHC y de RCC, mientras que el SNP rs17655 del gen *ERCC5* se asoció con la pérdida de RCC y de RMM.

Discusión

Sin embargo, en la actualidad se sabe que en el tratamiento de la LMC no sólo es relevante el hecho de alcanzar un determinado grado de respuesta, sino también la cinética de obtención de la misma. En este sentido, en el presente proyecto utilizamos las definiciones de consenso de la ELN 2009 [162], que catalogan la respuesta al tratamiento en óptima, subóptima o fallo en distintos momentos evolutivos. De acuerdo a estas recomendaciones, los pacientes con fallo a imatinib eran candidatos a cambiar de tratamiento, pues su supervivencia a largo plazo era inferior a la de aquellos con respuesta óptima [285]. Con el tiempo se ha visto que el grupo de pacientes con respuesta subóptima, como fue definido por la ELN 2009, era muy heterogéneo desde el punto de vista pronóstico. Así, los enfermos con respuesta subóptima en los primeros 12 meses tienen en realidad una supervivencia libre de progresión superponible a la de los pacientes con fallo en ese mismo período. En cambio, los respondedores subóptimos a los 18 meses (enfermos en RCC, pero sin RMM) tienen un pronóstico similar al de los pacientes con respuesta óptima [286, 287]. Esta información ha motivado la reciente publicación de unas nuevas recomendaciones de manejo de la LMC [288].

En nuestro estudio, la probabilidad de fallo a los 12 meses fue significativamente mayor en los pacientes portadores del alelo C del SNP rs2069705 del gen *IFNG* (riesgo 13 veces mayor por cada una de las copias del mismo), en los homocigotos para el alelo infrecuente del gen *SOCS1* (rs243327) (riesgo 14 veces mayor) y en los portadores del alelo T del gen *PTPN22* (rs2476601) (riesgo 14 veces mayor). En el análisis de respuesta a los 18 meses, la probabilidad de fallo al tratamiento fue mayor en los

Discusión

pacientes homocigotos para la variante C del SNP rs243327 del gen *SOCS1* (riesgo 6 veces mayor) y en los portadores de la variante T del SNP rs2476601 del gen *PTPN22* (riesgo 7 veces mayor). Por último, el SNP rs24342 del gen *SOCS1* se asoció de forma significativa con el riesgo de fallo y de respuesta inadecuada en cualquier momento evolutivo. Así, la supervivencia libre de fallo a los 5 años de los enfermos homocigotos para la variante T de este SNP fue del 100%. Por el contrario, los portadores del alelo menor en homocigosis (CC) tuvieron una tasa de fallo del 28% a los 18 meses de tratamiento, con una supervivencia libre de fallo a los 5 años del 68%. En nuestra serie observamos una correlación significativa entre los haplotipos de *XPC* (exones 8 y 16) y la respuesta a imatinib, donde los pacientes portadores de una o dos copias del haplotipo salvaje CA (grupo de buen pronóstico) tenían un riesgo cuatro veces menor de respuesta subóptima o fallo que el resto[266].

En un intento de trasladar la información mencionada anteriormente a la práctica clínica, diseñamos un índice de riesgo para la supervivencia libre de fallo al tratamiento con imatinib en los pacientes con LMC en fase crónica inicial. Este modelo se basó en los resultados de un estudio multivariante que confirmó el impacto pronóstico adverso de 4 factores independientes: el índice de Sokal de alto riesgo, el alelo T del SNP rs2476601 de *PTPN22* y la presencia de una o dos copias del alelo C del SNP rs243327 de *SOCS1*. Así, a cada uno de estos factores se le asignó un punto de cara a calcular el índice de riesgo, quedando éste estratificado en tres grupos pronósticos con diferente supervivencia libre de fallo. Así, el grupo de bajo riesgo (0-1 puntos), constituido por

Discusión

dos tercios de los pacientes, tenía una supervivencia libre de fallo a los 5 años del 95%. Es decir, el pronóstico es excelente, por lo que en este subgrupo de pacientes podría considerarse que imatinib es el fármaco de elección. Por el contrario, el grupo de alto riesgo (3-4 puntos), constituido por un 10% de los pacientes, tenía una supervivencia libre de fallo del 50% a los 5 años. Por tanto, los resultados de imatinib en este último subgrupo serían mejorables, lo que favorecería el empleo preferente en estos pacientes de inhibidores de tirosina cinasas de segunda generación. Con todo, este modelo pronóstico debe ser validado en una serie independiente antes de poder ser aplicado en la práctica clínica habitual, lo que a día de hoy todavía no se ha producido.

Con los resultados obtenidos es posible constatar la potencial asociación entre las variaciones interindividuales mediadas por SNPs y la respuesta al tratamiento con imatinib en la LMC. Cabe, no obstante, tratar de explicar los mecanismos biológicos potencialmente implicados en dichas asociaciones. Para ello es necesario conocer el papel fisiológico de las proteínas implicadas y la influencia que pueden tener los distintos polimorfismos en su funcionalismo.

La proteína SOCS1 se ha involucrado en la regulación negativa de las vías de señalización intracelular por inhibición directa de la fosforilación de la cinasa JAK2, a través de su dominio SH2, impidiendo la translocación nuclear de las proteínas STAT. Además, SOCS1 es capaz de frenar la señalización intracelular a través de la focalización de proteínas asociadas a la degradación del proteosoma. Para ello, recluta

Discusión

elongina BC que contiene el complejo E3 ubiquitina ligasa, hecho que promueve la degradación de las proteínas diana. SOCS1 es capaz de inhibir las señales proliferativas iniciadas por las formas oncogénicas de KIT, JAK2 y ABL [289]. La activación desregulada de la vía JAK/STAT está presente en numerosas neoplasias humanas [68-70], entre ellas la LMC. Así, SOCS1 se encuentra frecuentemente silenciado por hipermetilación en el carcinoma hepatocelular y la restauración de su actividad en líneas celulares de hepatocarcinoma mediante transfección resulta en la supresión del crecimiento tumoral. El silenciamiento de SOCS1 parece necesario para la progresión tumoral en enfermedades como el mieloma múltiple, donde la activación de citocinas es fundamental en su patogénesis. Así, la pérdida de la funcionalidad de SOCS1 provoca un aumento de la señal de transducción de IL-6 y con ello la supervivencia y expansión de las células mielomatosas [290]. SOCS1 se encuentra frecuentemente mutado en su región codificante en linfomas y otros tumores [291, 292], lo que apoya su papel como gen supresor tumoral. SOCS1 es capaz de inactivar STAT1 [293], ejerciendo un papel inhibitorio en el desarrollo de metástasis tumorales. Por lo que respecta a la LMC, el silenciamiento genético a través de la metilación aberrante de *SOCS1* ha sido demostrado en pacientes con LMC en crisis blástica. Por el contrario, se ha objetivado la sobreexpresión de SOCS1 en pacientes con LMC en fase crónica resistentes a interferón [83-85]. A fin de explicar estos hallazgos aparentemente paradójicos, se ha sugerido que la sobreexpresión de SOCS1 puede ser una consecuencia natural de la activación constitutiva de la vía JAK-STAT en los progenitores leucémicos en fases iniciales, mientras que la inactivación epigenética de SOCS1 podría ser un evento más

Discusión

tardío que podría contribuir a la progresión de la enfermedad. El SNP rs243327 del gen *SOCS1* se localiza en la región 5' del promotor del gen (posición -3969) y consiste en una sustitución del alelo ancestral T por C, lo que podría influir en la regulación transcripcional del gen y, con ello, en la expresión final de la proteína.

La proteína IFNG se produce en linfocitos activados por antígenos específicos o mitógenos. Es un potente activador de macrófagos y posee actividad antiviral, inmunoreguladora y antitumoral. La señalización de IFNG activa las células stem hematopoyéticas latentes, tanto sanas como leucémicas, promoviendo su proliferación, lo que podría sensibilizarlas al efecto apoptótico de imatinib y de otros inhibidores de tirosina cinasas. El SNP rs2069705 de *IFNG* se localiza en la región promotora, lo que sugiere su potencial influencia en la regulación de la expresión del gen [267]. En un estudio reciente, el genotipo de este SNP se correlacionó con la respuesta citogenética y molecular al tratamiento con imatinib en una serie de 229 pacientes con LMC [267].

La proteína PTPN22 (LYP) es una fosfatasa implicada en la regulación de la señalización intracelular [294, 295]. El SNP rs2476601 de *PTPN22* se localiza en la región codificante del gen, por lo que las variantes alélicas se traducen en un cambio proteico. Así, el cambio de posición del nucleótido 1858 de C a T resulta en la sustitución de una arginina por triptófano. Estudios experimentales han demostrado que la variante proteica con triptófano posee una mayor capacidad de inhibición del receptor de señalización de linfocitos T. Se ha propuesto que el mecanismo implicado en la

Discusión

predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes en los portadores de la variante infrecuente del SNP podría ser la persistencia de linfocitos T autorreactivos o el déficit funcional de los linfocitos T reguladores. En este sentido, la influencia de las variantes de *PTPN22* en la respuesta a imatinib podría estar mediada por mecanismos inmunes o, de forma alternativa, por el efecto directo de LYP en los niveles de fosforilación intracelular de BCR-ABL y sus sustratos [295].

La proteína PP2A es una fosfatasa heterotrimérica con actividad serina/treonina involucrada en la regulación del ciclo celular. Asimismo, PP2A participa en la regulación negativa de la reparación del ADN tras rotura de doble cadena y en la activación del ciclo celular en respuesta a la irradiación. Los distintos complejos de PP2A modularían los diferentes pasos en el proceso de reparación del ADN. PPP2R2A es un efector crítico de la reparación de la recombinación homóloga a través de la modulación de la fosforilación de ATM. PPP2R2A está infraexpresado en distintas neoplasias sólidas, lo que podría resultar en una ineficiente reparación del ADN en las células tumorales. En el caso concreto de la LMC, se ha descrito la inactivación funcional de PP2A en la crisis blástica mieloide a través del efecto de BCR-ABL en la expresión de SET. De hecho, el restablecimiento de la actividad normal de PP2A *in vitro* e *in vivo* antagoniza la proliferación celular derivada de la acción de BCR-ABL. Por ello, existe un interés creciente en el desarrollo de fármacos capaces de aumentar la actividad de PP2A para el tratamiento de los pacientes resistentes a inhibidores de BCR-ABL o en fases avanzadas de la enfermedad. Con respecto al SNP rs2046226 del gen

Discusión

PPP2R2A, su ubicación en una región intrónica hace que se desconozca su potencial efecto biológico, si bien se ha postulado que las variaciones alélicas podrían implicar un cambio funcional a nivel de otro gen cercano [296, 297].

ERCC5 interviene en la reparación del ADN actuando como cofactor de la ADN glicosilasa que remueve las pirimidinas oxidadas del ADN. Juega un papel crucial en la corrección de dímeros de ciclobutanopirimidina, fotoproductos y lesiones inducidas por agentes químicos [298]. El SNP rs17655 del gen *ERCC5*, localizado en una región exónica codificante, consiste en un cambio del alelo ancestral G por C, lo que resulta en un aminoácido distinto (aspartato por histamina). Con ello, se modifica la estructura de la proteína resultante y su función reguladora [299], lo que puede afectar a su función reparadora del daño a nivel del ADN.

El complejo XPC es el primer factor de unión a los sitios de daño del ADN y, junto con XPA, RPA y el complejo TFIIH, constituye el complejo de reconocimiento inicial [237]. Los polimorfismos estudiados en el gen *XPC* están involucrados en cambios en la secuencia de la proteína, cuya influencia en el riesgo de desarrollar neoplasias humanas ha sido descrita con anterioridad. Así, los haplotipos TA y CC dan lugar a variantes de proteínas que son menos activas en la reparación del ADN que el haplotipo salvaje (CA). Este hecho podría ser importante en la LMC, donde la sobreexpresión de BCR-ABL facilita las roturas de doble cadena del ADN como consecuencia del aumento en la generación de radicales libres de oxígeno. Un déficit en

Discusión

la reparación del ADN facilitaría la inestabilidad genómica con acumulación de alteraciones genéticas en las células proliferantes de la LMC, lo que podría ser el origen de resistencia al tratamiento con imatinib [282].

Hasta aquí se han repasado las asociaciones observadas en nuestra serie entre SNPs y respuesta al tratamiento con imatinib, junto con las bases biológicas que podrían estar involucradas en las mismas. Se constata, por tanto, una asociación entre la respuesta al tratamiento y determinados SNPs de genes reparadores del ADN (*XPC*), reguladores de la proliferación celular (*SOCS1*, *PTPN22*) y de genes implicados en la vía de señalización de IFN (*IFNG*). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con algunas de las asociaciones observadas por otros autores, hecho que, por otro lado, no es infrecuente en este tipo de estudios.

Así, por lo que respecta a genes implicados en la reparación del ADN, Kong y cols objetivaron una asociación entre la homocigosidad para el alelo T del gen reparador *ERCC1* (rs11615) y una mayor probabilidad de alcanzar una respuesta citogenética o molecular con imatinib [256], mientras que no se encontró ninguna asociación con el resto de SNPs estudiados de los genes *ERCC2*, *ERCC4*, *ERCC5*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC4* y *XRCC5*. En cuanto a genes implicados en la señalización de BCR-ABL Koyama y cols observaron que la actividad atenuada de *PTPN1*, resultante de las distintas variaciones interindividuales del gen, podría influir en el riesgo de resistencia a imatinib [76], pero este efecto no se confirmó en nuestra serie. El polimorfismo

Discusión

SLCO1B3 334T_G (gen que regula un transportador de flujo) se ha asociado con los niveles leucocitarios de imatinib, así como con la respuesta al tratamiento [261], pero esto último no se confirmó en nuestra serie. Nuestros resultados también discrepan con la asociación descrita entre los SNPs del gen *IFNG* (rs1861494, rs2069705) y la probabilidad de obtener respuesta citogenética completa o respuesta molecular mayor con imatinib [252].

Está descrita en la bibliografía la relación entre la distribución de imatinib y la respuesta al tratamiento [238-254]. Dos son los genes más estudiados por diferentes grupos a este respecto OCT-1 y ABCB1, genes implicados en el transporte de imatinib y de su introducción en la célula por parte de OCT-1 y de su expulsión por parte de ABCB1.

No ha sido objeto de esta tesis pero si estudiado por parte de los componentes de nuestro grupo el papel de la actividad de OCT-1 con la respuesta a imatinib [186, 260] si bien los datos resultantes son controvertidos respecto a algunos de los descritos previamente. Así en el estudio de Maffioli y cols [186] en el que participaron pacientes de nuestra serie no se objetivó una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo de rs628031 del gen hOCT1 y la respuesta a imatinib, si bien si se objetivó asociación entre la variabilidad genética del SNP rs6935207 y la respuesta inadecuada a dicho tratamiento. Bazeos y cols [238] objetivaron en una cohorte de 132 pacientes diagnosticados de LMC una asociación estadísticamente significativa entre la RMM y el

Discusión

SNP rs34130495 con una mayor tasa de RMM (P valor: 0.0155), pero estos resultados fueron criticados por White y cols, que no objetivaron en su serie de 136 pacientes dicha asociación; si bien, si objetivaron que la actividad de OCT-1 antes del tratamiento estaba relacionada con la duración de la respuesta [259].

Con respecto a ABCB1 los resultados también resultan controvertidos entre los diferentes estudios existentes. En el estudio realizado por parte de los componentes de nuestro grupo se objetivó que el ser portador del alelo T en rs2032582 de este gen confería protección frente al fallo inicial al tratamiento con imatinib. En otros estudios realizados se objetivó la asociación entre el genotipo TT y TA con mayor ratio de RMM [262]. Por otra parte, Kim y cols no objetivaron asociación entre la variación genética de rs2032582 y la respuesta a imatinib en las diferentes fases de la enfermedad en cualquiera de las dosis del mismo 400, 600 y 800 mg diarios [284]. Está descrito en la bibliografía que los pacientes con genotipo TT tienen mayor actividad de ABCB1 en estado estable [300], existiendo con ello una discrepancia entre nuestros resultados, mostrando que los pacientes con genotipo TT evolucionan mejor, datos no confirmados por Kim y cols que objetivan una asociación entre el genotipo TT y la disminución de la supervivencia [284]. Serían necesarios por tanto más estudios que confirmasen dichas asociaciones dadas las diferencias entre los resultados obtenidos.

La segunda parte del proyecto se centró en evaluar el papel de los SNPs candidatos en la predisposición a desarrollar una LMC y en las características clínicas

Discusión

de los pacientes al diagnóstico. En nuestra serie, las variaciones interindividuales de los genes *ERCC5* (rs17655), *RPA2* (rs7356), *PTPN22* (rs2476601) y *STAT5B* (rs809451), se asociaron al riesgo de desarrollar LMC, pero con un grado de significación estadística muy limitado, por lo que requieren validación en otras series. Por otro lado, nuestros datos no confirman la asociación previamente descrita [120] entre los SNPs rs1801018 y rs2279115 del gen *BCL2* y la predisposición a desarrollar una LMC[274]. Por el contrario, en nuestra serie dichos SNPs se asociaron al índice de riesgo de Sokal al diagnóstico de la enfermedad. Así, los pacientes portadores del alelo C del SNP rs2279115 de *BCL2* tuvieron tres veces más riesgo de presentar un índice de Sokal intermedio o alto que los pacientes homocigotos para el alelo A. En cambio, los homocigotos para el alelo infrecuente G del SNP exónico rs1801018 tuvieron un riesgo tres veces menor de ser diagnosticados con índice de Sokal intermedio o alto que los portadores del alelo A[274].

Estos polimorfismos implican a genes cuya desregulación se ha relacionado con la oncogénesis humana. El papel funcional de las proteínas traducidas de *ERCC5* y de *PTPN22* ha sido comentado previamente en la Discusión. Por su parte, la Proteína de replicación A (RPA) es un complejo proteico que se une al ADN, especialmente de hebra sencilla, donde interviene en la replicación del ADN, en su reparación y en los procesos de la recombinación genética. Al unirse al ADN durante la replicación evita que éste se pliegue sobre sí mismo para formar estructuras secundarias, manteniendo el ADN desenrollado para que la polimerasa pueda realizar su tarea. Por tanto,

Discusión

modificaciones en la actividad de este gen pueden resultar en alteraciones en la replicación y reparación del ADN [301]. A su vez, la proteína codificada por el gen *STAT5B* forma parte de la familia STAT de factores de transcripción. En respuesta a citocinas y factores de crecimiento, los miembros de la familia STAT son fosforilados por los receptores asociados a cinasas y forman homo o heterodímeros que son translocados al núcleo celular, actuando como activadores de la transcripción. Esta vía de señalización participa en numerosos procesos biológicos y su desregulación se ha implicado en diversas neoplasias [67, 68].

La proteína BCL-2 es una de los guardianes de la integridad de la membrana mitocondrial durante periodos de estrés y estímulos que generan la apoptosis, como son la exposición a radiación ionizante, el tratamiento con agentes quimioterápicos o el daño por isquemia/reperfusión, entre otros. Se trata por tanto de una proteína de supervivencia celular, lo que significa que cuando hay niveles elevados de dicha proteína, la célula detendrá el programa de muerte por apoptosis, aun cuando se encuentre dañada genéticamente. Así, se puede decir que la sobreexpresión de BCL-2 es un arma de doble filo, ya que no es deseable para un organismo mantener sus células vivas a toda costa cuando contienen mutaciones que podrían ser perjudiciales. Si además la célula dañada expresa algún oncogén importante que induzca proliferación, como *BCR-ABL*, la célula tendrá el camino libre para proliferar sin morirse, puesto que el tener niveles altos de BCL-2 previene la muerte. BCL-2 está sobreexpresado en las fases acelerada y blástica de la LMC con respecto a su expresión en FC [114, 115] lo

Discusión

que podría promover la supervivencia de clonas leucémicas con aberrancias genéticas [116].

El intento de correlacionar el perfil genético individual con la predisposición a desarrollar enfermedades no es nuevo. De hecho, es bien conocido que la variabilidad genética interindividual en determinados casos se correlaciona con la susceptibilidad a desarrollar cáncer en humanos [302, 303]. Sin embargo, con los datos disponibles no puede afirmarse que exista ningún SNP de riesgo de contraer una LMC que haya sido validado en series independientes. Con todo, cabe decir que la mayor parte de los estudios publicados al respecto se centran en análisis de asociación seleccionando un número reducido de SNPs de genes candidatos, generalmente en base a su potencial efecto biológico. Este tipo de estudios tienen una baja sensibilidad y la reproducibilidad de los resultados es inferior al 10%. Además, debe tenerse en cuenta que generalmente un determinado rasgo personal viene determinado por el efecto combinado de múltiples genes que interaccionan a su vez con factores ambientales.

Más recientemente, los avances en la secuenciación del ADN han permitido implementar estudios de asociación a gran escala (*Genome Wide Association Studies* o GWAS) basados en el análisis de las variaciones de miles de genes con el riesgo a desarrollar enfermedades complejas. De forma llamativa, en este tipo de estudios la mayoría de las variaciones alélicas que se han descrito en asociación con enfermedades humanas conciernen a SNPs localizados en regiones intrónicas. Por ello, resulta difícil

Discusión

conocer el mecanismo íntimo mediante el cual pueden estar involucradas en la patogénesis de las enfermedades complejas. Asimismo, falta información acerca del modo en que las distintas variantes de un determinado gen afectan su actividad transcripcional, la estructura o funcionalismo de la proteína resultante o interfieren con la regulación local de otros genes. Otra limitación de estos estudios es la elevada probabilidad de encontrar falsas asociaciones por azar (falsos positivos) debido al análisis simultáneo de miles de genes. Para evitar este error, se aplican métodos estadísticos de corrección de comparaciones múltiples, de manera que sólo se consideren significativas las asociaciones con una p menor 10^{-7} o 10^{-8} . En contrapartida, con estos métodos se reduce al mismo tiempo la potencia para detectar SNPs asociados verdaderamente a la enfermedad, por lo que resulta imprescindible un tamaño muestral adecuado o realizar metaanálisis de varios estudios similares. Por último, hay que tener en cuenta que factores ambientales o de exposición pueden influir en que un determinado SNP intensifique o no su potencial efecto fenotípico. Por todo lo anterior, es comprensible que los estudios GWAS no hayan respondido tampoco a las expectativas iniciales, de forma que en las enfermedades en las que se dispone de varios GWAS el efecto combinado de todos los polimorfismos asociados suele explicar menos del 5-10% del riesgo.

En el caso de la LMC, únicamente existe un estudio en el catálogo de GWAS en el que se identifican marcadores de susceptibilidad de desarrollar una LMC, no existiendo estudios de valoración de respuesta al tratamiento. Se trata del trabajo de

Discusión

Kim y cols [255] en el que se estudiaron un total de 2744 individuos, 671 casos y 2073 controles, y se evaluaron un total de 456,522 SNPs. El análisis reveló asociaciones significativas en dos loci, localizados en 6q25 y 17p11.1, con unos valores de p de 2.4×10^{-6} y 1.3×10^{-12} respectivamente. Ambas asociaciones fueron validadas en series independientes de individuos de Corea y Canadá. Con todo, el número de casos de LMC incluido en este estudio ($n=671$) puede considerarse bajo para lo que suele recomendarse en los estudios GWAS ($n>1000$).

Por tanto, se dispone cada vez de más información acerca del papel de la variabilidad genética interindividual en la susceptibilidad a desarrollar una LMC y en el pronóstico del tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa, fundamentalmente imatinib. En la presente tesis, se ha revisado la bibliografía del tema y se han expuesto los resultados del análisis de los pacientes de nuestra institución. Es evidente que queda mucho trabajo por hacer antes de que esta línea de investigación pueda aplicarse directamente a la práctica clínica. Para ello, será primordial desarrollar estudios adecuadamente dimensionados y con una metodología apropiada que solo serán posibles en un contexto de colaboración multiinstitucional.

Conclusión

Conclusión

Conclusión

V. CONCLUSIONES

-De los 105 pacientes diagnosticados de LMC en fase crónica tratados con imatinib, 25 (24%) tuvieron una respuesta subóptima y 11 (10,5%) fueron resistentes a imatinib de entrada. Durante el seguimiento posterior, 5 pacientes cumplieron los criterios de respuesta subóptima o de fallo, respectivamente. Por tanto, la tasa global de respuesta inadecuada a imatinib fue del 44%, similar a la observada en la mayoría de estudios.

-En nuestra serie, el riesgo de desarrollar una LMC se asoció con el genotipo de los polimorfismos de cuatro genes. Así, el alelo infrecuente de los SNPs de los genes *ERCC5* y *RPA2* se asoció a un menor riesgo de LMC, mientras que el de los genes *PTPN22* y *STAT5B* se acompañó de un discreto incremento del riesgo de LMC. En contraste con estudios previos, no se encontró ninguna asociación significativa entre los SNPs de *BCL2* y el riesgo de desarrollar LMC.

-En el estudio de la relación entre el patrón de polimorfismos en los genes candidatos y las características clínicas de los pacientes al diagnóstico de la LMC, los SNPs rs2279115 y rs1801018 de *BCL2* se asociaron al índice de riesgo de Sokal. El test de asociación de haplotipos mostró que el haplotipo 4777A-5735G se asociaba a un menor riesgo de presentación con un índice de Sokal intermedio o alto comparado con el del haplotipo 4777C-5735A.

Conclusión

-En la evaluación de la influencia de la variabilidad genética en la respuesta al tratamiento se observó una asociación estadísticamente significativa del SNP rs243327 de *SOCS1* con la probabilidad de alcanzar una respuesta citogenética completa con imatinib. A su vez, el SNP rs17655 de *ERCC5* se asoció a la estabilidad de la respuesta citogenética y molecular.

-Cuando se evaluó la respuesta al tratamiento con imatinib de acuerdo a los criterios de la European Leukemia Net 2009, la asociación entre genotipo y respuesta más significativa fue la observada entre los SNPs rs243327 de *SOCS1* y rs2476601 de *PTPN22* con la probabilidad de fallo a los 18 meses de tratamiento.

-En el análisis multivariante mediante la prueba de regresión de Cox, los factores independientes que se asociaron con la supervivencia libre de fallo a imatinib fueron el índice de Sokal de alto riesgo, el SNP rs2476601 de *PTPN22* (modelo dominante) y el SNP rs243327 de *SOCS1*. Estos tres factores permitieron desarrollar un modelo predictivo para la determinación de la supervivencia libre de fallo.

-En conjunto, se puede afirmar que existen datos que apoyan la influencia de los polimorfismos genéticos en la susceptibilidad a desarrollar LMC, en su perfil clínico al diagnóstico y en la respuesta al tratamiento, al menos con imatinib. Sin embargo, el grado de evidencia es aún insuficiente para tomar en consideración esta información en

Conclusión

la práctica clínica habitual. Se requieren más estudios antes de que esta herramienta pronóstica pueda ser aplicada a la práctica clínica.

Conclusión

Bibliografía

Bibliografia

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Sawyers, C.L., *Chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **340**(17): p. 1330-40.
2. Faderl, S., et al., *The biology of chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 1999. **341**(3): p. 164-72.
3. Rohrbacher, M. and J. Hasford, *Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML)*. Best Pract Res Clin Haematol, 2009. **22**(3): p. 295-302.
4. Hoglund, M., F. Sandin, and B. Simonsson, *Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update*. Ann Hematol, 2015. **94 Suppl 2**: p. S241-7.
5. Moloney, W.C., *Radiogenic leukemia revisited*. Blood, 1987. **70**(4): p. 905-8.
6. Kamada, N., *[Radiation-related CML]*. Nihon Rinsho, 2001. **59**(12): p. 2329-35.
7. Kamada, N. and H. Uchino, *Chronologic sequence in appearance of clinical and laboratory findings characteristic of chronic myelocytic leukemia*. Blood, 1978. **51**(5): p. 843-50.
8. Holmberg, M., *Is the primary event in radiation-induced chronic myelogenous leukemia the induction of the t(9;22) translocation?* Leuk Res, 1992. **16**(4): p. 333-6.
9. Galbraith, D., S.A. Gross, and D. Paustenbach, *Benzene and human health: A historical review and appraisal of associations with various diseases*. Crit Rev Toxicol, 2010. **40 Suppl 2**: p. 1-46.
10. Khalade, A., et al., *Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis*. Environ Health, 2010. **9**: p. 31.
11. Lv, L., et al., *The TNF-alpha 238A polymorphism is associated with susceptibility to persistent bone marrow dysplasia following chronic exposure to benzene*. Leuk Res, 2007. **31**(11): p. 1479-85.
12. Vlaanderen, J., et al., *Occupational benzene exposure and the risk of chronic myeloid leukemia: A meta-analysis of cohort studies incorporating study quality dimensions*. Am J Ind Med, 2012. **55**(9): p. 779-85.
13. Kantarjian, H.M., et al., *Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients*. Am J Med, 1987. **83**(3): p. 445-54.
14. Cervantes, F., et al., *A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia*. Br J Haematol, 1990. **76**(1): p. 27-32.

Bibliografia

15. Cervantes, F., et al., *An assessment of the clinicohematological criteria for the accelerated phase of chronic myeloid leukemia*. Eur J Haematol, 1996. **57**(4): p. 286-91.
16. Kantarjian, H.M., et al., *Intensive combination chemotherapy and interferons in the management of chronic myelogenous leukemia*. Acta Haematol, 1987. **78 Suppl 1**: p. 70-4.
17. Kantarjian, H.M. and M. Talpaz, *Definition of the accelerated phase of chronic myelogenous leukemia*. J Clin Oncol, 1988. **6**(1): p. 180-2.
18. Talpaz, M., et al., *Therapy of chronic myelogenous leukemia: chemotherapy and interferons*. Semin Hematol, 1988. **25**(1): p. 62-73.
19. Shtalrid, M., et al., *Analysis of breakpoints within the bcr gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia*. Blood, 1988. **72**(2): p. 485-90.
20. Urbano-Ispizua, A., et al., *Immunophenotypic characteristics of blast crisis of chronic myeloid leukaemia: correlations with clinico-biological features and survival*. Leukemia, 1993. **7**(9): p. 1349-54.
21. Rozman, M., et al., *Sequential study of myeloid differentiation antigens of neutrophil granulocytes in different phases of chronic myeloid leukaemia: natural history and prognostic significance*. Leukemia, 1993. **7**(1): p. 80-5.
22. Cervantes, F., et al., *'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features*. Br J Haematol, 1998. **100**(1): p. 123-8.
23. Janossy, G., et al., *Relation of "lymphoid" phenotype and response to chemotherapy incorporating vincristine-prednisolone in the acute phase of Ph1 positive leukemia*. Cancer, 1979. **43**(2): p. 426-34.
24. Derderian, P.M., et al., *Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis*. Am J Med, 1993. **94**(1): p. 69-74.
25. Druker, B.J., et al., *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1038-42.
26. Sawyers, C.L., et al., *Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3530-9.
27. Hajdu, S.I., *A note from history: The discovery of blood cells*. Ann Clin Lab Sci, 2003. **33**(2): p. 237-8.

Bibliografia

28. Dameshek, W., *Some speculations on the myeloproliferative syndromes*. Blood, 1951. **6**(4): p. 372-5.
29. Geary, C.G., *The story of chronic myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2000. **110**(1): p. 2-11.
30. Nowell PC, H., *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science, 1960. **132**: p. 1497.
31. Goldman, J.M., *Chronic myeloid leukemia: a historical perspective*. Semin Hematol, 2010. **47**(4): p. 302-11.
32. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
33. Groffen, J., et al., *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22*. Cell, 1984. **36**(1): p. 93-9.
34. Hazlehurst, L.A., et al., *Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation*. Cancer Control, 2009. **16**(2): p. 100-7.
35. Melo, J.V., et al., *The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia*. Blood, 1993. **81**(1): p. 158-65.
36. Cohen, G.B., R. Ren, and D. Baltimore, *Modular binding domains in signal transduction proteins*. Cell, 1995. **80**(2): p. 237-48.
37. Sawyers, C.L., et al., *The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth*. Cell, 1994. **77**(1): p. 121-31.
38. Yuan, Z.M., et al., *p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 814-7.
39. Lewis, J.M. and M.A. Schwartz, *Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14225-30.
40. Heisterkamp, N., et al., *Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation*. Nature, 1985. **315**(6022): p. 758-61.
41. Wetzler, M., et al., *Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3488-92.
42. Melo, J.V., *The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2375-84.

Bibliografia

43. Melo, J.V., *The molecular biology of chronic myeloid leukaemia*. Leukemia, 1996. **10**(5): p. 751-6.
44. Melo, J.V., et al., *P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia?* Leukemia, 1994. **8**(1): p. 208-11.
45. Ravandi, F., et al., *Chronic myelogenous leukaemia with p185(BCR/ABL) expression: characteristics and clinical significance*. Br J Haematol, 1999. **107**(3): p. 581-6.
46. Pane, F., et al., *Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction)*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2410-4.
47. Wilson, G., et al., *BCR-ABL transcript with an e19a2 (c3a2) junction in classical chronic myeloid leukemia*. Blood, 1997. **89**(8): p. 3064.
48. Li, S., et al., *The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1399-412.
49. Cazzaniga, G., et al., *The tyrosine kinase abl-related gene ARG is fused to ETV6 in an AML-M4Eo patient with a t(1;12)(q25;p13): molecular cloning of both reciprocal transcripts*. Blood, 1999. **94**(12): p. 4370-3.
50. Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3343-56.
51. Fialkow, P.J., et al., *Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia*. Blood, 1981. **58**(1): p. 158-63.
52. Raskind, W.H., et al., *Further evidence for the existence of a clonal Ph-negative stage in some cases of Ph-positive chronic myelocytic leukemia*. Leukemia, 1993. **7**(8): p. 1163-7.
53. Ferraris, A.M., et al., *Clonal B lymphocytes lack bcr rearrangement in Ph-positive chronic myelogenous leukaemia*. Br J Haematol, 1989. **73**(1): p. 48-50.
54. Lisker, R., et al., *Late-appearing Philadelphia chromosome in two patients with chronic myelogenous leukemia*. Blood, 1980. **56**(5): p. 812-4.
55. Fayad, L., et al., *Emergence of new clonal abnormalities following interferon-alpha induced complete cytogenetic response in patients with chronic myeloid leukemia: report of three cases*. Leukemia, 1997. **11**(5): p. 767-71.
56. Sattler, M. and J.D. Griffin, *Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene*. Int J Hematol, 2001. **73**(3): p. 278-91.

Bibliografia

57. Safley, A.M., et al., *Molecular and cytogenetic characterization of a novel translocation t(4;22) involving the breakpoint cluster region and platelet-derived growth factor receptor-alpha genes in a patient with atypical chronic myeloid leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **40**(1): p. 44-50.
58. Wang, L., et al., *Evolution of T-cell clonality in a patient with Ph-negative acute lymphocytic leukemia occurring after interferon and imatinib therapy for Ph-positive chronic myeloid leukemia*. J Hematol Oncol, 2010. **3**: p. 14.
59. Biernaux, C., et al., *Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals*. Blood, 1995. **86**(8): p. 3118-22.
60. Bose, S., et al., *The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3362-7.
61. Daley, G.Q., R.A. Van Etten, and D. Baltimore, *Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome*. Science, 1990. **247**(4944): p. 824-30.
62. Sawyers, C.L., et al., *Propagation of human blastic myeloid leukemias in the SCID mouse*. Blood, 1992. **79**(8): p. 2089-98.
63. Holyoake, T.L., et al., *Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 2002. **16**(4): p. 549-58.
64. Holyoake, T., et al., *Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 2056-64.
65. Pendergast, A.M., et al., *BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner*. Cell, 1991. **66**(1): p. 161-71.
66. Thielen, N., et al., *New insights into the pathogenesis of chronic myeloid leukaemia: towards a path to cure*. Neth J Med, 2011. **69**(10): p. 430-40.
67. Steelman, L.S., et al., *JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis*. Leukemia, 2004. **18**(2): p. 189-218.
68. Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1281-3.
69. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(11): p. 900-11.

Bibliografia

70. Hebenstreit, D., J. Horejs-Hoeck, and A. Duschl, *JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines*. Drug News Perspect, 2005. **18**(4): p. 243-9.
71. LaMontagne, K.R., Jr., G. Hannon, and N.K. Tonks, *Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14094-9.
72. Zhang, Z.Y. and J.E. Dixon, *Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1994. **68**: p. 1-36.
73. Neel, B.G. and N.K. Tonks, *Protein tyrosine phosphatases in signal transduction*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 193-204.
74. Lim, Y.M., et al., *BCR/ABL inhibition by an escort/phosphatase fusion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12233-8.
75. LaMontagne, K.R., Jr., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B antagonizes signalling by oncoprotein tyrosine kinase p210 bcr-abl in vivo*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2965-75.
76. Koyama, N., et al., *Inhibition of phosphotyrosine phosphatase 1B causes resistance in BCR-ABL-positive leukemia cells to the ABL kinase inhibitor STI571*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2025-31.
77. Kharbanda, S., et al., *The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 6898-901.
78. Liedtke, M., et al., *Regulation of Bcr-Abl-induced SAP kinase activity and transformation by the SHPTP1 protein tyrosine phosphatase*. Oncogene, 1998. **17**(15): p. 1889-92.
79. Neviani, P., et al., *The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein*. Cancer Cell, 2005. **8**(5): p. 355-68.
80. Lucas, C.M., et al., *Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A) at diagnosis of chronic myeloid leukemia is a critical determinant of disease progression*. Blood, 2011. **117**(24): p. 6660-8.
81. Oh, J., M.W. Hur, and C.E. Lee, *SOCS1 protects protein tyrosine phosphatases by thioredoxin upregulation and attenuates Jaks to suppress ROS-mediated apoptosis*. Oncogene, 2009. **28**(35): p. 3145-56.
82. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling*. Stem Cells, 2001. **19**(5): p. 378-87.

Bibliografia

83. Roman-Gomez, J., et al., *The suppressor of cytokine signaling-1 is constitutively expressed in chronic myeloid leukemia and correlates with poor cytogenetic response to interferon-alpha*. Haematologica, 2004. **89**(1): p. 42-8.
84. Sakai, I., et al., *Constitutive expression of SOCS3 confers resistance to IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2926-31.
85. Schultheis, B., et al., *Overexpression of SOCS-2 in advanced stages of chronic myeloid leukemia: possible inadequacy of a negative feedback mechanism*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1766-75.
86. Lucas, C.M., et al., *c-Myc inhibition decreases CIP2A and reduces BCR-ABL1 tyrosine kinase activity in chronic myeloid leukemia*. Haematologica, 2015. **100**(5): p. e179-82.
87. Sawyers, C.L., W. Callahan, and O.N. Witte, *Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes*. Cell, 1992. **70**(6): p. 901-10.
88. Nakamura, S., et al., *Down-regulation of Thanatos-associated protein 11 by BCR-ABL promotes CML cell proliferation through c-Myc expression*. Int J Cancer, 2012. **130**(5): p. 1046-59.
89. Nilsson, J.A. and J.L. Cleveland, *Myc pathways provoking cell suicide and cancer*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9007-21.
90. Helgason, G.V., M. Karvela, and T.L. Holyoake, *Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML*. Blood, 2011. **118**(8): p. 2035-43.
91. Calabretta, B. and D. Perrotti, *The biology of CML blast crisis*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4010-22.
92. Koptyra, M., et al., *BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance*. Blood, 2006. **108**(1): p. 319-27.
93. Dierov, J., et al., *BCR/ABL induces chromosomal instability after genotoxic stress and alters the cell death threshold*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 279-86.
94. Cramer, K., et al., *BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair*. Cancer Res, 2008. **68**(17): p. 6884-8.
95. Nowicki, M.O., et al., *BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3746-53.

Bibliografia

96. Canitrot, Y., et al., *p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2632-7.
97. Fernandes, M.S., et al., *BCR-ABL promotes the frequency of mutagenic single-strand annealing DNA repair*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1813-9.
98. Deutsch, E., et al., *BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs*. Blood, 2001. **97**(7): p. 2084-90.
99. Stoklosa, T., et al., *BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2576-80.
100. Friedberg, E.C., *How nucleotide excision repair protects against cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 22-33.
101. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes Dev, 1999. **13**(7): p. 768-85.
102. Sliwinski, T., et al., *STI571 reduces NER activity in BCR/ABL-expressing cells*. Mutat Res, 2008. **654**(2): p. 162-7.
103. Melo, J.V. and D.J. Barnes, *Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 441-53.
104. Simmons, P.J., J.P. Levesque, and A.C. Zannettino, *Adhesion molecules in haemopoiesis*. Baillieres Clin Haematol, 1997. **10**(3): p. 485-505.
105. Eaves, A.C., et al., *Unregulated proliferation of primitive chronic myeloid leukemia progenitors in the presence of normal marrow adherent cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(14): p. 5306-10.
106. Eaves, A.C. and C.J. Eaves, *Maintenance and proliferation control of primitive hemopoietic progenitors in long-term cultures of human marrow cells*. Blood Cells, 1988. **14**(2-3): p. 355-68.
107. Gordon, M.Y., et al., *Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia*. Nature, 1987. **328**(6128): p. 342-4.
108. Verfaillie, C.M., et al., *Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL positive clone?* J Lab Clin Med, 1997. **129**(6): p. 584-91.
109. Fierro, F.A., et al., *BCR/ABL expression of myeloid progenitors increases beta1-integrin mediated adhesion to stromal cells*. J Mol Biol, 2008. **377**(4): p. 1082-93.

Bibliografia

110. Bhatia, R., et al., *Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function.* J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 384-91.
111. Bedi, A., et al., *Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia.* Blood, 1994. **83**(8): p. 2038-44.
112. Cortez, D., L. Kadlec, and A.M. Pendergast, *Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5531-41.
113. Dubrez, L., et al., *BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation.* Blood, 1998. **91**(7): p. 2415-22.
114. Handa, H., et al., *Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase.* Leuk Res, 1997. **21**(6): p. 479-89.
115. Vidovic, A., et al., *The proto-oncogene expression varies over the course of chronic myeloid leukemia.* Hematology, 2008. **13**(1): p. 34-40.
116. Jaiswal, S., et al., *Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 10002-7.
117. Wei, Y., et al., *Changes in expression of apoptosis-related genes are linked to the molecular response to imatinib treatment in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients.* Acta Haematol, 2007. **117**(2): p. 83-90.
118. Delia, D., et al., *bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells.* Blood, 1992. **79**(5): p. 1291-8.
119. Tanaka, S., K. Saito, and J.C. Reed, *Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival.* J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 10920-6.
120. Kim, D.H., et al., *Genetic variants in the candidate genes of the apoptosis pathway and susceptibility to chronic myeloid leukemia.* Blood, 2009. **113**(11): p. 2517-25.
121. Nuckel, H., et al., *Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2007. **109**(1): p. 290-7.
122. Moon, J.H., et al., *BCL2 gene polymorphism could predict the treatment outcomes in acute myeloid leukemia patients.* Leuk Res, 2010. **34**(2): p. 166-72.

Bibliografia

123. Dierks, C., et al., *Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(3): p. 238-49.
124. Hofmann, I., et al., *Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis*. *Cell Stem Cell*, 2009. **4**(6): p. 559-67.
125. Jagani, Z., M. Dorsch, and M. Warmuth, *Hedgehog pathway activation in chronic myeloid leukemia*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(17): p. 3449-56.
126. Zhao, C., et al., *Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 776-9.
127. Yong, A.S. and J.V. Melo, *The impact of gene profiling in chronic myeloid leukaemia*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2009. **22**(2): p. 181-90.
128. Mohty, M., et al., *Association between BMI-1 expression, acute graft-versus-host disease, and outcome following allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical siblings in chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 2163-6.
129. Yong, A.S., et al., *Improved outcome following allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia is associated with higher expression of BMI-1 and immune responses to BMI-1 protein*. *Leukemia*, 2011. **25**(4): p. 629-37.
130. Jamieson, C.H., et al., *Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(7): p. 657-67.
131. Samanta, A., et al., *Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2011. **25**(3): p. 463-72.
132. Coluccia, A.M., et al., *Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation*. *EMBO J*, 2007. **26**(5): p. 1456-66.
133. Majsterek, I., et al., *Does the bcr/abl-mediated increase in the efficacy of DNA repair play a role in the drug resistance of cancer cells?* *Cell Biol Int*, 2002. **26**(4): p. 363-70.
134. Slupianek, A., et al., *Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(12): p. 4189-201.
135. Sattler, M., et al., *The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(32): p. 24273-8.
136. Barnes, D.J., et al., *Dose-dependent effects of Bcr-Abl in cell line models of different stages of chronic myeloid leukemia*. *Oncogene*, 2005. **24**(42): p. 6432-40.

Bibliografia

137. Barnes, D.J., et al., *Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia*. *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 8912-9.
138. Modi, H., et al., *Role of BCR/ABL gene-expression levels in determining the phenotype and imatinib sensitivity of transformed human hematopoietic cells*. *Blood*, 2007. **109**(12): p. 5411-21.
139. Perrotti, D., et al., *BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2*. *Nat Genet*, 2002. **30**(1): p. 48-58.
140. Guerzoni, C., et al., *Inducible activation of CEBPB, a gene negatively regulated by BCR/ABL, inhibits proliferation and promotes differentiation of BCR/ABL-expressing cells*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 4080-9.
141. Mitani, K., et al., *Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia*. *EMBO J*, 1994. **13**(3): p. 504-10.
142. Nakamura, T., et al., *Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia*. *Nat Genet*, 1996. **12**(2): p. 154-8.
143. Fioretos, T., et al., *Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations*. *Blood*, 1999. **94**(1): p. 225-32.
144. Deng, Y., S.S. Chan, and S. Chang, *Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(6): p. 450-8.
145. Brummendorf, T.H., et al., *Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry*. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 1883-90.
146. Boultonwood, J., et al., *Telomere length shortening is associated with disease evolution in chronic myelogenous leukemia*. *Am J Hematol*, 1999. **61**(1): p. 5-9.
147. Ohyashiki, K., et al., *Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression*. *Leukemia*, 1997. **11**(2): p. 190-4.
148. Ohyashiki, J.H., et al., *Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia*. *Oncogene*, 2002. **21**(4): p. 680-7.
149. Ohyashiki, K. and J.H. Ohyashiki, *Measurement of telomerase activity in human hematopoietic cells and neoplastic disorders*. *Methods Mol Med*, 2002. **68**: p. 279-99.

Bibliografia

150. Engelhardt, M., et al., *Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture*. *Cancer Res*, 2000. **60**(3): p. 610-7.
151. Harley, C.B., *Telomerase and cancer therapeutics*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(3): p. 167-79.
152. Ahuja, H., et al., *Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(17): p. 6783-7.
153. Sill, H., J.M. Goldman, and N.C. Cross, *Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 1995. **85**(8): p. 2013-6.
154. Radich, J.P., et al., *Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(8): p. 2794-9.
155. Forkner, C.E. and T. Scott. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia preliminary report. *JAMA*. 1931;97(1):3-5
156. Hehlmann, R., et al., *Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group*. *Blood*, 1993. **82**(2): p. 398-407.
157. Tsao, A.S., H. Kantarjian, and M. Talpaz, *STI-571 in chronic myelogenous leukaemia*. *Br J Haematol*, 2002. **119**(1): p. 15-24.
158. Druker, B.J. and N.B. Lydon, *Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(1): p. 3-7.
159. Hoffbrand, V., ed. *Postgraduate Haematology*. Blackell Wiley, 2005
160. Goldman, J.M., *Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia*. *Lancet*, 2000. **355**(9209): p. 1031-2.
161. Sawyers, C.L., *Molecular studies in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors*. *Semin Hematol*, 2001. **38**(3 Suppl 8): p. 15-21.
162. Bacarani, M., et al., *Response definitions and European Leukemianet Management recommendations*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2009. **22**(3): p. 331-41.
163. Marin, D., *Current status of imatinib as frontline therapy for chronic myeloid leukemia*. *Semin Hematol*, 2010. **47**(4): p. 312-8.

Bibliografia

164. Cervantes, F., et al., *Early intervention during imatinib therapy in patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: a study of the Spanish PETHEMA group*. *Haematologica*, 2010. **95**(8): p. 1317-24.
165. Hehlmann, R. and S. Saussele, *Treatment of chronic myeloid leukemia in blast crisis*. *Haematologica*, 2008. **93**(12): p. 1765-9.
166. Hochhaus, A., *Educational session: managing chronic myeloid leukemia as a chronic disease*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. **2011**: p. 128-35.
167. Bixby, D. and M. Talpaz, *Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: p. 461-76.
168. Branford, S., et al., *Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis*. *Blood*, 2003. **102**(1): p. 276-83.
169. Soverini, S., et al., *ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(18): p. 4100-9.
170. Nicolini, F.E., et al., *Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP)*. *Leukemia*, 2006. **20**(6): p. 1061-6.
171. Barthe, C., et al., *Mutation in the ATP-binding site of BCR-ABL in a patient with chronic myeloid leukaemia with increasing resistance to STI571*. *Br J Haematol*, 2002. **119**(1): p. 109-11.
172. Roumiantsev, S., et al., *Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(16): p. 10700-5.
173. Lionberger, J.M., M.B. Wilson, and T.E. Smithgall, *Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(24): p. 18581-5.
174. Donato, N.J., et al., *BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571*. *Blood*, 2003. **101**(2): p. 690-8.

Bibliografia

175. Zhong, J.S., et al., *Correlation between imatinib trough concentration and efficacy in Chinese chronic myelocytic leukemia patients*. *Acta Haematol*, 2012. **127**(4): p. 221-7.
176. Malhotra, H., et al., *Correlation of plasma trough levels of imatinib with molecular response in patients with chronic myeloid leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(11): p. 2614-9.
177. Guilhot, F., et al., *Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity Trial*. *Haematologica*, 2012. **97**(5): p. 731-8.
178. Sohn, S.K., et al., *Trough plasma imatinib levels are correlated with optimal cytogenetic responses at 6 months after treatment with standard dose of imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2011. **52**(6): p. 1024-9.
179. de Lima, L.T., et al., *Relationship between SLCO1B3 and ABCA3 polymorphisms and imatinib response in chronic myeloid leukemia patients*. *Hematology*, 2015. **20**(3): p. 137-42.
180. de Lima, L.T., et al., *Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia*. *Med Oncol*, 2014. **31**(3): p. 851.
181. Angelini, S., et al., *Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy*. *Haematologica*, 2013. **98**(2): p. 193-200.
182. Au, A., et al., *Association of genotypes and haplotypes of multi-drug transporter genes ABCB1 and ABCG2 with clinical response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients*. *Biomed Pharmacother*, 2014. **68**(3): p. 343-9.
183. Seong, S.J., et al., *Influence of enzyme and transporter polymorphisms on trough imatinib concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia patients*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(3): p. 756-60.
184. Gromicho, M., et al., *Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1*. *Leuk Lymphoma*, 2011. **52**(10): p. 1980-90.
185. Yamakawa, Y., et al., *Association of genetic polymorphisms in the influx transporter SLCO1B3 and the efflux transporter ABCB1 with imatinib pharmacokinetics in patients with chronic myeloid leukemia*. *Ther Drug Monit*, 2011. **33**(2): p. 244-50.

Bibliografia

186. Maffioli, M., et al., *Correlation between genetic polymorphisms of the hOCT1 and MDR1 genes and the response to imatinib in patients newly diagnosed with chronic-phase chronic myeloid leukemia*. *Leuk Res*, 2011. **35**(8): p. 1014-9.
187. Eechoute, K., et al., *Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(3): p. 406-15.
188. Peng, X.X., et al., *Overexpression of P-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myelogenous leukemia cells*. *Chin J Cancer*, 2012. **31**(2): p. 110-8.
189. White, D.L., et al., *Chronic phase chronic myeloid leukemia patients with low OCT-1 activity randomized to high-dose imatinib achieve better responses and have lower failure rates than those randomized to standard-dose imatinib*. *Haematologica*, 2012. **97**(6): p. 907-14.
190. Copland, M., et al., *Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction*. *Blood*, 2006. **107**(11): p. 4532-9.
191. O'Hare, T., et al., *In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants*. *Cancer Res*, 2005. **65**(11): p. 4500-5.
192. Weisberg, E., et al., *Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(2): p. 129-41.
193. Weisberg, E., et al., *AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(12): p. 1765-9.
194. Giannoudis, A., et al., *Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2008. **112**(8): p. 3348-54.
195. Clark, R.E., et al., *Pharmacologic markers and predictors of responses to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2008. **49**(4): p. 639-42.
196. Goldman, J.M., *How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era*. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 2828-37.
197. Shah, N.P., *Ponatinib: targeting the T315I mutation in chronic myelogenous leukemia*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2011. **9**(12): p. 925-6.

Bibliografia

198. Lundell, B.I., et al., *Activation of beta1 integrins on CML progenitors reveals cooperation between beta1 integrins and CD44 in the regulation of adhesion and proliferation*. *Leukemia*, 1997. **11**(6): p. 822-9.
199. Traycoff, C.M., et al., *Chronic myelogenous leukaemia CD34+ cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34+ cells*. *Br J Haematol*, 1998. **102**(3): p. 759-67.
200. von Bubnoff, N., C. Peschel, and J. Duyster, *Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back*. *Leukemia*, 2003. **17**(5): p. 829-38.
201. Mahon, F.X., et al., *MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models*. *Blood*, 2003. **101**(6): p. 2368-73.
202. Mahon, F.X., et al., *Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(11): p. 1029-35.
203. Goldman, J.M., *Treatment strategies for CML*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2009. **22**(3): p. 303-13.
204. Sachidanandam, R., et al., *A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms*. *Nature*, 2001. **409**(6822): p. 928-33.
205. Weber, J.L., et al., *Human diallelic insertion/deletion polymorphisms*. *Am J Hum Genet*, 2002. **71**(4): p. 854-62.
206. Abecasis, G.R., et al., *A map of human genome variation from population-scale sequencing*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1061-73.
207. Mills, R.E., et al., *An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome*. *Genome Res*, 2006. **16**(9): p. 1182-90.
208. Mills, R.E., et al., *Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome*. *Genome Res*, 2011. **21**(6): p. 830-9.
209. Collins, F.S., et al., *Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis*. *Science*, 1987. **235**(4792): p. 1046-9.
210. Ostertag, E.M. and H.H. Kazazian, Jr., *Biology of mammalian L1 retrotransposons*. *Annu Rev Genet*, 2001. **35**: p. 501-38.

Bibliografia

211. Botstein, D. and N. Risch, *Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 228-37.
212. Frazer, K.A., et al., *A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 851-61.
213. Cargill, M., et al., *Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes*. Nat Genet, 1999. **22**(3): p. 231-8.
214. Sherry, S.T., M. Ward, and K. Sirotkin, *dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation*. Genome Res, 1999. **9**(8): p. 677-9.
215. Sherry, S.T., et al., *dbSNP: the NCBI database of genetic variation*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 308-11.
216. Zhu, X., et al., *Haplotype block definition and its application*. Pac Symp Biocomput, 2004: p. 152-63.
217. Gabriel, S.B., et al., *The structure of haplotype blocks in the human genome*. Science, 2002. **296**(5576): p. 2225-9.
218. Crawford, D.C., D.T. Akey, and D.A. Nickerson, *The patterns of natural variation in human genes*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2005. **6**: p. 287-312.
219. Dickinson, A.M., et al., *Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants*. Br J Haematol, 2004. **127**(5): p. 479-90.
220. Naccarati, A., et al., *Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage*. Mutat Res, 2006. **593**(1-2): p. 22-31.
221. Bolufer, P., et al., *The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia*. Haematologica, 2007. **92**(3): p. 308-14.
222. Barragan, E., et al., *The GST deletions and NQO1*2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia*. Leuk Res, 2007. **31**(7): p. 947-53.
223. Jabir, R.S., et al., *Pharmacogenetics of taxanes: impact of gene polymorphisms of drug transporters on pharmacokinetics and toxicity*. Pharmacogenomics, 2012. **13**(16): p. 1979-88.

Bibliografia

224. Krajnovic, M., et al., *Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms*. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1496-501.
225. Vijayakrishnan, J. and R.S. Houlston, *Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis*. *Haematologica*, 2010. **95**(8): p. 1405-14.
226. Wan, J., et al., *Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning*. *Environ Health Perspect*, 2002. **110**(12): p. 1213-8.
227. Blanco, J.G., et al., *Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies*. *Pharmacogenetics*, 2002. **12**(8): p. 605-11.
228. Rollinson, S., et al., *Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(1): p. 43-7.
229. Goode, E.L., C.M. Ulrich, and J.D. Potter, *Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**(12): p. 1513-30.
230. Gaymes, T.J., et al., *Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies*. *Haematologica*, 2013. **98**(9): p. 1397-406.
231. Michiels, S., et al., *Polymorphism discovery in 62 DNA repair genes and haplotype associations with risks for lung and head and neck cancers*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(8): p. 1731-9.
232. Gdowicz-Klosok, A., M. Widel, and J. Rzeszowska-Wolny, *The influence of XPD, APE1, XRCC1, and NBS1 polymorphic variants on DNA repair in cells exposed to X-rays*. *Mutat Res*, 2013. **755**(1): p. 42-8.
233. Sorour, A., M.W. Ayad, and H. Kassem, *The genotype distribution of the XRCC1, XRCC3, and XPD DNA repair genes and their role for the development of acute myeloblastic leukemia*. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013. **17**(3): p. 195-201.
234. Seedhouse, C., et al., *The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3761-6.

Bibliografia

235. Worrillow, L.J., et al., *An intron splice acceptor polymorphism in hMSH2 and risk of leukemia after treatment with chemotherapeutic alkylating agents*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 3012-20.
236. Seedhouse C, F.R., Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N., *Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia*. Clin Cancer Res, 2004. **10**: p. 2675-2680.
237. Melis, J.P., et al., *The role of XPC: implications in cancer and oxidative DNA damage*. Mutat Res, 2011. **728**(3): p. 107-17.
238. Shi, J.Y., et al., *Genetic variations of DNA repair genes and their prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia*. Int J Cancer, 2011. **128**(1): p. 233-8.
239. Skibola, C.F., et al., *Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12810-5.
240. Zintzaras, E., et al., *Variants of the MTHFR gene and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children: a synthesis of genetic association studies*. Cancer Epidemiol, 2012. **36**(2): p. 169-76.
241. de Jonge, R., et al., *Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2009. **113**(10): p. 2284-9.
242. Gemmati, D., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival*. Haematologica, 2007. **92**(4): p. 478-85.
243. Robien, K., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genotypes and risk of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukemia*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(9): p. 973-80.
244. Jones, A.V., et al., *JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 446-9.
245. Olcaydu, D., et al., *A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 450-4.
246. Oddsson, A., et al., *The germline sequence variant rs2736100_C in TERT associates with myeloproliferative neoplasms*. Leukemia, 2014. **28**(6): p. 1371-4.

Bibliografia

247. Guillem, V.M., et al., *Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies*. *Leukemia*, 2007. **21**(7): p. 1413-22.
248. Hosgood, H.D., 3rd, et al., *Caspase polymorphisms and genetic susceptibility to multiple myeloma*. *Hematol Oncol*, 2008. **26**(3): p. 148-51.
249. Park, B.L., et al., *Identification of variants in cyclin D1 (CCND1) and B-Cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)*. *J Hum Genet*, 2004. **49**(8): p. 449-54.
250. Lee, K.H., et al., *P2X7 receptor polymorphism and clinical outcomes in HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Haematologica*, 2007. **92**(5): p. 651-7.
251. Carvalho, A., et al., *Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation*. *Exp Hematol*, 2009. **37**(9): p. 1022-9.
252. Black, A.J., et al., *Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine*. *Ann Intern Med*, 1998. **129**(9): p. 716-8.
253. Chang, H., et al., *Association of the interferon-gamma single nucleotide polymorphism +874(T/A) with response to immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia*. *Blood Cells Mol Dis*, 2010. **45**(4): p. 313-6.
254. Guillem, V., et al., *A polymorphism in the TYMP gene is associated with the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation*. *Am J Hematol*, 2013. **88**(10): p. 883-9.
255. Kim, D.H., et al., *A genome-wide association study identifies novel loci associated with susceptibility to chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2011. **117**(25): p. 6906-11.
256. Thomas, J., et al., *Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3739-45.
257. Widmer, N., et al., *Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations*. *Blood*, 2003. **102**(3): p. 1142.
258. Widmer, N., et al., *Relationship of imatinib-free plasma levels and target genotype with efficacy and tolerability*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(10): p. 1633-40.
259. White, D.L., et al., *OCT-1 activity measurement provides a superior imatinib response predictor than screening for single-nucleotide polymorphisms of OCT-1*. *Leukemia*, 2010. **24**(11): p. 1962-5.

Bibliografia

260. White, D.L., et al., *Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity.* Blood, 2007. **110**(12): p. 4064-72.
261. Bazeos, A., et al., *hOCT1 transcript levels and single nucleotide polymorphisms as predictive factors for response to imatinib in chronic myeloid leukemia.* Leukemia, 2010. **24**(6): p. 1243-5.
262. Dulucq, S., et al., *Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia.* Blood, 2008. **112**(5): p. 2024-7.
263. Cascorbi, I., et al., *Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects.* Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 169-74.
264. Vivona, D., et al., *ABCB1 haplotype is associated with major molecular response in chronic myeloid leukemia patients treated with standard-dose of imatinib.* Blood Cells Mol Dis, 2012. **48**(2): p. 132-6.
265. Ni, L.N., et al., *Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia.* Med Oncol, 2011. **28**(1): p. 265-9.
266. Takeru NAMBU, a.A.H., a,b Reiko NAKASHIMA,a Misato YUKI,a Tatsuya KAWAGUCHI,c and c.a.H.S. Hiroaki MITSUYA, a,b, *Association of SLCO1B3 Polymorphism with Intracellular Accumulation of Imatinib in Leukocytes in Patients with Chronic Myeloid Leukemia.* Biol. Pharm. Bull. , (2011). **34** ((1)): p. 114-119.
267. Kim, D.H., et al., *The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(21): p. 5339-50.
268. Kreil, S., et al., *A polymorphism associated with STAT3 expression and response of chronic myeloid leukemia to interferon alpha.* Haematologica, 2010. **95**(1): p. 148-52.
269. Katagiri, S., et al., *The BCL2L11 (BIM) deletion polymorphism is a possible criterion for discontinuation of imatinib in chronic myeloid leukaemia patients.* Br J Haematol, 2013. **160**(2): p. 269-71.
270. Kong, J.H., et al., *Polymorphisms of ERCC1 genotype associated with response to imatinib therapy in chronic phase chronic myeloid leukemia.* Int J Hematol, 2012. **96**(3): p. 327-33.

Bibliografia

271. Dickinson, A.M., et al., *Impact of genomic risk factors on outcome after hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia*. *Haematologica*, 2010. **95**(6): p. 922-7.
272. Sokal, J.E., et al., *Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia*. *Blood*, 1984. **63**(4): p. 789-99.
273. McGuigan, F.E. and S.H. Ralston, *Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan*. *Psychiatr Genet*, 2002. **12**(3): p. 133-6.
274. Guillem, V., et al., *BCL2 gene polymorphisms and splicing variants in chronic myeloid leukemia*. *Leuk Res*, 2015.
275. Smith, C.C. and N.P. Shah, *Tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia: approach to patients with treatment-naive or refractory chronic-phase disease*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. **2011**: p. 121-7.
276. Radich, J.P., *How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia*. *Blood*, 2009. **114**(16): p. 3376-81.
277. Melo, J.V. and D.M. Ross, *Minimal residual disease and discontinuation of therapy in chronic myeloid leukemia: can we aim at a cure?* *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. **2011**: p. 136-42.
278. Zu, B., et al., *MDR1 gene polymorphisms and imatinib response in chronic myeloid leukemia: a meta-analysis*. *Pharmacogenomics*, 2014. **15**(5): p. 667-77.
279. Salimizand, H., et al., *Concurrent effects of ABCB1 C3435T, ABCG2 C421A, and XRCC1 Arg194Trp genetic polymorphisms with risk of cancer, clinical output, and response to treatment with imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia*. *Tumour Biol*, 2015.
280. Nalejska, E., E. Maczynska, and M.A. Lewandowska, *Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology*. *Mol Diagn Ther*, 2014. **18**(3): p. 273-84.
281. Guillem, V., et al., *Functional polymorphisms in SOCS1 and PTPN22 genes correlate with the response to imatinib treatment in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia*. *Leuk Res*, 2012. **36**(2): p. 174-81.
282. Guillem, V.M., et al., *XPC genetic polymorphisms correlate with the response to imatinib treatment in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia*. *Am J Hematol*, 2010. **85**(7): p. 482-6.

Bibliografia

283. Hernandez-Boluda, J.C., et al., *A polymorphism in the XPD gene predisposes to leukemic transformation and new nonmyeloid malignancies in essential thrombocythemia and polycythemia vera*. Blood, 2012. **119**(22): p. 5221-8.
284. Kim, D.H., et al., *Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate genes to predict response and resistance to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(14): p. 4750-8.
285. Breccia, M., et al., *Suboptimal response to imatinib according to 2006-2009 European LeukaemiaNet criteria: a 'grey zone' at 3, 6 and 12 months identifies chronic myeloid leukaemia patients who need early intervention*. Br J Haematol, 2011. **152**(1): p. 119-21.
286. Alvarado, Y., et al., *Significance of suboptimal response to imatinib, as defined by the European LeukemiaNet, in the long-term outcome of patients with early chronic myeloid leukemia in chronic phase*. Cancer, 2009. **115**(16): p. 3709-18.
287. Jabbour, E., J.E. Cortes, and H.M. Kantarjian, *Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy?* Mayo Clin Proc, 2009. **84**(2): p. 161-9.
288. Baccarani, M., et al., *European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013*. Blood, 2013. **122**(6): p. 872-84.
289. Hatirnaz, O., et al., *The SOCS-1 gene methylation in chronic myeloid leukemia patients*. Am J Hematol, 2007. **82**(8): p. 729-30.
290. Galm, O., et al., *SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2784-8.
291. Huang, F.J., et al., *Molecular basis for the critical role of suppressor of cytokine signaling-1 in melanoma brain metastasis*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9634-42.
292. Schif, B., et al., *SOCS1 mutation subtypes predict divergent outcomes in diffuse large B-Cell lymphoma (DLBCL) patients*. Oncotarget, 2013. **4**(1): p. 35-47.
293. Rottapel, R., et al., *The tumor suppressor activity of SOCS-1*. Oncogene, 2002. **21**(28): p. 4351-62.
294. Fiorillo, E., et al., *Autoimmune-associated PTPN22 R620W variation reduces phosphorylation of lymphoid phosphatase on an inhibitory tyrosine residue*. J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26506-18.

Bibliografia

295. Stanford, S.M., T.M. Mustelin, and N. Bottini, *Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases*. *Semin Immunopathol*, 2010. **32**(2): p. 127-36.
296. Quintas-Cardama, A., et al., *Reverse phase protein array profiling reveals distinct proteomic signatures associated with chronic myeloid leukemia progression and with chronic phase in the CD34-positive compartment*. *Cancer*, 2012. **118**(21): p. 5283-92.
297. Perrotti, D. and P. Neviani, *ReSETting PP2A tumour suppressor activity in blast crisis and imatinib-resistant chronic myelogenous leukaemia*. *Br J Cancer*, 2006. **95**(7): p. 775-81.
298. Zhu, M.L., et al., *Association between the ERCC5 Asp1104His polymorphism and cancer risk: a meta-analysis*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e36293.
299. Vodicka, P., et al., *Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(5): p. 757-63.
300. Gurney, H., et al., *Imatinib disposition and ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein) genotype*. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **82**(1): p. 33-40.
301. Anantha, R.W. and J.A. Borowiec, *Mitotic crisis: the unmasking of a novel role for RPA*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(3): p. 357-61.
302. Shen, Y.F. and J. Zhu, *Power analysis of principal components regression in genetic association studies*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009. **10**(10): p. 721-30.
303. Mao, X., B.D. Young, and Y.J. Lu, *The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research*. *Curr Genomics*, 2007. **8**(4): p. 219-28.