



# SOCIEDAD PERUANA DE HEMATOLOGIA

I CURSO EDUCATIVO 2015

“DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DEL PACIENTE  
HEMATOLÓGICO: LABORATORIO Y PATOLOGIA”

Objetivo:

EN BUSCA DE UN DIAGNÓSTICO OPORTUNO,  
INTEGRADO Y DE CALIDAD

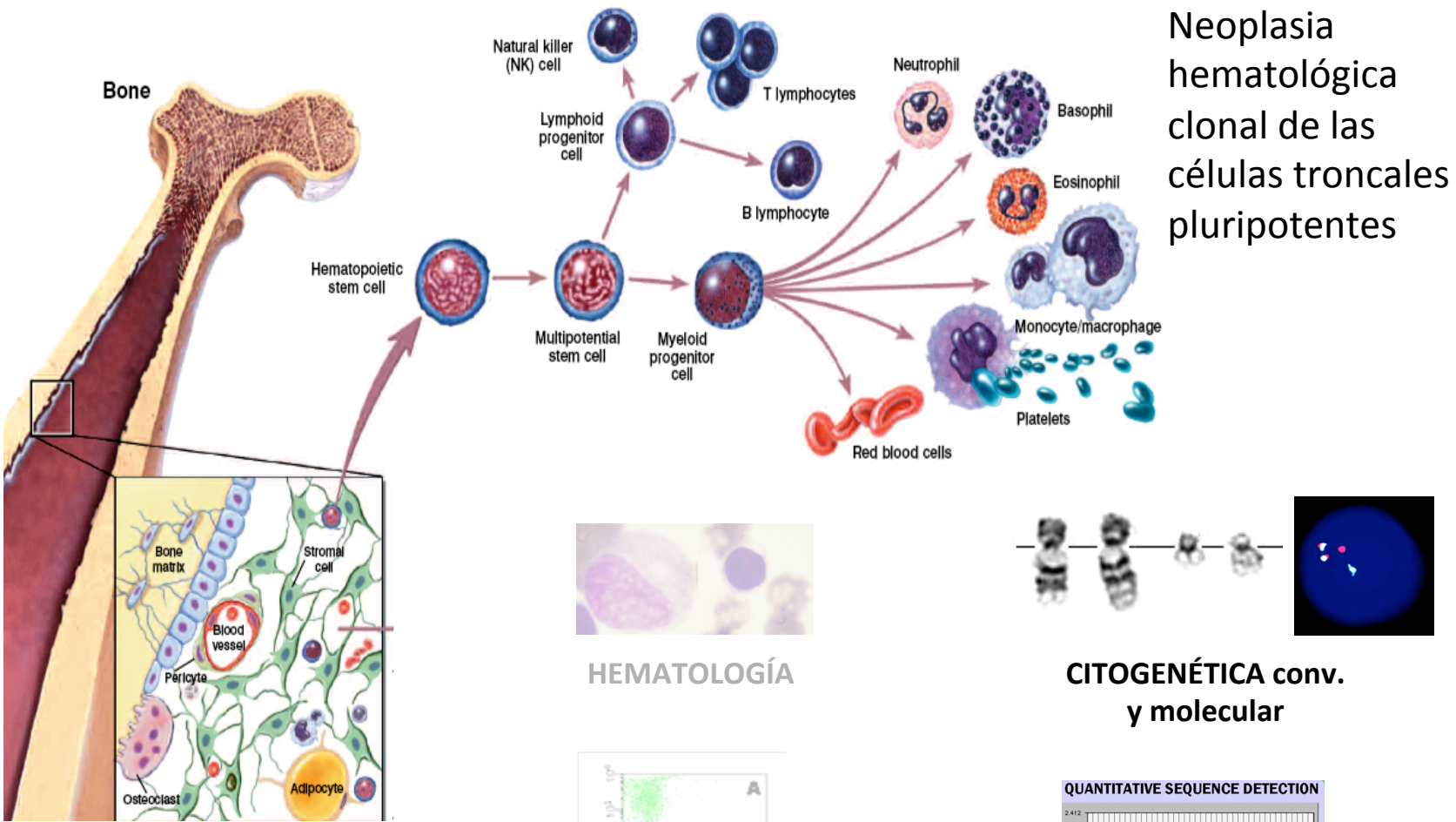


EQUIPO FUNCIONAL  
DE GENÉTICA Y  
BIOLOGÍA  
MOLECULAR

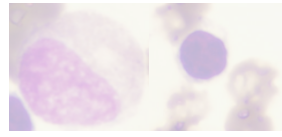
## CITOGENETICA, FISH y PRUEBAS MOLECULARES:

Importancia del seguimiento en neoplasias  
mieloproliferativas crónicas (LMC)

Pamela Mora Alferez  
Médico Genetista



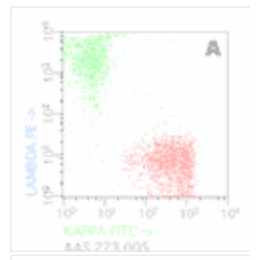
Neoplasia hematológica clonal de las células troncales pluripotentes



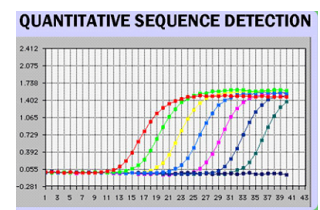
HEMATOLOGÍA



CITOGENÉTICA conv. y molecular



CITOMETRÍA DE FLUJO



BIOLOGÍA MOLECULAR

# Leucemia Mieloide Crónica

Diagnóstico

Seguimiento y Pronóstico

**A Minute Chromosome in Human  
Chronic Granulocytic Leukemia**

In seven cases thus far investigated (five males, two females), a minute chromosome has been observed replacing one of the four smallest autosomes in the chromosomal complement of cells of chronic granulocytic leukemia cultured from peripheral blood. No abnormality was observed in the cells of four cases of acute granulocytic leukemia in adults or of six cases of acute leukemia in children. There have been several recent reports of chromosome abnormalities in a number of cases of human leukemia [including two of the seven cases reported here: Nowell and Hungerford, *J. Natl. Cancer Inst.* 25, 85 (1960)], but no series has appeared in which there was a consistent change typical of a particular type of leukemia. Cells of the five new cases were obtained from peripheral blood (and bone marrow in one instance), grown in culture for 24-72 hours, and processed for cytological examination by a recently developed air-drying technique (Moorhead, *et al.*, *Exptl. Cell Research*, in press). The patients varied from asymptomatic untreated cases to extensively treated

cases of several years duration in terminal myeloblastic crisis. All seven individuals showed a similar minute chromosome, and none showed any other frequent or regular chromosome change. In most of the cases, cells with normal chromosomes were also observed. Thus, the minute is not a part of the normal chromosome constitution of such individuals.

The findings suggest a causal relationship between the chromosome abnormality observed and chronic granulocytic leukemia.

PETER C. NOWELL

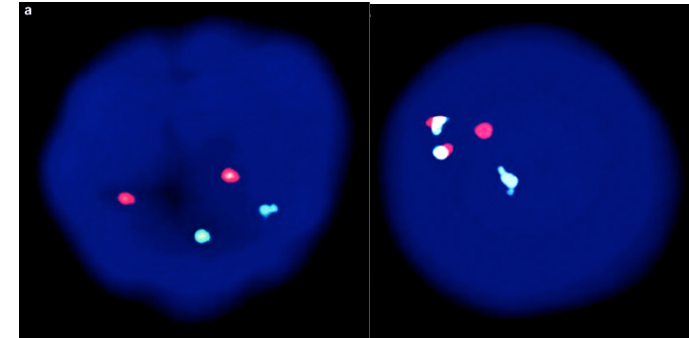
*School of Medicine,  
University of Pennsylvania*

DAVID A. HUNGERFORD

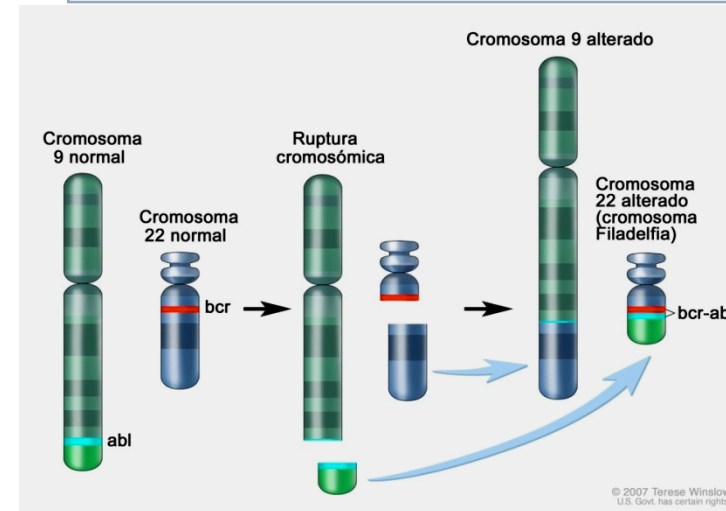
*Institute for Cancer Research*

Nowell & Hungerford, 1960 Science 132,1497

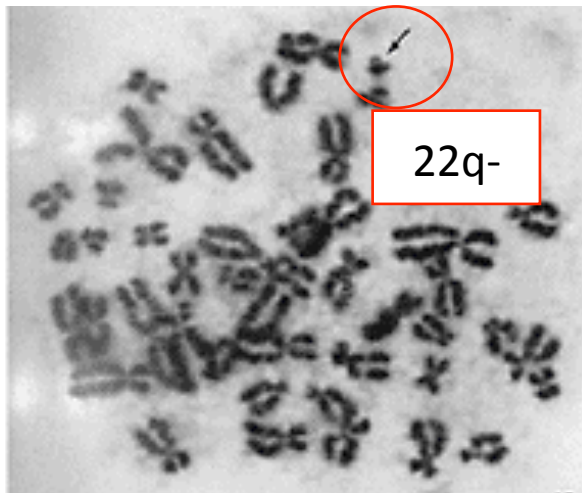
**FISH**



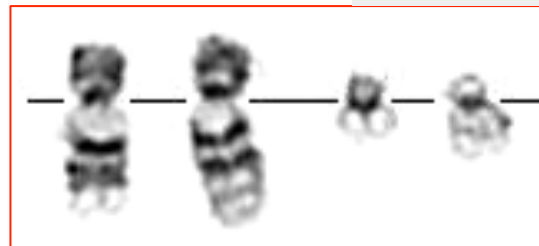
**Dual color / dual fusion**



© 2007 Terese Winslow  
U.S. Govt. has certain rights



22q-

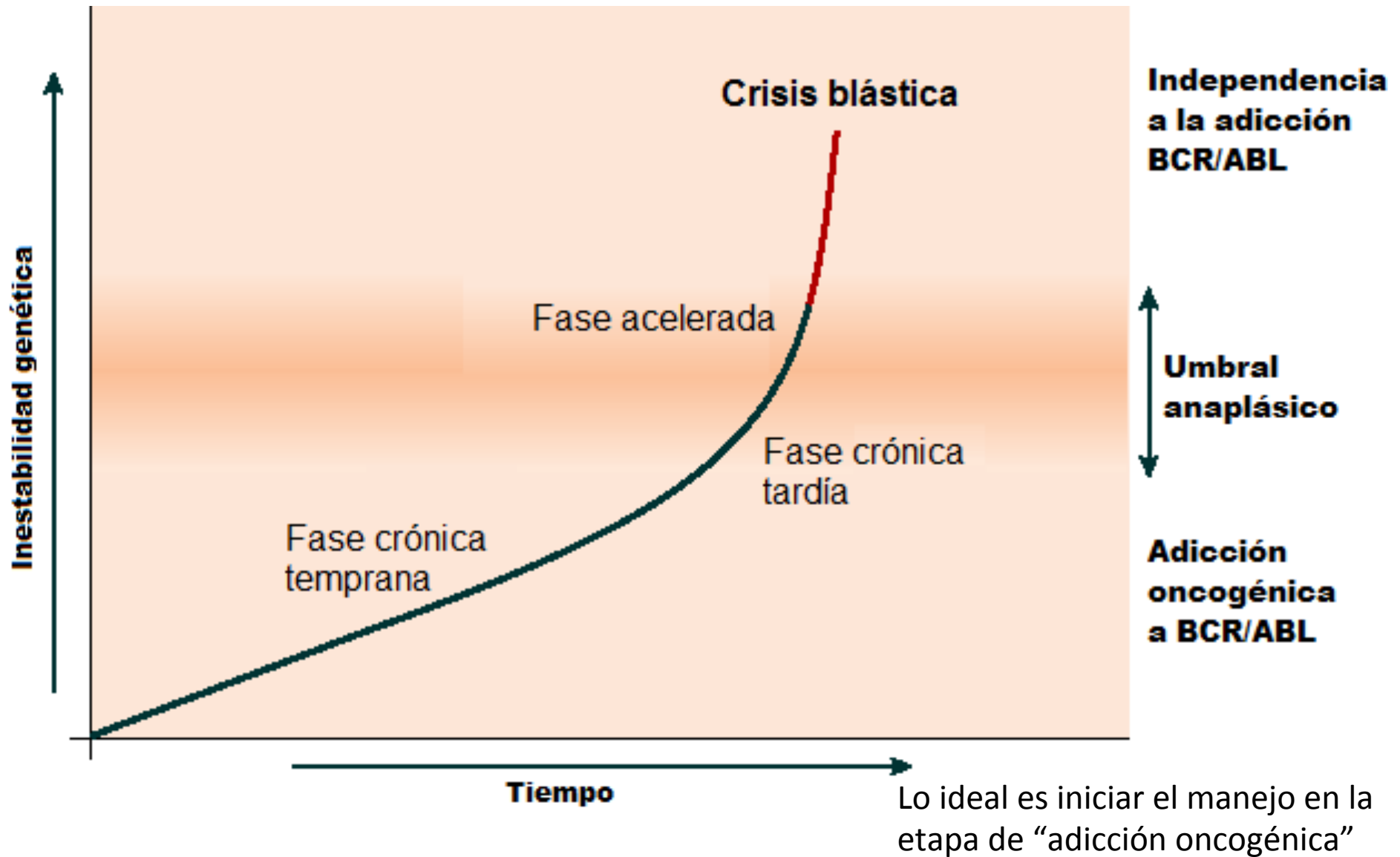


**t(9;22)(q34;q11)**

**LMC**

**95%**

Mod. LMCD



## HISTORIA NATURAL DE LMC

## Recomendaciones de la European LeukemiaNet para el manejo de la leucemia mieloide crónica (LMC)

### Secuencia del monitoreo citogenético y molecular

<b>Al diagnóstico</b>	CBA, FISH en casos Ph- (para detectar translocaciones variantes o crípticas ) PCR cualitativo (para determinar el tipo de transcrito)
<b>Durante el tratamiento</b>	RQ-PCR <b>cada 3 meses</b> hasta obtenerse la RMM, después <b>cada 3-6 meses</b> y/o CBA a los <b>3, 6 y 12 meses</b> hasta conseguirse la RCC; a partir de entonces <b>cada 12 meses</b> . Una vez obtenida la RCC se puede hacer el FISH en sangre periférica.
<b>Fracaso, progresión</b>	RQ-PCR, análisis mutacional y CBA, inmunofenotipo en CB.
<b>Advertencias</b>	Hacer el estudio molecular y citogenético con <b>mayor frecuencia</b> . CBA en caso de mielodisplasia o ACA/Ph-

CBA: Chromosome banding analysis de metafases de medula ósea, analizar al menos 20 metafases

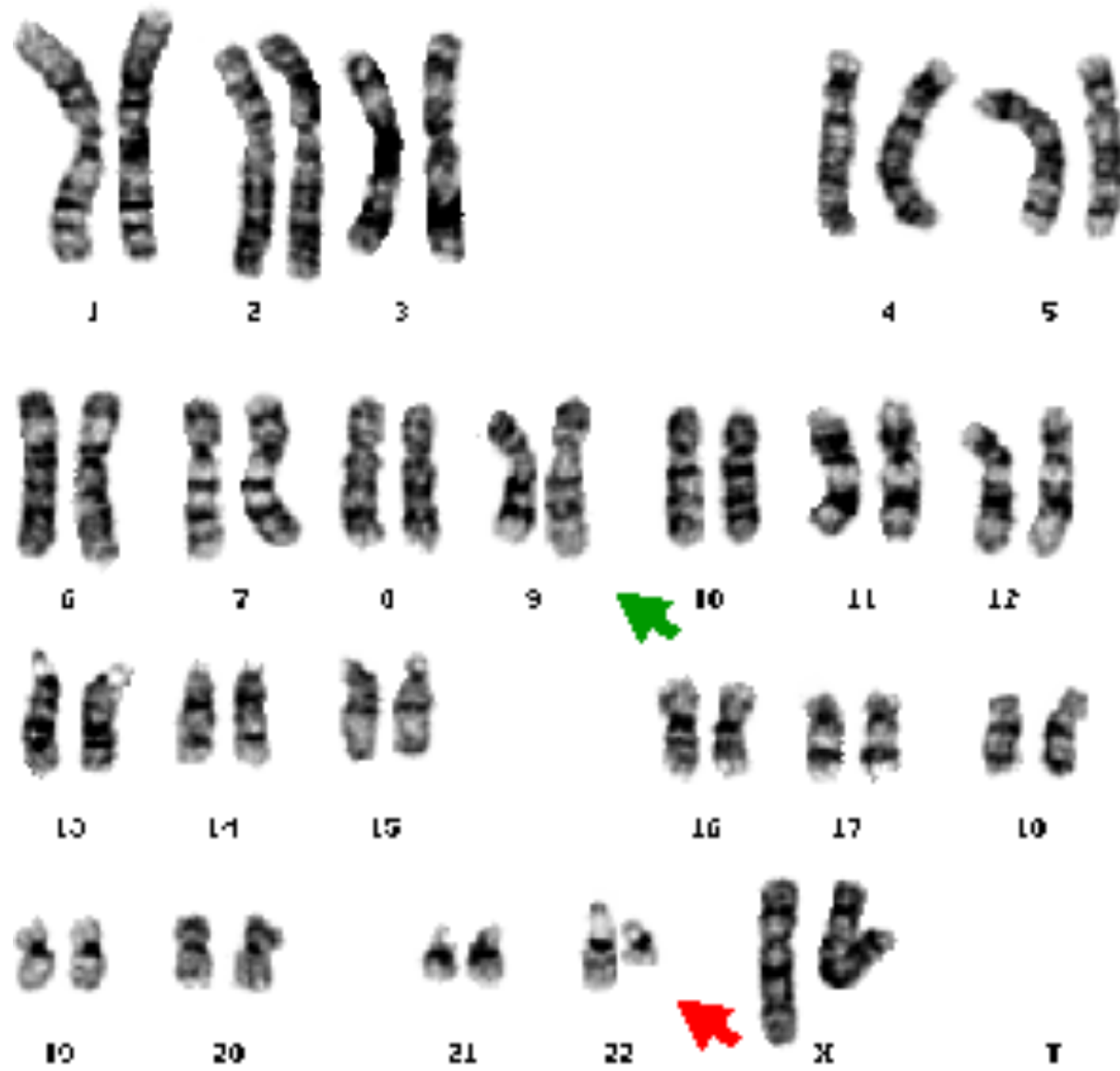
# Citogenética en LMC

## DIAGNOSTICO

- Presencia del cromosoma Ph:  $t(9;22)(q34;q11)$ : gen de fusión BCR/ABL
- Cariotipo convencional: técnica más empleada para el diagnóstico confirmatorio de la LMC,
- 20 metafases
- International System for Human Cytogenetic Nomenclature

# Análisis Citogenético

Cromosoma  
*Philadelphia*



46,XX,t(9;22)(q34;q11)

# **Respuesta citogenética (ELN 2013):**

control al 3er y 6to mes hasta cada 3 meses hasta RCC,  
luego cada 12 meses

- Sin respuesta citogenética: metafases Ph+ > 95%.
- Mínima (RCmin): metafases Ph+ 66-95%.
- Menor (RCm): metafases Ph+ 36-65%.
- **Parcial (RCP): metafases Ph+ 1-35%.**
- **Completa (RCC): metafases Ph+ 0%**



# Respuesta citogenética (NCCN):

## Búsqueda de CyMR a los 12 meses

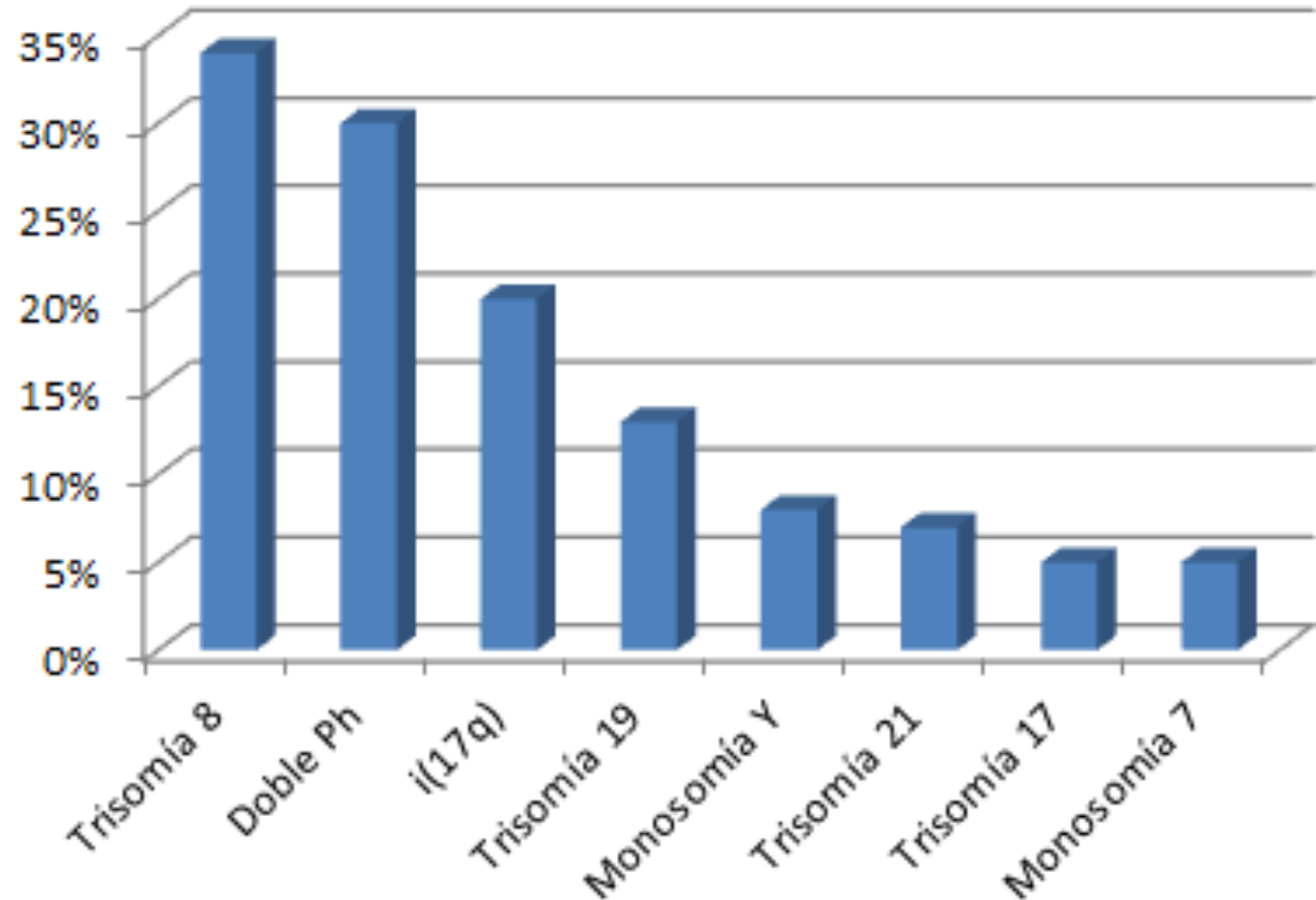
- Respuesta citogenética mayor (CyMR)
  - No se evidencia metafases Ph+
- Respuesta citogenética completa (CyCR)
  - Metafases Ph+ (0-35%)
- Respuesta citogenética parcial (CyPR)
  - Metafases Ph+ (1-34%)

# Variantes Ph

- 2-10%
- Implican otros cromosomas diferentes a 9 y 22.
- 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12, y 22q13.
- Mas frecuentes:
  - $t(3;9;22)(p21;q34;q11)$
  - $t(17;9;22)(q25;q34;q11)$
  - publicadas en más de 10 casos
- No varia en presentación clínica y pronóstico que Ph típico

# Anomalías cromosómicas adicionales (ACAs)

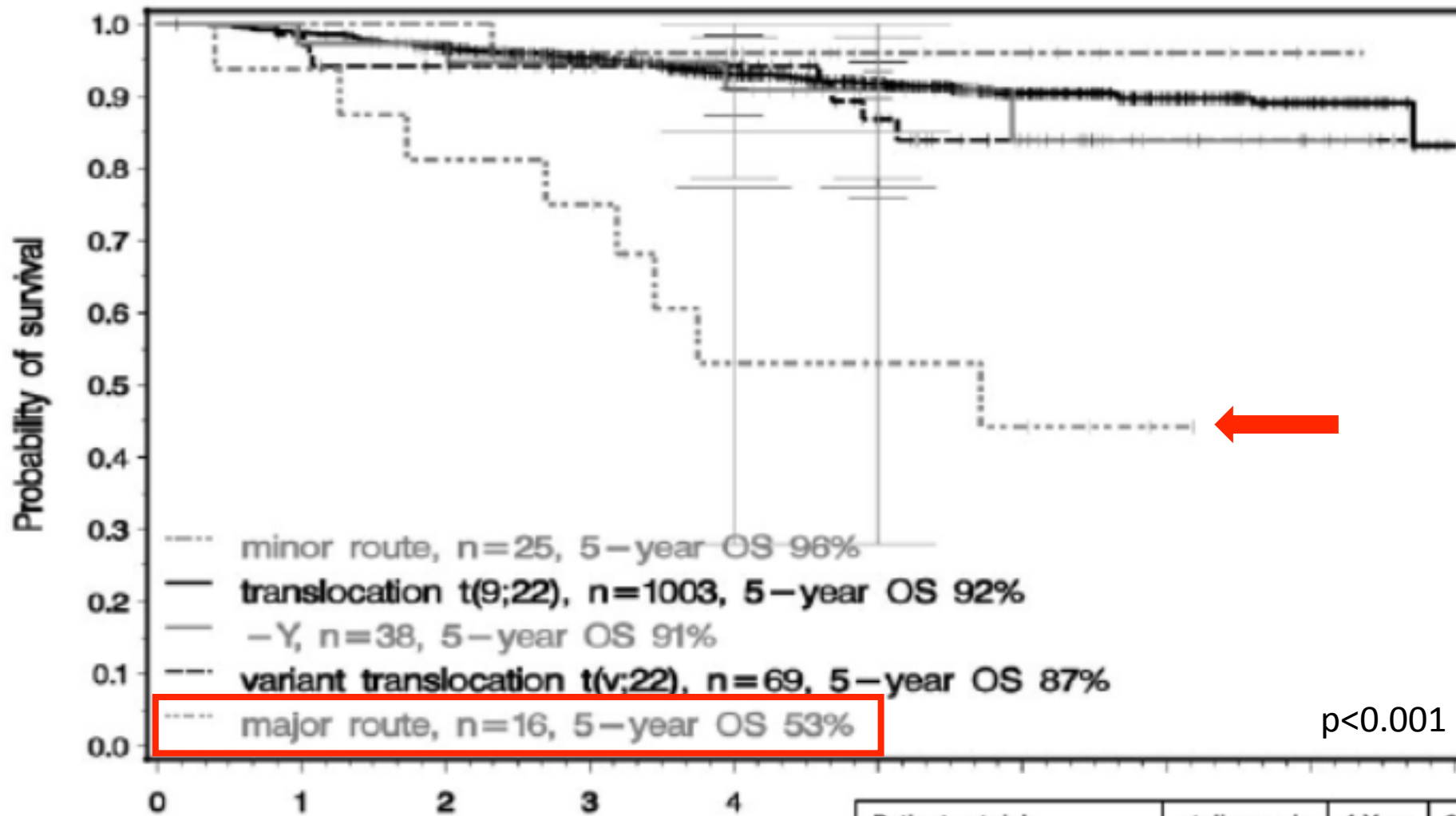
- 5% de casos en fase crónica
- 60%-80% de durante la crisis blástica (BC)
- 45% de los casos con resistencia ITK
- Orden de aparición se relaciona con la frecuencia .
- Hiperdiploidias: mas frecuentes (+8, +19 y +Ph) 50%: 47 y 50 cromosomas.
- NO balanceados



# ACAs balanceadas

- $t(15;17)(q22;q12-21)$
- $inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26)$
- $t(3;21)(q26;q22)$
- $t(7;11)(p15;p15)$
- $t(8;21)(q22;q22)$
- $inv(16)(p13q22)$

- ACA ruta mayor:
  - Mal de pronostico y se relacionan con fallo al tratamiento; fase acelerada
  - +8, +Ph, i (17)(q10), +19, +21, +17 y -7
- ACA ruta menor:
  - No cambios en el pronostico
  - -Y, variante Ph



Sobrevivencia global en v

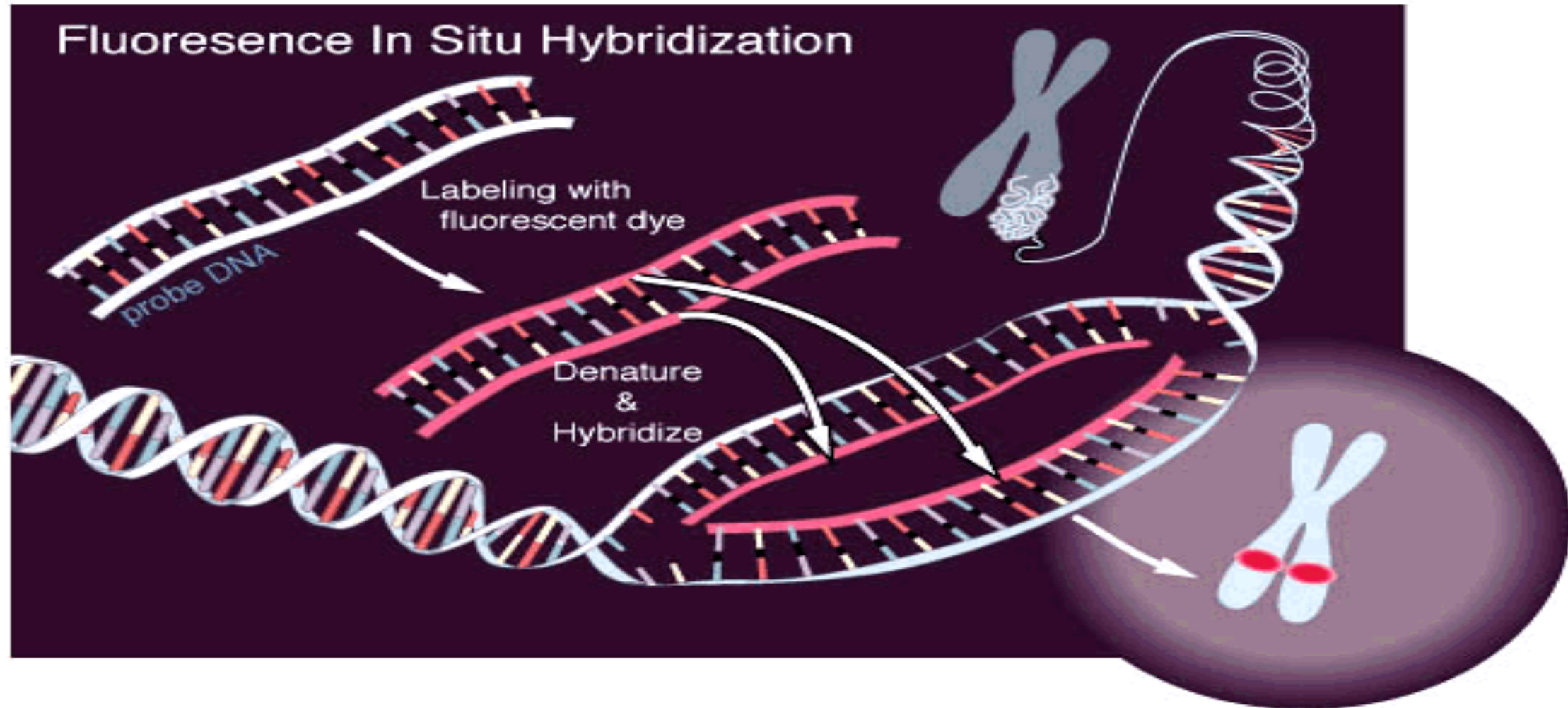
Patients at risk	at diagnosis	1 Year	2 Years	3 Years	4 Years	5 Years
translocation t(9;22)	1003	988	942	816	663	518
variant translocation t(v;22)	69	67	61	51	47	32
minor route	25	25	25	23	18	12
major route	16	15	13	12	7	6
-Y	38	37	36	32	24	17

# ACA en clonas Ph-

- 5% de los casos con RCg: desarrollo de la enfermedad y resistencia a tratamiento ITK .
- Su implicación clínica no esta clara.
- Monosomía 7: evolución a SMD y LMA

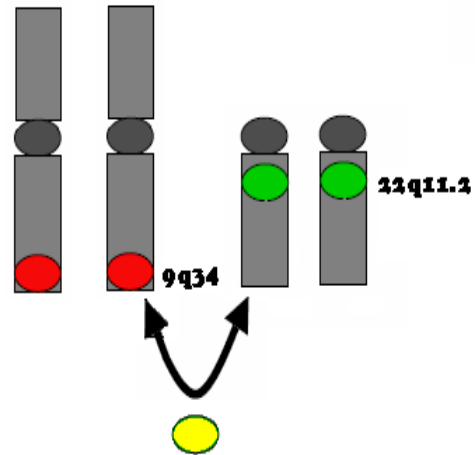
ACA	%
Trisomía 8	34-86%
Monosomía 7	19-25%
5q-	Poco frecuente
20q-	Poco frecuente
Cariotipos complejos	Poco frecuente

# FISH en LMC

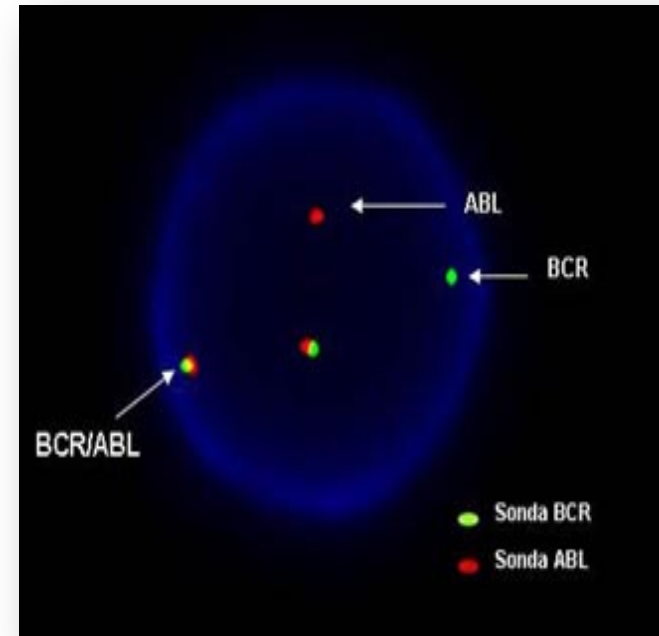




# Leucemia Mieloide Crónica



200 núcleos en interfase: >1% de núcleos positivos



**nuc ish (ABL1 x 2),(BCR x 2) (ABL1 con BCR x 1)[400]**

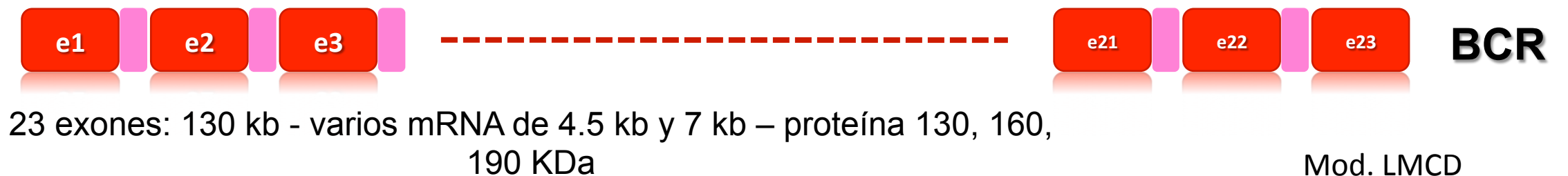
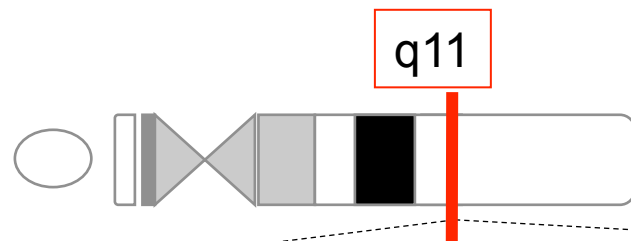
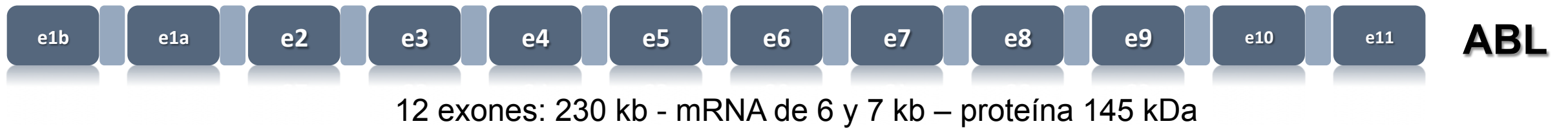
# Aplicaciones de FISH

- ✓ Identificación y verificación de translocaciones cromosómicas
- ✓ Patrones de hibridación atípicos (variantes Ph) o Ph supernumerario
- ✓ Progresión clonal y en crisis blástica.

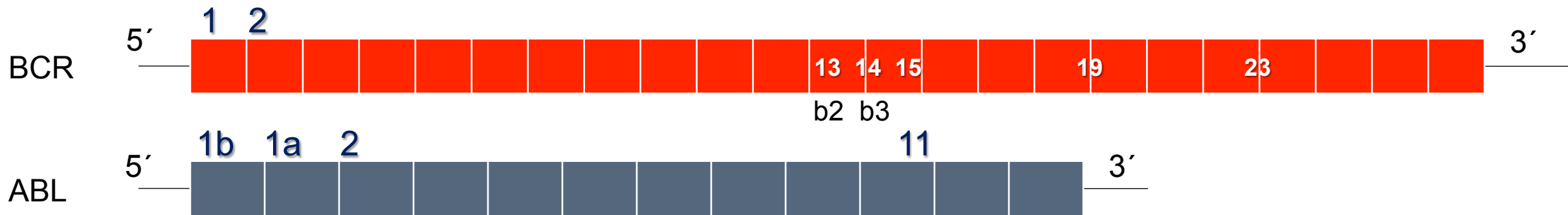
# FISH en el seguimiento de LMC

- **La falla de respuesta a tratamiento no se define en base a FISH: No usado en seguimiento (NCCN 2015, ELN 2013)**
  - Citogenética no informativa o sospecha de delección del der(9) (no varía pronóstico), variante Ph
  - Alta tasa de falsos positivos (1-10%), disminuye con el uso de sondas de doble fusión.
  - NO acceso a prueba molecular.
  - <1% de núcleos con la translocación sobre 200 núcleos analizados en interfase podría asumirse como RCg.

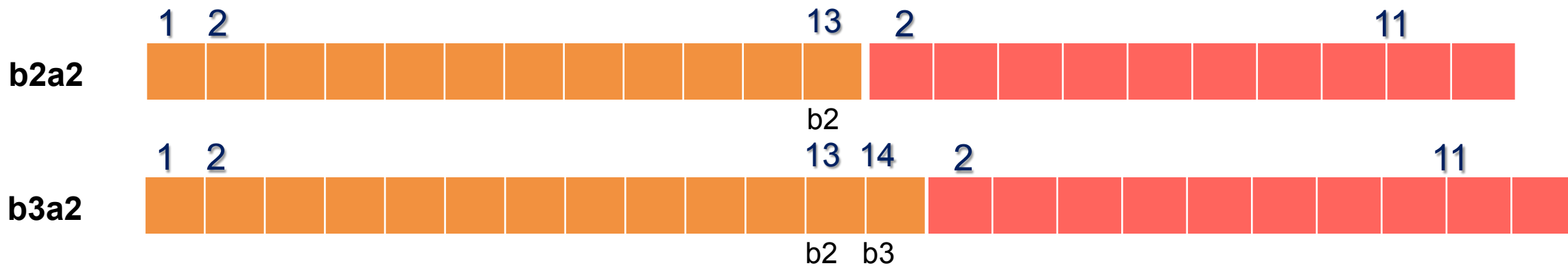
# BCR/ABL en LMC



Mod. LMCD



MAJOR (Mbcr) p210



MINOR (mbcr) p190



## Quantitative real-time RT-PCR monitoring of *BCR-ABL* in chronic myelogenous leukemia shows lack of agreement in blood and bone marrow samples

WENDY STOCK<sup>1</sup>, DAOHAI YU, TED KARRISON<sup>1</sup>, DORIE SHI,  
RICHARD A. LARSON<sup>1</sup> and CLARA D. BLOCH

<sup>1</sup>University of Chicago Cancer Research Center, Chicago, IL; CALGB  
The Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Columbus, OH  
Boston, MA; Cancer and Leukemia Group B, Chicago

## Correlations Between Cytogenetic and Molecular Monitoring Among Patients With Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase

Post Hoc Analyses of the Rationale and Insight  
for Gleevec High-Dose Therapy Study

No existe diferencia estadística significativa entre la muestra tomada periférica y medula ósea en el pretratamiento.

No se deben intercambiar muestras entre el seguimiento  
No se debe intercambiar el gen control interno

Encuentra una correlación fuerte y significativa entre los resultados obtenidos de MO y SP

# Diagnóstico:

## Determinación de variante (estudio cualitativo)

### PCR convencional

Leukemia (1999) 13, 1901-1928

© 1999 Stockton Press All rights reserved 0887-6924/99 \$15.00

<http://www.stockton-press.co.uk/leu>

#### Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease

##### *Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia*

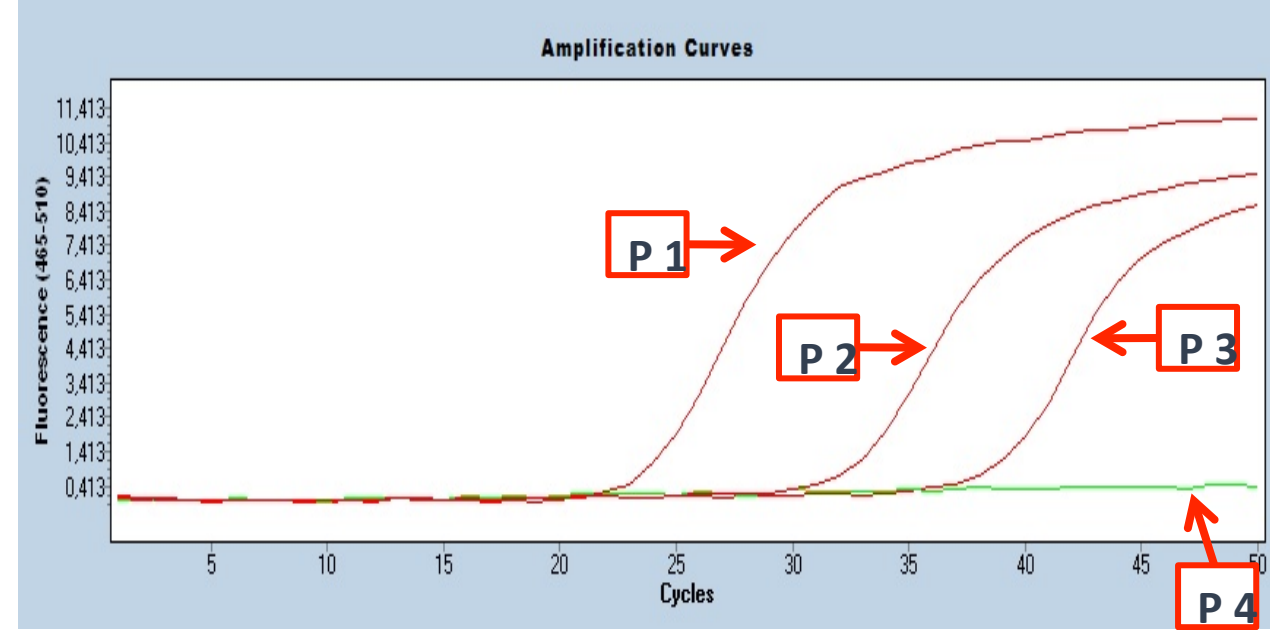
JJM van Dongen<sup>1</sup>, EA Macintyre<sup>2</sup>, JA Gabert<sup>3</sup>, E Delabesse<sup>2</sup>, V Rossi<sup>4</sup>, G Saglio<sup>5</sup>, E Gottardi<sup>5</sup>, A Rambaldi<sup>6</sup>, G Dotti<sup>6</sup>, F Griesinger<sup>7</sup>, A Parreira<sup>8</sup>, P Gameiro<sup>8</sup>, M González Díaz<sup>9</sup>, M Malec<sup>10</sup>, AW Langerak<sup>1</sup>, JF San Miguel<sup>9</sup> and A Biondi<sup>4</sup>

Adaptar y replicar estudios molecular según recomendaciones de EAC. Van Dongen 2003

## Monitoreo: Detección y cuantificación de enfermedad mínima residual

## Estudio de expresión génica: RNA de sangre ó médula ósea

Gabert et al. 2003



Samples					Results		
Include	Color	Pos	Name		Cp	Conc (copias)	Stand...
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D5	JIR	P1	25,62	1,62E4	POSITIVO
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D4	EMC	P2	32,46	3,69E1	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D2	IJL	P3	39,53	2,75	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D7	LRA	P4			NEGATIVO

Leukemia (2003) 17, 2318-2357  
 © 2003 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/03 \$25.00  
 www.nature.com/leu

### LEADING ARTICLE

## Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program

J Gabert<sup>1,17,18,19</sup>, E Beillard<sup>1,17</sup>, VHJ van der Velden<sup>2</sup>, W Bi<sup>3</sup>, D Grimwade<sup>4</sup>, N Pallisgaard<sup>5</sup>, G Barbany<sup>6,20</sup>, G Cazzaniga<sup>7</sup>, JM Cayuela<sup>8</sup>, H Cavé<sup>9</sup>, F Pane<sup>10</sup>, JLE Aerts<sup>11</sup>, D De Micheli<sup>12</sup>, X Thirion<sup>13</sup>, V Pradel<sup>15</sup>, M González<sup>14</sup>, S Viehmann<sup>15</sup>, M Malec<sup>16</sup>, G Saglio<sup>12</sup> and JJM van Dongen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology Biology, Institut Paoli Calmettes, France; <sup>2</sup>Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands; <sup>3</sup>Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; <sup>4</sup>Department of Haematology, Division of Medical and Molecular Genetics, Guy's, King's & St Thomas' School of Medicine, University College London Hospitals, London, UK; <sup>5</sup>Department of Immuno-haematology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark; <sup>6</sup>Department of Medical Sciences, Uppsala University Hospital, Uppsala, Sweden; <sup>7</sup>Pediatric Clinic, University of Milan Bicocca, San Gerardo Hospital, Monza, Italy; <sup>8</sup>Central Laboratory of Hematology and INSERM U462, Hôpital Saint Louis, Paris, France; <sup>9</sup>Department of Genetic Biochemistry, Hôpital Robert Debré, Paris, France; <sup>10</sup>Department of CEINGE & Department of Biochemistry & Medical Biotechnology, University Hospital 'Federico II', Naples, Italy; <sup>11</sup>Department of Haematology, University Hospital, Leuven, Belgium; <sup>12</sup>Clinical and Biological Science, University of Turin, Ospedale San Luigi Gonzaga, Orbassano-Torino, Italy; <sup>13</sup>Department of Medical Information, University Hôpital Sainte Marguerite/Biostatistics Laboratory Timone, Université de la Méditerranée, Marseille, France; <sup>14</sup>Department of Hematology, Hospital Clínico Universitario, Salamanca, Spain; <sup>15</sup>Biogenetics Laboratory, Children's University Hospital, Giessen, Germany; and <sup>16</sup>Department of Hematology, Karolinska, Stockholm, Sweden



# Diferentes modelos de ensayos en cuantificación

**Hematopathology** / QUANTITATIVE BCR-ABL ASSAY

© American Society for Clinical Pathology

*Am J Clin Pathol* 2003;120:42-48  
DOI: 10.1309/60A9C8WGEGHRNXEE

## **Comprehensive Validation of a Real-Time Quantitative bcr-abl Assay for Clinical Laboratory Use**

*Carol D. Jones, Cecilia Yeung, and James L. Zehnder, MD*

## Inter-Laboratory Comparison of Chronic Myeloid Leukemia Minimal Residual Disease Monitoring

*Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 9, No. 4, September 2007*  
Copyright © American Society for Investigative Pathology  
and the Association for Molecular Pathology  
DOI: 10.2353/jmoldx.2007.060134

### *Summary and Recommendations*

Tong Zhang,\* Sylvie Grenier,\*

**Leukemia (2003) 17, 1013–1034**

© 2003 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/03 \$25.00

[www.nature.com/leu](http://www.nature.com/leu)

## **Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects**

VHJ van der Velden<sup>1</sup>, A Hochhaus<sup>2</sup>, G Cazzaniga<sup>3</sup>, T Szczepanski<sup>1,4</sup>, J Gabert<sup>5</sup> and JJM van Dongen<sup>1</sup>

# Molecular Monitoring of Chronic Myelogenous Leukemia

## *Identification of the Most Suitable Internal Control Gene for Real-Time Quantification of BCR-ABL Transcripts*

Y. Lynn Wang,\* Joong Won Lee,\*  
Ethel Cesarman,\* David K. Jin,<sup>†</sup> and  
Balazs Csernus\*

| 970 | haematologica/the hematology journal | 2007; 92(07)

## **An international study to standardize the detection and quantitation of BCR-ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR**

Martin C. Müller, Giuseppe Saglio, Feng Lin, Heike Pfeifer, Richard D. Press, Raymond R. Tubbs, Peter Paschka, Enrico Gottardi, Steven G. O'Brien, Oliver G. Ottmann, Hubertus Stockinger, Lothar Wieczorek, Kirsten Merx, Heiko König, Uwe Schwindel, Rüdiger Hehlmann, Andreas Hochhaus

Leukemia (2015), 1–5

© 2015 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0887-6924/15



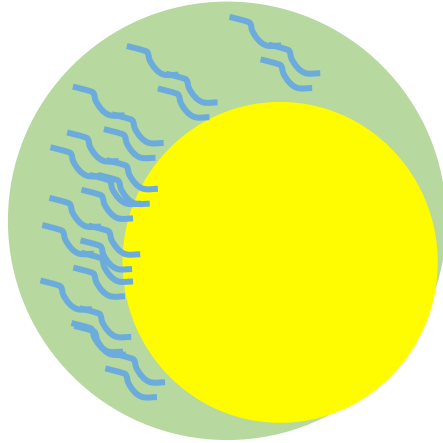
[www.nature.com/leu](http://www.nature.com/leu)

### REVIEW

## Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia

NCP Cross<sup>1,2</sup>, HE White<sup>1,2</sup>, D Colomer<sup>3</sup>, H Ehrencrona<sup>4</sup>, L Foroni<sup>5</sup>, E Gottardi<sup>6</sup>, T Lange<sup>7</sup>, T Lion<sup>8</sup>, K Machova Polakova<sup>9</sup>, S Dulucq<sup>10</sup>, G Martinelli<sup>11</sup>, E Oppliger Leibundgut<sup>12</sup>, N Pallisgaard<sup>13</sup>, G Barbany<sup>14</sup>, T Sacha<sup>15</sup>, R Talmaci<sup>16</sup>, B Izzo<sup>17</sup>, G Saglio<sup>6</sup>, F Pane<sup>17,18</sup>, MC Müller<sup>19</sup> and A Hochhaus<sup>20</sup>

# GEN CONTROL



- Las células producen un número variable de mRNA
- RNA es lábil
- Dificulta la cuantificación absoluta

El gen control normaliza los valores absolutos

$$\frac{\text{\# de transcritos de BCR-ABL}}{\text{\# de transcritos de ABL}} = \%$$

Dx.:  $\frac{10234 \text{ copias BCR-ABL}}{14239 \text{ copias ABL}} = 71,87\%$

# Que estableció el estudio IRIS?

(Imatinib vs. Interferon en primera línea de tratamiento)

- Seguimiento a los 8 años de uso de imatinib (45% descontinuaron tto)
  - SLE 81%
  - SG estimada del 85%
- Establece respuesta molecular mayor (RMM) a los 18 meses de iniciado el tratamiento con imatinib como uno de los objetivos terapéuticos.
- Determina la necesidad de realizar una correcta cuantificación de *BCR-ABL1* mediante RQ-PCR .
- Introduce el término de Escala Internacional y Factor de Conversión: armonización de laboratorios

# Escala Internacional

## National Institutes of Health Consensus Group 2006

1. Unificar criterios para apoyar la decisión clínica
2. El paciente puede trasladarse a otros centros especializados y el resultado será una buena referencia.
3. Fácil interpretación por los especialistas

### **Dificultades:**

1. Diferencias intra e interlaboratorios.
2. Metodologías “in house” (RUO)
3. Ideal: Metodologías estandarizadas, validadas y reproducibles entre laboratorios



**FACTOR DE CALIBRACIÓN**

## EVALUACIÓN DE RESPUESTA CITOGENÉTICA COMPLETA

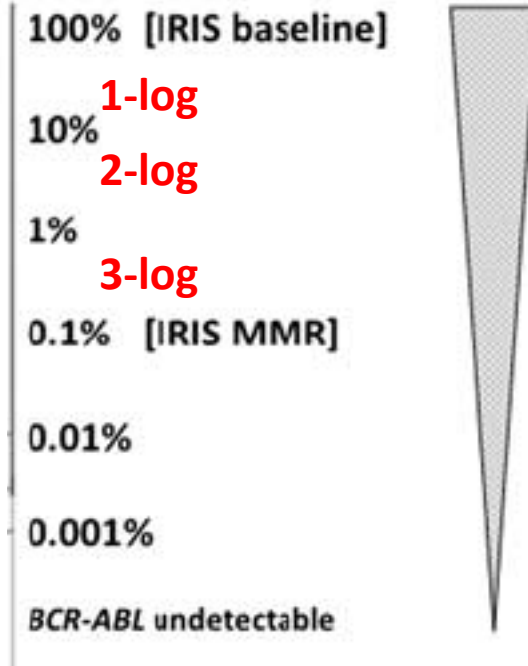
- Análisis de MO por citogenética convencional.
- Ausencia de Ph+ luego de 12 meses de tratamiento
- No menos 20 metafases
- FISH no se usa para monitoreo

**IRIS**

## EVALUACIÓN DE RESPUESTA MOLECULAR

### International Scale

CCyR



Línea de base:  
Análisis de PCR convencional y  
Q-PCR (Tiempo real)

IRIS Baseline  
(Cuantificación al diagnóstico)

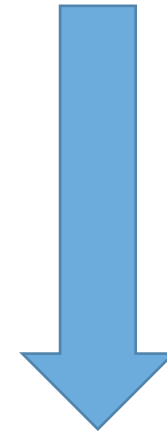
IRIS MMR  
(Cuantificación a 12 meses)

**IRIS**

**Valor promedio de cuantificación antes del diagnóstico de 30 pacientes que se asume como 100%.**

# Factor de conversión

Muestras de referencia,  
(preparadas y distribuidas de un laboratorio central)  
Correspondientes a 100%, 1%, 0.1%, 0.01%  
BCR-ABL/gen control



El laboratorio analiza la muestra de referencia conociendo cuales corresponden a 100%, 1%, 0.1%, 0.01% BCR-ABL según la escala internacional (International Scale) y calculan un Factor de Conversión propio del laboratorio.

**Desirable performance characteristics for *BCR-ABL* measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials**

Susan Branford, Linda Fletcher, Nicholas C. P. Cross, Martin C. Müller, Andreas Hochhaus, Dong-Wook Kim, Jerald P. Radich, Giuseppe Saglio, Fabrizio Pane, Suzanne Kamel-Reid, Y. Lynn Wang, Richard D. Press, Kevin Lynch, Zbigniew Rudzki, John M. Goldman and Timothy Hughes

**Iniciativa para adecuar los resultados por medio de un factor de conversión para cada laboratorio del mundo (*BCR-ABL*) teniendo como referencia MMR > 0,1% (IRIS):**

Adelaide	0.08%	$0.1/0.08 = 1.25$	$BCR-ABL^L \times 1.25$
Mannheim	0.12%	$0.1/0.12 = 0.83$	$BCR-ABL^L \times 0.83$
London	0.045%	$0.1/0.045 = 2.22$	$BCR-ABL^L \times 2.22$



# Respuesta molecular (ELN 2013)

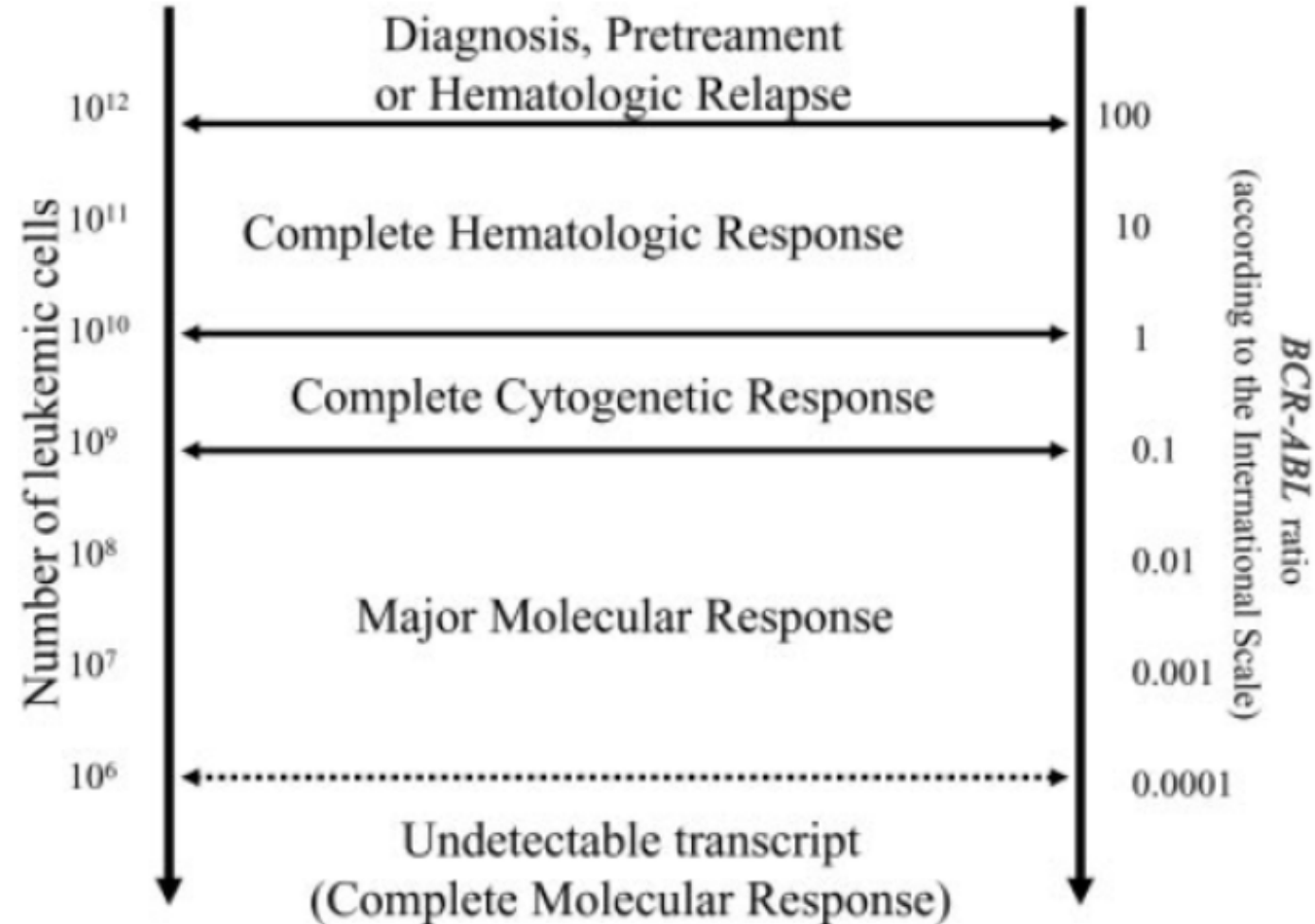
- Mayor (RMM): cociente de BCR-ABL respecto a ABL es  $\leq 0,1\%$  en la escala internacional.
- Completa (RMC): transcritos de mRNA de BCR-ABL no detectables en dos muestras sanguíneas consecutivas de calidad adecuada.

# Relación entre el nivel de *BCR-ABL1* y la respuesta Citogenética

- Estrecha correlación
- Útil ante la ausencia de citogenética.

RESPUESTA CITOGÉNÉTICA	
<i>BCR-ABL1</i> <sup>IS</sup> >10%	No respuesta Citogenética Mayor
<i>BCR-ABL1</i> <sup>IS</sup> >1% ≤10%	Respuesta Citogenética Mayor
<i>BCR-ABL1</i> <sup>IS</sup> ≤1%	Respuesta Citogenética Completa

# Relación aproximada entre número de células leucémicas y nivel de transcritos



Respuesta hematológica	Respuesta citogenética*	Respuesta molecular**
<b>Completa:</b>  Plaquetas $< 450 \times 10^9/L$  Leucocitos $< 10 \times 10^9/L$  No presencia de granulocitos inmaduros  Basófilos $< 5\%$  Bazo no palpable	<b>Completa (RCC):</b> metafases Ph+ 0%	<b>Mayor (RMM)***:</b> <i>BCR-ABL</i> $\leq 0.1\%$  <b>Completa (RMC):</b> transcritos de <i>BCR-ABL</i> no cuantificables o indetectables
	<b>Parcial (RCP):</b> metafases Ph+ 1-35%	
	<b>Menor (RCm):</b> metafases Ph+ 36-65%	
	<b>Mínima (RCmin):</b> metafases Ph+ 66-95%	
	<b>Sin respuesta:</b> metafases Ph+ $> 95\%$	
	<b>RC mayor (RCM) =</b> RCP + RCC	

# Respuesta al tratamiento ITK

- **Respuesta óptima:**

- 3 meses: BCR/ABL <10%, Ph+ >35%
- 6 meses: BCR/ABL <1%, Ph+ 0% (RCC)
- 12 meses: : BCR/ABL <0.01% (RMM)
- Los controles de la enfermedad aseguran supervivencia a largo plazo adecuada.

- **Respuesta subóptima:**

- No RCg a los 3 mese
- Menos de RCP a los 6 meses y 12 meses
- Menos de RMM a los 18 meses
- Se desconoce si paciente evolucionara a fracaso o a respuesta optima (etapa transitoria), puede ser necesario un cambio en tto

- **Fallo o fracaso:**

- No RHC a los 3 meses
- Perdida de RHC, RCC, RMM, mutaciones nuevas, ACA, Ph+
- Cambio de tratamiento o transplante alogénico

# RESISTENCIA A ITK:

- No rpta hematológica completa a los 3 m
- No rpta citogenética a los 6 m
- No rpta citogenética mayor a los 12 m
- OPCIONES:
- Análogos de Imatinib: Dasatinib, Nilotinib
- Asociación de Imatinib con Interferón o Ara-C

Definiciones de respuesta a los ITC **en primera línea** y en 2ª línea en caso de intolerancia, todas las fases (FC, FA y CR)

Tiempo	Respuesta óptima	Advertencia	Fracaso
Basal		Alto riesgo Ruta mayor ACA/Ph+	
3 meses	BCR-ABL <sup>IS</sup> ≤10%* Ph+ ≤35% (RCP)	BCR-ABL <sup>IS</sup> >10%* Ph+ 36-95%	No RHC* Ph+ >95%
6 meses	BCR-ABL <sup>IS</sup> <1%* Ph+ 0% (RCC)	BCR-ABL <sup>IS</sup> 1-10%* Ph+ 1-35%	BCR-ABL <sup>IS</sup> >10%* Ph+ >35%
12 meses	BCR-ABL <sup>IS</sup> ≤0.1%* (RMM)	BCR-ABL <sup>IS</sup> 0.1-1%*	BCR-ABL <sup>IS</sup> >1%* Ph+ >0%
A partir de entonces, en cualquier momento	RMM o mejor	ACA/Ph- (-7, or 7q-)	Pérdida de RHC Pérdida de RCC Pérdida de RMM**, confirmada Mutaciones ACA/Ph+

\*y/o \*\*en 2 pruebas consecutivas, una de ellas ≥1% IS IS: BCR-ABL en la Escala Internacional

# Resistencia primaria

- NO remisión hematológica despues de 3-6 meses de iniciado tto (NCCN2015)
- 15-25% no logra RCg
  - Inadecuada concentración plasma de imatinib (defecto de la glicoproteina alfa1)
  - Concentración disminuida TK intracelular: defecto proteínas transporte ATP binding cassette: MDR1, hOCT1

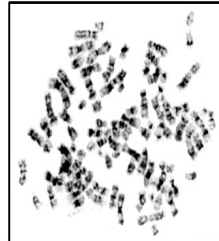
# Resistencia secundaria

- *No se excluye de la primaria (fases de evocución)*
- Mutaciones del dominio TK de la fusión génica BCR/ABL
- Adquisición de PH adicionales



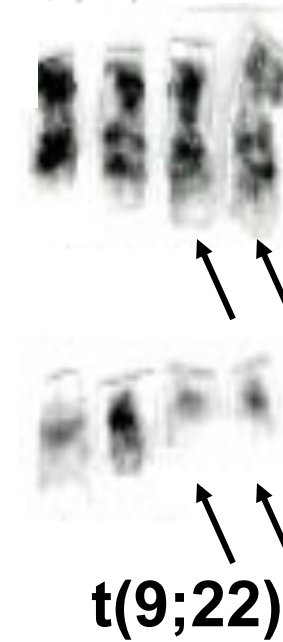
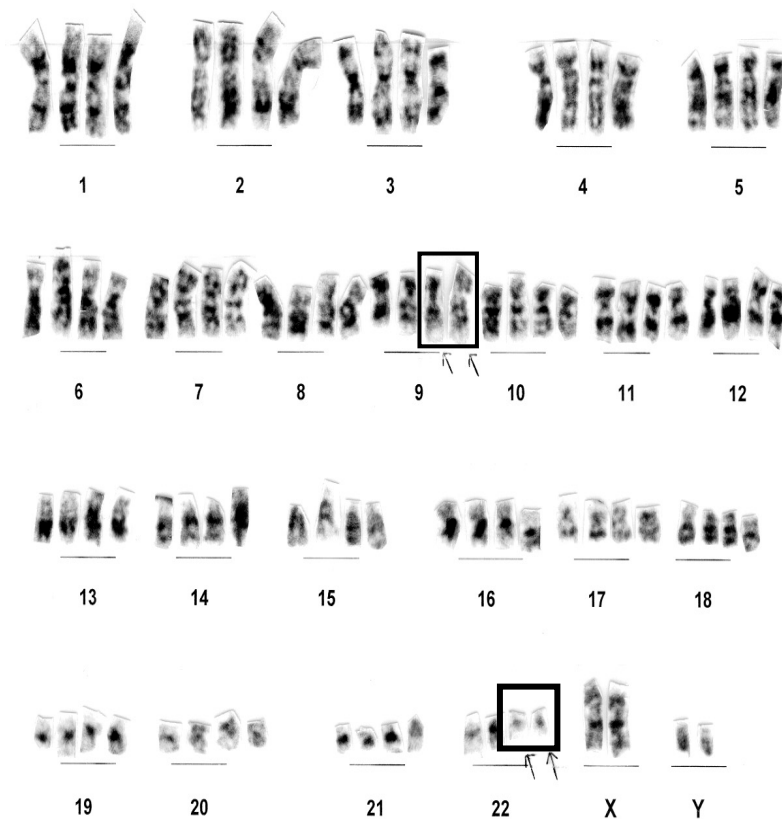


“DR. EDUARDO CACERES GRAZIANI”



**92,XXYY, t(9;22)(q34;q11), t(9;22)(q34;q11)**

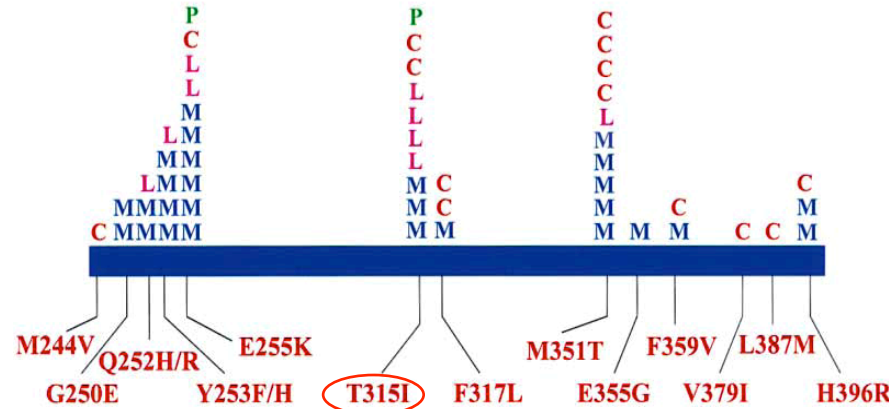
## LMC (doble Ph)



BCR

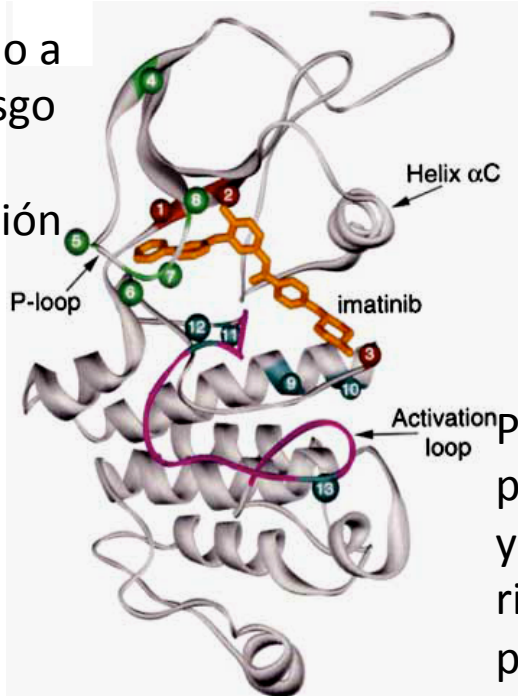


ABL

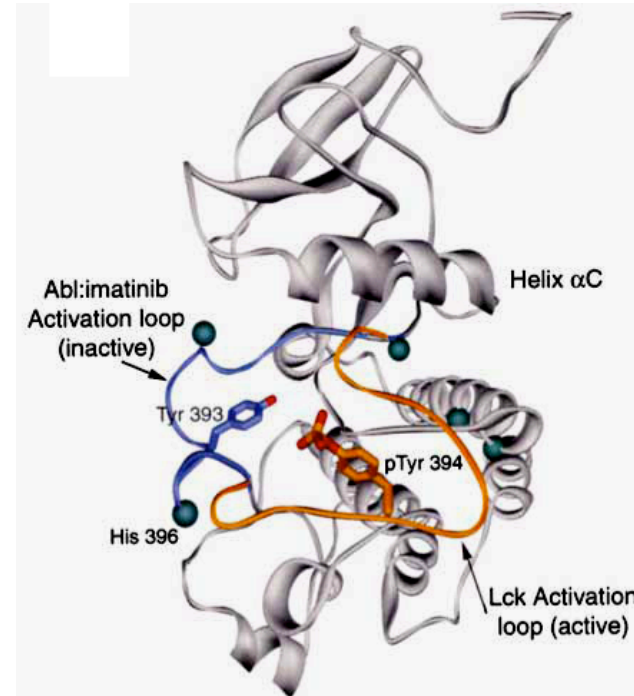


Dominio cinasa  
207 – 507 aa

Asociado a alto riesgo de progresión



Pobre pronóstico y alto riesgo de progresión



# Mutaciones más frecuentes en BCR-ABL que confieren Resistencia

	imatinib (nM)	nilotinib (nM)	dasatinib (nM)		imatinib (nM)	nilotinib (nM)	dasatinib (nM)
Native Bcr-Abl	260	13	0.8	317F>L	1050	50	7.4
244M>V	2000	38	1.3	317F>V	350 <sup>†</sup>	nd	53 <sup>†</sup>
250G>E	1350	48	1.8	315M>T	880	15	1.1
252Q>H	1325	70	3.4	355E>G	2300 <sup>‡</sup>	nd	1.8 <sup>§</sup>
253Y>F	3475	125	1.4	359F>V	1825	175	2.2
253Y>H	>6400	450	1.3	379V>I	1630	51	0.8
255E>K	5200	200	5.6	387L>M	1000	49	2
255E>V	>6400	430	11	396H>P	850	41	0.6
299V>L	540 <sup>†</sup>	nd	18 <sup>†</sup>	396H>R	1750	41	1.3
311F>L	480	23	1.3				
315T>A	971	61	125 <sup>†</sup>				
315T>I	>6400	>2000	>200				

■ Sensitive   
 ■ Intermediate sensitivity   
 ■ Insensitive

Se detecta por secuenciación de gen de fusión BCR/ABL

Mutation Incidence for Imatinib

E

Mutation Incidence for Dasatinib

Criteria Defining Treatment Failure

Mutation Incidence for Nilotinib

Criteria Defining Treatment Failure

Mutation	Number	Mutation	Number of Patients	Criteria Defining Treatment Failure												
				Mutation	Composite			MCyR			CCyR			Other		
					Number of Patients Exposed to Treatment	Composite Mutations	Incidence (%)	Number of Patients Exposed to Treatment	Number of Mutations	Incidence (%)	Number of Patients Exposed to Treatment	Number of Mutations	Incidence (%)	Number of Patients Exposed to Treatment	Number of Mutations	Incidence (%)
M244V		M244V	3													
L248V		L248V	3													
G250E		G250E	3													
Q252H		Q252H	3	M244V	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
Y253F		Y253F	3	L248V	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
Y253H		Y253H	3	G250E	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
E255K		E255K	3	Q252H	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
E255V		E255V	3	Y253F	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
D276G		D276G	3	Y253H	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
V299L		V299L	3	E255K	61	1	1.64	61	0	0	61	0	0	61	1	1.64
T315A		T315A	3	E255V	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
T315I		T315I	3	D276G	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F317L		F317L	3	V299L	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F317C		F317C	3	T315A	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F317I		F317I	3	T315I	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F317V		F317V	3	F317L	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
M351T		M351T	3	F317C	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
E355G		E355G	3	F317I	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F359C		F359C	3	F317V	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F359V		F359V	3	M351T	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F359I		F359I	3	E355G	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
H396R		H396R	3	F359C	61	1	1.64	61	0	0	61	0	0	61	1	1.64
E450G		E450G	3	F359V	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
F459K		F459K	3	F359I	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
CCyR=complete		H396R	3	E450G	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
		F459K	3	F459K	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
				H396R	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
				E450G	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0
				F459K	61	0	0	61	0	0	61	0	0	61	0	0

CCyR=complete cytogenetic response; MCyR=major cytogenetic response.

# CONCLUSIONES

- Tanto la CG como los test moleculares constituyen los pilares de seguimiento en LMC.
- Es necesaria la evaluación CG en cada uno de los controles: ACAs o evoluciones clonales.
- Es recomendable el uso de escala internacional y factores de conversión.
- Con el advenimiento de nuevas metodologías se hace más sencillo el estudio de resistencia al tratamiento.



EQUIPO FUNCIONAL DE  
GENÉTICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

- Equipo  
Oncohematología –  
Laboratorio de Biología  
Molecular
  - Blga. Kenny Dongo
  - Blga. Yubell Alvarez
  - Blga. Silvia Dávila
  - Blgo. César Ortiz
  - Blgo. Julio Mendoza