

Biología de la leucemia mieloide crónica

Biology of chronic myeloid leukemia

Bianchini M

CIO-FUCA (Instituto Alexander Fleming) CABA, Argentina

mbianchini@conicet.gov.ar



NEOPLASIAS
MIELOPROLIFERATIVAS

HEMATOLOGÍA
Volumen 21 N° Extraordinario: 294-307
XXIII Congreso Argentino
de Hematología
Noviembre 2017

Palabras claves: leucemia,
biomarcadores,
microRNA.

Keywords: leukemia,
biomarkers,
microRNA.

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa de origen clonal que se origina a partir de una lesión genética, el cromosoma Philadelphia (Ph1), que ocurre en una célula madre hematopoyética (LSC, *leukemic stem cell*). Mundialmente, la LMC tiene una incidencia que va de uno a dos casos por cada 100.000 personas por año y es responsable del 15% de los casos de leucemia en pacientes adultos. Gracias a la introducción de los inhibidores de tirosín-quinasa (ITK, p.ej. imatinib, nilotinib y dasatinib) y a la existencia de valiosas herramientas moleculares de diagnóstico y monitoreo de los pacientes, la tasa de mortalidad se redujo

significativamente en los últimos 15 años. Sin embargo, a pesar de la extraordinaria eficacia terapéutica de los ITKs, el manejo clínico de pacientes con LMC se enfrenta todavía a tres grandes desafíos: 1) resistencia a la terapia: entre un 10-15% de los pacientes con LMC no responde al tratamiento con ITKs, debido, en la mayoría de los casos, a la selección de clones mutados (p.ej. la mutación T315I en el dominio quinasa del ABL1); 2) progresión de la enfermedad: los pacientes que progresan a crisis blástica no son candidatos a las terapias dirigidas y la única opción es el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, que se asocia con una ele-

vada morbilidad y mortalidad; 3) la persistencia de clones leucémicos: en pacientes respondedores a la terapia y con enfermedad mínima residual indetectable, la persistencia de células leucémicas impide en la mayoría de los casos la posibilidad de discontinuar el tratamiento en forma segura. La persistencia se debe a la incapacidad de los ITKs de eliminar las LSCs; estas células se caracterizan por ser quiescentes, independientes de la actividad tirosín-quinasa de la oncoproteína quimérica, y por ubicarse en el nicho de la médula ósea. Tratar de solucionar estos desafíos pendientes requiere de un elevado nivel de estandarización de las metodologías, una caracterización específica de los mecanismos moleculares de resistencia al tratamiento y persistencia de las LSCs, y una mejor comprensión de la biología de la enfermedad, en particular a nivel del sistema inmunológico del paciente (inmunobiología).

Hipótesis de trabajo

Nuestra hipótesis es que la frecuencia y el nivel de expresión de BCR-ABL1 de las LSCs podrían asociarse a una biología diferente de la enfermedad y, por lo tanto, serían útiles como biomarcador, tanto a nivel pronóstico de evolución de la enfermedad así como predictivo de la respuesta al tratamiento, en pacientes tratados con ITKs. La carga leucémica inicial a nivel de células madre y sus características moleculares estarían asociadas a la cinética de respuesta al tratamiento y a la capacidad de discontinuar la terapia en forma segura. De tal modo que la cuantificación de este compartimento celular muy primitivo, podría ser útil para complementar, junto con la cuantificación molecular clásica (RT-qPCR), el pronóstico de pacientes bajo tratamiento. Esto podría traducirse en un mejor control de la enfermedad a largo plazo, una menor tasa de resistencia y menor frecuencia de progresión y, posiblemente, llevar a un mayor número de pacientes a poder discontinuar el tratamiento en forma segura.

En base a nuestra hipótesis, con el uso de los ITKs la erradicación de la enfermedad se puede lograr sólo en raros casos; poder eliminar definitivamente las LSCs implicaría combinar los ITKs con otros tratamientos, o bien recurrir a abordajes terapéuticos alternativos. Para esto se impone un mejor conocimiento de la biología y genética de las LSCs, que representan hoy el último obstáculo hacia la curación “funcional” de la enfermedad (Goldman, 2006). Sin

embargo, nuestra hipótesis es que para conseguir la curación “operativa” de pacientes con LMC no es necesario lograr la erradicación de las LSCs; ya que aun cuando las LSCs persisten en la sangre del paciente, éstas no representarían siempre un peligro de recaída o progresión de la enfermedad. Esto podría deberse a múltiples causas, como por ejemplo al sistema inmunológico del paciente, que podría retomar el control de la enfermedad, al vencer la inmunotolerancia que en algún momento posibilitó la expansión del clon leucémico (Hughes, 2017), o bien a la selección de clones leucémicos altamente quiescentes (Zhang, 2016), que expresan niveles muy bajos de BCR-ABL1 y, “exhaustos”, no representan por lo tanto un peligro de progresión (Warfvinge, 2017).

Relevancia del problema y aportes originales de nuestro grupo

El BCR-ABL1 es un oncogén quimérico proveniente de la translocación cromosómica t(9;22)(q34;q11); la tirosina quinasa resultante es una proteína que conduce a la activación de señales que transforman las HSCs (O'Hare, 2012). La actividad del BCR-ABL1 en las HSCs causa la LMC, la cual si no es tratada inexorablemente progresa y se vuelve mortal. Los ITKs, como el imatinib, representan hoy el estándar terapéutico de la LMC, posibilitando mejorar significativamente la sobrevida de los pacientes (Druker, 2006). Sin embargo estos tratamientos, utilizados como monoterapias, no son capaces de eliminar las LSCs (Graham, 2002), responsables de mantener la enfermedad indefinidamente, e incrementando sensiblemente el costo necesario para sostener la remisión molecular del paciente. Aproximadamente, sólo un 20% de los pacientes tratados en fase crónica con ITKs logran las condiciones para discontinuar la terapia; sin embargo, menos de la mitad de ellos mantienen la remisión molecular luego de la suspensión (Mahon, 2010), reafirmando la necesidad de una mejor comprensión de la biología de las LSCs y del significado que tendría su abundancia en condicionar las diferentes cinéticas de repuesta molecular a los ITKs, la posibilidad de alcanzar una respuesta molecular indetectable, y discontinuar en forma segura el tratamiento. Además, nuevas evidencias sugieren que la LMC es una patología más compleja de lo que se presumía, cuando todo parecía depender sólo del BCR-ABL1 (Foley, 2013). Efectivamente, pese a que histórica-

mente la LMC ha sido considerada un modelo de neoplasia causado por un único evento genético, hoy tenemos al menos tres evidencias que sugieren que BCR-ABL1 no sería el único responsable de la enfermedad. Primero, aproximadamente en un 30% de individuos sanos las células de la sangre pueden ser positivas para BCR-ABL1 (Bayraktar, 2010; Biernaux, 1995; Bose, 1998). Segundo, muy raras veces se puede alcanzar la curación definitiva con el solo uso de los inhibidores de tirosina quinasa (Savona, 2008). Tercero, niveles de expresión crónicamente bajos del BCR-ABL1 en las LSCs reafirman la independencia de estas células y explicarían la persistencia bajo tratamiento (Kumari, 2012). Estos datos sugieren, por lo tanto, que además de la presencia del BCR-ABL1, cambios moleculares ulteriores podrían ser necesarios para el desenlace de la enfermedad, su progresión y su persistencia. Además, teniendo particularmente en cuenta que la supervivencia de las LSCs es independiente de la actividad tirosín quinasa del BCR-ABL1 (Corbin, 2011) y que BCR-ABL1 puede ser oncogénico sin necesidad de su señal tirosín-quinasa (Neviani, 2013), formulamos una hipótesis en base a la cual el evento genético de la translocación que genera el cromosoma Philadelphia provocaría, además, otras alteraciones independientes del BCR-ABL1. Entre ellas, por ejemplo, un desbalance en la expresión de los microRNAs localizados en las porciones genómicas que migran, debido al cambio del contexto genómico en el que pasan a ubicarse luego de este evento. Estas alteraciones asociadas a la translocación no estarían relacionadas con la actividad quinasa de BCR-ABL1, sino que representarían un efecto secundario del intercambio de material entre los cromosomas 9 y 22. Como las poblaciones más primitivas son las responsables de la persistencia a las terapias, la caracterización de la expresión de estos miRNAs en poblaciones celulares primitivas de médula ósea, posibilitaría identificar dianas específicas de células leucémicas que no sean compartidas con las células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cell*). Por último, en este contexto no podemos desatender el papel del sistema inmunológico, siendo que las LSCs pueden sobrevivir a pesar de compartir y estar permanentemente en contacto con células inmunológicas. En la LMC el linaje linfoide no está directamente afectado por el BCR-ABL1, siendo que las LSCs son incapaces de diferenciarse hacia

este linaje, por lo tanto los linfocitos (p. ej. CD56+, CD8+, CD4+) provienen de las HSC normales. Efectivamente, cada vez hay más evidencias de la importancia del sistema inmunológico en facilitar el desenlace de la LMC, su progresión y eventualmente su erradicación definitiva. Al diagnóstico de la enfermedad, antes de comenzar cualquier tratamiento, el sistema inmunológico de los pacientes con LMC muestra múltiples alteraciones, inducidas principalmente por las mismas células leucémicas. Los ITKs, al remover las células leucémicas, indirectamente logran normalizar el sistema inmunológico del paciente (Vonka, 2015). Sin embargo, este conjunto de alteraciones inmunológicas presenta diferencias entre los pacientes y, por lo tanto, creemos que podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad y su pronóstico (Rea, 2017). Dado que no se conoce la duración del intervalo entre el evento genético de la translocación y la aparición de los síntomas clínicos relacionados con la enfermedad, podemos solamente suponer que las alteraciones inmunológicas constituyen una serie de eventos que gradualmente entran en el proceso patológico y contribuyen a la progresión de la enfermedad, al reducir la capacidad del sistema inmunológico de controlarla a medida que la progresión de la misma lo debilita todavía más. Si esta hipótesis es correcta, el desarrollo de la enfermedad y la alteración del sistema inmunológico serían dos procesos paralelos que se condicionan mutuamente. Por eso un mejor entendimiento de la inmunobiología de la LMC podría ayudar a una definición más personalizada del estado actual de la enfermedad en cada paciente. Esto posibilitará también un diseño más apropiado de qué tipo de inmunoterapia utilizar en cada caso y el momento más oportuno para hacerlo; la discontinuación de la terapia es, a nuestro entender, un momento crítico de la evolución del paciente y, teniendo en cuenta que todavía no existen herramienta pronósticas seguras, consideramos que la caracterización del sistema inmunológico podría representar una herramienta clínica nueva y valiosa.

LMC biología y tratamiento. La LMC suele afectar a la población de edad media y la aparición de la enfermedad se da entre los 45 y 55 años. Cada año en la Argentina se diagnostican unos 400 casos nuevos de LMC. Hoy sabemos que es una neoplasia de las células hematopoyéticas, que se origina en una célula madre hematopoyética a partir de una abe-

rración cromosómica conocida como cromosoma Philadelphia (producto de la translocación recíproca t(9;22)(q34;q11)) que lleva a la formación de un gen quimérico, conocido como BCR-ABL1 (Nowell, 1960; Rowley, 1973), cuyo producto es una onco-proteína (p210, en más del 95% de los casos de LMC) que mantiene activo el dominio tirosín-quinasa de ABL1, independientemente de las señales externas. El reconocimiento de la p210 como causa única y suficiente para el desarrollo de la enfermedad, impulsó el diseño de moléculas dirigidas (p.ej. imatinib) a este blanco molecular específico, capaces de inhibir su actividad quinasa (Sawyers, 1999). El estudio IRIS (*International Randomised Study of Interferon versus STI571*) realizado para valorar la eficacia terapéutica de imatinib en comparación con interferon y citarabina, después de casi 11 años de seguimiento mostró una sobrevida global del 83,3% para los pacientes de la rama imatinib y efectos tóxicos muy despreciables (O'Brien, 2003; Druker, 2006; Hochhaus, 2017). Algunos años más tarde, el desarrollo de ITKs de segunda generación, principalmente nilotinib y dasatinib, y su aplicación en pacientes recién diagnosticados, mostró producir respuestas más rápidas y efectivas, con mayores beneficios de supervivencia sin aumento de efectos secundarios (Larson, 2012; Kantarjian, 2012).

Monitoreo de la respuesta a los ITKs y estandarización. Debido a la acción antitumoral potente de estos tratamientos, los pacientes entran rápidamente en remisión citogenética completa (RCC, 0% de metafases Ph+), por lo tanto para el seguimiento ulterior de la enfermedad se hizo necesaria la implementación de una metodología más sensible. Efectivamente, hoy el monitoreo de la enfermedad residual en pacientes que alcanzaron la RCC, se realiza mediante RT-qPCR (Branford, 2006). La determinación de los niveles de expresión del transcripto quimérico en sangre periférica refleja fehacientemente la abundancia relativa del clon leucémico y, por lo tanto, permite definir la respuesta molecular al tratamiento; la profundidad de esta respuesta y el tiempo necesario para alcanzarla son factores pronósticos útiles a la hora de definir una respuesta óptima, sub-óptima o falla del tratamiento (Baccarani, 2009; Baccarani, 2013). Entre estos factores pronósticos, el más significativo es la respuesta molecular mayor (RMMa; BCR-ABL1/gen control < 0,1%) que hoy representa uno de los primeros objetivos clíni-

cos a alcanzar. Además de estas cuestiones pronósticas importantes, el IRIS evidenció la necesidad de una armonización de las metodologías de RT-qPCR. Efectivamente, los resultados moleculares obtenidos en el IRIS son reportados de acuerdo a metodologías armonizadas a una escala única de referencia, conocida como escala internacional (IS, del inglés *International Scale*). La IS representa un método práctico y teóricamente adoptable por cualquier centro, que mejora significativamente la comparabilidad de los resultados de RT-qPCR de diferentes laboratorios; sin embargo para su adopción se requiere el cálculo de un factor de conversión (FC). Por tal motivo "*The first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL1 mRNA*" fue aprobado por una comisión de expertos de la WHO en 2009 (White HE, 2010); este material de referencia universal está disponible como calibradores "primarios" de la WHO con el propósito de poder calcular el FC a la escala internacional. Sin embargo, la dificultad en producir este material biológico, sumado a la gran demanda, obligó a la organización internacional a reducir su ambicioso proyecto de estandarización mundial y limitar la disponibilidad de los primarios solamente para aquellos centros que puedan producir calibradores "secundarios", es decir que cuenten con las herramientas y *know-how* necesarios para generar calibradores derivados de los primarios (Cross, 2016; Ruiz, 2016). Considerando la importancia pronóstica que tiene la valoración cuantitativa de los niveles de transcripto BCR-ABL1 en sangre periférica, desde el año 2013 estamos liderando un programa para la estandarización de la RT-qPCR. En Argentina, por primera vez, gracias a la colaboración entre academia (Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires), investigación y desarrollo (CIO-FUCA, Instituto A. Fleming de Buenos Aires) y farmacéutica (Novartis Argentina) se concibió una iniciativa que permitió generar calibradores secundarios para que todos aquellos laboratorios que quieran realizar el monitoreo molecular de la LMC puedan hacerlo de acuerdo a la IS. El material en cuestión es concebido con los mismos criterios de los calibradores primarios de la WHO y distribuido localmente con el soporte técnico necesario para su correcto uso e interpretación. Finalmente, el material que entregamos a los laboratorios para la armonización es liofilizado en el CIO-FUCA; actualmente contamos con 26

laboratorios (provenientes de 10 países latinoamericanos diferentes, Argentina, Uruguay, Paraguay, Chile, Costa Rica, Panamá, Guatemala, Colombia, Ecuador y Perú) estandarizados a la escala internacional mediante nuestros calibradores secundarios (Ruiz, 2016).

Un estudio de Marin y col. (2012) mostró que el valor del cociente del 10% después de 3 meses de comenzado el tratamiento con ITKs permite separar un grupo de buen pronóstico (<10% BCR-ABLIS) con un 93,3% de supervivencia total después de 8 años de seguimiento vs. un grupo de mal pronóstico (>10% BCR-ABLIS) con sólo un 56,9% de supervivencia total. Para el grupo de buen pronóstico la conducta es relativamente fácil, seguir con el tratamiento y los controles; sin embargo, no tan simple es tomar una decisión apropiada para aquéllos que no logran reducir los niveles de transcritos por debajo del 10%. A pesar que algunos médicos consideran esto una falla del tratamiento y, por lo tanto, aconsejan una conducta conocida como “*hit hard and early*” (Hanfstein, 2012), es decir un cambio inmediato a ITKs más potentes o dosis más altas, estas conductas no están todavía validadas por resultados de ensayos clínicos y existe por lo tanto mucha controversia al respecto. En este contexto, hay evidencias preliminares que sugieren que la determinación de la carga de LSCs, puede ser un marcador válido para definir tempranamente la conducta terapéutica, complementando la determinación molecular en sangre periférica (Mustjoki, 2013, Thielen, 2016). Estos autores muestran que los pacientes con alta carga de LSC al diagnóstico tienen una peor respuesta citogenética y molecular y una elevada toxicidad al tratamiento.

Respuesta molecular profunda y discontinuación de la terapia. En la actualidad, muchos pacientes bajo tratamiento con ITKs alcanzan una respuesta molecular completa (RMC), persistente en el tiempo, sugiriendo la erradicación de la enfermedad. Sin embargo, es necesario remarcar que la no-detección del transcripto BCR-ABL1 no necesariamente significa erradicación del clon leucémico. Por esta razón es más correcto hablar de respuesta molecular indetectable, y definir el nivel de respuesta molecular teniendo en cuenta la sensibilidad que se pudo alcanzar en la medición de la muestra (p.ej. RM4.0, RM4.5 y RM5.0) (Cross, 2015). Estas observaciones tienen un impacto clínico importante con res-

pecto a la discontinuación de la droga; en base al estudio STIM (*S*Top *I*Matinib), sólo un 40% de los pacientes permanece libre de enfermedad al suspender el tratamiento, mientras que en el 60% restante reaparece el clon leucémico original (Mahon, 2010). A pesar de que estos pacientes, luego de la re-introducción de la medicación, vuelven a responder, se consideran pacientes en riesgo de enfermedad, para los cuales la cesación de la terapia no fue una decisión acertada. Estos datos sugieren que los ITKs son capaces de controlar la enfermedad, a través de la inhibición de la proliferación de células en división, pero son incapaces de eliminar el clon leucémico madre. Hay modelos matemáticos que avalan esta hipótesis, mostrando que durante el tratamiento con imatinib, la reducción de los transcritos BCR-ABL1 sigue un perfil bifásico (Stein, 2011). Este modelo matemático apoya la teoría de la existencia de dos poblaciones celulares con susceptibilidad diferente al tratamiento con ITKs. Las células diferenciadas más maduras son eliminadas rápidamente por el fármaco, mientras que las células más primitivas sobreviven principalmente en virtud de su estado de quiescencia (Tang, 2011). Recientemente, Minami y col. (2012) demostraron que este perfil bifásico se puede encontrar también dentro de la población más primitiva (definida fenotípicamente como CD34+ CD38-), sugiriendo que internamente al compartimento de células madre existe una población de LSC proliferantes y otra población de células más quiescentes. Interesantemente ellos mostraron que los ITKs de segunda generación serían más efectivos con respecto al imatinib en eliminar las poblaciones celulares más quiescentes, pudiendo inducir apoptosis en estas células; por lo tanto los ITKs de segunda generación podrían ser una herramienta más efectiva con el fin de eliminar tempranamente las LSCs (Defina, 2012; Thielen, 2016). Recientemente, Chomel y col. (2011) demostraron, a través de la caracterización molecular de colonias en metilcelulosa (ensayo LTC-IC), la persistencia de LSCs aun en pacientes con RMC a nivel de sangre periférica. Al poco tiempo Kumari y col. (2012) publicaron un trabajo donde realizaron un análisis detallado de los niveles de expresión de BCR-ABL1 en CFU-C (*Colony Forming Unit in Culture*) es decir en células progenitoras, tanto en pacientes con RMMa así como en pacientes al diagnóstico. Llamativamente, ellos encontraron que las colonias de pacientes

en RMMa expresaban niveles más bajos de BCR-ABL1 con respecto al diagnóstico. Posteriormente, Chomel y col. (2012 y 2016) publicaron otros trabajos donde demostraron que tanto las LSCs como los precursores hematopoyéticos más maduros, expresan significativamente menos BCR-ABL1 con respecto a los mismos compartimentos celulares provenientes de pacientes resistentes a los ITKs. Estos resultados pueden ser interpretados de la siguiente manera: altos niveles de expresión del BCR-ABL1 son incompatibles con la persistencia de clones leucémicos bajo tratamiento con imatinib, mientras que niveles bajos de BCR-ABL1 contribuyen a la resistencia intrínseca a los inhibidores. Sin embargo, en las células más primitivas habría una reducción del transcripto quimérico todavía más pronunciada con respecto a las progenitoras, pudiendo representar un mecanismo que previene la eliminación del clon leucémico; esto sugiere también que, en el contexto de la discontinuación, son necesarios estudios que correlacionen la evolución de la enfermedad con los

niveles de transcriptos BCR-ABL1 en las LSCs. A pesar de estos estudios interesantes, estos resultados no permiten demostrar si la quiescencia es la causa de la resistencia o bien un fenómeno secundario no implicado directamente en la resistencia. A este respecto, Corbin y col. (2011) demostraron que la supervivencia de las LSCs es independiente de la actividad quinasa de la p210. Estos resultados indican que el imatinib puede llegar a las LSCs, entrar en ellas e inhibir la actividad quinasa de la p210, tanto en células quiescentes como en células proliferantes de ambos compartimentos, progenitoras y células madre, sin embargo, estas últimas no son “adictas” a las señales de la proteína oncogénica y, por lo tanto, no son eliminadas tan rápidamente como ocurre en las células más diferenciadas.

En estos 3 últimos años nuestra labor se orientó al estudio de las LSC en la médula ósea de pacientes con LMC, mediante ensayos de cultivo de largo término (LTC-IC, *Long Term Culture-Initiating Cells*) (**Figura 1**).

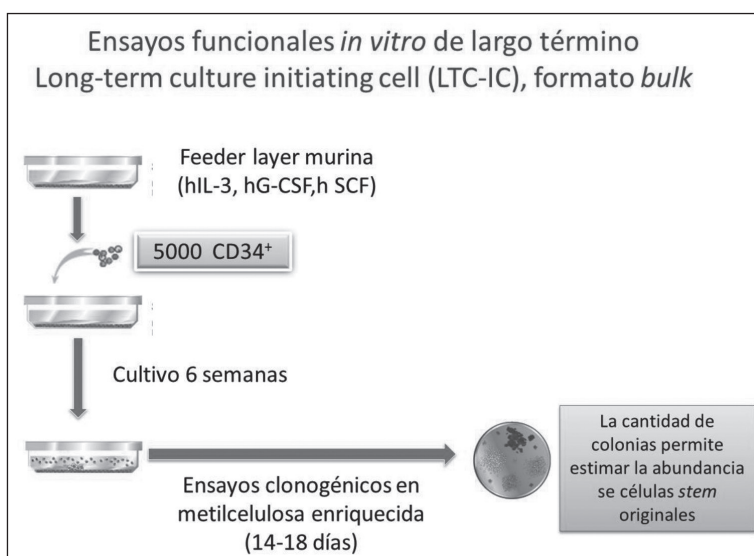


Figura 1

Uno de los resultados más interesante que surgió de este estudio es el reconocimiento de la baja expresión de BCR-ABL1 en la fracción primitiva de células hematopoyéticas en pacientes bajo tratamiento con ITKs. Este fenómeno puede explicarse por la ocurrencia de dos procesos que serían simultáneos: el primero, la disminución en la frecuencia de LSCs conforme el paciente responde al tratamiento con ITKs. Mediciones realizadas por nosotros mediante FISH en *pools* de colonias, sumado a los resultados de trabajos publicados por otros grupos, sugieren

que la frecuencia de LSCs que expresan BCR-ABL1 es baja. El segundo, la disminución en los niveles de expresión de BCR-ABL1 en la fracción primitiva a nivel de células individuales. Nuestros resultados sugieren que las colonias individuales provenientes de LTC-IC expresan niveles bajos de BCR-ABL1, lo cual podría explicarse según el modelo que admite la selección de clones leucémicos de baja expresión en presencia de ITKs (Ruiz, 2015a, Ruiz 2015b). Estos resultados preliminares sugieren reconsiderar los abordajes moleculares para la evaluación de per-

sistencia de la enfermedad en pacientes candidatos a discontinuación del tratamiento; nosotros sugerimos que esta evaluación podría ser complementada mediante la medición, a nivel de DNA y no RNA, de células primitivas Ph⁺. Aunque la presencia del rearrreglo original a nivel de DNA genómico ha sido demostrada en pacientes en remisión y libres de tratamiento, se desconoce si las células persistentes, portadoras del rearrreglo, corresponden a células terminales diferenciadas, incapaces de reanudar el desarrollo de la enfermedad, o a células primitivas con potencial de autorrenovación. Por otro lado, estas mediciones también podrían resultar de utilidad para complementar el pronóstico temprano en pacientes con LMC tratados con ITKs, en particular para aquellos casos que no alcanzan ciertos objetivos (*endpoints*) moleculares de relevancia clínica (p.ej. <10% BCR-ABL1/ABLIS a los 3 meses). Actualmente, estos resultados preliminares son objeto de una publicación científica que estamos por enviar para su publicación. Sin embargo, con este subsidio contamos seguir reclutando pacientes con el propósito de aumentar el poder estadístico de nuestro ensayo y poder eventualmente trasladarlo a una aplicación clínica relevante.

Rol del sistema inmunológico en el control de la LMC. Otro aspecto importante de la biología de la LMC tiene que ver con las diferentes vías de escape utilizadas por las células leucémicas para evadir la inmunovigilancia. Al igual que en otros tumores, uno de estos mecanismos de escape consiste en la supresión de células del sistema inmunológico; efectivamente, ya al diagnóstico, los pacientes muestran una funcionalidad comprometida de las células NK y linfocitos T (CD8⁺ y CD4⁺) debido a la expresión de receptores de muerte programada como PD-1 y un aumento en la fracción de células T-regulatorias y células supresoras derivadas de células mieloides (Christiansson, 2013). Antes de la era de los ITKs los pacientes con LMC eran tratados principalmente con interferón- α (IFN- α). El IFN- α es una citoquina conocida por su efecto inmunomodulatorio; a pesar de que sólo una minoría de los pacientes tratados con IFN- α respondía bien al tratamiento, cuando lo lograban, una fracción de ellos era capaz de discontinuar el tratamiento y permanecer en remisión. Interesantemente en estos pacientes se observó un incremento de células NK y células T efectoras de memoria (Kreutzman, 2011a; Ilander, 2014). Re-

cientemente se ha demostrado que el inhibidor de segunda generación, dasatinib, tiene efecto inmunomodulatorio (Kreutzman, 2011b; Mustjoki, 2013; Kreutzman, 2014), capaz de inducir una expansión clonal de linfocitos T-CD8⁺ (Kreutzman, 2010). En particular, luego de una única dosis de dasatinib se observó una movilización rápida de linfocitos que varía según la concentración en plasma de la droga (Mustjoki, 2013). Además, durante el pico de concentración plasmática se observó un incremento en la transmigración a través de una capa de células endoteliales y un incremento en la citotoxicidad de células NK. El efecto colateral a nivel inmunológico observado con dasatinib estaría asociado con una mejor respuesta terapéutica en pacientes con leucemias más avanzadas. Estos estudios sugieren que el sistema inmunológico podría jugar un papel importante para el control de la LMC luego de la discontinuación del tratamiento (Hughes, 2017). Un estudio publicado recientemente por el grupo francés denominado IMMUNOSTIM (Rea, 2017) sobre 51 pacientes del ensayo clínico STIM (Mahon, 2010) demostró que los pacientes que pudieron sostener la remisión molecular sin tratamiento, al momento de la discontinuación, eran aquéllos con un número significativamente más alto de células-NK (CD-56^{dim}), mientras que los NK CD56^{bright} y células-T no diferían significativamente. Estos resultados sugieren que las células NK juegan un rol importante en el control de las LSC luego de la suspensión de la terapia; sin embargo, estudios ulteriores son necesarios para descifrar los mecanismos que subyacen a las diferencias funcionales de las células NK entre pacientes.

Monitoreo del sistema inmune en pacientes con cáncer. En cuanto a nuestra experiencia en la caracterización del sistema inmunológico de pacientes oncológicos, contamos con algunos trabajos realizados en otros modelos tumorales, en los cuales hemos caracterizado fenotipo y rol funcional de células del sistema inmunológico, en particular de los NK; recientemente describimos que tanto en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal así como en células linfocitarias infiltrantes en los mismos tumores, el fenotipo y la funcionalidad de los NKs se encuentra alterado, siendo que estas células tienen menor capacidad de producir citoquinas y de degranulación, favoreciendo por lo tanto la progresión de la enfermedad (Rocca, 2013 y 2016). Algo

similar encontramos en un subtipo de cáncer de mama, el cáncer de mama triple negativo, donde los NK serían modulados por el tumor hacia un fenotipo menos citotóxico, en particular en los pacientes con tumores más avanzados. Sin embargo, en modelos murinos demostramos que el uso de ciertas citoquinas (IL-2 y IL-15) podría modular este inmunofenotipo hacia uno más lítico, y la combinación con anticuerpos monoclonales (ej. el cetuximab) actualmente utilizados en terapia humana, podría ser más efectiva en estos pacientes (Roberti, 2012 y 2015). Contamos con poder trasladar nuestra experiencia adquirida en modelos de tumores sólidos al estudio de la inmunología en LMC, siendo que este último es un modelo más sencillo de trabajar por sus características biológicas.

MicroRNA en la LMC. Así como ocurre en otros modelos tumorales, el hallazgo de pequeñas moléculas de RNA, los microRNAs (miRNAs), las cuales regulan la expresión de casi un 30% de los genes (Yu, 2007; Liu 2008), abrió una nueva era en la comprensión de los procesos de regulación génica y sumó un nivel ulterior de complejidad en la interpretación de la leucemogénesis y sensibilidad a los ITKs, al mismo tiempo que ofrece la posibilidad de caracterizar potenciales biomarcadores tumorales nuevos. Los miRNAs son RNAs simple cadena no codificantes de ≈ 22 nucleótidos que regulan varias funciones celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación y apoptosis, al regular la expresión génica. Estos RNAs generalmente silencian múltiples dianas específicas al dirigir la degradación o represión de la traducción de los mRNAs por complementariedad parcial con los mismos (Ambros, 2004). Los miRNAs tienen un rol importante en la hematopoyesis normal, dado que regulan la diferenciación hematopoyética, mientras que la expresión aberrante ha sido asociada con varias enfermedades incluyendo las leucemias (Vasilatou, 2010; Calin, 2008). Por ejemplo, la expresión aberrante de miR-17-92 ha sido asociada a LMC. Los niveles de expresión del factor de transcripción E2F1 (diana de miR-20), aumentan según la dosis luego del tratamiento con anti-miR-20. Estos resultados sugieren que los miembros del clúster miR-17-92 pueden representar un biomarcador y posible diana terapéutica en LMC. De hecho, ya se ha emprendido el primer ensayo clínico en utilizar como diana un miRNA. En el mismo se pretende estudiar el uso po-

tencial de LNA-antimir-122 (*Locked Nucleic Acid anti microRNA 122*) para el tratamiento de hepatitis C. Se han descrito también miRNAs involucrados en la auto-renovación de HSCs. El gen supresor de tumores TP53 tiene un rol importante en la autorrenovación de HSCs y, dado que miR-33a-5p (localizado en la porción translocada del cromosoma 22 en LMC) produce una disminución en su expresión, este miRNA sería relevante para la autorrenovación de HSCs (Herrera, 2010). Más recientemente, algunos trabajos científicos describen nuevas firmas moleculares de microRNAs asociadas con *stemness* y pronóstico en leucemias mieloides agudas (LMA) (Metzler, 2013), así como microRNAs específicos (entre ellos miR126 y miR99) relevantes para la erradicación de LSCs residuales en LMA (de Leeuw, 2014; Khalaj, 2017). Sin embargo, en LMC la caracterización de microRNAs específicos a nivel de LSCs queda todavía pendiente.

Además de los ensayos funcionales como herramienta para aislar LSCs, realizamos la puesta a punto de una estrategia de *gating* por citometría de flujo, que posibilita el aislamiento de poblaciones muy puras; la combinación de diferentes marcadores de superficie, nos permiten separar las LSCs de sus contrapartes normales en pacientes al diagnóstico de la enfermedad (**Figura 2**).

La optimización y validación de estos parámetros para el ensayo de citometría representó un hallazgo importante de nuestro grupo; sin embargo, debido a que estas células son poco abundantes y disminuyen todavía más con el tratamiento, es posible realizar este tipo de pruebas sólo al inicio de la enfermedad, cuando la carga leucémica es alta. A pesar de que esta limitación impide por el momento la posibilidad de una eventual aplicación para el monitoreo clínico, representa una herramienta muy valiosa para fines de investigación, ya que podemos de esta manera aislar las dos poblaciones (HSC vs. LSC) a partir de la médula de un mismo paciente, y hacer estudios moleculares *high-throughput* para valorar la expresión de miles y miles de genes o caracterizar variantes genéticas. Efectivamente, es gracias a este hallazgo que pudimos comenzar un análisis a gran escala del miRnoma (conjunto de todos los microRNAs) de estas células. En base a nuestra hipótesis, según la cual la translocación que genera el cromosoma Philadelphia provocaría además del BCR-ABL1 un desbalance en la expresión de los

miRNAs involucrados en las regiones genómicas que sufren el cambio de contexto genómico. La caracterización de la expresión de estos miRNAs en poblaciones celulares primitivas de médula ósea

posibilitaría identificar dianas específicas de células leucémicas que no sean compartidos con las células madre hematopoyéticas normales.

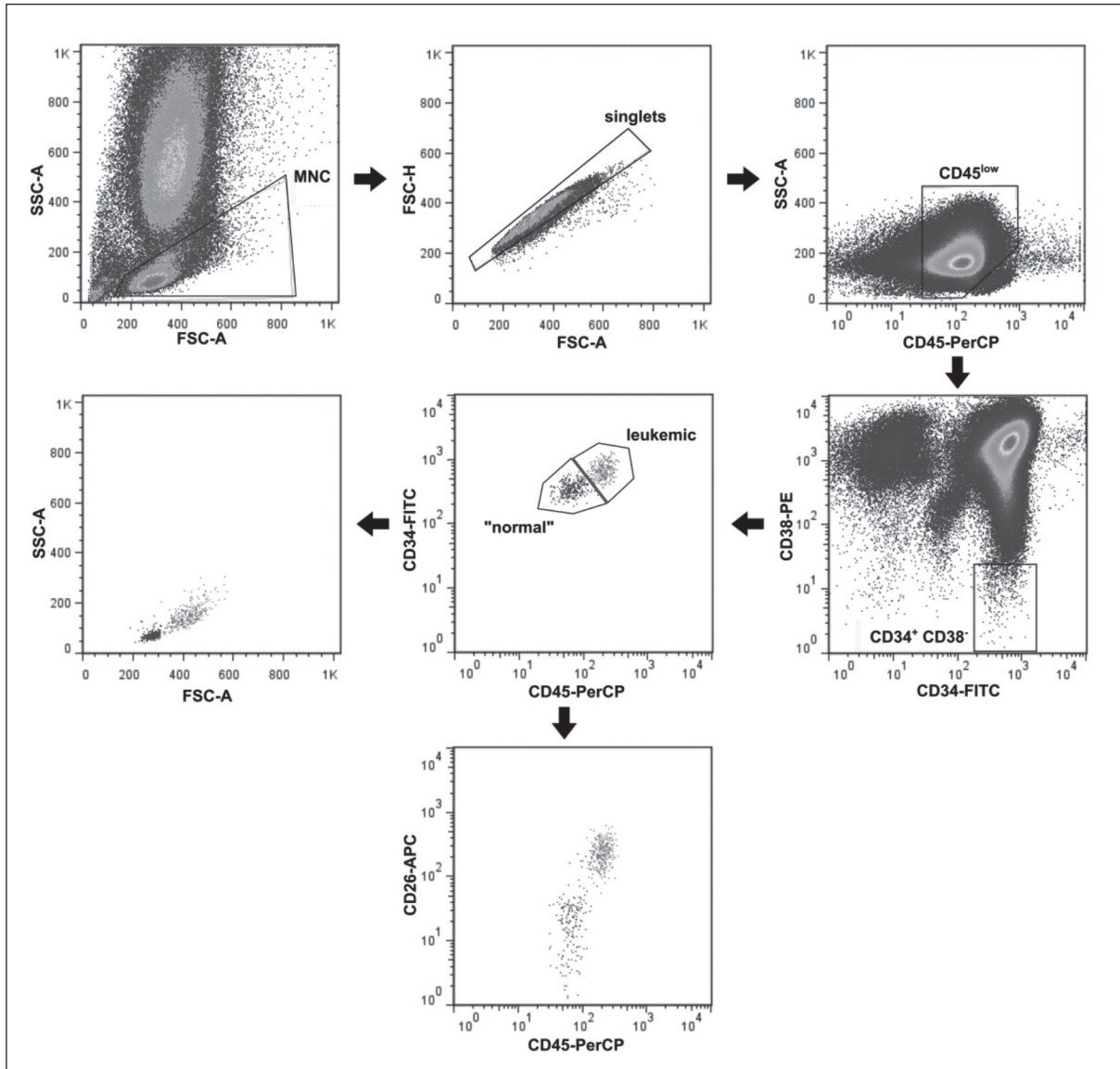


Figura 2. Estrategia de gating por citometría de flujo para la detección de células madre leucémicas y normales en pacientes con LMC. Las células $CD45^{low}CD34^{+}CD38^{-}$ son separadas primero de acuerdo a la intensidad de tinción de los marcadores CD45 y CD34. El fenotipo $CD45^{low}CD34^{low}$ corresponde con las células más primitivas y normales (BCR-ABL1-negativo); por el contrario $CD45^{high}CD34^{high}$ coincide con aquellas células primitivas y leucémicas (BCR-ABL1-positivo). La valoración del marcador CD26 permite separar todavía con más especificidad estas dos poblaciones, aumentando por lo tanto la pureza.

Con el objetivo de identificar estos nuevos potenciales blancos terapéuticos, optimizamos además un protocolo de extracción de RNA total a partir de pequeñas cantidades de células (150-10.000 células) en *buffer* de lisis para extracción de RNA total de buena calidad (RIN>8) que conserva la fracción de

RNAs pequeños (<200 nucleótidos). El RNA total obtenido proveniente de 7 pacientes con LMC al diagnóstico fue enviado al CEMO-INCA (Río de Janeiro, Brasil) gracias a un acuerdo de colaboración bilateral entre nuestro grupo y el centro brasileño dirigido por la Dra. Ilana Zalberg (FAPERJ-CO-

NICET 2015-2017). En este centro se generaron las bibliotecas para su secuenciación en la plataforma HiSeq2500 de Illumina, realizando la purificación del producto específico de la biblioteca mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6%. Se procesaron cuatro *pools* de muestras de pacientes con LMC al diagnóstico, de los cuales dos correspondían a una fracción enriquecida en LSCs y dos en HSCs. A su vez se construyeron bibliotecas a partir de un *pool* de dadores sanos, correspondientes a la fracción primitiva (CD34⁺ CD38^{-dim}) y a la fracción de células progenitoras (CD34⁺ CD38⁺). Finalmente se incluyeron dos líneas celulares como controles técnicos, una portadora del rearrreglo BCR-ABL1 (K562) y una línea sin el mismo (HL-60). Las muestras fueron secuenciadas *single-end*, obteniéndose más de 200 millones de lecturas totales, de alta calidad (90% con calidad >Q30), enriquecidas en la fracción de miRNAs y otros ARNs pequeños (piwiRNAs, snoRNAs).

En la figura 3 se muestran algunos resultados preliminares y parciales obtenidos a través de uno de los análisis que estamos realizando con el GFold (Feng, 2012), sobre el listado de microRNA que se pudieron secuenciar con la plataforma Illumina. El GFold es un *software* algoritmo bioinformático que permite definir producir listas de genes diferencialmente expresados, y está especialmente diseñado para los casos donde no hay replicas biológicas. En esta comparación, la intersección entre cada caso, círculo rojo (miRNAs diferencialmente expresados entre células madre leucémicas (CD26⁺) y normales (CD26⁻)) y círculo verde (miRNAs diferencialmente expresados entre células madre leucémicas y células madre de dadores sanos) nos permitió seleccionar 19 microRNAs altamente específicos de las LSCs. Es interesante constatar que de la mayoría de estos miRNAs se dispone de pocas evidencias en el modelo de la LMC, por lo tanto representa un campo muy fértil para caracterizar nuevos biomarcadores. Teniendo en cuenta que cada microRNA puede regular de diferentes maneras un grupo muy amplio de genes, resulta muy importante poder valerse de otras herramientas bioinformáticas para ordenarlos y clasificarlos (*Clustering* funcional); esto, junto con la validación por RT-PCR y posterior análisis funcional en líneas celulares, será parte del trabajo objeto de este pedido de financiación.

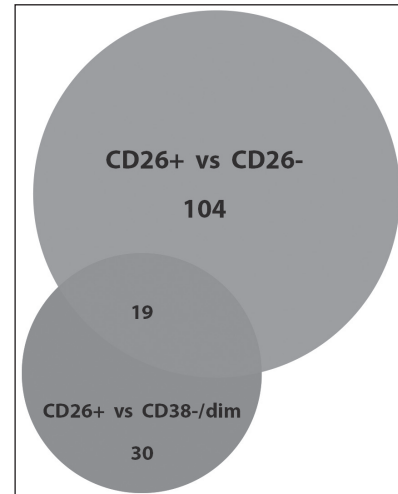


Figura 3. MicroRNAs diferencialmente expresados en LMC.

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara que no posee conflictos de interés.

Bibliografía

1. Ambros V: The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431:350-355
2. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of EuropeanLeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):6041-51.
3. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-84.
4. Bayraktar S, Goodman M. Detection of BCR-ABL Positive Cells in an Asymptomatic Patient: A Case Report and Literature Review. *Case Rep Med*. 2010;2010:939706.
5. Bianchini M, De Brasi C, Gargallo P, Gonzalez M, Bengió R, Larripa I. Specific assessment of BCR-ABL transcript overexpression and imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol*. 2009 ;82(4):292-300.
6. Bianchini M, Martinelli G, Renzulli M, Gonzalez Cid M, Larripa I. cDNA microarray study to identify expression changes relevant for apoptosis in K562 cells co-treated with amifostine and imatinib. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007; 59(3):349-60.

7. Bianchini M, Ottaviani E, Grafone T, Giannini B, Soverini S, Terragna C, Amabile M, Piccaluga PP, Malagola M, Rondoni M, Bosi C, Baccarani M, Martinelli G. Rapid detection of Flt3 mutations in acute myeloid leukemia patients by denaturing HPLC. *Clin Chem*. 2003 ;49(10):1642-50.
8. Biernaux C1, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood*. 1995;86(8):3118-22.
9. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. 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):3362-7.
10. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M et al MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:5166-5171.
11. Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, Bertrand A, Meunier MC, Fichelson S, Melkus M, Benaïche-Griscelli A, Guilhot F, Turhan AG. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood*. 2011 ;118(13):3657-60.
12. Chomel JC, Sorel N, Guilhot J, Guilhot F, Turhan AG. BCR-ABL expression in leukemic progenitors and primitive stem cells of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2012 ;119(12):2964-5.
13. Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, Sloma I, Benaïche-Griscelli A, Rea D, Legros L, Marfaing-Koka A, Bourhis JH, Ame S, Guerci-Bresler A, Rousselot P, Turhan AG. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients in deep molecular response induced by tyrosine kinase inhibitors and the impact of therapy discontinuation. *Oncotarget*. 2016;7(23):35293-301.
14. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest*. 2011;121(1):396-409.
15. Christiansson L, Söderlund S, Svensson E, Mustjoki S, Bengtsson M, Simonsson B, Olsson-Strömberg U, Loskog AS. Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS One*. 2013;8(1):e55818.
16. Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015; 29(5):999-1003.
17. Cross NC, White HE, Ernst T, Welden L, Dietz C, Saglio G, Mahon FX et al. Development and evaluation of a secondary reference panel for BCR-ABL1 quantification on the International Scale. *Leukemia*. 2016 Jun 3. doi: 10.1038/leu.2016.90.
18. Defina M, Ippoliti M, Gozzetti A, Abruzzese E, Castagnetti F, Crupi R, Tiribelli M, Breccia M, Salvucci M, Aprile L, Baratè C, Gozzini A, Rosti G, Lauria F, Bocchia M. Evaluation of residual CD34(+) Ph(+) progenitor cells in chronic myeloid leukemia patients who have complete cytogenetic response during first-line nilotinib therapy. *Cancer*. 2012 ;118(21):5265-9.
19. de Leeuw DC, Denkers F, Olthof MC, Rutten AP, Pouwels W, Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ, Smit L. Attenuation of microRNA-126 expression that drives CD34+38- stem/progenitor cells in acute myeloid leukemia leads to tumor eradication. *Cancer Res*. 2014; 74(7):2094-105.
20. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006; 355(23):2408-17.
21. Ferri C, Bianchini M, Icardi G, Belli C, Bengiò R, Larripa I. Early detection and quantification of mutations in the tyrosine kinase domain of chimerical BCR-ABL1 gene combining high-resolution melting analysis and mutant-allele specific quantitative polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(3):598-606.
22. Feng J1, Meyer CA, Wang Q, Liu JS, Shirley Liu X, Zhang Y. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*. 2012;28(21):2782-8.

23. Foley SB1, Hildenbrand ZL, Soyombo AA, Magee JA, Wu Y, Oravec-Wilson KI, Ross TS. Expression of BCR/ABL p210 from a knockin allele enhances bone marrow engraftment without inducing neoplasia. *Cell Rep.* 2013 17;5(1):51-60.
24. Goldman J1, Gordon M. Why do chronic myelogenous leukemia stem cells survive allogeneic stem cell transplantation or imatinib: does it really matter? *Leuk Lymphoma.* 2006 Jan;47(1):1-7.
25. Graham SM1, Jørgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood.* 2002;99(1):319-25.
26. Hanfstein B, Müller MC, Hehlmann R, Erben P, Lauseker M, Fabarius A et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia.* 2012;26(9):2096-102.
27. Herrera-Merchan A, Cerrato C, Luengo G et al. miR-33-mediated downregulation of p53 controls hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Cycle.* 2010; 9:3277-3285.
28. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menses HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ; IRIS Investigators. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2017;376(10):917-927.
29. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, Baccarani M, Cortes J, Cross NC, Druker BJ, Gabert J, Grimwade D, Hehlmann R, Kamel-Reid S, Lipton JH, Longtine J, Martinelli G, Saglio G, Soverini S, Stock W, Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood.* 2006; 108(1):28-37.
30. Hughes A, Clarson J, Tang C, Vidovic L, White DL, Hughes TP, Yong AS. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood.* 2017; 129(9):1166-1176.
31. Ilander M, Kreutzman A, Mustjoki S. IFN α induces prolonged remissions modeling curative immunologic responses in chronic myeloid leukemia. *Oncoimmunology.* 2014;3:e28781.
32. Khalaj M, Woolthuis CM, Hu W, Durham BH, Chu SH, Qamar S, Armstrong SA, Park CY. miR-99 regulates normal and malignant hematopoietic stem cell self-renewal. *J Exp Med.* 2017 doi: 10.1084/jem.20161595.
33. Kantarjian HM, Shah NP, Cortes JE, Baccarani M, Agarwal MB, Undurraga MS et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood.* 2012; 119(5):1123-9.
34. Kreutzman A, Rohon P, Faber E, Indrak K, Juvonen V, Kairisto V, Voglová J, Sinisalo M, Flochová E, Vakkila J, Arstila P, Porkka K, Mustjoki S. Chronic myeloid leukemia patients in prolonged remission following interferon- α monotherapy have distinct cytokine and oligoclonal lymphocyte profile. *PLoS One.* 2011;6(8):e23022.
35. Kreutzman A, Ladell K, Koechel C, Gostick E, Ekblom M, Stenke L, Melo T, Einsele H, Porkka K, Price DA, Mustjoki S, Seggewiss R. Expansion of highly differentiated CD8+ T-cells or NK-cells in patients treated with dasatinib is associated with cytomegalovirus reactivation. *Leukemia.* 2011;25(10):1587-97.
36. Kreutzman A, Ilander M, Porkka K, Vakkila J, Mustjoki S. Dasatinib promotes Th1-type responses in granzyme B expressing T-cells. *Oncoimmunology.* 2014;3:e28925.
37. Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, Ekblom M, Stenke L, Seggewiss R, Porkka K, Mustjoki S. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood.* 2010;116(5):772-82.
38. Kumari A, Brendel C, Hochhaus A, Neubauer A, Burchert A. Low BCR-ABL expression levels in hematopoietic precursor cells enable persistence of chronic myeloid leukemia under imatinib. *Blood.* 2012 ;119(2):530-9.
39. Larson RA, Hochhaus A, Hughes TP, Clark RE, Etienne G, Kim DW, Flinn IW, Kurokawa M, Moiraghi B, Yu R, Blakesley RE, Gallagher NJ,

- Saglio G, Kantarjian HM. Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia*. 2012; 26(10):2197-203.
40. Liu X, Fortin K, Mourelatos Z: MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol*. 2008; 18:113-121
 41. Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P; 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):1029-35.
 42. Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, Gerrard G, Wang L, Szydlo RM, Clark RE, Apperley JF, Milojkovic D, Bua M, Pavlu J, Paliompeis C, Reid A, Rezvani K, Goldman JM, Feroni L. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):232-8.
 43. Metzeler KH, Maharry K, Kohlschmidt J, Volinia S, Mrózek K, Becker H, Nicolet D, Whitman SP, Mendler JH, Schwind S, Eisfeld AK, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Kolitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Stone RM, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013; 27(10):2023-31.
 44. Minami Y, Abe A, Minami M, Kitamura K, Hiraga J, Mizuno S, Yamamoto K, Sawa M, Inagaki Y, Miyamura K, Naoe T. Retention of CD34+ CML stem/progenitor cells during imatinib treatment and rapid decline after treatment with second-generation BCR-ABL inhibitors. *Leukemia*. 2012;26(9):2142-3.
 45. Mustjoki S, Richter J, Barbany G, Ehrencrona H, Fioretos T, Gedde-Dahl T et al. Impact of malignant stem cell burden on therapy outcome in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2013;27(7):1520-6.
 46. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Ellis JJ, Ferenchak G et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest*. 2013;123(10):4144-57.
 47. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960 25:85-109.
 48. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348(11):994-1004.
 49. O'Hare T1, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(8):513-26.
 50. Rea D, Henry G, Khaznadar Z et al. Natural killer-cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. *Haematologica*. 2017; 102(8): 1368-1377.
 51. Roberti MP, Rocca YS, Amat M, Pampena MB, Loza J, Coló F, Fabiano V, Loza CM, Arriaga JM, Bianchini M, Barrio MM, Bravo AI, Domenichini E, Chacón R, Mordoh J, Levy EM. IL-2- or IL-15-activated NK cells enhance Cetuximab-mediated activity against triple-negative breast cancer in xenografts and in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136(3):659-71.
 52. Roberti MP, Juliá EP, Rocca YS, *Eur J Immunol*. Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade. 2015;45(5):1560-9.
 53. Rocca YS, Roberti MP, Arriaga JM, Amat M, Bruno L, Pampena MB, Huertas E, Loria FS, Pairola A, Bianchini M, Mordoh J, Levy EM. Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun*. *Eur J Immunol*. 2013;19(1):76-85.
 54. Rocca YS, Roberti MP, Juliá EP, Pampena MB, Bruno L, Rivero S, Huertas E, Sánchez Loria F, Pairola A, Caignard A, Mordoh J, Levy EM. Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK

- Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15. *Front Immunol.* 2016;7:413.
55. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973; 243(5405):290-3.
 56. Ruiz MS, Medina M, Tapia I, Mordoh J, Cross NCP, Larripa I, Bianchini M. Standardization of molecular monitoring for chronic myeloid leukemia in Latin America using locally produced secondary cellular calibrators. *Leukemia* 2016 (en prensa).
 57. Ruiz MS, Baffa Trasci S, Moiraghi B, Pérez M, Burgos R, Foncuberta C, Vitriu A, Pavlovsky C, Mordoh J, Larripa I, Sánchez Ávalos JC, Bianchini M. BCR-ABL1 expression is reduced in the primitive precursor fraction from cml tki-treated patients. *European Hematology Association (Vienna, Austria 2015).*
 58. Ruiz MS, Baffa Trasci S, Moiraghi B, Pérez M, Burgos R, Foncuberta C, Vitriu A, Pavlovsky C, Mordoh J, Larripa I, Sánchez Ávalos JC, Bianchini M. Expresión reducida de BCR-ABL1 en precursores primitivos provenientes de pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con inhibidores de tirosín quinasa (Mar del plata, Argentina, 2015).
 59. Savona M, Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(5):341-50.
 60. Sawyers CL, Druker B. Tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Cancer J Sci Am.* 1999; 5(2):63-9.
 61. Stein AM, Bottino D, Modur V, Branford S, Kaeda J, Goldman JM, Hughes TP, Radich JP, Hochhaus A. BCR-ABL transcript dynamics support the hypothesis that leukemic stem cells are reduced during imatinib treatment. *Clin Cancer Res.* 2011;17(21):6812-21.
 62. Tang M, Gonen M, Quintas-Cardama A, Cortes J, Kantarjian H, Field C, Hughes TP, Branford S, Michor F. Dynamics of chronic myeloid leukemia response to long-term targeted therapy reveal treatment effects on leukemic stem cells. *Blood.* 2011 ;118(6):1622-31.
 63. Thielen N, Richter J, Baldauf M, Barbany G, Fioretos T, Giles F, Gjertsen BT et al. Leukemic Stem Cell Quantification in Newly Diagnosed Patients With Chronic Myeloid Leukemia Predicts Response to Nilotinib Therapy. *Clin Cancer Res.* 2016 Mar 22.
 64. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V et al The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *European journal of Haematology* 2010; 84:1-16.
 65. Vonka V, Petráčková M. Immunology of chronic myeloid leukemia: current concepts and future goals. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015;11(4):511-22.
 66. Warfvinge R, Geironson L, Sommarin MNE, Lang S, Karlsson C, Roschupkina T, Stenke L, Stentoft J, Olsson-Strömberg U, Hjorth-Hansen H, Mustjoki S, Soneji S, Richter J, Karlsson G. Single-cell molecular analysis defines therapy response and immunophenotype of stem cell subpopulations in CML. *Blood.* 2017 Apr 27;129(17):2384-2394. doi: 10.1182/blood-2016-07-728873. Epub 2017 Jan 25.
 67. Yu Z, Jian Z, Shen SH et al Global analysis of microRNA target gene expression reveals that miRNA targets are lower expressed in mature mouse and *Drosophila* tissues than in the embryos. *Nucleic acids research* 2007; 35:152-164.
 68. Zhang B, Li L, Ho Y, Li M, Marcucci G, Tong W, Bhatia R. Heterogeneity of leukemia-initiating capacity of chronic myelogenous leukemia stem cells. *J Clin Invest.* 2016;126(3):975-91.