

**Dirección de Prestaciones Médicas**  
**Unidad de Atención Médica**  
**Coordinación de Unidades Médicas de Alta Especialidad**  
**U.M.A.E. Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret"**  
**Centro Médico Nacional La Raza, México D.F.**

**Un estudio piloto abierto y comparativo de Transplante Autólogo de Célula Tallo Periférica (TACTP) + Imatinib vs. Imatinib en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica cromosoma Filadelfia-positivo en fase crónica con falla terapéutica a  $\alpha$ -interferón.**

**T E S I S**

PARA OTENER EL TÍTULO EN LA  
**ESPECIALIDAD DE HEMATOLOGIA**

**P R E S E N T A**

**Dra. Lilia Adela García Stivalet**

**Asesor:**

**Dr. José Luis Manuel Ayala Sánchez**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos:**

### **A Dios:**

**Por darme la vida y la capacidad para llegar hasta donde estoy**

### **A mis Padres:**

**Por darme el amor, la educación y el ejemplo de trabajo y dedicación para llegar hasta este momento de mi vida. GRACIAS.**

### **A mi Abuela Consuelo:**

**Por su apoyo y dedicación durante toda mi vida y especialmente en mi residencia.**

### **A mis Maestros:**

**Por sus enseñanzas y apoyo durante el periodo de mi residencia, con mención especial para el Dr. Ayala y al Dr. Jorge Vela por su apoyo en la realización de esta tesis.**

### **A mis Pacientes:**

**Por ser siempre como un libro abierto en donde obtuve innumerables conocimientos, gracias por su confianza. Espero no defraudarlos.**

### **A mi Amiga Adriana Guerrero:**

**Que más que una amiga es como una hermana, gracias por tu apoyo y amistad en todo momento.**

### **A mi Esposo:**

**Por ser mi apoyo y motor para la vida. Gracias por tu amor y comprensión.**

## ÍNDICE:

|  | <b>Pág.</b>  |
|--|--------------|
| <b>1. Introducción:</b>                              | <b>1-5</b>   |
| <b>2. Justificación y Planteamiento del Problema</b> | <b>6</b>     |
| <b>3. Hipótesis</b>                                  | <b>7</b>     |
| <b>4. Objetivos del Estudio</b>                      | <b>8</b>     |
| <b>5. Material y Métodos</b>                         | <b>9-31</b>  |
| <b>6. Análisis Estadístico</b>                       | <b>32-33</b> |
| <b>7. Cronograma de Trabajo</b>                      | <b>34</b>    |
| <b>8. Resultados</b>                                 | <b>35-43</b> |
| <b>9. Discusión</b>                                  | <b>44-47</b> |
| <b>10. Conclusiones</b>                              | <b>48</b>    |
| <b>11. Bibliografía</b>                              | <b>49-52</b> |
| <b>11. Apéndices y Anexos</b>                        | <b>49-77</b> |

## INTRODUCCION Y ANTECEDENTES CIENTIFICOS

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden hematopoyético maligno de la célula tallo, caracterizada por una excesiva producción de células de la serie mieloide, aunado a la presencia de una anomalía molecular, la fusión del gene BCR del cromosoma 22 y el ABL del cromosoma 9 conocido como BCR-ABL, una translocación balanceada entre cromosomas 9 y 22 [t (9; 22) (q34; q11)] anomalía citogenética conocida como cromosoma Philadelphia (Ph) en las células leucémicas. Se han identificado las funciones específicas de la alteración molecular en la patogénesis de la enfermedad, habiéndose establecido que el gen: a.-codifica una proteína de fusión con elevada actividad tirosin-cinasa, b.- inhibe apoptosis y c.- altera la adhesión del microambiente medular, que puede llevar a la iniciación de la enfermedad, la subsiguiente expansión de la clona maligna puede requerir la vía proliferativa del c-myc.<sup>1, 2, 3,4</sup> El patrón clonal Ph positivo se encuentra en las células de los linajes mielo-monocítico, eritroide y megacariocítico, lo cual indica que la mutación BCR/ABL ocurre en los progenitores hematopoyético tempranos. En la fase crónica de la enfermedad la mayoría de los linfocitos T y algunos de los linfocitos B son policlonales y Ph-negativos.<sup>32</sup>

La LMC inicialmente presenta un curso indolente, fácilmente controlado con terapia, tratada de forma convencional puede progresar a una fase acelerada en 18 a 30 meses, siguiendo a ésta una fase blástica, resultando en la muerte del paciente en 3 a 6 meses. Un 20-25% de los pacientes fallecen por complicaciones de la fase acelerada y otro 20-25% desarrolla fase blástica sin una fase acelerada intermedia.

La hidroxiurea y el busulfan son los agentes más comúnmente utilizados como tratamiento estándar, proporcionan un efectivo control de la enfermedad en la fase crónica, induciendo RC en más del 70% de pacientes, sin embargo éstas son "pseudoremisiones", ya que en estudios citogenéticos en los pacientes tratados con estos agentes, se ha demostrado la persistencia de células Ph + en la mayoría de las metafases medulares, ya que sólo ocasional y transitoriamente la hidroxiurea ha logrado respuestas citogenéticas. Se ha comparado de manera aleatoria a la hidroxiurea y al busulfan, estableciendo para la primera una ventaja en la supervivencia (mediana 58 vs. 45 meses  $p = 0.008$ ).<sup>5, 6</sup>

Talpaz y col. iniciaron el tratamiento con interferón en LMC. Desde entonces en diversos estudios se ha confirmado su eficacia, produciendo repuestas hematológicas del 60 al 80% y repuestas citogenéticas en 35 a 55% de los pacientes. Se han reportado en diversas investigaciones repuestas a la terapia con  $\alpha$ -interferón en LMC, las diferencias encontradas en la frecuencia de repuestas hematológicas y citogenéticas en los diversos estudios, ya han sido analizadas y pueden deberse a la fase de LMC en la que se encontraba cada paciente, al grupo de riesgo, sus características pre-tratamiento y la dosis de tratamiento con  $\alpha$ -interferón establecida.<sup>7,8</sup>

El autotransplante como tratamiento intensivo de la LMC, se describió desde 1974 por el grupo de Seattle, inicialmente con la intención de mejorar el pronóstico fatal de dos pacientes con LMC en transformación y alcanzar una 2da fase crónica. Los pacientes fueron tratados con dosis altas de ciclofosfamida e irradiación corporal total, seguido por la infusión de células de médula autóloga, previamente cosechadas y criopreservadas durante la fase crónica. Posteriormente se reportó el caso de 7 pacientes que alcanzaron la meta de una 2da fase crónica. Subsecuentemente un estudio del Hospital Hammersmith demostró que células colectadas de sangre periférica por leucoféresis, también restauraba la hematopoyesis posterior a terapia mieloablativa.<sup>9, 10,11</sup>

Existen por lo menos 3 posibles razones para el uso de autotrasplante para prolongar la sobrevida de pacientes con LMC: A) La progresión de la enfermedad a fases más avanzadas de la misma pueden depender en parte a eventos aleatorios que ocurren en células tallo primitivas BCR/ABL positivas, por lo que cualquier procedimiento que reduzca su número puede retrasar la transformación, B) Existe evidencia de que los procedimientos que reduzcan el número tanto de células tallo normales como leucémicas a niveles bajos proveen ventajas de proliferación a las células tallo normales sobre las leucémicas, C) Varios grupos han reportado la presencia de un número significativo de poblaciones de células hematopoyéticas normales muy primitivas en la MO por lo menos en pacientes recientemente diagnosticados con LMC, declinando con el tiempo.<sup>28</sup>

Butturini y cols. revisaron más de 200 trasplantes autólogos reportados en LMC, siendo realizados en fase crónica en aproximadamente 50% de los casos, observándose un

retorno a la fase crónica en la mayoría de los pacientes posterior al trasplante y aproximadamente en 60% presentaron respuesta citogenética completa. Sin embargo no hay evidencia convincente de que alguno de estos tratamientos, realizados en la fase crónica, incremente la duración de la misma ó la supervivencia libre de enfermedad a 3 años. La supervivencia global fue de aproximadamente 70%, con menos del 10% de pacientes muertos por complicaciones relacionadas al trasplante. Goldman y col. fueron los primeros investigadores en utilizar células tallos periféricas para manejo de pacientes con LMC. Posteriormente se ha utilizado este procedimiento en otras patologías observándose la reconstitución hematopoyética. También fueron los primeros investigadores en demostrar claramente que las células tallo de sangre periférica recolectadas durante la fase crónica podrían restablecer la función hematopoyética después de tratamiento mieloablativo para la crisis blástica de esta enfermedad. Sin embargo, la mayoría de las células recogidas y transfundidas provenían de la clona Ph positiva y el paciente obtenía una segunda fase crónica de corta duración. El TACTP tiene, a 2 años, una incidencia de respuesta hematológica completa y respuesta citogenética mayor de  $67\pm 4\%$  y  $32\pm 4\%$  respectivamente y una supervivencia a 4 y 8 años de  $71\pm 3\%$  y  $64\%$  respectivamente.<sup>12, 13,14</sup>

El grupo de Minneapolis mostró que las células CD34+ que son también DR- son predominantemente Ph-negativas; en contraste con las células CD34+/DR+ que son predominantemente Ph-positivas. Se reportó recientemente que en pacientes en fase crónica temprana el 80% de las células CD34+/DR- son BCR/ABL RNAm negativas.<sup>29, 32</sup> Por lo que la selección por fluorescencia de células CD34+/DR- provee un injerto autologo altamente purificado funcionando como purga in vitro.<sup>28</sup> Los resultados de diversos estudios indican que la depleción de progenitores Ph+ por manipulaciones ex vivo es posible, y se puede asociar con una mayor frecuencia de remisiones citogenéticas postrasplante, sin embargo a pesar de que los resultados de estos estudios son alentadores no se pueden hacer aún conclusiones definitivas. Las remisiones citogenéticas fueron de corta duración, así como la presencia de injerto parcial o muy retrasado fueron los problemas más significativos encontrados en estos ensayos clínicos.<sup>29</sup> Otro tipo de abordaje para depletar células malignas de la cosecha es el tratamiento con dosis altas de QT previo a la cosecha también llamado purga in vivo, esto

puede estar en relación, en parte, a las diferencias en la cinética de regeneración entre las células progenitoras Ph negativas de las positivas en pacientes con LMC. Se han reportado también ensayos con purga in vivo utilizando una quimioterapia más o menos intensiva seguida de la administración de FEC-G, encontrándose que en la mayoría de los casos fue posible colectar predominantemente progenitores mieloides Ph- negativas.<sup>28</sup> Un abordaje alternativo a la purga in vivo involucra la colección de células tallo de sangre periférica posterior a la inducción de respuesta citogenética con  $\alpha$ -interferón, siendo posible y bien tolerado y generalmente provee una colección de un número adecuado de células.<sup>28</sup>

Los resultados de ensayos clínicos con TACTP en pacientes con LMC sugieren que este procedimiento puede inducir remisiones citogenéticas en un subgrupo de pacientes y puede estar asociado a una expectativa de sobrevida más prolongada. McGlave y cols recopilaron los resultados de 20 trasplantes autólogos realizados con o sin purga, de médula ósea o de sangre periférica en 8 centros europeos y norteamericanos entre junio de 1984 y enero de 1992. La mediana de sobrevida para 142 pacientes en fase crónica no se había alcanzado; para pacientes en fase acelerada la mediana de sobrevida fue de 35.9 meses; para fase blástica fue de 4.1 meses. La probabilidad de sobrevivida para pacientes en fase crónica fue de 58% a 5 años. Cabe mencionar que la mayoría de los pacientes trasplantados tenían enfermedad residual.<sup>29</sup>

La meta en el tratamiento de pacientes con LMC es eliminar la clona Ph+ y restaurar la hematopoyesis con la clona Ph-.<sup>28</sup> Actualmente la curación en LMC sólo es posible mediante TMO alogénico, el cual sin embargo sólo puede ofrecerse a pacientes jóvenes y que tengan un donador HLA compatible. Esto significa que muy probablemente el 70% de los pacientes, no tendrán un donador compatible, con lo que se pierde la posibilidad de modificar la evolución natural de la enfermedad con la inexorable progresión de la misma. Los resultados del aló injerto correlacionan con la fase de la enfermedad y tipo de donador, la frecuencia de recaída actuarial es alrededor del 10-20% posterior a trasplante HLA compatible en fase crónica, 50% en fase acelerada y 70-80% en fase blástica.<sup>15, 16,17</sup>

El imatinib es un inhibidor tirosin kinasa dirigida contra abl, que ha mostrado una alta eficacia en el tratamiento de la LMC. En noviembre del 2000 participamos en un estudio Internacional de Acceso Expandido fase 2 para evaluar mesilato de imatinib (anteriormente



llamado STI571) en pacientes con LGC que habían fallado a terapia con  $\alpha$ -interferón, siendo el objetivo primario determinar la tasa de respuestas citogenéticas, incluyéndose 28 pacientes que alcanzaron respuestas citogenéticas mayores en un 47% y 60% a 12 y 18 meses respectivamente.<sup>18</sup>

Dewar y cols mostraron que los blancos de acción de imatinib pueden extenderse para incluir el receptor de FEC-M y c-fms el cual es expresado en niveles bajos por monocitos, aumentando su nivel durante la diferenciación a macrófagos. Aunque la potencia de esta inhibición es menor que aquella observada para abl.<sup>29</sup>

Desde junio del 98 en que se trató al primer paciente, más de 15000 pacientes con LMC en todo el mundo han sido tratados con imatinib, aprobado por la FDA en mayo del 2001, produce mejores respuesta hematológicas y citogenéticas que  $\alpha$ -interferón en cualquier fase de la enfermedad y en LMC de reciente diagnóstico comparado con  $\alpha$ -interferón + citarabina obtuvo respuesta citogenéticas completas de un 68 vs. 7%.<sup>19, 20, 21, 22, 23, 24,25</sup> La administración de imatinib posterior a un trasplante autólogo puede mejorar o prolongar la respuesta citogenética.<sup>31</sup>

Con respecto a la utilización de imatinib en pacientes previamente sometidos a autotrasplante de células tallo, Beck y cols realizaron un estudio con 18 pacientes de varias instituciones europeas obteniendo hasta 62.5% de respuestas citogenéticas mayores con 50% de respuestas citogenéticas completas, concluyendo que el uso de mesilato de imatinib es una terapia efectiva y segura para pacientes con historia de tratamientos intensivos como el TACTP.<sup>33</sup>

En pacientes con fase crónica temprana tratados con imatinib se logran remisiones citogenéticas completas en alrededor de 68% de los pacientes después de 12 meses de tratamiento, sin embargo no existen datos clínicos para determinar la duración de la respuesta a imatinib o la sobrevida a largo plazo. La enfermedad mínima residual medida en pacientes que responden por medio de RT-qPCR generalmente alcanzan una meseta o continúan descendiendo, aunque pocos pacientes logran la negativización de la prueba, aunado a esto, el desarrollo de resistencia a imatinib se encuentra bien documentado, lo cual puede surgir por varios mecanismos incluyendo mutaciones dentro del dominio kinasa de abl, sobre expresión de

bcr-abl o amplificación del oncogen bcr-abl y evolución citogenética. Por lo que hasta el momento actual es poco claro si el imatinib por si solo ofrecerá potencial curativo, y que los pacientes que inicialmente responden pudieran eventualmente perder la misma. Tomando en cuenta esta posibilidad es prudente colectar CTP en pacientes tratados con imatinib siempre y cuando se encuentren con respuesta citogenética completa o molecular.<sup>34</sup>

En pacientes tratados con imatinib que alcanzan remisión citogenética completa, la movilización y cosecha de células CD34 + puede representar otra opción terapéutica, utilizándolo como purga in vivo cuando se continua el mismo durante la movilización y cosecha, pudiendo ser utilizadas posteriormente como tratamiento de rescate una vez que el paciente pierda la respuesta.<sup>34</sup> Hui y cols demostraron que con dosis estándar de FEC-G con el uso concomitante de imatinib se puede obtener una buena cosecha de CTP en la mayoría de los pacientes que se encontraban en remisión citogenética completa, esto sin impacto en el control de la enfermedad. Se ha demostrado que imatinib puede suprimir de forma selectiva a los progenitores leucémicos in vitro, al revertir la proliferación aumentada más que aumentar la apoptosis, los efectos biológicos del imatinib en las células tallo normales y su interacción con las citocinas utilizadas en la movilización aún se desconocen. Sin embargo los resultados de enfermedad residual mínima realizados a las cosechas sugieren que se encuentran niveles bajos de bcr-abl medidos por PCR en 10/11 de las cosechas de CTP, a pesar la ausencia de células Ph-positivas en las muestras de MO analizadas por citogenética convencional y niveles bajos de bcr-abl en sangre periférica previos a la cosecha.<sup>38</sup>

En nuestro servicio, la LMC representa el 20% de todas las leucemias y es la entidad que proporciona más pacientes al TMO alogénico (alrededor del 40%), a pesar de esto, un número importante de pacientes queda fuera del programa de TMO<sup>28</sup> y su tratamiento se mantiene con  $\alpha$ -interferón por tiempo indefinido ó hasta la transformación de la enfermedad. El tratamiento convencional en nuestro servicio de la LMC en fase crónica incluye busulfan, hidroxiurea,  $\alpha$ -interferón, citarabina, trasplante alogénico y autólogo de CPH.

## JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la curación en LMC sólo es posible alcanzarla por TMO alogénico, el cual sin embargo sólo puede ofrecerse a pacientes jóvenes y que tengan un donador HLA compatible. Esto significa que muy probablemente el 70% de los pacientes, no tendrán un donador compatible, con lo que se pierde la posibilidad de modificar la evolución natural de la enfermedad con la inexorable progresión de la enfermedad.

En nuestro servicio, la LMC representa el 20% de todas las leucemias y es la entidad que proporciona más pacientes al TMO alogénico (alrededor del 40%), a pesar de esto, un número importante de pacientes queda fuera del programa de TMO y su tratamiento se mantiene con  $\alpha$  interferón por tiempo indefinido ó hasta la transformación de la enfermedad. El tratamiento convencional en nuestro servicio de la LMC en fase crónica incluye busulfan, hidroxiurea,  $\alpha$ -interferón, citarabina,  $\beta$ -interferón, trasplante alogénico y autólogo de CPH.

¿Los pacientes con LMC en FC que han fracasado a tratamiento con  $\alpha$ -IFN, pueden presentar una mejor respuesta citogenética completa al recibir TACTP + Imatinib comparado con Imatinib?

## **HIPOTESIS**

Los pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica a los cuales se les trata en ATCTP + Imatinib como tratamiento de mantenimiento tienen una respuesta citogenética completa de un 30% igual o mejor comparada a la obtenida con Imatinib.

Se realizará estadística descriptiva de las características basales de los pacientes en ambos grupos.

Se compararan proporciones mediante la prueba exacta de Fisher como método de contraste para rechazar  $H_0$ .

El análisis de supervivencia y supervivencia libre de transformación se realizará con el Método de Kaplan y Meier.

## **HIPÓTESIS ESTADISTICA**

$$**H 0 : A = B**$$

$$**H 1 : A > B**$$

## **OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

1. Comparar la tasa de respuestas citogenéticas completas del TACTP + Imatinib vs. Imatinib, demostrado por la desaparición del cromosoma Ph-positivo de las células en la médula ósea en esta población de pacientes.
2. Comparar la supervivencia y supervivencia libre de progresión.

## MATERIAL Y METODOS

**TIPO DE ESTUDIO:**

- PROSPECTIVO
- ALEATORIZADO
- COMPARATIVO
- LONGITUDINAL
- OBSERVACIONAL

### UNIVERSO DE TRABAJO:

La población elegible incluye pacientes adultos con LMC cromosoma Ph-positivo en fase crónica con falla terapéutica a  $\alpha$ -interferón y que se consideren adecuados para el tratamiento.

Se aleatorizaron a los pacientes a dos brazos:

- Brazo A: Autotrasplante de células tallo (ATCTP) y posteriormente Imatinib a 400mg c/24hrs.
- Brazo B: Imatinib 400mg VO c/24hrs.

### CARACTERISTICAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL:

Pacientes adultos  $\geq 16$  ó  $\leq 60$  años, de ambos sexos (mujeres no embarazadas) con diagnóstico de LMC en FC, con un ECOG 0,1 ó 2 y una expectativa de vida superior a 3 meses, tratamiento mínimo por 1 año con  $\alpha$ -interferón, sin remisión hematológica, respuesta citogenética mayor ó intolerancia al mismo. Que sean aceptados por el Comité de Transplante de Células Hematopoyéticas de acuerdo a los requisitos vigentes.

## **CARACTERISITICAS DEL GRUPO CONTROL:**

Pacientes adultos \_16 ó \_60 años, de ambos sexos (mujeres no embarazadas) con diagnostico de LMC Ph + en FC, con un ECOG 0,1 ó 2 y una expectativa de vida superior a 3 meses, tratamiento mínimo por 1 año con  $\alpha$ -interferón, sin remisión hematológica, respuesta citogenética mayor ó intolerancia al mismo.

## **AMBITO GEOGRAFICO**

Departamento de Hematología

Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "La Raza"

IMSS, Delegación 36

México DF.

## **RECUROSOS HUMANOS**

### **INVESTIGADOR RESPONSABLE:**

DR. JOSÉ LUIS MANUEL AYALA SÁNCHEZ

CLÍNICA DE LMC Y TRACETH

### **INVESTIGADORES ASOCIADOS:**

DR. FRANCISCO TRIPP VILLANUEVA

CLÍNICA DE TRACETH

DR. LUIS DAVID GARCIA LEON

UNIDAD DE AFÉRESIS

DRA. LILIA GARCIA STIVALET

RESIDENTE 2do. AÑO DE HEMATOLOGIA

DR. JORGE VELA OJEDA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA Y PROGRAMA DE TRACETH

M.C. LAURA MONTIEL CERVANTES

LABORATORIO DE INMUNOTIPIFICACION

M. C. ERNESTO LONGORIA REVILLA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

PASANTE QBP XOCHITL AQUINO ORTEGA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### **RECURSOS MATERIALES**

Mesilato de Imatinib cap. 100 mg.

Recursos propios de la Unidad de TRACETH y de la Unidad de Aféresis y Criopreservación.

### **FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO**

Recursos propios de la unidad.

### **LIMITE EN TIEMPO DE LA INVESTIGACION**

Del 1o de abril del 2003 al 1o de julio del 2004.



### **CRITERIOS DE INCLUSION:**

1. Hombres y mujeres  $\geq 18$  y  $\leq 60$  años de edad.
2. Pacientes con diagnóstico confirmado de LMC cromosoma Ph-positivo en fase crónica.
3. Los pacientes deben tener falla terapéutica documentada a  $\alpha$ -interferón definida como alguno de los siguientes postulados:
  - a) Resistencia hematológica:** Falla en alcanzar una respuesta hematológica completa, con una duración de al menos un mes a pesar de 6 o más meses de un régimen de tratamiento que contenga interferón alfa (al menos 25 millones de unidades internacionales (MIU) por semana).
  - b) Resistencia citogenética:** Citogenética de la médula ósea con 65% de cromosoma Ph positivo, luego de al menos un año de terapia basada en interferón alfa.
  - c) Refractariedad citogenética:** Un incremento en las células cromosoma Ph positivo de la médula ósea de al menos 30 puntos porcentuales (por ejemplo, del 20% al 50%, o del 30% al 60%) confirmado por dos muestras con al menos un mes de diferencia, o un incremento  $\geq 65\%$ .
  - d) Refractariedad hematológica:** Un recuento de leucocitos creciente ( $\geq 100\%$  de incremento y hasta un nivel  $\geq 20 \times 10^9/L$  confirmado por dos muestras con al menos dos semanas de diferencia) mientras recibían un régimen conteniendo interferón alfa (al menos 25 MIU por semana).
4. Pacientes que han demostrado intolerancia a la terapia con interferón alfa definida como: Grado  $\geq 3$  de toxicidad no hematológica documentada, persistente por más de un mes en un paciente que recibe un régimen conteniendo interferón alfa. Los pacientes que son intolerantes al interferón alfa deben tener más de tres meses de diagnosticados.
5. No ser candidatos a Transplante Alogénico de Células Tallo Periféricas.
6. Consentimiento informado escrito dado voluntariamente.

## CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Las pacientes en edad fértil sin una prueba de embarazo negativa antes de iniciar el fármaco de estudio. Deben utilizar medidas anticonceptivas de barrera a lo largo del estudio en ambos sexos.
2. Concentraciones séricas de creatinina y bilirrubinas mayores de 1.5 veces por arriba del límite superior del rango normal.
3. SGOT (AST) y SGPT (ALT) mayores de 1.5 veces el límite superior del rango normal.
4. Pacientes con diagnóstico de LMC con cromosoma Ph positivo (ó pacientes que son cromosoma Ph negativos pero BCR-ABL positivos) en fase acelerada definida por la presencia de una ó más de las siguientes características:
  - Porcentaje de blastos en sangre ó médula ósea  $\geq 20\%$  pero  $< 30\%$
  - Porcentaje de blastos más promielocitos en sangre periférica o médula ósea  $\geq 20\%$ .
  - Basófilos en sangre periférica ó médula ósea  $\geq 20\%$ .
  - Trombocitopenia  $< 100 \times 10^9/L$  no relacionadas con el tratamiento.
5. Pacientes que han regresado a la fase crónica de la LGC después de haber respondido al tratamiento ya sea de la fase acelerada ó crisis blástica.
6. Pacientes con un Status de Performance ECOG  $\geq 3$ .
7. Pacientes que reciben busulfan dentro de las 6 semanas de la Visita 1.
8. Pacientes que reciben tratamiento con  $\alpha$ -interferón dentro de los 28 días del inicio del tratamiento.
9. Pacientes que reciben tratamiento con arabinósido de citosina dentro de los 14 días del inicio del tratamiento.
10. Pacientes que reciben hidroxiurea dentro de los 7 días del inicio del tratamiento.
11. Pacientes que han recibido otros agentes experimentales dentro de los 28 días del inicio del tratamiento.
12. Pacientes con problemas cardíacos Grado 3/4 definidos de acuerdo a los criterios de la New York Heart Association.
13. Pacientes con historia de no-cumplimiento de regímenes médicos o que son considerados potencialmente no confiables.

## **ESPECIFICACIÓN DE LAS VARIABLES**

### **Variable dependiente grupo experimental:**

La remisión hematológica completa de la LMC, es considerada como la desaparición de la actividad leucémica clínica y por laboratorio. La respuesta citogenética es la disminución del porcentaje de células con el cromosoma Ph-positivo por análisis citogenético y la respuesta molecular la desaparición del oncogen bcr-abl por detección de enfermedad residual mínima con PCR.

No existe un método estándar único, aceptado para evaluar la remisión completa, en la mayoría de los casos, el parámetro clínico es la desaparición de los síntomas y la esplenomegalia, el parámetro de laboratorio es la normalización de la biometría hemática y el parámetro citogenético es la desaparición del cromosoma Ph, desde el punto de vista molecular la desaparición del oncogen BCR-ABL a través de los diversos métodos de detección de ERM (FISH, análisis de Southern, PCR, análisis multiparamétrico por citometría de flujo).

Dado que la respuesta citogenética y molecular puede ocurrir en forma independiente de la respuesta hematológica, se considera deben evaluarse independientemente, por lo que se proponen los siguientes criterios de eficacia para su evaluación:

### **Categoría: Respuesta hematológica**

Control total: Respuesta hematológica completa.

GB  $_ 10 \times 10^9 / L$ .

Plaquetas  $_ 450 \times 10^9 / L$ .

Ausencia de desviación a la izquierda en sangre periférica.

Desaparición de todos los signos y síntomas de la enfermedad.

Control parcial: Respuesta hematológica parcial.

Presencia de alguno de los criterios mencionados.

Fracaso: No respuesta hematológica.

Sin respuesta.

Categoría: Respuesta citogenética

Control total: Respuesta citogenética completa.

Supresión al 100% Ph.

Control parcial: Respuesta citogenética parcial.

Ph+ 1-35%.

Control parcial: respuesta citogenética menor.

Ph+ 36-65%.

Control parcial: Respuesta mínima.

Ph+ 66-90%.

Fracaso: No respuesta citogenética.

No-supresión de Ph.

Categoría: respuesta molecular

Respuesta molecular:

Desaparición del oncogen BCR-ABL.

Falla:

No -desaparición del oncogen BCR-ABL.

**Variable independiente grupo experimental:**

El Trasplante Autólogo de Célula Tallo periférica (TACTP) investigado inicialmente por Goldman y cols. como manejo en pacientes con LMC y donde se observó la reconstitución hematopoyética, carece del problema de incompatibilidad HLA, sin embargo su desventaja con respecto al trasplante Alogénico es la contaminación con células neoplásicas.

El TACTP ha resuelto además, ciertos problemas relacionados al TMO Autólogo (médula ósea hipocelular, infiltrada, osteopetrosis, osteolisis. mielofibrosis, ó dificultad técnica para su extracción) con las siguientes ventajas sobre el TMO Alogénico y Autólogo: Una rápida recuperación de neutrófilos y plaquetas, reduciendo las complicaciones infecciosas y

hemorrágicas, una menor contaminación por células neoplásicas y observándose además una recuperación hematopoyética completa posterior a tratamiento mieloablativo.

Las células tallo periféricas se obtienen mediante leucoféresis. Los procedimientos de aféresis pueden ser realizados en condiciones basales ó bien durante períodos de regeneración hematopoyética. La movilización de las células tallo a la sangre periférica puede estimularse mediante la aplicación de quimioterapia y la administración de factores de crecimiento hematopoyético como el FEC-GM, FEC-G ó IL-3.

El número de unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM) se utilizan como una medida adecuada para predecir la capacidad de reconstitución hematopoyética en trasplante Autólogo. Aunque se han descrito injertos con cifras muy variables de UFC-GM, que van entre 2 y  $50 \times 10^4$ /Kg. de peso del paciente. La movilización de las CTP utilizando quimioterapia y factores de crecimiento hematopoyético, puede reducir el número de procedimientos de leucoféresis 6 a 8, que en condiciones basales pudiera requerir hasta 20 procedimientos, para lograr una cosecha satisfactoria.

Seleccionando las células tallo periféricas con alguno de los métodos actuales de separación con selección positiva ó negativa, podemos disminuir significativamente la posibilidad de la contaminación con células neoplásicas y por otra parte lograr un injerto satisfactorio cuantificando con precisión las cifras de UFC-GM a transplantar. Los resultados actuales de TACTP en LMC con purga "in vivo", purga "in vitro" ó selección positiva CD-34 son variables, con rango de respuestas citogenéticas mayores de 30 a 68% y supervivencia de 50 a 80% a 3 años, 60 a 83% a 4 años y 56% a 5 años.

En el presente protocolo, iniciaremos con la movilización de CTP con mini-ICE y FEC-G, para cosecha de CTP con selección positiva CD34 y análisis citogenético, concluyendo con un condicionamiento con el esquema BuCy2 y trasplante Autólogo de CTP.

Se analizarán las complicaciones clínicas de la movilización, cosecha, duración de hospitalización, necesidad de antibióticos y requerimientos transfusionales. Así mismo se revisará de la muestra obtenida: número y características de las citoféresis, número de CMN, células CD34 obtenidas por inmunofenotipo, citogenético, molecular de la suspensión celular a trasplantar. Valoración de los efectos de la criopreservación sobre células tallo periférica con

cuantificación del número de CMN y UFC-GM tras la descongelación. Análisis de resultados clínicos obtenidos con el trasplante de CTP en pacientes con LMC.

La ruta crítica del TACTP será de acuerdo a los siguientes pasos:

1.- MOVILIZACION DE CELULA TALLO A SANGRE PERIFERICA.

- a.- Ciclofosfamida 4 g / m<sup>2</sup> / día 1 I.V. 1 h.
- b.- Mesna 20% de la dosis de ciclofosfamida, 3 dosis, a las 0, 4 y 8 hrs.
- c.- Filgrastim 5 ug / Kg / dosis día +1 y hasta completar cosechas.

2. -COSECHA DE CELULA TALLO HEMATOPOYETICA PERIFERICA.

a.- Se iniciará la recolección de CTH de sangre periférica con procedimiento de aféresis siguiendo las normas del procesamiento automatizado de células mononucleares del separador CS-3000, programa TNX-6 y una vez que la recuperación medular temprana se evidencie a través de la presencia de cuenta de leucocitos de  $1 \times 10^9/L$  y CD34 >0.05% en SP.

b.- En cada paciente se valorará:

- I.-Número total de células y número de células mononucleares, células CD34+ de cada procedimiento y del producto final.
- II.-Número de células CD34+ HLA-DR- y análisis citogenético de cada cosecha.
- IV.-Número de procedimientos de aféresis realizados por paciente.

3. -CRIOPRESERVACION.

4. -MEDIDAS DE PROFILAXIS.

- a.- Dieta para paciente en aislamiento estricto, baja en bacterias, de 2000-3000 Kcal. al día, dependiendo de las condiciones clínicas del enfermo.
- b.- Baño diario con jabón neutro, con isodine en región perianal y manos. Nistatina en polvo en regiones axilares e inguinales.
- c.- Colutorios con bicarbonato de sodio y nistatina (alternos) cada 4 hrs., hasta que los neutrófilos se encuentren por arriba de 1000/mm<sup>3</sup> en 3 días consecutivos.

d.- En las mujeres: óvulos de nistatina, aplicación vaginal cada 12 hrs., Hasta que la cuenta de neutrófilos esté arriba de 1000/mm<sup>3</sup>.

e.- La profilaxis para pneumocystis carinii se efectuará con trimetoprim + sulfametoxazol 2 tabletas cada 8 hrs. del día -9 al día -2.

f.- Para efectuar profilaxis para infecciones por bacterias gram negativas, principalmente de tubo digestivo, se utilizará ciprofloxacina 250-500 mg cada 12 hrs. a partir del día -1 y hasta la recuperación de los neutrófilos, o bien hasta que se inicie un antimicrobiano de amplio espectro. Igualmente se usará fluconazol 100-200 mg/día del día -1 hasta la recuperación de neutrófilos, como profilaxis para micosis.

g.- Vitamina K hidrosoluble 10 mg I.V. cada tercer día, en caso que el paciente reciba antimicrobianos de amplio espectro (para prevenir deficiencia de esta vitamina y alteraciones de coagulación).

h.- Los pacientes con masa tumoral alta, deberán recibir alopurinol 300-600 mg al día y bicarbonato de sodio 1 gr. V.O. cada 6-8 hrs. antes y después de la quimioterapia de acondicionamiento.

i.- Los pacientes que reciban busulfan a dosis altas, deben tratarse con difenilhidantoina 100 mg cada 8 hrs. el primer día del busulfan y posteriormente cada 12 hrs., hasta finalizar el mismo.

j.- Alimentación enteral o parenteral total y sin tubo digestivo funcional, en pacientes incapaces de ingerir más de 1000 Kcal. por día.

k.- Todos los productos sanguíneos serán irradiados y transfundidos si es posible utilizando filtros desleucocitadores.

l.- La dieta que deberá recibir el paciente será baja en bacterias y preparada de acuerdo al protocolo vigente en el departamento de dietología. Se llevará un control del balance de líquidos y Kcal. que el paciente ingiera durante el período de internamiento.

m.- Valoración nutricional diario por el personal de dietología, así como balance nitrogenado semanal para determinar el estado catabólico del paciente.

n.- Los pacientes con pérdida de peso del 6% o mayor con relación al basal, deberán recibir apoyo nutricional con alimento polimérico de acuerdo a valoración clínica.

ñ.- La indicación de nutrición enteral o parenteral ya se ha descrito en el inciso k del párrafo anterior.

#### 5. - REGIMEN DE ACONDICIONAMIENTO.

Terapia Antiemética.

a.- Dexametasona 16 mg 30 min. antes del inicio de la quimioterapia, diluir en 20 ml de solución NaCl 0.9%, infusión de 15 min.

b.- Ondansetron 8 mg 30 min. antes del inicio de la quimioterapia y 3 horas después. Diluir en 20 ml solución NaCl 0.9%. Infusión de 15 min.

Quimioterapia de acondicionamiento.

a.- Busulfan 16 mg/kg repartidos en 16 dosis de 1 mg/kg cada 6 hrs., Vía oral, los días -8, -7, -6 y -5. Presentación tabletas de 2 mg. Las tabletas se hacen polvo y se diluyen con agua o jugo de naranja.

#### 6. -INFUSION DE CELULA TALLO HEMATOPOYETICA PERIFERICA.

a.- Un día previo a la infusión se localizarán las bolsas correspondientes y se colocarán en la fase gaseosa del tanque de almacenamiento, con el objeto de prevenir la ruptura de las mismas en el momento de la descongelación.

b.- Las bolsas serán descongeladas en baño térmico a 37°C e infundidas inmediatamente.

c.- Cada bolsa se administrará a intervalos de 20-30 min.

d.- Durante la infusión, se producirá un olor desagradable que durará varios días, debido a la eliminación del dimetilsulfóxido por la piel del paciente.

e.- La infusión se llevará a cabo el día

0. jf.- Premedicación:

Hidrocortisona 200 mg I.V. D.U.

Difenhidramina 50 mg. I.V. D.U.

Clorhidrato de clorfeniramina 20mg I.V. P.R.N.

g.- Se aplicará a través del catéter de Hickman en infusión de 60-120 min.



h.- Factor estimulante de colonias granulocito 300 ug/m<sup>2</sup> S.C. vía subcutánea, iniciar el día +8 y hasta neutrófilos totales mayor de 1000/mm<sup>3</sup> por 3 días consecutivos.

#### 7. -TRANSFUSION DE FRACCIONES SANGUINEAS.

a.- Se transfundirá paquete globular para mantener hemoglobina arriba de 10gr ó hematocrito mayor del 30%. Usaremos plaquetas obtenidas por aféresis cada 24-48 hrs. según el estado clínico cuando la cifra de plaquetas se encuentre por abajo de 10000 mm<sup>3</sup>.

b.- El uso de plasma fresco congelado, crioprecipitados o alguna otra fracción del plasma, se reservará para aquellos pacientes en los que se demuestre alguna deficiencia en factores de la coagulación.

c.- La actualización de los donadores de plaquetas de aféresis (serología principalmente) se llevará a cabo cada 10 días según la Ley General de Salud.

d.- Todos los productos a transfundir, principalmente paquete globular y plaquetas, deberán ser citomegalovirus negativo, irradiadas y administradas por medio de filtro desleucocitador.

#### 6. -MANTENIMIENTO CON IMATINIB.

a.- Todos los pacientes que completen la fase de cosecha y transplante con un injerto completo y aquellos en los que habiéndose cosechado no completaron la cantidad de células CD34 mínimas para el transplante, al igual que los que sean aleatorizados al grupo control, recibirán por 12 meses mesilato de imatinib 400 mg diarios V.O.

El mesilato de imatinib (anteriormente llamado STI571) es un inhibidor de la proteína cinasa de tirosina asociado con el marcador bcr-abl, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el c-Kit, pero no de los otros miembros de la familia de receptores de cinasas Tipo III, tales como el Flt-3 y el Fms. La leucemia mieloide crónica (CML) representa una enfermedad - objetivo ideal para el tratamiento con el STI571 dado que se cree que la bcr-abl cinasa juega un papel dominante en la desregulación de la proliferación de las células mieloides, la cual es la principal característica de la enfermedad. La inhibición de la cinasa bcr-abl parece tener más efecto antileucémico durante la fase crónica de la CML, dado que las anormalidades cromosómicas pueden conducir el proceso de malignidad durante la fase

acelerada y la crisis blástica. Sin embargo, la actividad durante estas fases tardías de la enfermedad no puede ser descartada completamente. La completa erradicación del clon bcr-abl durante la terapia con imatinib podría elevar las posibilidades de cura. El imatinib muestra selectividad por la proteína cinasa de tirosina *in vitro*, a nivel celular e *in vivo*. El compuesto inhibe específicamente la proliferación de las células de expresión bcr-abl. En estudios de formación de colonias utilizando sangre periférica *ex vivo* y muestras de médula ósea, el imatinib muestra inhibición selectiva por las colonias bcr-abl positivas de pacientes con CML. En modelos animales, el compuesto muestra una potente actividad antitumoral contra las células con bcr-abl y v-abl a dosis tolerables.<sup>27</sup>

Los pacientes recibirán una administración oral diaria de imatinib a una dosis de 400 mg durante 12 meses. Luego de haber completado los 12 meses de terapia, los pacientes podrán ser elegibles para recibir terapia adicional, si se prueba que, en opinión del investigador el paciente se beneficia con el tratamiento con imatinib y en ausencia de cualquier preocupación concerniente a la seguridad.

El imatinib deberá ser administrado cada mañana junto con el desayuno. El imatinib es un irritante local y debe tomarse en posición sentado con un gran vaso de agua (250 mL/8 oz). Los pacientes para quienes la dosis de imatinib ha sido escalada a 400 mg dos veces al día, como se describió previamente, tomarán la segunda dosis todas las noches junto con la cena.

**Usos:** El imatinib se está utilizando en diversas patologías hematológicas principalmente en leucemia Granulocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda Ph1+ y ocasionalmente en leucemia mieloblástica aguda.

**Presentación:** Cáps. 100 mg.

**Dosificación:** en LGC se ha utilizado a dosis variables, que van de 400 a 800 mg/día, por vía oral.

**Toxicidad:**

Los efectos adversos del imatinib se observan con la administración crónica del medicamento puede haber: náusea leve en aproximadamente 40% de los pacientes, artralgias, mialgias, edema periorbital, han sido observados en el 10% de los pacientes, finalmente edema intersticial y ganancia de peso fueron ocasionales, neutropenia y trombocitopenia se han llegado a presentar en grado 2/3, así como una elevación de transaminasas sin una clara relación con la dosis.

**Dosis:**

Durante este estudio, los pacientes recibirán una administración oral diaria de imatinib a una dosis de 400 mg por hasta 12 meses, luego de completar los 12 meses de terapia, los pacientes podrán ser elegibles para recibir una terapia adicional habiéndose aprobado que, a juicio de los investigadores, el paciente se ha beneficiado con el tratamiento de imatinib y en ausencia de preocupación en cuanto a la seguridad, pudiendo continuar hasta que uno de los siguientes hechos suceda:

1. - Progresión a fase blástica.
2. - Muerte.
- 3.- Desarrollo de toxicidad intolerable.
- 4.- El investigador siente que el paciente pierde interés en continuar con la terapia.

**Escalada en la dosis:**

Pacientes que no demuestran una respuesta hematológica completa a los 3 meses o que alcanzaron la respuesta hematológica completa pero sufrieron recidiva (documentada por dos muestras tomadas con al menos 2 semanas de diferencia).

Que no demostraron una respuesta citogenética completa o parcial a los 12 meses ó que alcanzaron una respuesta citogenética completa o parcial pero sufrieron recidiva.

Pueden tener un incremento de dosis a un total de 600 mg diarios. Si la respuesta sigue sin ser satisfactoria, las dosis podrán incrementarse a 800 mg diarios, administrados como 400 mg 2

veces al día, habiéndose probado que no existen problemas concernientes a la seguridad (AST, ALT y las bilirrubinas deben ser monitorizadas antes de la escalada en la dosis).

### **Modificaciones de dosis:**

Todas las interrupciones, reducciones o cambios en la administración de la medicación experimental deben ser registrados. Con excepción de la toxicidad no hematológica de grado 3 o 4, cualquier paciente que recibe una dosis reducida y que no alcanza o mantiene una respuesta hematológica completa a la dosis reducida puede escalar a la dosis precedente luego de un mínimo de seis semanas de terapia, si se prueba que no alcanzó un grado de toxicidad.

#### Toxicidad no hematológica

##### *Grado 2*

Si un paciente experimenta toxicidad no hematológica grado 2 con una duración de más de 2 días, la droga debe ser suspendida hasta que la toxicidad se hubiese resuelto a un grado = 1. La medicación experimental podrá entonces ser administrada nuevamente a una dosis de 400 mg diarios. Si la toxicidad grado 2 recurre, la droga debe ser suspendida hasta que la toxicidad se hubiese resuelto a un grado = 1. La medicación experimental podrá entonces ser administrada nuevamente a una dosis de 300 mg diarios.

##### *Grado 3/4*

Si un paciente experimenta toxicidad de grado 3 / 4, la droga debe ser suspendida hasta que la toxicidad se hubiese resuelto a un grado = 1. La medicación experimental podrá entonces ser administrada nuevamente a una dosis de 300 mg diarios.

#### Toxicidad hematológica

##### *Grado 2*

No se interrumpirá o reducirá la dosis para grados de toxicidad 1/2.

### *Grado 3/4*

Si un paciente experimenta toxicidad hematológica grado 3 / 4, definida como ANC <1000 / mm<sup>3</sup> o recuento de plaquetas <50 x 10<sup>9</sup>/L, la medicación experimental debe ser discontinuada hasta que la toxicidad se resuelva a un grado \_2. El ANC. Tendrá prevalencia sobre el WBC en la determinación del grado de leucopenia (las dosis no deberán ser interrumpidas para un paciente con WBC <2.0 x 10<sup>9</sup> /L pero un ANC >1.0 x 10<sup>9</sup> /L. Sí la toxicidad se resuelve dentro de las dos semanas, el tratamiento puede ser retomado a una dosis de 400 mg diarios. Si el grado de toxicidad 3 / 4 recurre o persiste más allá de 2 semanas, la medicación experimental será discontinuada hasta que la toxicidad se resuelva a un grado \_ 2. La medicación experimental podrá ser retomada a una dosis de 300 mg diarios.

Los pacientes que desarrollen anemia podrán ser transfundidos a discreción del Investigador.

### **Evaluación de eficacia:**

Todos los parámetros de eficacia serán analizados de manera descriptiva.

Las variables de eficacia en este estudio clínico son:

- Remisión hematológica.
- Respuesta citogenética.
- Mejoría sintomática.

Se presentarán el número y el porcentaje de los respondedores hematológicos y citogenéticos (según categoría de respuesta: completa, parcial, menor y mínima, tal como se definió en la sección 3), al igual que los intervalos de confianza del 95% asociados.

La mejora sintomática será presentada como listados y tablas cruzadas (inicio versus peor valor durante el estudio clínico).

Los análisis de las variables de eficacia serán realizados en los siguientes subgrupos de la población ITT:

- Resistencia / refractariedad hematológica.
- Resistencia / refractariedad citogenética.
- Pacientes que son intolerantes al interferón.

### **Monitoreo terapéutico:**

Las evaluaciones de seguridad consistirán en el monitoreo y el registro de todos los eventos adversos y todos los eventos adversos de informe inmediato. Se monitoreará mensualmente la hematología. De manera adicional, la SGOT (AST), SGPT (ALT), bilirrubina, fosfatasa alcalina y LDH serán monitoreados semanalmente durante el primer mes.

### Eventos adversos

La información acerca de todo evento adverso, ya sea descrita voluntariamente por el paciente, descubierto durante un interrogatorio por el investigador, o detectado por medio de exámenes físicos, de laboratorio u otros, debe ser recolectada y registrada en el formulario de reporte de casos de Eventos Adversos y seguida apropiadamente. Un evento adverso es definido como cualquier signo indeseable, síntoma o condición médica que acontece luego de iniciada la administración de la medicación experimental (imatinib), independientemente de si es considerado como relacionado a la medicación experimental o no. Las condiciones médicas / enfermedades ocurridas antes del inicio del ensayo clínico serán consideradas eventos adversos si empeoran luego del comienzo del mismo (cualquier procedimiento indicado en el protocolo). Los eventos clínicos ocurridos antes del comienzo del estudio pero luego de la firma del consentimiento informado serán registradas en el formulario de reporte de casos de Historia Médica / Condiciones Médicas actuales.

Los resultados de laboratorio anormales constituyen eventos adversos, solo si inducen signos clínicos o requieran intervención terapéutica, y deben ser registrados en el formulario de reporte de casos de Eventos Adversos, bajo los signos, síntomas o diagnósticos asociados con ellos.

Tanto como sea posible, cada evento adverso debe también ser descrito por:

1. Su duración (comienzo y fin).
2. Su grado de severidad según criterios de toxicidad del NCI / NIH (grados 1-4) (Apéndice 1).
3. Su relación con la droga experimental (sospechado/ no sospechado).
4. La(s) acción (es) tomada (s).

### Eventos adversos de informe inmediato

La información acerca de todo evento adverso de informe inmediato debe ser recolectada y registrada en el formulario de reporte de casos de Eventos Adversos de Informe Inmediato. Para garantizar la seguridad del paciente, cada evento adverso de informe inmediato debe ser también reportado a NOVARTIS dentro de las 24 horas de tenerse conocimiento del mismo.

Un Evento Adverso de Informe Inmediato es un signo, síntoma o condición médica indeseable que:

1. Es fatal o implica riesgo de vida.
2. Requiere o prolonga la hospitalización.
3. Es significativo o produce incapacidad y/o falta de habilidad permanente.
4. Constituye una anomalía congénita o defectos de nacimiento.
5. Puede poner en peligro al paciente y puede requerir intervención médica o quirúrgica para prevenir algunos de los ítems mencionados arriba.

Los eventos NO considerados como eventos adversos de informe inmediato son aquellas hospitalizaciones que ocurren bajo las siguientes circunstancias:

- Planeadas antes de ingresar al estudio clínico.
- Para tratamientos electivos de una condición preexistente.
- Ocurridos en una emergencia, sobre base ambulatoria y que no resulten en una noche completa de hospitalización (salvo que cumplan con los criterios arriba mencionados).
- Tratamientos de rutina o monitoreo de la indicación del estudio y no asociados con cualquier condición deteriorante.

El embarazo, si bien no es en sí mismo un evento adverso de informe inmediato, deberá también ser reportado en un formulario de eventos adversos de informe inmediato o en un formulario de embarazo y ser seguido para determinar los resultados, incluyendo finalización espontánea o voluntaria del embarazo, detalle del nacimiento, y presencia o ausencia de cualquier defecto o anomalía congénita.

Debe reportarse cualquier evento adverso de informe inmediato que le ocurra al paciente luego de haber brindado el consentimiento informado y hasta las cuatro semanas posteriores de haberse finalizado en estudio clínico. Todo evento adverso de informe inmediato también debe ser reportado para el período en el cual el protocolo del estudio clínico interfiere con la medicación estándar administrada al paciente. Discontinuación del tratamiento durante el período de "wash out", (cambio en el tratamiento a una dosis fija de medicación concomitante).

### Evaluaciones de laboratorio

#### Hematología

Se realizará semanalmente durante el primer mes, de allí en más mensualmente, y durante el día de la discontinuación temprana de la medicación experimental.

La hematología incluye determinaciones de hemoglobina, WCB totales, ANC, recuento de plaquetas y un recuento diferencial incluyendo neutrófilos, bandas, monocitos, eosinófilos, basófilos, formas tempranas y porcentaje de blastos.

EL ANC usado por el centro para realizar los ajustes de dosis deberá ser registrado en el CRF. Para los propósitos del análisis, el ANC será calculado automáticamente de:  $WCB \times \text{neutrófilos segmentados} + \text{bandas} \times 10^9/L$ .

#### Bioquímica

Realizar mensualmente en el primer año de tratamiento, después cada 2 meses y en el día de suspensión temprana del fármaco de estudio. La bioquímica incluye BUN, creatinina, ácido úrico, albúmina, proteínas totales, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, AST (SGOT), ALT (SGPT), y LDH.

#### Examen físico

Un examen físico incluyendo signos vitales, peso y una evaluación del área de la superficie corporal durante la selección y se repetirá mensualmente durante el resto del primer año bajo tratamiento. La información acerca del examen físico y los signos vitales debe estar presente en la documentación original en el centro. Los hallazgos significativos realizados luego del



comienzo de la administración de la medicación experimental, que cumplan con la definición de un evento adverso, deben registrarse en el formulario de reporte de caso de eventos adversos.

#### Análisis de médula ósea

Los aspirados y/o biopsias de médula ósea incluyendo el análisis citogenético deben ser realizados a todos los pacientes cada seis meses durante el primer año del estudio, y de allí en más cada seis meses hasta la discontinuación.

#### Análisis Inmunofenotípico

El inmunofenotipo por citometría de flujo se realizará para iniciar la cosecha, una vez que la recuperación medular temprana se evidencie a través de la presencia de cuenta de leucocitos de  $1 \times 10^9/L$  y CD34 >0.05% en SP.

Se cuantificará adicionalmente en cada cosecha el número total de células, número de células mononucleares, células **CD34+ HLA-DR-**.

#### Análisis Citogenético

Se aleatorizará con un estudio citogenético basal máximo de 6 meses previo al inicio del protocolo, en el brazo A se analizará el producto de la 2da cosecha, previo al inicio de imatinib, a los 6 y 12 meses de iniciado el tratamiento. En el brazo B se asignará con estudio citogenético basal, a los 6 y 12 meses de tratamiento con imatinib.

#### Análisis Molecular

Se realizará por RT-PCR en el brazo A, el análisis de oncogenes bcr-abl, bcl-xl, bax y bcl-xs previo a la movilización, en la 2da cosecha, previo al inicio de imatinib y al concluir 1 año de tratamiento. En el brazo B el análisis incluirá un basal y a los 12 meses de l tratamiento.

#### Status de Performance

El status de Performance ECOG será medido con la escala correspondiente.

### Niveles de drogas y evaluaciones farmacocinéticas

No se realizarán mediciones de niveles de droga.

Las evaluaciones de seguridad consistirán en el monitoreo y el registro de todos los eventos adversos y todos los eventos adversos de informe inmediato. Se monitoreará mensualmente la hematología. De manera adicional, la SGOT (AST), SGPT (ALT), bilirrubina, fosfatasa alcalina y LDH serán monitoreados semanalmente durante el primer mes.

### **ESCALAS DE MEDICION DE LAS VARIABLES**

#### Variable dependiente grupo experimental:

Tipo: NOMINAL, DISCRETA Y FINITA.

Escala: TIPO DE RESPUESTA.

#### Variable dependiente grupo control:

Tipo: NOMINAL, DISCRETA Y FINITA.

Escala: TIPO DE RESPUESTA.

#### Variable independiente grupo experimental:

Tipo: NOMINAL, DISCRETA Y FINITA.

Escala: TRATAMIENTO A.

#### Variable independiente grupo control:

Tipo: NOMINAL, DISCRETA Y FINITA.

Escala: TRATAMIENTO B.

### **SISTEMA DE CAPTACION DE INFORMACION**

a.- Tabla de evaluación de ECOG.

b.- Tabla de reacciones adversas clínicas y de laboratorio.

c.- Tabla de criterios para evaluación de la toxicidad por quimioterapia antineoplásica sistémica (NCI-NIH).

d.- Historia clínica.

## **ESQUEMA DE EVENTOS**

Los pacientes deberán ser seguidos de acuerdo al cronograma de visitas y evaluaciones que se describe en las tablas 1 y 2. Una vez probado que no existen preocupaciones concernientes a la seguridad, los pacientes pueden ser evaluados por el médico tratante mensualmente.

La periodicidad de los estudios se muestra en el esquema siguiente:

**Tabla 1 Cronograma de visitas y evaluaciones para el grupo control y la fase de mantenimiento del grupo experimental.**

| <b>Mes</b>   | <b>1</b> | <b>1</b>       | <b>2</b> | <b>3</b>  | <b>4</b>  | <b>5</b>  | <b>6</b>  | <b>7</b>  | <b>8</b>  | <b>9</b>  | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> | <b>13</b> |
|--|----------|----------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Semana</b>                                      | <b>1</b> | <b>4</b>       | <b>8</b> | <b>12</b> | <b>16</b> | <b>20</b> | <b>24</b> | <b>28</b> | <b>32</b> | <b>36</b> | <b>40</b> | <b>44</b> | <b>48</b> | <b>52</b> |
| <b>Visita #</b>                                    | <b>1</b> | <b>2</b>       | <b>3</b> | <b>4</b>  | <b>5</b>  | <b>6</b>  | <b>7</b>  | <b>8</b>  | <b>9</b>  | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> | <b>13</b> | <b>14</b> |
| Registro del paciente                              | X        |                |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
| Historia médica relevante                          | X        |                |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
| Historia de la enfermedad                          | X        |                |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
| Síntomas relacionados con el cáncer                | X        |                |          |           | X         |           |           | x         |           |           | x         |           |           | X         |
| Compromiso extramedular                            | X        |                |          |           | X         |           |           | x         |           |           | x         |           |           | X         |
| Status de performance ECOG                         | X        | X              | X        | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         |
| Análisis morfológico y citogenético de médula ósea | X        |                |          |           |           |           |           | x         |           |           |           |           |           | x         |
| Análisis de Oncogenes por RT-PCR                   | X        |                |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           | X         |
| Hematología a                                      | X        | X              | X        | X         | X         | X         | x         | x         | x         | x         | x         | x         | x         | x         |
| Bioquímica sanguínea a                             | X        | x <sup>b</sup> | x        | x         | X         | x         | x         | x         | x         | x         | x         | x         | x         | x         |
| Eventos adversos                                   |          |                |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
| Medicación concomitante                            |          |                |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
| Comentarios  |          |                |          |           |           |           |           | X         |           |           |           |           |           |           |

a Realizar una vez al mes y a la discontinuación temprana

b Sólo tests de la función hepática [AST (SGOT), ALT (SGPT), bilirrubina, fosfatasa alcalina y LDH

## **TECNICA PARA CONTROLAR LAS DIFERENCIAS ENTRE LOS SUJETOS DE ESTUDIO**

SELECCION HOMOGENEA.

## **TECNICA PARA CONTROLAR LAS DIFERENCIA SITUACIONALES ENTRE LOS SUJETOS DE ESTUDIO**

ALEATORIZACION.

## **PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LA MUESTRA**

Todos los pacientes con LGC en FC con falla al tratamiento con  $\alpha$ -interferón que cumplan con los criterios de inclusión, serán candidatos a incluirse a alguno de los brazos de tratamiento.

Los pacientes con "intención de tratar" (ITT) son todos aquellos pacientes que recibieron al menos una dosis de la medicación experimental y de quienes se dispone, al menos una medición de eficacia posterior al Inicio.

Se calculó con los siguientes supuestos:

\_ 0.05

\_ 0.20

\_ 30

Con la fórmula para proporciones:

$$N = [Z_{\alpha} P(1-P) (1/q_1+1/q_2) + Z_{\beta} P_1 (1-P_1) (1/q_1) + \{P_2 (1-P_2) (1/q_2) \} ]^2$$

$$N = 33$$

## **ANALISIS ESTADISTICO DE LA INFORMACIÓN QUE SE OBTENDRA**

Este protocolo sigue un diseño prospectivo comparativo y aleatorizado.

### **1. HIPÓTESIS GENERAL:**

Los pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica a los cuales se les trata en ATCTP + Imatinib como tratamiento de mantenimiento tienen una respuesta citogenética completa de un 30% igual o mejor comparada a la obtenida con Imatinib.

Se realizará estadística descriptiva de las características basales de los pacientes en ambos grupos.

Se compararan proporciones mediante la prueba exacta de Fisher como método de contraste para rechazar H0.

El análisis de supervivencia y supervivencia libre de transformación se realizará con el Método de Kaplan y Meier.

## 2. HIPÓTESIS ESTADÍSTICA:

H 0 : A = B

H 1 : A > B

### **TIPO DE ESTUDIO**

PROSPECTIVO.

ALEATORIZADO.

COMPARATIVO.

LONGITUDINAL.

OBSERVACIONAL.

### **CONSIDERACIONES ETICAS APLICABLES AL ESTUDIO**

Se considerarán los acuerdos de la Declaración de Helsinki modificación de Tokio de 1975, referentes a sus principios fundamentales y a la investigación médica asociada a la asistencia profesional (investigación clínica), así como la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en su título quinto, capítulo único, artículos 96 al 103.

### **CONSIDERACIONES DE LAS NORMAS E INSTRUCTIVOS INSTITUCIONALES EN MATERIA DE INVESTIGACION CIENTIFICA**

Se basará en las normas e instructivos institucionales, establecidos por la Comisión de Investigación Científica del IMSS, a través de su Jefatura de Servicios de Investigación Médica, en materia de Investigación Científica.

## **CRONOGRAMA DE TRABAJO**

1. Elaborar protocolo de enero del 2003-febrero 2003.
2. Autorización del Comité Local de Investigación julio 2003 del Hospital de Especialidades del Centro Medico "La Raza" IMSS.
3. Aleatorización, recolección de datos en el servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Medico "La Raza" IMSS del 1o de abril del 2003 al 1o de julio de 2004.
4. Seguimiento de pacientes por 30 meses posterior a la aleatorización.
5. Análisis de resultados 1 al 15 Enero del 2006 por el investigador responsable.
6. Tratamiento estadístico del 16-30 Enero del 2006.
7. Análisis de resultados estadísticos del 1-10 de Febrero del 2006 por el investigador responsable y tesista.
8. Elaboración del informe final del 15-28 de febrero del 2006 por el investigador responsable y tesista con un procesador de textos Microsoft Word 2000 y el análisis estadístico en el programa SPSS 10, en una PC Sony VAIO PCG-687P.

## RESULTADOS

Entre febrero del 2003 y abril del 2005 se incluyeron 41 pacientes con diagnóstico de LGC en fase crónica. Se aleatorizaron a los pacientes a dos brazos, un grupo sometido a autotrasplante de células tallo (ATCTP) y posteriormente imatinib a 400mg c/24hrs (brazo A) con 15 pacientes y otro a recibir imatinib 400mg VO c/24hrs (brazo B) con 26 pacientes. Se excluyeron 3 pacientes, 2 del brazo A uno de ellos debido a crisis blástica y el segundo por problemas administrativos con la institución. También se excluyó uno del brazo B por problemas administrativos con la institución. Se tuvieron 38 pacientes evaluables 13 en el brazo A, siendo de estos 2 mujeres y 11 hombres, y del brazo B 25 pacientes 14 mujeres y 11 hombres. La mediana de edad al diagnóstico fue de 35 años para el brazo A y 45 años para el brazo B, la mediana de edad a la aleatorización fue de 37 y 48 para el brazo A y brazo B respectivamente. La mediana de tiempo del diagnóstico a la aleatorización fue de 31 meses para el brazo A y 23 meses para el brazo B. Las características demográficas de los pacientes se encuentran descritas en la tabla 1. El sexo por brazos de tratamiento se encuentra descrito en la grafica 1.

TABLA 1: Características demográfica de ambos grupos.

|  | Brazo A           | Brazo B           | Valor P |
|--|-------------------|-------------------|---------|
| No de pacientes (%)  | 13a / 9b<br>(100) | 25 / 29C<br>(100) |         |
| Género hombres/mujeres (%)                                   | 11 / 2            | 11 / 14           |         |
| Edad al Dx media (rango)                                     | 37 (16-53)        | 41.7 (18-63)      | NS      |
| Edad al Dx Mediana (desviación estándar)                     | 35 (10.8)         | 45 (12.9)         | NS      |
| Edad a la aleatorización media (rango)                       | 39.5 (19-57)      | 43.4 (18-66)      | NS      |
| Edad a la aleatorización mediana (desviación estándar)       | 37 (11.7)         | 48 (13.4)         | NS      |
| Tiempo del Dx a Aleatorización media (rango)                 | 33.8 (14-77)      | 25.8 (4-52)       | NS      |
| Tiempo del Dx a Aleatorización Mediana (desviación estándar) | 31 (20.4)         | 23 (14.1)         | NS      |

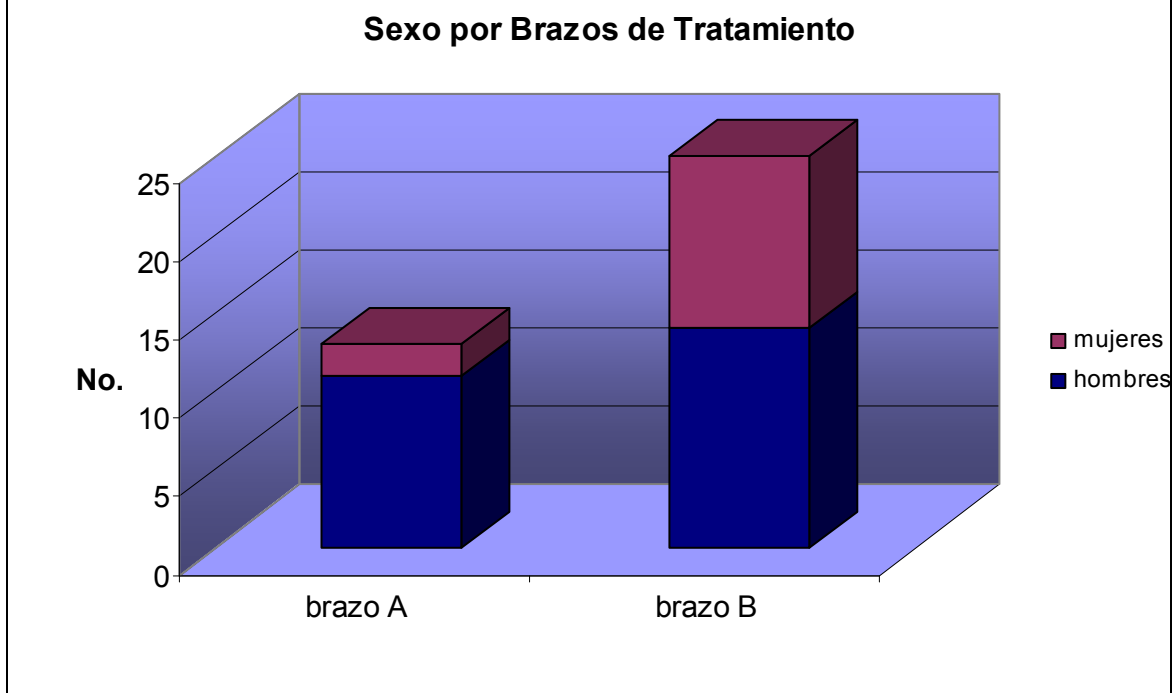
a Movilizados.

b Transplantados.

c Imatinib + 4 cruzados del brazo A.



Fig. 1. Sexo por Brazos de tratamiento.



#### CARACTERÍSTICAS PRONOSTICAS AL DIAGNOSTICO:

Las características pronósticas al diagnóstico de los pacientes se encuentran descritas en la tabla 2. Por riesgo de Hasford en el brazo A el riesgo bajo fue el más frecuente con 5 pacientes, y en el brazo B lo fue el riesgo alto con 11 pacientes. Por Sokal el más frecuente fue el riesgo alto con 6 pacientes en el brazo A, y en el brazo B el de riesgo intermedio con 11 pacientes. Esto se encuentra graficado en las figuras 2 y 3.

Tabla 2: Características Pronósticas al diagnóstico.

| Hasford           | Brazo A | Brazo B |
|-------------------|---------|---------|
| Riesgo bajo       | 5       | 6       |
| Riesgo intermedio | 4       | 9       |
| Riesgo alto       | 2 (2)   | 11      |
| Sokal             | Brazo A | Brazo B |
| Riesgo bajo       | 5       | 4       |
| Riesgo intermedio | 0       | 11      |
| Riesgo alto       | 6       | 10      |

Fig. 2 Sokal al Diagnóstico.

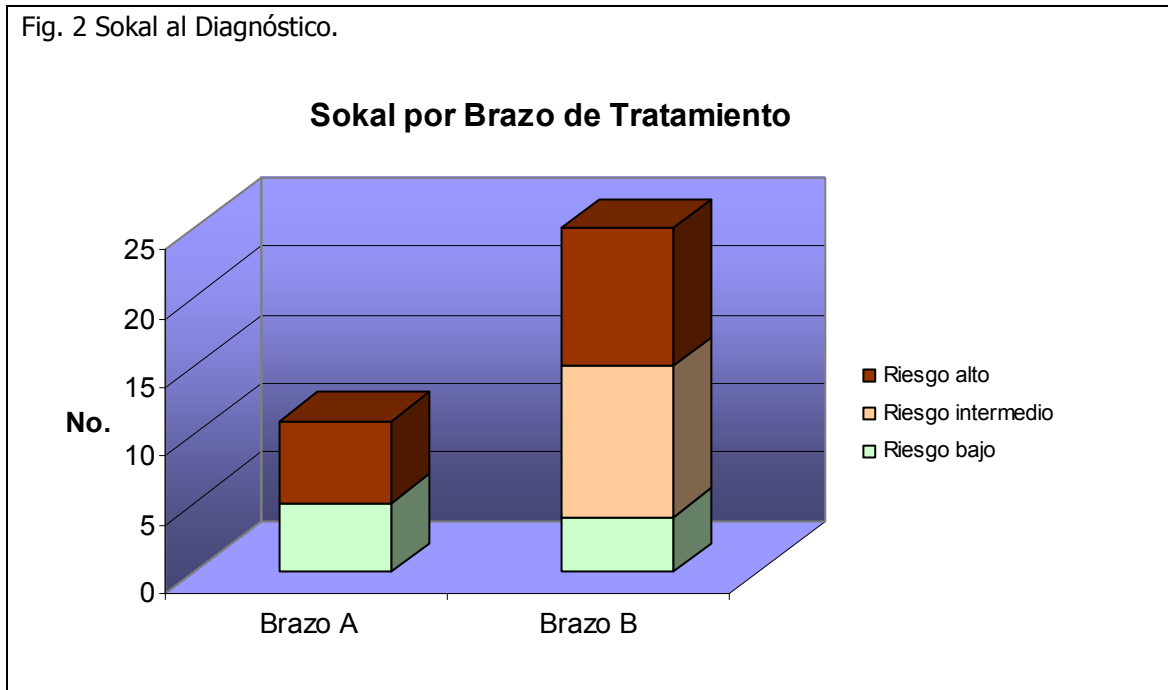
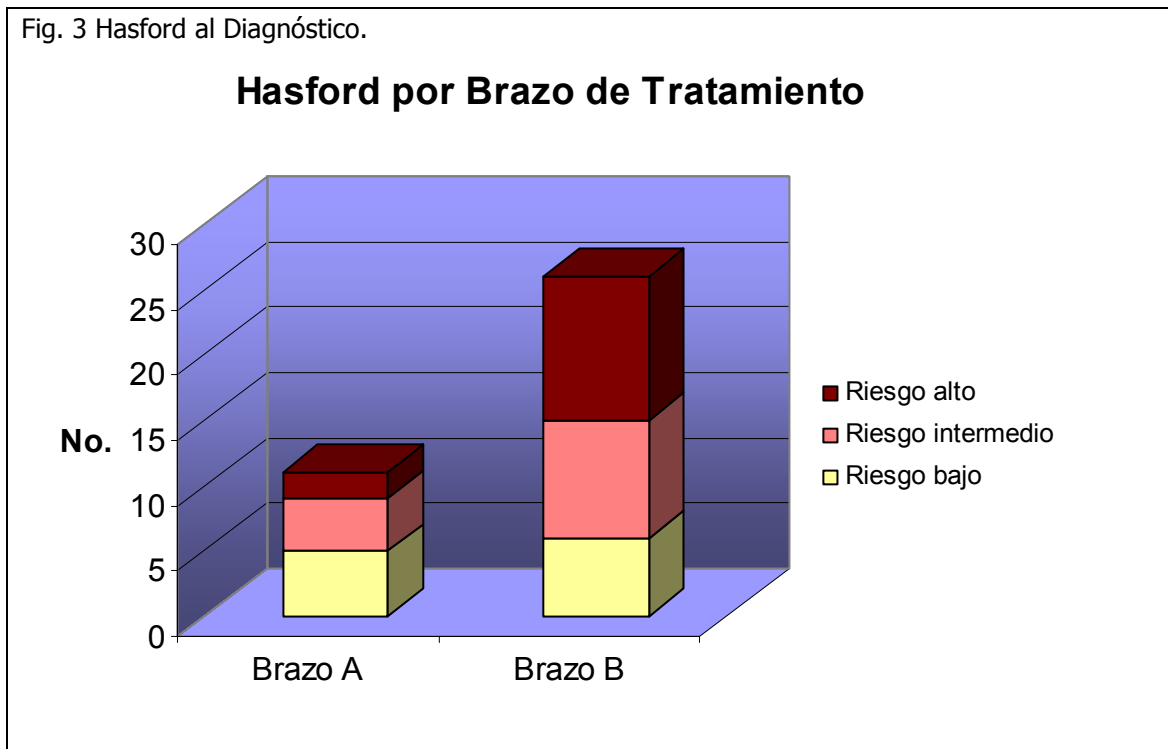


Fig. 3 Hasford al Diagnóstico.



#### **MOVILIZACIÓN Y COSECHA DE LAS CÉLULAS TALLO PERIFÉRICAS:**

Se realizó a 13 pacientes movilización de células tallo periféricas, fueron movilizados utilizando CFM + FEC-G a una dosis de 5 mcg / Kg. peso, un paciente además fue movilizado en 2da intención utilizando MiniICE que consiste en idarubicina a 8mg/m<sup>2</sup> cada 24hrs por 3 días,

citarabina a 800mg/m<sup>2</sup> en infusión de 2 hrs. cada 24hrs por 3 días y etopósido a 150mg/m<sup>2</sup> en infusión de 2 hrs. por tres días, más FEC-G a 5 mcg /Kg. peso siendo cosechados, previa colocación de catéter doble lumen tipo mahurkar con una mediana cosechas de 2 con un rango de 1-4, la mediana de células CD34 positivas de 4.4, x 10<sup>6</sup>/Kg. con un rango de 0.1 – 210 x 10<sup>6</sup>/Kg. La mediana de células mononucleares totales de 6212, con 83x 10<sup>6</sup>/Kg. La mediana de células CD34+/HLADR- fue de 56 x 10<sup>6</sup>/Kg. y 2 x 10<sup>6</sup>/Kg. de CD34+/HLADR+. De los 13 pacientes movilizados 4 cosechas fueron fallidas, por lo que los pacientes no se sometieron a trasplante autólogo, tres de ellas fueron debido a contaminación por blastos y una de ellas debido a que no se logro la dosis mínima requerida. Las características de la movilización se encuentran descritas en la tabla 3.

Tabla 3: Características de la movilización.

|                                      | Media | Mediana | Desviación estándar | Rango    |
|--------------------------------------|-------|---------|---------------------|----------|
| No. Cosechas                         | 2.2   | 2       | 0.7                 | 1-4      |
| CD34 x10 <sup>6</sup> / kg           | 22    | 4.4     | 56                  | 0.1-210  |
| CMN totales                          | 7485  | 6212    | 6064                | 38-20416 |
| CMN x kg peso x10 <sup>6</sup> / kg  | 110   | 83      | 93                  | 21-304   |
| CD34+ HLA-DR- x 10 <sup>6</sup> / kg | 19.7  | 56      | 2.5                 | 0.4-205  |
| CD34+ /HLA-DR+ x10 <sup>6</sup> / kg | 2.73  | 2       | 2.58                | 0.1-9.8  |

#### **AUTOTRASPLANTE DE CÉLULAS TALLO PERIFÉRICAS Y TRATAMIENTO DE SOPORTE:**

Nueve pacientes fueron sometidos a trasplante autólogo de células tallo periféricas, la mediana para el injerto fue de 18 días para el injerto eritrocitario (rango 16-27 días) y de neutrófilos (rango 14-19 días) , y para el injerto plaquetario fue de 19 días (rango 11-152 días). La mediana de tiempo entre el autotrasplante y el inicio de imatinib fue de 3.5 meses (rango 1-8 meses). Las características de los pacientes durante el trasplante se encuentran descritas en la tabla 4.

Tabla 4: Características del trasplante.

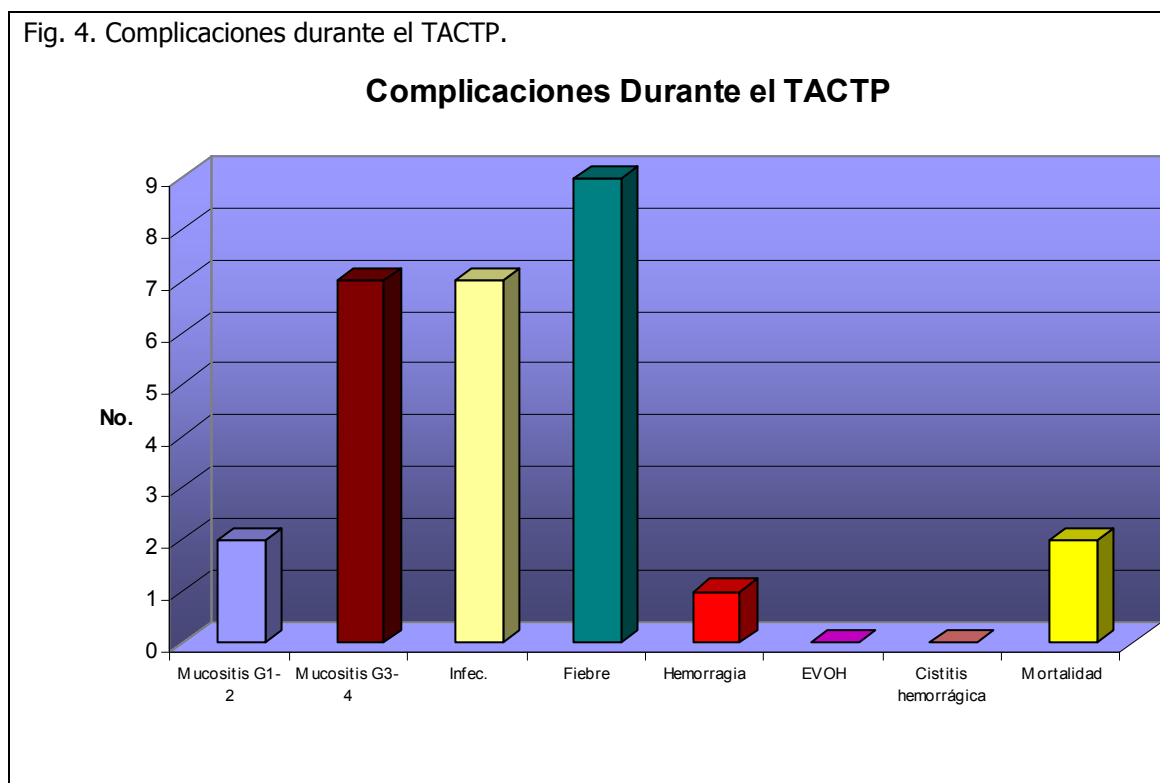
|   | Media | Mediana | Desviación estándar | Rango  |
|---|-------|---------|---------------------|--------|
| Injerto eritrocitario                     | 19    | 18      | 3.7                 | 16-27  |
| Injerto neutrófilos                       | 17    | 18      | 1.9                 | 14-19  |
| Injerto Plaquetas                         | 36    | 19      | 51                  | 11-152 |
| Tiempo ATCTP a inicio de Imatinib (meses) | 3.5   | 3.5     | 2.6                 | 1-8    |

Las complicaciones durante el trasplante más frecuentemente reportadas fueron mucositis grado 3 y 4 en 7 pacientes (78%), fiebre asociada a neutropenia en el 100% de los pacientes, con una mortalidad asociada al trasplante autólogo de 22% (2 pacientes). Las complicaciones asociadas al trasplante autólogo de células tallo periféricas se encuentran descritas en la tabla 5 y se encuentran graficadas en la figura 4.

Tabla 5: Complicaciones de trasplante.

|                       | 9 pacientes (No) | %   |
|-----------------------|------------------|-----|
| Mucositis grado 1 y 2 | 2                | 22  |
| Mucositis grado 3 y 4 | 7                | 78  |
| Infección             | 7                | 78  |
| Fiebre                | 9                | 100 |
| Hemorragia orgánica   | 1                | 11  |
| EVOH                  | 0                | 0   |
| Cistitis hemorrágica  | 0                | 0   |
| Mortalidad            | 2                | 22  |

Fig. 4. Complicaciones durante el TACTP.



## MANTENIMIENTO CON IMATINIB Y SEGUIMIENTO CITOGENETICO

Todos los pacientes que completaron la fase de cosecha y trasplante con un injerto completo y aquellos en los que habiéndose cosechado no completaron la cantidad de células CD34 mínimas para el trasplante, al igual que los que fueron aleatorizados al grupo control, recibieron mesilato de imatinib 400 mg diarios V.O. El 100% de los pacientes del brazo A y 88% de los del brazo B lograron RHC a las 4 semanas. En el seguimiento citogenético a los 6 meses se lograron 20% de respuestas citogenéticas mayores (RCGM) en el brazo A con 5 citogenéticos no evaluables debido a falta de desarrollo, y 48% en el brazo B, con 3 no evaluables por la misma razón. A 12 meses de seguimiento las RCGM en el brazo A fueron de 50% y en el brazo B de 56%, con 2 pacientes no evaluables en cada grupo. Los pacientes que lograron un seguimiento de 24 meses lograron RCGM de 66% en el brazo A y 36% en el brazo B con 3 y 4 fallas respectivamente. Las características de eficacia se encuentran descritas en la tabla 6. En cuanto a las remisiones moleculares en algún momento del seguimiento encontramos 40% de las mismas en el brazo A y 20% en el brazo B.

En cuanto a la toxicidad se encontró toxicidad grado 3-4 en la serie eritrocitaria en 10% y 20% en el brazo A y B respectivamente. La toxicidad grado 3-4 a leucocitos fue de 40 y 16 % en el brazo A y B respectivamente ( $p=0.003$ ). En cuanto a la toxicidad grado 3-4 en la serie plaquetaria esta fue de 20 y 12% en el brazo A y B respectivamente ( $p=0.016$ ). El 50% de los pacientes en el brazo A requirieron de ajuste de dosis debido a toxicidad contra 20% en el brazo B. Las características de toxicidad se encuentran descritas en la tabla 6.

Tabla 6: Características de eficacia y toxicidad.

|                                  | Brazo A %        | Brazo B %        |
|----------------------------------|------------------|------------------|
| RHC a las 4 semanas              | 100              | 88               |
| RCG mayor a 6 meses              | 20 (5 NE)        | 48 (3 NE)        |
| RCG mayor a 12 meses             | 50 (2 NE)        | 56 (2 NE)        |
| RCG mayor a 24 meses             | 33 (1 NE)        | 57 (2 NE)        |
| Perdida de respuesta             | 66<br>(4 Fallas) | 36<br>(3 Fallas) |
| Remisión molecular               | 40               | 20               |
| Toxicidad eritrocitaria G: 3-4   | 10               | 4                |
| Toxicidad a leucocitos G: 3-4    | 40               | 16               |
| Toxicidad a plaquetas G: 3-4     | 20               | 12               |
| Toxicidad no hematológica G: 3-4 | 0                | 0                |
| Suspensión por toxicidad         | 30               | 20               |
| Ajuste de dosis                  | 50               | 20               |

## **SUPERVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE PROGRESION:**

La mediana de supervivencia global desde el diagnóstico fue de 47 meses para el brazo A y 49 meses para el brazo B, la supervivencia global post-aleatorización fue de 28 meses para el brazo A y de 24 meses para el brazo B, en cuanto a la supervivencia libre de progresión desde el diagnóstico fue de 44 meses y 49 meses para los brazos A y B respectivamente, la supervivencia libre de progresión post-aleatorización fue de 24 meses para ambos brazos. Se tuvieron 30% de evoluciones clonales en el brazo A y 20% en el grupo B. No tuvimos evolución a fases aceleradas, sin embargo tuvimos 20% de crisis blásticas mieloides en el brazo A y 8 % en el brazo B, y crisis blástica linfóide en 10% de los pacientes del brazo A. Al último seguimiento encontramos 33.4% de defunciones en el brazo A y 10.4% en el brazo B. Las características de supervivencia y progresión se encuentran descritas en la tabla 7. Las SG al diagnóstico y post aleatorización y la SLP al diagnóstico y post aleatorización se encuentran graficadas en las Fig. 5, 6, 7 y 8.

Tabla 7: Supervivencia Global y Libre de Progresión.

|   | BRAZO A    | BRAZO B    |
|---|------------|------------|
| Supervivencia meses (media / mediana)                                       | 56.6 / 47  | 51.2 / 49  |
| Supervivencia post-aleatorización meses ( media /mediana)                   | 25.76 / 28 | 25.48 / 24 |
| Supervivencia libre de progresión meses (media / mediana)                   | 55.76 / 44 | 50.84 / 49 |
| Supervivencia libre de progresión post-aleatorización meses (media/mediana) | 21.92 / 24 | 25.04 / 24 |
| Evolución clonal %  | 30         | 20         |
| Fase acelerada %  | 0          | 0          |
| Fase blástica mielóide %  | 20         | 8          |
| Fase blástica linfóide %  | 10         | 0          |
| Pacientes vivos %   | 66.6       | 89.6       |
| Defunciones %   | 33.4       | 10.4       |

Fig. 5 Supervivencia Global desde el Diagnostico

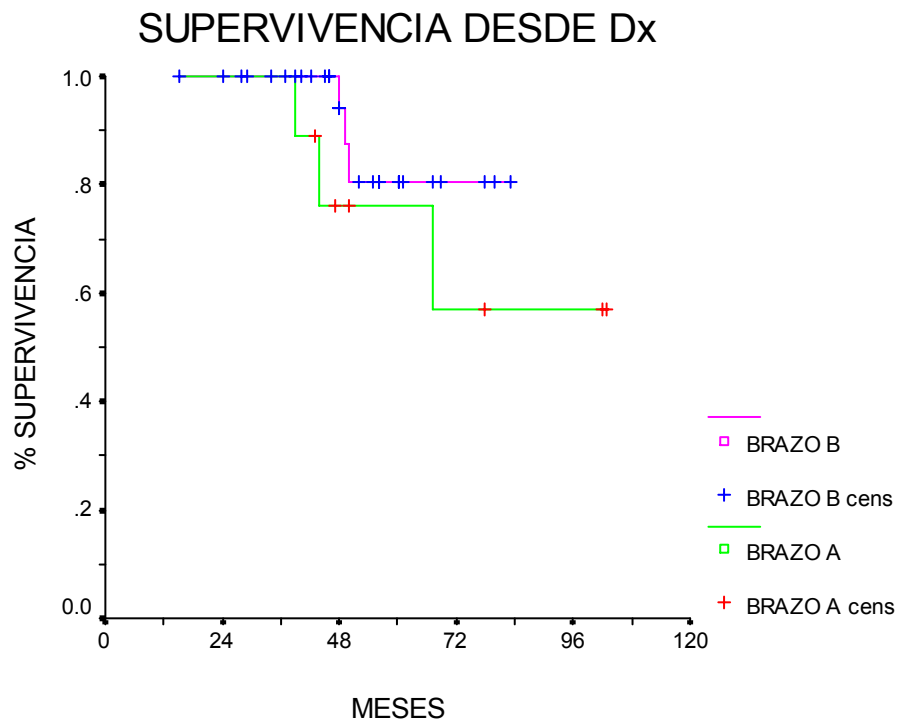


Fig. 6 Supervivencia Global desde la Aleatorización

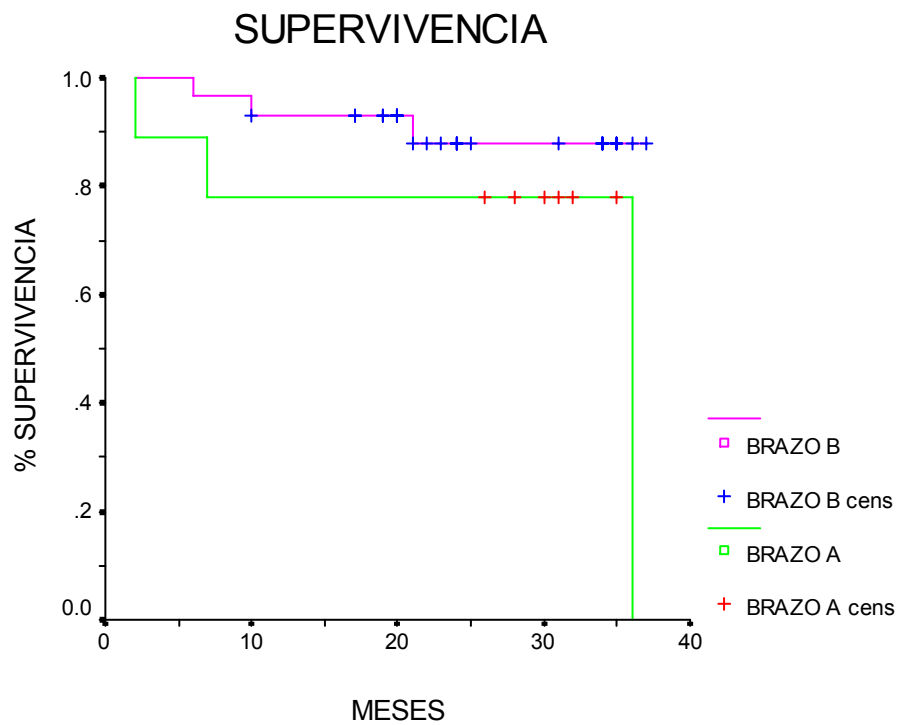


Fig. 7 Supervivencia Libre de Progresión desde el Diagnostico

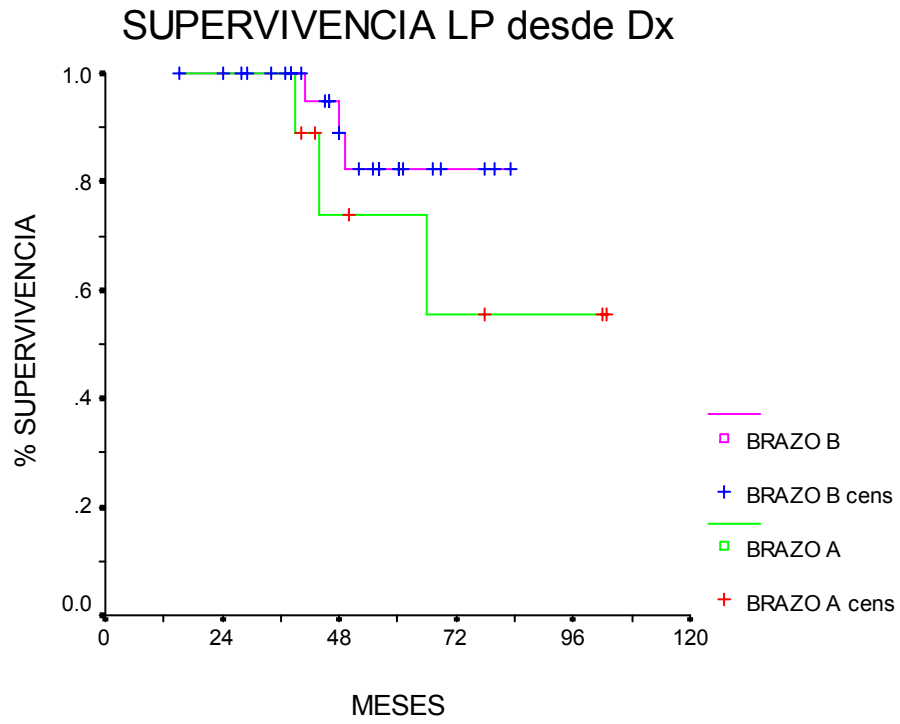
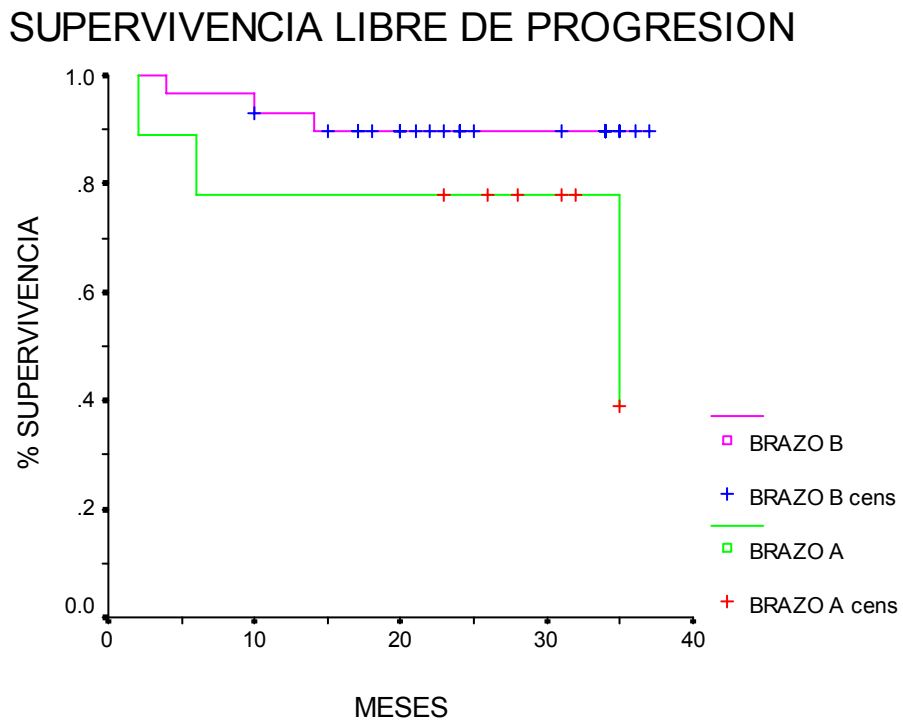


Fig. 8 Supervivencia Libre de Progresión Post-Aleatorización





## DISCUSIÓN

La Leucemia Mieloide Crónica Ph+ se caracteriza por una translocación balanceada entre los cromosomas 9 y 22, dando origen a un gen de fusión quimérico BCR-ABL, con una actividad de la quinasa de tirosina aumentada.

La inhibición de la proteína quinasa BCR-ABL con mesilato de imatinib (Glivec) ha mostrado ser la mejor opción terapéutica en Leucemia Mieloide Crónica Ph+ con una marcada tasa de respuestas en la fase crónica, sin embargo en fase acelerada y blástica los resultados sólo tienen un limitado incremento en la supervivencia.

Después de los primeros estudios en los que se demostró que el trasplante autólogo de células tallo obtenidas en la fase crónica después de la transformación de la enfermedad podía inducir una 2da fase crónica corta de la enfermedad se volvió evidente que el trasplante autólogo podía inducir un periodo sostenido de hematopoyesis Ph-negativa. Se puede considerar que el autotrasplante produce una disminución de las células malignas en favor de las benignas.<sup>41</sup>

Desde 1980 se ha investigado el efecto del autotrasplante en LMC, intentando utilizar células progenitoras normales que coexisten con las malignas después de quimioterapia. Una mezcla de colonias Ph- positivas y negativas se observaron cuando las células de la MO de pacientes con LMC se ponían en cultivo.<sup>36</sup> El grupo de Vancouver demostró que estos progenitores Ph-negativos son capaces de reconstituir de forma completa la hematopoyesis después de cultivos ex vivo.<sup>36</sup> Después de los estudios iniciales que mostraron que las células tallo de pacientes con LMC en fase crónica reinfundidas después de la transformación de la enfermedad a una fase aguda podía reinstaurar una segunda fase crónica, se hizo evidente en varios ensayos que el autotrasplante en fase crónica podía sostener un periodo de hematopoyesis Filadelfia negativo en pacientes que recibían células tallo periféricas obtenidas después de quimioterapia. Carvalho y cols demostraron en el 2004 que el ATCTP en pacientes con fase crónica temprana seguida de tratamiento con  $\alpha$ -INF post-trasplante produce una reducción de la población de células Ph-negativas en la MO, aunque sin lograr curación de la

enfermedad, sin embargo se deberá tomar en cuenta que la población en dicho estudio fue pequeña, así como el seguimiento de los pacientes corto, lo cual limitó la evaluación de la supervivencia global.<sup>35</sup>

En los últimos 3 años el tratamiento de la LMC ha tenido un progreso rápido con la disponibilidad de mesilato de imatinib el cual bloquea de forma selectiva la actividad tirosinasa de la oncoproteína bcr/abl. Sin embargo no existen estudios clínicos que determinen la duración de la respuesta a imatinib en cuanto a supervivencia a largo plazo. La enfermedad residual mínima, evaluada por RT-qPCR en pacientes en remisión citogenética completa, normalmente alcanzan una meseta o continúan disminuyendo sus niveles, sin embargo pocos pacientes alcanzan la negativización de la PCR, aunado a esto el desarrollo de resistencia a imatinib está bien documentado, el cual puede presentarse por varios mecanismos incluyendo mutaciones dentro del dominio de al, sobre-expresión de bcr/abl, amplificación del oncogén y evolución clonal.

El estudio IRIS a 54 meses muestra una tasa de respuestas citogenéticas completas de 86%, supervivencia global de 90% y una supervivencia libre de progresión de 84%, con respuestas moleculares en 40%\*. Las dosis altas de mesilato de imatinib, han mostrado en estudios no controlados, ser más eficaces en alcanzar respuestas citogenéticas completas\*, aunque no se ha definido aún su impacto en la supervivencia a largo plazo.

Se han mostrado resultados más modestos en pacientes resistentes a  $\alpha$ -interferón, tanto en la tasa de respuestas citogenéticas completas, como en la supervivencia y han sido publicados por el grupo Internacional para el tratamiento de la LMC\*, nuestra experiencia en 28 pacientes con Leucemia Mieloide Crónica en fase crónica resistentes ó intolerantes  $\alpha$ -interferón, incluidos en el estudio fase II Internacional de acceso expandido en noviembre del 2000, mostraron una tasa de respuestas citogenéticas mayores a 12 meses de un 40%, con una supervivencia y supervivencia libre de progresión a 25 meses de 93 y 85% respectivamente\*, en la mayoría de pacientes se discontinuó el tratamiento, después de los 24 meses, por falla en alcanzar una respuesta citogenética completa, asignándoles a diferentes terapias incluyendo PEG-interferón + citarabina, trasplante autólogo y trasplante no mieloablativo, a pesar de

esto un seguimiento a 3 años estableció una supervivencia y supervivencia libre de progresión del 86 y 78% respectivamente y a 5 años una supervivencia del 65%.

Al momento actual es poco claro si imatinib por si solo probará ser curativo, y si los pacientes que responden inicialmente eventualmente perderán esta respuesta. Tomando en cuenta esta posibilidad sería prudente colectar células tallo autologas en pacientes tratados con imatinib con respuesta citogenética y niveles bajos de la oncoproteína por PCR. Hui y cols demostraron que la movilización de células tallo periféricas con dosis estándar de filgrastim de forma concomitante con imatinib permite la colección de células tallo periféricas igual o mayor a  $2.0 \times 10^6/\text{Kg}$ . En la mayoría de los pacientes que lograron RCGc, sin efectos deletéreos sobre el control de la enfermedad. Se ha demostrado recientemente que imatinib suprime de forma selectiva progenitores no quiescentes de LMC in vitro revirtiendo el aumento en la proliferación más que aumentando la apoptosis, los efectos biológicos de imatinib en las células tallo de la MO normal se desconocen.

En el estudio realizado por Hui y cols demostró que el efecto sorbe la proliferación del filgrastim en algunos pacientes puede ser contrarrestado por el efecto anti-proliferativo de imatinib en progenitores de LMC y probablemente normales, resultando en una movilización sub-óptima. Se demostró también que en estudios de enfermedad residual mínima hay persistencia de niveles bajos de bcr/abl en 10/11 cosechas a pesar de la ausencia de células Ph positivas en las muestras de MO previas evaluado por citogenética, lo cual nos arroja dos preguntas; la primera si es que los progenitores recolectados mientras se administraba imatinib son en verdad células tallo de largo plazo, lo cual solamente se puede evaluar por medio de ensayos en cultivos de largo plazo o ensayos de trasplante. Por otro lado, la presencia de enfermedad residual mínima para bcr/abl en las cosechas nos hace preguntarnos si se deberá dar tratamiento de soporte posterior al trasplante autólogo.<sup>38</sup>

Al diagnóstico se pueden detectar progenitores Ph negativos en la MO de algunos pacientes con LMC. Se ha demostrado por diferentes grupos que lo progenitores BCR/ABL negativos son más abundantes en un precursor más inmaduro el cual expresa el antígeno CD34, pero carece del antígeno HLA-DR, no así las células que co-expresan el antígeno CD34 y HLA-DR u otros marcadores de inmadures. Todos estos estudios indican que los progenitores

Ph negativos coexisten con los Ph positivos, en el pool medular. Delforge y cols demostraron que las células CD34+ en la MO y sangre periférica de pacientes con LMC, que son BCR/ABL mRNA negativas y Ph negativas son policlonales y por lo tanto probablemente benignas.<sup>39</sup>

Se ha demostrado de forma clara que el reservorio de células de la hematopoyesis normal declina con el tiempo, se deseable movilizar a los pacientes y cosechar células tallo periféricas tan pronto como se realiza el diagnóstico, para de esta forma criopreservar células tallo Ph negativas.<sup>40</sup>

Por lo anterior, iniciamos en el 2003 un estudio para comparar la movilización de células tallo periféricas y trasplante autólogo + imatinib vs. Imatinib, bajo la premisa de que el trasplante autólogo en la era pre-imatinib, prolongaba la supervivencia e incrementaba la tasa de respuesta citogenéticas en pacientes con LMC en fase crónica, por lo que movilizar con quimioterapia sistémica y filgrastim, continuando con autotransplante disminuiría la carga leucémica y en el post-injerto la terapia con imatinib permitiría alcanzar una mayor tasa de respuesta citogenéticas y por ende incrementar la supervivencia.

Los resultados muestran que la movilización en nuestra población de pacientes transplantados, no cumplió con el objetivo primario de disminuir la carga leucémica, ya que un 30% tuvieron una movilización fallida, un 20% presentaron falla de injerto con mortalidad asociada y un 40% iniciaron imatinib tardíamente por injerto retrasado, lo que repercutió en obtener respuestas citogenéticas adecuadas al tiempo de tratamiento con imatinib y aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, el costo tóxico y económico de este terapia no justifica su utilización en pacientes en fase crónica tardía, por lo que la movilización y criopreservación debería reservarse a pacientes con LMC con respuesta citogenética completa preferentemente dentro del 1er año del diagnóstico y transplantarse a la progresión de la enfermedad ó a la pérdida de la respuesta a imatinib ó a otros inhibidores de quinasa de tirosina de 2da generación. En nuestro estudio se encontró que los pacientes que fueron sometidos a TACTP tenían una mayor frecuencia de toxicidad a neutrófilos y plaquetaria con una p significativa ( $p=0.003$ ) y ( $p=0.016$ ) respectivamente, por lo que se agrego toxicidad. Aunado a que el 50% de los pacientes en el brazo A requirieron reducción de dosis debido a toxicidad en comparación con 20% del grupo B.

## CONCLUSIONES

1. Los resultados muestran que la movilización en nuestra población de pacientes, no cumplió con el objetivo primario de disminuir la carga leucémica, ya que un 30% tuvieron una movilización fallida, un 20% presentaron falla de injerto con mortalidad asociada y un 40% iniciaron imatinib tardíamente por injerto retrasado, lo que repercutió en obtener respuestas citogenéticas adecuadas al tiempo de tratamiento con imatinib y aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, el costo tóxico y económico de esta terapia no justifica su utilización en pacientes en fase crónica tardía.
2. La movilización y criopreservación debería reservarse a pacientes con LMC con respuesta citogenética completa preferentemente dentro del 1er año del diagnóstico y transplantarse a la progresión de la enfermedad ó a la pérdida de la respuesta a imatinib ó a otros inhibidores de quinasa de tirosina de 2da generación.
3. En nuestro estudio se encontró que los pacientes que fueron sometidos a TACTP tenían una mayor frecuencia de toxicidad a neutrófilos y plaquetaria con una p significativa ( $p=0.003$ ) y ( $p=0.016$ ) respectivamente, por lo que se agregó toxicidad.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.-Nowell, P.C. & Hungerford, D.A. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. **Science, 132, 1497.**
- 2.-Rowley, J.D. (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic Myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature, 243, 290–293.**
- 3.-Kurzrock, R., Gutterman, J.U. & Talpaz, M. (1988) The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. **New England Journal of Medicine, 319, 990–998.**
- 4.-Vigneri, P. & Wang, J.Y. (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR–ABL tyrosine kinase. **Nature Medicine, 7, 228–234.**
- 5.-Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., et. al. (1993) Randomized comparison of busulphan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. **Blood, 82, 398–407.**
- 6.-Sawyers, C.L. (1999) Medical Progress. Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine, 340, 1330–1340.**
- 7.-The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia(1994) Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine, 330, 820–825.**
- 8.-Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., et. al. (1997) Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. **New England Journal of Medicine, 337, 223–239.**
- 9.-Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor “mobilised” peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. **Blood 1993;81:1079-19.**
- 10.-Bensigner W, Singer F, Appelbaum K, et al. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. **Blood 1993;81:3158-63.**

- 11.-Khouri IF, Kantarjian HM, Talpaz M, et al. Results with high-dose chemotherapy and unpurged autologous stem cell transplantation in 73 patients with chronic myelogenous leukemia: the MD Anderson experience. **Bone Marrow Transplantation 1996;17:775-79.**
- 12.-McGlave P, De Fabritis P, Deisseroth A, et al. Autologous transplants for chronic myelogenous leukemia:Results from eight transplant group. **Lancet 1994; 343: 1486-8.**
- 13.-Sureda A, Petit J, Brunet S *et al.* Mini-ICE regimen as mobilization therapy for chronic myelogenous leukaemia patients at diagnosis. **Bone Marrow Transplantation 1999; 24: 1285–1290.**
- 14.-Carella AM, Lerma E, Corsetti MT *et al.* Autografting with philadelphia chromosome-negative mobilized hematopoietic progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. **Blood 1999; 93: 1534–1539.**
- 15.-Gratwohl A, Hermans J, Niederwieser E, et. al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long term results. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplantation 1993;12(5):509-16.**
- 16.-Appelbaum F,Clift R, Radich J, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **Sem Onc 1995;22 (4) 405-11.**
- 17.-Horowitz, M.M., Rowlings, P.A. & Passweg, J.R. (1996) Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. **Bone Marrow Transplantation, 17, S5–S6.**
- 18.-Ayala, M., Rosas, A., Tripp, F., et. al. (2002) STI571 therapy for chronic myelogenous leukemia resistant or intolerant to interferon: Single Mexican Center experience, preliminary results. **EHA 7 Abstract.**
- 19.-Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., et. al. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of BCR–ABL positive cells. **Nature Medicine, 2, 561–566.**
- 20.-Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, et. al. (2001b) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR–ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine, 344, 1031–1037.**

- 21.-Sawyers, C.L., Hochhaus, A., Feldman, et. al. (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crises: results of a phase II study. **Blood, 99, 3530–3539.**
- 22.-Kantarjian, H.M., Sawyers, C., Hochhaus, A., et. al (2002a) Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **New England Journal of Medicine, 346, 645–652.**
- 23.-A., Baccarani, M., Stone, R., Tura, S., et. al (2002) Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. **Blood, 99, 1928–1937.**
- 24.-Druker, B.J. & International Randomized IFN vs. STI571 Study Group (IRIS) (2002) STI-571 (Gleevec / Glivec, imatinib) versus interferon (IFN) + cytarabine as initial therapy for patients with CML: results of a randomized study. **ASCO, 1 Abstract.**
- 25.-Kantarjian, H.M., Jorge, C., O'Brien, S., et. al. (2002b) High rates of early major and complete cytogenetic responses with imatinib mesylate therapy given at 400 mg or 800 mg orally daily in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase. **ASCO, Abstract 1043.**
- 26.-Vela-Ojeda J, Tripp-Villanueva F, Ayala-Sánchez M et. al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a single center experience. **Arch Med Res 2000 Mar-Apr;31(2):206-9.**
- 27.-Savage, D.G. & Antman, K.H. (2002) Imatinib Mesylate – A new oral targeted therapy. **New England Journal of Medicine, 346, 683–693.**
28. Autotrasplants in Chronic Myeloid Leucemia; **The Oncologist 1998;3:50-64**
29. Autologous hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Hematol Ocol Clin N Am 18(2004)715-32.**
30. Successful peripheral blood stem cell mobilization with filgrastim in patients with chronic myeloid leukaemia achieving complete cytogenetic response with imatinib, without increasing disease burden as measures by quantitative real-time PCR. **Leukemia (2003) 821-28**
31. Macophage colony-simulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. **Blood, 2005; 205(8):3127-32.**



32. BCR/ABL- CD34+HLA-DR- Progenitor Cells in Early Chronic Phase, but not in More Advanced Phases, of Chronic Myelogenous Leukemia Are Polyclonal. **Blood, 1999;93 (1):284-92.**
33. Imatinib Mesylate (STI571) treatment in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia previously submitted to autologous stem cell transplantation. **British Journal of Haematology, 2003; 120:500-04.**
34. Autologous peripheral blood stem cell transplantation of stem cells harvested in imatinib induced complete cytogenetic remission: an example of in vivo purging in CML. **Leukemia, 2003, 17: 2525.26.**
35. Autografting of peripheral-blood progenitor cells early in chronic **myeloid Leucemia. Rev bras hematol hemoter, 2004;26(4):256-62.**
36. Autografting with Ph-negative progenitors in patients at diagnosis of chronic myeloid leukemia induces a prolonged prevalence of Ph-negative hemopoiesis. **Experimental hematology, 2000; 20:210-15.**
36. Imatinib Mesylate (STI571) treatment in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia previously submitted to autologous stem cell transplantation. **British Journal of Haematology, 2003; 120:500-04.**
37. Successful peripheral blood stem cell mobilization with filgrastim in patients with chronic myeloid leukaemia achieving complete cytogenetic response with imatinib, without increasing disease burden as measures by quantitative real-time PCR. **Leukemia (2003) 821-28.**
38. Autotrasplants in Chronic Myeloid Leucemia; **The Oncologist 1998; 3: 50-64.**
39. BCR/ABL- CD34+HLA-DR- Progenitor Cells in Early Chronic Phase, but not in More Advanced Phases, of Chronic Myelogenous Leukemia Are Polyclonal. **Blood, 1999;93 (1):284-92.**
40. Ten-year follow-up of a single center prospective trial of unmanipulated peripheral blood stem cell autograft and interferon alfa in early phase chronic myeloid leukemia. **Haematologica, 2001; 86: 596-601.**
41. Autografting of peripheral-blood progenitor cells early in chronic myeloid **Leucemia. Rev bras hematol hemoter, 2004;26(4):256-62.**

a.- TABLA DE REACCIONES ADVERSAS CLINICAS

**Apéndice 1: Criterios comunes de toxicidad del NCI/NIH**

| <b>Grado</b>   |                                |  |   |  |  |
|--|--------------------------------|--|---|--|--|
| <b>Toxicidad</b>   | <b>0</b>                       | <b>1</b>   | <b>2</b>  | <b>3</b>   | <b>4</b>   |
| <b>SANGRE / MEDULA OSEA</b>  |                                |  |   |  |  |
| Celularidad de la médula ósea  | normal para la edad            | Levemente hipocelular o 25% de reducción de la celularidad normal para la edad | Moderadamente hipocelular o >25 - _ 50% de reducción de la celularidad normal para la edad o >2 pero <4 semanas para recuperar la celularidad normal para la edad | Severamente hipocelular o >50 - _ 75% de reducción de la celularidad normal para la edad o 4 - 6 semanas para recuperar la celularidad normal para la edad | aplasia o >6 semanas para recuperar la celularidad normal de la médula ósea. |
| Rangos normales:   |                                |  |   |  |  |
| niños (_ 18 años)  | 90% promedio de celularidad    |  |   |  |  |
| Adultos jóvenes (19-59)  | 60-70% promedio de celularidad |  |   |  |  |
| Adultos añosos (_ 60 años)   | 50% promedio de celularidad    |  |   |  |  |
| Nota: Grado de celularidad de la médula ósea sólo para cambios relacionados con tratamientos y no con enfermedades |                                |  |   |  |  |

| <b>Toxicidad</b>  | <b>0</b> | <b>1</b>   | <b>2</b>   | <b>3</b>  | <b>4</b>   |
|---|----------|--|--|---|--|
| Recuento de CD4   | WNL      | < LLN - 500/mm <sup>3</sup>  | 200 - < 500/mm <sup>3</sup>  | 50 - < 200/mm <sup>3</sup>  | < 50/mm <sup>3</sup>   |
| Haptoglobina  | normal   | Disminuida   | -  | Ausente   | -  |
| Hemoglobina (Hgb)   | WNL      | < LLN - 10.0 g/dl<br>< LLN - 100 g/L<br>< LLN - 6.2 mmol/L   | 8.0 - < 10.0 g/dl<br>80 - < 100 g/L<br>4.9 - < 6.2 mmol/L                                      | 6.5 - < 8.0 g/dl<br>65 - 80 g/L<br>4.0 - < 4.9 mmol/L               | < 6.5 g/dl<br>< 65 g/L<br>< 4.0 mmol/L   |
| Nota: Los siguientes criterios deben ser usados para estudios de leucemia o procesos infiltrativos/ mieloblásticos si así lo especifica el protocolo.                     |          |  |  |   |  |
|   | WNL      | 10 - <25% disminución desde el pre tratamiento   | 25 - <50% disminución desde el pre tratamiento   | 50 - <75% disminución desde el pre tratamiento                      | _75% disminución desde el pre tratamiento  |
| Hemólisis (pe., anemia hemolítica inmune , hemólisis relacionadas con las drogas, otros)  | ninguna  | Sólo evidencia de laboratorio de hemólisis [pe., test de antiglobulina directa(DAT, Coombs') esquitocitos] | Evidencia de destrucción de glóbulos rojos y _ 2gm disminución en hemoglobina, sin transfusión | requirió transfusión y/o intervención médica (pe., esteroides)      | Consecuencias catastróficas de hemólisis (pe., falla renal, hipotensión, broncoespasmo, esplenectomía de emergencia) |
| También considerar Haptoglobina, Hgb.   |          |  |  |   |  |
| Leucocitos (total WBC)  | WNL      | < LLN - 3.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br>< LLN - 3000/mm <sup>3</sup>   | _2.0 - < 3.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br>_2000 - < 3000/mm <sup>3</sup>                            | _1.0 - < 2.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br>_1000 - < 2000/mm <sup>3</sup> | < 1.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br>< 1000/mm <sup>3</sup>   |
| Para estudios de trasplante de médula ósea:   | WNL      | _2.0 - <3.0 X 10 <sup>9</sup> /L<br>_2000 - <3000/mm <sup>3</sup>  | _1.0 - <2.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br>_1000 - <2000/mm <sup>3</sup>                              | _0.5 - <1.0 x 10 <sup>9</sup> /L _500 - <1000/mm <sup>3</sup>       | <0.5 x 10 <sup>9</sup> /L<br><500/mm <sup>3</sup>  |
| <i>Nota:</i> Los siguientes criterios pueden ser usados para estudios pediátricos de leucemia o procesos infiltrativos/ mieloblásticos si así lo especifica el protocolo. |          |  |  |   |  |

| <b>Toxicidad</b>  | <b>0</b> | <b>1</b>  | <b>2</b>  | <b>3</b>  | <b>4</b>   |
|---|----------|---|---|---|--|
|   |          | <u>75</u> - <100% LLN   | <u>50</u> - <75% LLN  | <u>25</u> - 50% LLN   | <25% LLN   |
| Linfopenia  | WNL      | <LLN - 1.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><LLN - 1000/mm <sup>3</sup>                    | <u>0.5</u> - <1.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>500</u> - <1000/mm <sup>3</sup>        | <0.5 x 10 <sup>9</sup> /L<br><500/mm <sup>3</sup>                                   | -  |
| <i>Nota: Los siguientes criterios usando valores normales para edad, raza y sexo pueden ser utilizados para estudios pediátricos si el protocolo así lo especifica.</i> |          |   |   |   |  |
|   |          | <u>75</u> -<100%LLN   | <u>50</u> -<75%LLN  | <u>25</u> -<50%LLN  | <25%LLN  |
| Neutrófilos /granulocitos (ANC/AGC)   | WNL      | <u>1.5</u> - <2.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>1500</u> - <2000/mm <sup>3</sup>     | <u>1.0</u> - <1.5 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>1000</u> - <1500/mm <sup>3</sup>       | <u>0.5</u> - <1.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>500</u> - <1000/mm <sup>3</sup>        | < 0.5 x 10 <sup>9</sup> /L<br>< 500/mm <sup>3</sup>    |
| Para de trasplante de médula ósea:  | WNL      | <u>1.0</u> - <1.5 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>1000</u> - <1500/mm <sup>3</sup>     | <u>0.5</u> - <1.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>500</u> - <1000/mm <sup>3</sup>        | <u>0.1</u> - <0.5 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>100</u> - <500/mm <sup>3</sup>         | <0.1 x 10 <sup>9</sup> /L<br><100/mm <sup>3</sup>      |
| <i>Nota: Los siguientes criterios pueden ser utilizados para estudios leucemia o procesos infiltrativos/ mieloblásticos si el protocolo así lo especifica.</i>          |          |   |   |   |  |
|   | WNL      | 10 - <25%<br>disminución desde el inicio  | 25 - <50%<br>disminución desde el inicio  | 50 - <75% disminución desde el inicio   | <u>75</u> % disminución desde el inicio                |
| Plaquetas   | WNL      | < LLN - <75.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br>< LLN - 75000/mm <sup>3</sup>               | <u>50.0</u> - < 75.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>50000</u> - < 75000/mm <sup>3</sup> | <u>10.0</u> - < 50.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>10000</u> - < 50000/mm <sup>3</sup> | < 10.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br>< 10000/mm <sup>3</sup> |
| Para estudios de trasplante de médula ósea:   | WNL      | <u>50.0</u> - <75.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>50000</u> - <75000/mm <sup>3</sup> | <u>20.0</u> - <50.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>20000</u> - <50000/mm <sup>3</sup>   | <u>10.0</u> - <20.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><u>10000</u> - <20000/mm <sup>3</sup>   | <10.0 x 10 <sup>9</sup> /L<br><10000/mm <sup>3</sup>   |
| <i>Nota: Los siguientes criterios pueden ser usados para estudios de leucemia o procesos infiltrativos/ mieloblásticos si así lo especifica el protocolo.</i>           |          |   |   |   |  |

| Toxicidad   | 0       | 1   | 2  | 3  | 4   |
|---|---------|---|--|--|---|
| estudios de leucemia o procesos infiltrativos/ mieloblásticos | WNL     | 10 - <25% disminución desde la línea de base        | 25 - <50% disminución desde la línea de base           | 50 - <75% disminución desde la línea de base | _75% disminución desde la línea de base   |
| Transfusión: Plaquetas  | ninguna | -   | -  | Si   | Transfusiones de Plaquetas y otras medidas requieren para aumentar el recuento de plaquetas, refractarias a las transfusiones de plaquetas asociadas con hemorragias que con llevan riesgo de vida(pe. transfusiones de plaquetas luego de cross-match o HLA) |
| Para estudios de trasplante de médula ósea:                   | ninguna | 1 transfusión de plaquetas en 24 horas              | 2 transfusiones de plaquetas en 24 horas               | _3 transfusiones de plaquetas en 24 horas    | Transfusiones de Plaquetas y otras medidas requieren para aumentar el recuento de plaquetas, refractarias a las transfusiones de plaquetas asociadas con hemorragias que con llevan riesgo de vida(pe. transfusiones de plaquetas luego de cross-match o HLA) |
| También considere plaquetas.                                  |         |   |  |  |   |
| Transfusión: GRS(Glóbulos rojos sedimentados)                 | ninguna | -   | -  | Si   | -   |
| Para trasplante de médula ósea:                               | ninguna | _2 u GRS (_15cc/kg) en 24 horas electiva o planeada | 3 u GRS (>15 _30cc/kg) en 24 horas electiva o planeada | _4 u GRS (>30cc/kg) en 24 horas              | Hemorragia o hemólisis asociada con anemia que con llevan riesgo de vida; intervención médica requerida para mejorar la Hgb   |
| También considere Hemoglobina.                                |         |   |  |  |   |

| Toxicidad   | 0       | 1  | 2  | 3  | 4  |
|---|---------|--|--|--|--|
| Sangre /Médula ósea- Otros<br>(Especifique, _____)  | ninguna | Leve   | moderada   | severa   | Riesgo de vida o incapacitante                   |
| <b>COAGULACION</b>  |         |  |  |  |  |
| Nota: Véase la categoría HEMORRAGIA para la graduación de eventos de sangrado severo.   |         |  |  |  |  |
| CID<br>(coagulación intravascular<br>diseminada)  | ausente | -  | -  | Hallazgos de laboratorio<br>presentes sin<br>sangrado                        | Hallazgos de laboratorio presentes<br>y sangrado |
| Nota: Debe haber aumento en los productos del fibrinógeno o D-dimer para ser clasificado como CID   |         |  |  |  |  |
| Fibrinógeno   | WNL     | $\leq 0.75 - < 1.0 \times$<br>LLN                                  | $\leq 0.5 - < 0.75 \times$<br>LLN                                      | $\leq 0.25 - < 0.5 \times$<br>LLN  | $< 0.25 \times$ LLN                              |
| Nota: Los siguientes criterios deben usarse para estudios de leucemia o procesos infiltrativos /mieloblásticos si el protocolo lo especifica. |         |  |  |  |  |
| Para estudios de leucemia:  | WNL     | $< 20\%$<br>disminución<br>del valor de<br>pretratamiento<br>o LLN | $\leq 20 - < 40\%$ disminución<br>del valor de<br>pretratamiento o LLN | $\leq 40 - < 70\%$<br>disminución<br>del valor de<br>pretratamiento<br>o LLN | $< 50 \text{ mg } \%$                            |
| Tiempo parcial de I tromboplastina<br>(PTT)   | WNL     | $> \text{ULN} - \leq 1.5$<br>$\times \text{ULN}$                   | $> 1.5 - \leq 2 \times$ ULN  | $> 2 \times$ ULN   | -  |
| La flebitis es graduada en la categoría CARDIOVASCULAR (GENERAL)  |         |  |  |  |  |
| Tiempo de protrombina (PT)  | WNL     | $> \text{ULN} - \leq 1.5$<br>$\times \text{ULN}$                   | $> 1.5 - \leq 2 \times$ ULN  | $> 2 \times$ ULN   | -  |
| La trombosis/embolismo es graduada en la categoría CARDIOVASCULAR (GENERAL).  |         |  |  |  |  |

| Toxicidad  | 0       | 1  | 2  | 3   | 4  |
|--|---------|--|--|---|--|
| Microangiopatía trombótica (pe., púrpura trombótica trombocitopénica /TTP o síndrome urémico hemolítico/HUS)                                 | ausente | -  | -  | Hallazgos de laboratorio sin consecuencias clínicas   | Hallazgos de laboratorio y consecuencias clínicas (pe. hemorragias en el SNC /sangrado o trombosis/ embolismo o falla renal) que requieren intervención terapéutica. |
| Para Trasplante médula ósea:   | -       | evidencia de destrucción de RBC (esquistocitosis) sin consecuencias clínicas | evidencia de destrucción de RBC con creatinina elevada ( $\geq 3$ x ULN) | evidencia de destrucción de RBC con creatinina elevada ( $>3$ x ULN) que no requiere diálisis | evidencia de destrucción de RBC con falla renal que requiere diálisis y/o encefalopatía  |
| También considere Hemoglobina (Hgb), Plaquetas, Creatinina.  |         |  |  |   |  |
| Nota: Debe haber cambio microangiopáticos en la muestra de sangre (pe., esquistocitosis, células en casquete, fragmentos de glóbulos rojos). |         |  |  |   |  |
| Coagulación, otros (especifique---   | ninguna | Leve   | moderada   | severa  | Riesgo de vida o incapacitante   |

| <b>SINTOMAS CONSTITUCIONALES</b>  |         |  |   |   |                                   |
|---|---------|--|---|---|-----------------------------------|
| Fatiga<br>(letargo, malestar, astenia)  | ninguna | Incremento de la fatiga desde el Inicio, pero sin alterar las actividades normales   | moderada (pe., disminución del status de performance en 1 nivel ECOG o 20% Karnofsky o <i>Lansky</i> ) o que causa dificultad para realizar algunas actividades | severa (pe., disminución del status de performance en _2 nivel ECOG o 40% Karnofsky o <i>Lansky</i> ) o pérdida posibilidad de realizar algunas actividades | Reposo en cama o incapacitante    |
| Nota: Véase Apéndice III para las escalas de status performance.                                      |         |  |   |   |                                   |
| Fiebre (en ausencia de neutropenia, cuando neutropenia se define como AGC < 1.0 x 10 <sup>9</sup> /L) | ninguna | 38.0 – 39.0°C (100.4 - 102.2°F)  | 39.1 - 40.0°C (102.3 - 104.0°F )  | > 40.0°C (>104.0°F ) para < 24hrs   | > 40.0°C (>104.0°F ) para > 24hrs |
| También considere reacción alérgica/hipersensibilidad   |         |  |   |   |                                   |
| Nota: Las temperaturas son de medición oral o timpánica.  |         |  |   |   |                                   |
| Las tuforadas se gradúan en la categoría ENDOCRINA.   |         |  |   |   |                                   |
| Temblor, escalofríos  | ninguna | leve, que requiere tratamiento sintomático (pe., frazadas) o medicación no narcótica | severa y/o prolongada, requiere medicación narcótica  | No respondiendo a medicación narcótica  | -                                 |
| Sudor (diaforesis)  | normal  | Leve y ocasional   | Frecuente o muy abundante   | -   | -                                 |
| Ganancia de peso corporal   | < 5%    | 5 - <10%   | 10 - <20%   | _ 20%   | -                                 |
| También considere Ascitis, Edema, derrame Pleural   |         |  |   |   |                                   |



| Toxicidad   | 0       | 1        | 2         | 3                   | 4  |
|---|---------|----------|-----------|---------------------|--|
| Ganancia de peso corporal – enfermedad vaso oclusiva (VOD)  |         |          |           |                     |  |
| Nota: Los siguientes criterios serán utilizados SOLAMENTE para aumento de peso corporal asociada a VOD.   |         |          |           |                     |  |
|   | <2%     | _2 - <5% | _5 - <10% | _10% o como ascitis | _10% o retención de fluidos resultando en insuficiencia pulmonar |
| Pérdida de peso corporal  | < 5%    | 5 - <10% | 10 - <20% | _20%                | -  |
| También considere vómitos, deshidratación, diarrea  |         |          |           |                     |  |
| Síntomas constitucionales –otros (Especifique, _____)   | ninguna | Leve     | moderada  | severa              | Riesgo de vida o incapacitante                                   |
| <b>HEMORRAGIA</b>   |         |          |           |                     |  |
| Nota: Transfusión a la que se refiere en esta sección es a la infusión de GRS   |         |          |           |                     |  |
| Para cualquier sangrado con Grado 3 o 4 de plaquetas (< 50,000), siempre Hemorragia/sangrado con Grado 3 o 4 de trombocitopenia. También considere plaquetas, transfusión- GRS, y transfusión - plaquetas en adicción al Grado que incorpora el sitio / tipo de sangrado.   |         |          |           |                     |  |
| Si el sitio / tipo de hemorragia/sangrado es listado, también use la graduación que incorpora el sitio de sangrado: hemorragia/sangrado del CNS, Hematuria, Hematemesis, Hemoptisis, Hemorragia/sangrado con cirugía, Melena/ sangrado GI bajo, Petequia /púrpura (Hemorragia/sangrado cutáneo), sangrado Rectal /hematoquecia, sangrado Vaginal. |         |          |           |                     |  |
| Si el recuento de plaquetas es _50,000 y el sitio tipo de sangrado es listado, Grado específico del sitio. Si el sitio o tipo no es listado y el recuento de plaquetas es _50,000, gradúe el Grado de Hemorragia/sangrado sin Grado 3 o 4 de trombocitopenia y especifique el sitio o tipo en otra categoría.                                     |         |          |           |                     |  |

| Toxicidad  | 0       | 1                    | 2 | 3   | 4   |
|--|---------|----------------------|---|---|---|
| Hemorragia/sangrado con Grado 3 o 4 de trombocitopenia   | ninguna | leve sin transfusión |   | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención no electiva        |
| También considere Plaquetas, Hemoglobina, Transfusión - plaquetas, Transfusión - GRS.  |         |                      |   |   |   |
| Nota: Esta Toxicidad debe ser graduada para cada sangrado con Grado 3 o 4 de trombocitopenia. También gradúe el sitio o tipo de hemorragia/sangrado. Si el sitio no está listado, Gradúe como otros en la categoría HEMORRAGIA.                  |         |                      |   |   |   |
| Hemorragia/sangrado sin Grado 3 o 4 trombocitopenia  | ninguna | leve sin transfusión |   | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención no electiva        |
| También considere Plaquetas, Hemoglobina, Transfusión - plaquetas, Transfusión - GRS.  |         |                      |   |   |   |
| Nota: Sangrado en ausencia de Grado 3 o 4 de trombocitopenia es graduado aquí solo si el sitio o tipo de sangrado no se encuentra listado en ningún otro lugar de la categoría HEMORRAGIA. También gradúe como otros en la categoría HEMORRAGIA. |         |                      |   |   |   |
| hemorragia/sangrado del CNS  | ninguna | -                    | - | sangrado notado en la CT u otra evaluación , sin consecuencias clínicas | Accidente cerebro vascular (CVA) con signos y síntomas neurológicos |
| Epistaxis  | ninguna | leve sin transfusión | - | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención mayor no electiva  |
| Hematemesis  | ninguna | leve sin transfusión | - | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención mayor no electiva  |

| Toxicidad  | 0       | 1                                 | 2  | 3   | 4  |
|--|---------|-----------------------------------|--|---|--|
| Hematuria<br>(en ausencia de sangrado vaginal)   | ninguna | Solamente microscópico            | Sangrado abundante intermitente, sin coágulos. cataterización  | Sangrado abundante persistente o coágulos; puede requerir cataterización o instrumentación, o transfusión | Cirugía abierta o necrosis o ulceración profunda de la vejiga      |
| Hemoptisis   | ninguna | leve sin transfusión              | -  | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención mayor no electiva |
| Hemorragia/sangrado asociados con cirugía  | ninguna | leve sin transfusión              | -  | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención mayor no electiva |
| Nota: La pérdida de sangre esperable en una cirugía no debe ser graduada como Toxicidad. |         |                                   |  |   |  |
| Melena/ sangrado GI  | ninguna | leve sin transfusión              | -  | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención mayor no electiva |
| Petequia /púrpura<br>(hemorragia/sangrado cutáneo o de mucosa)                           | ninguna | Petequia escasa en piel           | petequia o púrpura en áreas pendientes de la piel  | Poca petequia generalizada o púrpura en piel o petequia en cualquier mucosa                               |  |
| Sangrado Rectal / hematoquecia   | ninguna | leve sin transfusión o medicación | persistente, que requiere medicación(pe ., supositorios de esteroides) y/o interrupción de la terapia de radiación | que requiere transfusión  | Sangrado catastrófico, que requiere intervención no electiva       |

| Toxicidad   | 0       | 1   | 2   | 3                        | 4  |
|---|---------|---|---|--------------------------|--|
| Sangrado Vaginal  | ninguna | Goteo , que requiere < 2 toallas higiénicas por día | que requiere _ 2 toallas higiénicas por día, pero no que requiere transfusión | que requiere transfusión | Sangrado catastrófico, que requiere intervención mayor no electiva |
| Hemorragia - Otros (Especifique sitio, _____)   | ninguna | leve sin transfusión                                | -   | que requiere transfusión | Sangrado catastrófico, que requiere intervención mayor no electiva |
| <b>HEPÁTICO</b>   |         |   |   |                          |  |
| Fosfatasa alcalina  | WNL     | > ULN - 2.5 x ULN                                   | > 2.5 - 5.0 x ULN   | > 5.0 - 20.0 x ULN       | > 20.0 x ULN   |
| Bilirrubina   | WNL     | > ULN - 1.5 x ULN                                   | > 1.5 - 3.0 x ULN   | > 3.0 - 10.0 x ULN       | > 10.0 x ULN   |
| Bilirrubina- enfermedad aloinjerto huésped (GVHD)   |         |   |   |                          |  |
| Nota: Los siguientes criterios serán utilizados únicamente con (GVHD).  |         |   |   |                          |  |
|   | normal  | _2 - <3 mg/100 ml                                   | _3 - <6 mg/100 ml   | _6 - <15 mg/100 ml       | _15 mg/100 ml  |
| GGT (_ - Glutamyl transpeptidasa)   | WNL     | > ULN - 2.5 x ULN                                   | > 2.5 - 5.0 x ULN   | > 5.0 - 20.0 x ULN       | > 20.0 x ULN   |
| Hepatomegalia   | ausente | -   | -   | Presente                 | -  |
| Nota: Se gradúa el Agrandamiento hepático sólo para los cambios relacionados con VOD o toxicidad relacionada con otros tratamientos |         |   |   |                          |  |
| Hipoalbuminemia   | WNL     | <LLN - 3 g/dl                                       | _2 - <3 g/dl  | <2 g/dl                  | -  |
| Disfunción/falla hepática (clínica)   | normal  | -   | -   | Asterixis                | encefalopatía o coma   |
| Nota: La hepatitis viral documentada es graduada en la categoría INFECCIÓN.   |         |   |   |                          |  |

| Toxicidad   | 0       | 1                            | 2   | 3  | 4  |
|---|---------|------------------------------|---|--|--|
| Flujo de la vena porta  | normal  | -                            | Disminución del flujo portal  | Reflujo/ retroceso del flujo portal  | -  |
| SGOT (AST)<br>(Transaminasa glutámica oxalacética sérica)   | WNL     | > ULN - 2.5 x ULN            | > 2.5 - 5.0 x ULN   | > 5.0 - 20.0 x ULN   | > 20.0 x ULN                                 |
| SGPT (ALT)<br>(Transaminasa glutámica pirúvica sérica)  | WNL     | > ULN - 2.5 x ULN            | > 2.5 - 5.0 x ULN   | > 5.0 - 20.0 x ULN   | > 20.0 x ULN                                 |
| Hepático - Otros<br>(Especifique, _____)  | ninguna | Leve                         | moderada  | severa   | riesgo de vida o incapacitante               |
| <b>INFECCIÓN/ NEUTROPENIA FEBRIL</b>  |         |                              |   |  |  |
| Infección relacionada al catéter  | ninguna | leve, sin tratamiento activo | infección moderada, localizada, que requiere tratamiento local u oral | Infección severa, sistémica, que requiere antibiótico IV o tratamiento antifúngico u hospitalización | Riesgo de vida, sepsis (pe., shock séptico ) |
| Neutropenia febril (fiebre de origen desconocido sin infección clínica o microbiológicamente documentada) | ninguna | -                            | -   | Presente   | Riesgo de vida, sepsis (pe., shock séptico ) |
| (ANC < 1.0 x 10 <sup>9</sup> /L, fiebre ≥38.5°C)  |         |                              |   |  |  |
| Nota: hipotermia en lugar de fiebre puede estar asociado con neutropenia y se gradúa aquí.                |         |                              |   |  |  |

| Toxicidad  | 0       | 1                            | 2   | 3  | 4  |
|--|---------|------------------------------|---|--|--|
| Infección (clínica o microbiológicamente documentada) con Grado 3 o 4 de neutropenia (ANC < 1.0 x 10 <sup>9</sup> /L)  | ninguna | -                            | -   | Presente   | Riesgo de vida, sepsis (pe., shock séptico ) |
| Nota: hipotermia en lugar de fiebre puede estar asociado con neutropenia y se gradúa aquí. En ausencia de Infección documentada con Grado 3 o 4 neutropenia, Gradúe como neutropenia febril. |         |                              |   |  |  |
| Infección con ANC desconocido  | ninguna | -                            | -   | Presente   | Riesgo de vida, sepsis (pe., shock séptico ) |
| Nota: Este criterio se utiliza en los raros casos en los que ANC es desconocido.   |         |                              |   |  |  |
| Infección sin neutropenia  | ninguna | leve, sin tratamiento activo | infección moderada, localizada, que requiere tratamiento local u oral | Infección severa, sistémica, que requiere antibiótico IV o tratamiento antifúngico u hospitalización | Riesgo de vida, sepsis (pe., shock séptico ) |
| Infección/ Neutropenia febril- Otros (Especifique, _____)  | ninguna | Leve                         | moderada  | Severa   | riesgo de vida o incapacitante               |
| Las infecciones de heridas se gradúan en la categoría DERMATOLOGIA/PIEL.   |         |                              |   |  |  |

## **APÉNDICE 2**

### Aislamiento de Células Mononucleares.

- 1.-Se obtienen 20 ml de sangre heparinizada por punción venosa ó 2-4 ml de médula ósea.
- 2.-En un tubo de 22 ml mezclar la sangre con 2 ml de PBS/azida de sodio 50 mM y homegenizar por versión suave.
- 3.-Agregar 5 ml de Ficoll-Hypaque 1.077 g/ml en un tubo de centrífuga de 15 ml.
- 4.-Agregar al tubo de centrífuga aproximadamente 11 ml de sangre, resbalando cuidadosamente por las paredes del tubo para formar 2 fases.
- 5.-Centrifugar a 1500 rpm durante 30 minutos a 4C.
- 6.-Retirar con una pipeta Pasteur de cola larga desde la interfase los mononucleares y colocarlos en un tubo de centrífuga de 15 ml.
- 7.-Llenar el tubo (15 ml) con PBS/azida de sodio.
- 8.-Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm a 4C.
- 9.-Tirar el sobrenadante y dar golpes en la base del tubo para disolver la pastilla.
- 10.-Agregar 5 ml de PBS/azida de sodio y tomar una alícuota de 50 microlitros y mezclarlos con azul de tripano al 1%.
- 11.-Colocar 50 microlitros en una cámara de Neubauer y contar las células y calcular su número en base a la siguiente fórmula: #de células/ml =  $nx2x1x10^4$ .
- 12.-Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos a 4C.
- 13.-Retirar el sobrenadante y suspender las células en 100 microlitros de amortiguador B/azida de sodio y transferir al tubo Eppendorf.
- 14.-Empastillar las células con un toque de ultra centrífuga.
- 15.-Retirar el sobrenadante.
- 16.-La pastilla de células se almacena a -70C.

### Extracción de DNA mediante RNAzol.

Después de extraer el RNA se procede a extraer el DNA en la fase orgánica.

- 1.-Añadir un volumen del amortiguador STE (NaCl 0.1 M, tris HCL pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.1 mM) con SDS 1% y ajustar pH a 12 con NaOH 5N.
- 2.-Mezclar con vortex 30 segundos.
- 3.-Centrifugar a 12000 rpm durante 20 minutos a 4C.
- 4.-Se transfiere la fase acuosa con DNA y se precipita con etanol según el procedimiento clásico, se obtienen aproximadamente 700 microlitros.
- 5.-Separar el sobrenadante de 700 microlitros en dos alícuotas.
- 6.-Un volumen de la fase acuosa (350 microlitros) se mezclan con dos volúmenes de etanol absoluto (700 microlitros) a -20C, se homogeniza la mezcla y se incuba a -20C por una hora.
- 7.-Se centrifuga a 12000 rpm por 15 minutos a 4C.
- 8.-Decantar el sobrenadante y secar la pastilla de DNA:
- 9.-Resuspender el DNA en un ml de etanol al 70%, agitar con vortex 5 segundos.
- 10.-Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4C.
- 11.-Se retira el etanol y secar la pastilla.
- 12.-Se resuspende la pastilla de DNA con 100 microlitros de agua inyectable, incubar a 37C durante 10 minutos para disolver el DNA.
- 13.-Se almacena el DNA total a -20C ó 4C.

### Realización de reacción en cadena de la polimerasa.

Se toman 250 a 500 nanogramos de DNA total y se realiza la siguiente mezcla de reacción:

- 5 microlitros de Buffer de 10 PCR.
- 2.5 microlitros de MgCl<sub>2</sub>.
- 2.0 microlitros de cada uno de los dinucleótidos.
- 1.0 microlitros de Taq-polimerasa.
- 1.0 microlitros de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores.



Agua destilada para completar 100 microlitros.

Se correrán las muestras con las siguientes condiciones:

Un ciclo a 94C por 7 minutos.

40 ciclos.

-1 minuto a 94C.

-1 minuto a 55C.

-1 minuto a 72C.

Un ciclo a 72C por 7 minutos.

#### Metodología RT-PCR de oncogenes de apoptosis.

Reactivos.

Agarosa de bajo punto de fusión (GIBCO-BRL).

Alcohol etílico. (JT Baker S.A.).

Alcohol isopropílico. (JT Baker S.A.).

Azul tripano al 1%. (Sigma, Chemical Company).

Bromuro de etidio, 5 µg/µL (Sigma, Chemical Company).

Cloroformo. (JT Baker S.A.).

dNTP\_s (GIBCO-BRL).

Kit de Taq polimerasa (GIBCO-BRL).

Kit de transcriptasa reversa (RT) (SuperScript II, GIBCO-BRL).

Ficoll-Hypaque de densidad 1.119 g/dl.

Heparina 1000U. (Laboratorios PiSA).

Hexámeros (random primers -GIBCO-BRL, Gaithesburg.MD).

“Primers” o iniciadores (GIBCO-BRL).

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Trizol. Solución monobásica de fenol y tiocianato de guanidina (GIBCO).

Balanza semianalítica. Sartorius.

Baño María. Aparatos Científicos. JM Ortiz.

Cámara de electroforesis, mini SUB DNA CELL, BIO-RAD.

Cámara de Neubauer. Relaby, S.A.

Centrífuga refrigerada. Baxter.

Centrífuga. Sorvall TC.

Congelador de -20\_C. Ojeda.

Congelador de -70\_C. REVCO. Inc.

Estufa. Fisher Scientific.

Fuente de poder. BIO-RAD.

Horno. HV-2030. FIGURSA.

Microcentrífuga. IEC, MicroMax.

Espectrofotómetro, Ultrospec III. Pharmacia LKB.

Potenciómetro. Accumet. Fisher Scientific.

Termociclador Omn-E (Hybaid L.UK.).

Vortex. "Super Mixer". Fisher Scientific.

#### Obtención de células mononucleares por gradiente de densidad.

1- Se obtienen 20 mL de sangre periférica en una jeringa heparinizada, se agregan 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se homogeneiza por inversión suavemente. En los casos en que la muestra sea de médula ósea, se obtienen 3 mL y se le agrega 3 mL de PBS (v/v).

2- A otro tubo de centrifuga de 15 mL se agrega 5 mL de Ficoll-Hypaque de densidad 1.119 g/dl.

- 3.- Se estratifica en el tubo con Ficoll-Hypaque, la mezcla de sangre periférica o de médula ósea (según sea el caso) por las paredes del tubo sin romper el gradiente de densidad.
- 4.- Se centrifuga a 1500 rpm durante 30 min. a 4\_ C.
- 5.- Se retira con una pipeta Pasteur, desde la interfase, los mononucleares y se coloca en un tubo de centrifuga de 15 mL.
- 6.- Se llena el tubo con solución de PBS.
- 7.- Se centrifuga durante 10 min. a 3500 rpm a 4\_ C.
- 8.- Se decanta el sobrenadante y resuspendió el botón celular.
- 9.- Se agrega 5 mL de PBS, se tomó una alícuota de 50\_ L y se mezclaron con 50\_ L de azul tripano al 1%.
- 10.- Se coloca 50\_ L de la suspensión celular en una cámara de Neubauer y se contaron las células; se calcula el número con base en la sig. fórmula:  
No. Células/ml  $= n \times 2 \times 10^4$ .  
Donde n es el número de células contadas en un cuadrante.
- 11.- Se centrifuga a 3500 rpm durante 10 min. a 4\_ C.
- 12.- Se retira el sobrenadante y se ajustaron a  $1 \times 10^7$  células/ mL de amortiguador B; se transfieren a un tubo Eppendorf.
- 13.- Se mantienen las células a -70\_ C hasta su uso.

#### Extracción de RNA por el método Chomczynski y Sacchi.

- 1.- Se descongela la muestra que se mantuvo a -70\_ C en los tubos Eppendorf.
- 2.- Se centrifuga a 12000 rpm durante 30 segundos para separar las células; se desecha con cuidado el sobrenadante.
- 3.- Se agrega un mL de Trizol para el aislamiento de RNA, DNA y proteínas.
- 4.- Se lisa por pipeteo, mezclando con una pipeta de 1000\_ L, hasta que todo queda disgregado y se obtiene el RNA libre.
- 5.- Se incuba a \_20\_ C durante 15 min.

- 6.- Se agregan 200  $\mu$ L de cloroformo a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - 7.- Se agita vigorosamente durante 15 seg.
  - 8.- Se incuba a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.
  - 9.- Se centrifuga a 12000 rpm durante 15 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - 10.- Se obtienen tres fases:
    - Acuosa incolora  $\rightarrow$  RNA.
    - Interfase blanca  $\rightarrow$  DNA.
    - Orgánica rosa  $\rightarrow$  proteínas.
  - 11.- Se transfiere la fase acuosa a un tubo Eppendorf evitando contaminarla con DNA y proteínas.
  - 12.- Se precipita el RNA con 0.5 mL de isopropanol absoluto, se tapó, se invirtió suavemente y se observa una turbulencia lechosa.
  - 13.- Se incuba a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 45 min.
  - 14.- Se centrifuga a 12000 rpm durante 15 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - 15.- Se decanta el sobrenadante, vaciando de un solo golpe y sin regresar, se coloca el tubo Eppendorf sobre papel absorbente, de manera que se seque completamente el tubo.
  - 16.- Se agrega un 1 mL de etanol al 100%, se agitó en un vortex y se disuelve la pastilla.
  - 17.- Se centrifuga a 12000 rpm durante 15 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; se elimina el sobrenadante totalmente como en el paso 15.
  - 18.- Se agregan 30  $\mu$ L de agua des-ionizada estéril y se disolvió la pastilla.
  - 19.- Se incuba a  $57^{\circ}\text{C}$  durante 15min.
  - 20.- Se cuantifica el RNA por el método espectrofotométrico a una  $\lambda = 260 / 280$  nanómetros.
  - 21.- Se realiza un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para observar la calidad del RNA.
  - 22.- Se realiza la transcripción reversa para obtener el DNA complementario (cDNA) a partir de 1  $\mu$ g de RNA.
- Obtención de DNA complementario (cDNA) por RT.

La síntesis del cDNA se lleva a cabo en todos los casos a partir de 1 µg de RNA total que se mezcla con hexámeros (random primers -GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) y se calienta a 70°C durante 10 min. y posteriormente se agrega la siguiente mezcla: Amortiguador 5X 4 µL, DTT 0.1 mM 1 µL, dNTP\_s 10 mM 1 µL; se incubó la mezcla a 25°C durante 10 min, después a 42°C durante 2 min., al término de esta incubación se le agregó 1 µL de la enzima transcriptasa reversa (RT) (SuperScript II, GIBCO-BRL) y se procedió a una incubación de 42°C durante 50 min y una final de 70°C durante 10 min. El cDNA se mantuvo a -20°C hasta su uso.

#### Expresión de los genes *bcl-xl* y *bax* por el método de RT-PCR.

La identificación de la expresión de los genes *bcl-xl* y *bax* se realiza por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a la Transcriptasa Reversa (RT-PCR) con lo cual se tiene un análisis más específico. En esta prueba se realiza una RT-PCR múltiple, para evaluar mediante un gen control, la validez de cada uno de los resultados obtenidos; se empleó *actina* como gen control.

La primera fase de este método consiste en obtener el cDNA y en la segunda fase se lleva a cabo la PCR a partir de 2 µL de cDNA que se agrega a una mezcla de 5 µL de amortiguador 10X, 1 µL de dNTP\_s 10mM (GIBCO-BRL), 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM (GIBCO), 1 µL de oligos correspondientes para cada una de las determinaciones ( *Bax*\_ *bax* sentido y *bax* antisentido y *Bcl-xL*\_ *bcl-xL* sentido y *bcl-xL* antisentido) y 1 µL de DNA Taq polimerasa 5U/µL, esta segunda fase (PCR) se realizó en un termociclador Omn-E (Hybaid L.UK), en el cual se usó un programa con 35 ciclos de 94°C un minuto, 54°C un minuto y con una polimerización de 72°C un minuto para *bax* y *bcl-xl*.

*Bax*\_ sentido (5' \_ TGG ACG GGT CCG GGG AGC\_3').

\_ antisentido (5' \_ GCA CAG GGC CTT GAG CAC\_3').

*Bcl-xL*\_ sentido (5' \_ AGT TTG AAC TGC GGT ACC GGC GG\_3').

\_ antisentido (5' \_ GAA CCA GCG GTT GAA GCG TTC CT\_3').

*β actina*\_ sentido ( 5' \_ GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA\_3').

\_ antisentido ( 5' \_ CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC\_3').

Los productos de la PCR se visualizan mediante un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, el cual se corrió a 0.040 mA durante 40 min.

Se espera una banda de 377 pares de bases (pb) para *bcl-xl*, 384 pb para *bax* y de 539 pb para *actina*.

Medición de la expresión de los genes *actina*, *bcl-xl* y *bax* por densitometría con el programa ChemiImager 4400.

- 1.- Se coloca el gel al 2% teñido con bromuro de etidio en la plataforma del transiluminador.
- 2.- Se abre el programa de ChemiImager 4400.
- 3.- El gel se observa previamente a la luz blanca para ajustar la imagen.
- 4.- Se ajusta el paso de luz y tiempo de exposición.
- 5.- Se hace incidir luz ultravioleta (uv) sobre la imagen ajustada del gel, hasta que aparecieron las bandas de la expresión de los genes a determinar.
- 6.- Se congela la imagen.
- 7.- Se selecciona un área de 1008 mm<sup>2</sup>, el proceso de cuantificación para calcular las densidades, lo realiza el programa ChemiImager 4400 quien emite resultados en valores de densidades integrados (IDV).
- 8.- Se documentan los resultados y se fotografían los geles.

### **APENDICE 3**

#### Técnica directa para estudio citogenético en médula ósea.

- 1.- En un tubo cónico de polipropileno, poner 10 ml de sol. hipotónica 0.075 M, más 200 ml de colchicina, agregar 1.0 ml de médula ósea.
- 2.- Incubar 60 mint. a 37C.
- 3.- Centrifugar 5 mints. a 3500 RPM y desechar sobrenadante.
- 4.- Agregar sol. de Carnoy fría (5 ml),gota a gota, mezclando en vortex.
- 5.- Dejar reposar a temperatura ambiente 30 mints.
- 6.- Centrifugar 5 mints. a 3500 RPM y decantar.
- 7.- Repetir 5 ó 6 veces éste paso, hacer laminillas de prueba y teñir con giemsa 3 mints.
- 8.- Observar al microscopio, sí el material es adecuado, hacer laminillas restantes.
- 9.- En caso contrario, dejar el material en sol. Carnoy en el refrigerador 24 hs.
- 10.- Centrifugar, decantar y hacer laminillas.
- 11.- Dejar las laminillas a 60C por 2 ó 3 días y hacer bandas G.

### Técnica de cultivo

1.- En un tubo cónico, poner 5 ml de medio nutritivo suplementado, más 0.2 ml de fitohemaglutinina y 1 ml de médula ósea.

2.- Incubar 72 hs a 37C, una hora antes de las 72 hs poner 200 ml de colchicina, incubar el tiempo que falta, centrifugar 5 mins. a 3500 RPM y decantar.

3.- Agregar 6 ml de sol. hipotónica 0.075 M, incubar a 37C por 30 mins.

4.- Seguir los mismos pasos que para la técnica directa.

Nota: Para las 2 técnicas, los tubos se hacen por duplicado, por lo cual es necesario tomar mínimo 4.0 ml de médula ósea, en una jeringa heparinizada ( bañar toda la jeringa primero y luego dejar 0.1 ml de heparina).



## CARTA DE CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE

Por medio de la presente declaro haber sido ampliamente informado (a) por el Doctor **Manuel Ayala Sánchez** sobre el Protocolo de investigación:

**“Estudio comparativo y aleatorizado de Transplante Autólogo de Célula Tallo Periférica (TACTP) + Imatinib vs. Imatinib en pacientes con Leucemia Granulocítica Crónica cromosoma Filadelfia-positivo en fase crónica con falla terapéutica a \_-interferón.”**

He sido advertido en pleno uso de mis facultades, que estoy aceptando incluirme a un estudio en el que puedo recibir dos opciones de tratamiento dependiendo del grupo que designe mi aleatorización, siendo el grupo experimental denominado “A” compuesto por tres fases, una fase 1 que requiere de una COLECCIÓN de células madre, que dependerá de la calidad y cantidad de las células, el pasar a una fase 2 de TRANSPLANTE AUTÓLOGO ó pasar directamente a la fase 3 de MANTENIMIENTO con imatinib, en caso de que la cosecha de células no sea la indispensable para la fase 2 ó al grupo control denominado grupo “B” recibiendo por 12 meses tratamiento con imatinib, así como de los posibles riesgos que pueden incluir efectos colaterales (náusea, vómito, fiebre etc.), tóxicos en diferentes órganos (falla orgánica), progresión de la enfermedad ó toxicidad letal por los riesgos inherentes al estado de mielodepresión durante el acondicionamiento de la fase 3 y ventajas (lograr el control de mi enfermedad y prolongar mi supervivencia), que ello representa al ser incluido en dicho protocolo, otorgando mi consentimiento para ser sometido a los procedimientos inherentes al mismo y eximiendo de cualquier responsabilidad a la Institución: **Instituto Mexicano del Seguro Social** y a terceros relacionados al protocolo en cuestión.

Entiendo así mismo, que en cualquier momento puedo salir del estudio, sí así lo decido ó cuando mi Médico tratante lo considere necesario. Se me informó también que los datos clínicos y de laboratorio serán registrados y analizados en computadora y que la información será manejada confidencialmente.

Nombre del paciente

Firma del paciente

Testigo

Testigo

Fecha

Firma del Médico Investigador