

Diez años de seguimiento y monitoreo de 87 pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con inhibidores de cinasa de tirosina: experiencia en FUNDALEU, Buenos Aires, Argentina

Carolina Pavlovsky, Isolda Fernández, Miguel A Pavlovsky, Federico Sackmann, Guillermmina Remaggi, Santiago Pavlovsky*†

En memoria del Dr. Santiago Pavlovsky

RESUMEN

Antecedentes: el pronóstico de los pacientes con leucemia mieloide crónica ha cambiado de manera muy significativa desde la introducción de los inhibidores de cinasa de tirosina. El monitoreo de la enfermedad mínima residual por PCR en tiempo real (RQ-PCR) es hoy una herramienta indispensable para el seguimiento de los pacientes.

Objetivo: evaluar el seguimiento de pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con inhibidores de cinasa de tirosina en un centro especializado. El objetivo secundario fue evaluar la enfermedad mínima residual por el método de PCR en tiempo real en pacientes en remisión citogenética completa en fase crónica, en tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina analizando diferentes variables con repercusión en el sostenimiento de la respuesta molecular mayor.

Material y método: estudio retrospectivo y transversal efectuado con base en el análisis de los pacientes con leucemia mieloide crónica tratados en el FUNDALEU-Centro de Hematología Pavlovsky con la intención de evaluar los resultados del seguimiento y el monitoreo de la enfermedad. La mediana de edad de todos los pacientes incluidos fue de 50 años. 87 pacientes recibieron imatinib, 60 (69%) como primera línea de manera continua y 27 (31%) secundario a interferón.

Resultados: de los 87 pacientes en seguimiento, 86 (99%) alcanzaron remisión citogenética completa. Setenta y tres (84%) continúan en tratamiento con imatinib, 12 (14%) cambiaron a un inhibidor de cinasa de tirosina de segunda generación y dos suspendieron el tratamiento. De los pacientes en remisión citogenética completa 63/86 (73%) alcanzaron una respuesta molecular mayor o estable (BCR-ABL[IS] <0.1%). No alcanzar una respuesta molecular mayor a la estable determina mayor riesgo de recaída citogenética (4% sin respuesta molecular mayor vs 0% en respuesta molecular mayor). Los pacientes con respuesta molecular mayor sostenida tuvieron una supervivencia libre de recaída citogenética a diez años significativamente más prolongada (100% vs 65%, P=0.002) sin repercusión en la supervivencia global. Obtener una respuesta molecular mayor sostenida en el tiempo se considera un factor pronóstico de protección de recaída citogenética. La supervivencia libre de recaída citogenética fue de 95% a 10 años.

Conclusiones: en la actualidad, el monitoreo molecular por PCR en tiempo real es indispensable para el seguimiento de pacientes con leucemia mieloide crónica en remisión citogenética completa. El 95% de los pacientes tratados con imatinib continúan en remisión citogenética completa. Conseguir una respuesta molecular mayor estable es un predictor importante de durabilidad de la remisión citogenética completa.

Palabras clave: leucemia mieloide crónica, inhibidores de cinasa de tirosina, FUNDALEU, enfermedad mínima residual, PCR en tiempo real.

ABSTRACT

Background: The prognostic of chronic myeloid leukemia (CML) patients has dramatically changed since the introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKI). Minimal residual disease (MRD) monitoring by Real Time quantitative PCR (RQ-PCR) is at present a useful tool for monitoring patients in the TKI Era.

Objectives: to evaluate CML patients follow-up under treatment with TKI in a specialized center. Evaluate MRD by RQ-PCR in complete cytogenetic remission patients (CCR) in chronic phase analyzing different variables with impact in the maintenance of major molecular response (MMR).

Material and Methods: CML patients treated in FUNDALEU were analyzed with the intention to evaluate follow-up and molecular monitoring results. Median age was 50 years, 87 patients received imatinib treatment, 60 (69%) as 1st line and 27 (31%) 2nd to Interferon.

Results: From 87 patients followed, 86 (99%) obtained CCR. Seventy three (84%) continue under imatinib treatment, 12 (14%) changed to a 2nd generation TKI and 2 interrupted treatment. Patients in CCR 63/86 (73%) obtained stable MMR (BCR-ABL[IS] <0.1%). Not reaching a stable MMR determined a major risk for cytogenetic relapse (4% with no MMR vs 0% in MMR). Patients with sustained MMR showed a significant longer cytogenetic relapse free survival at 10 years (100% vs 65%, P=0.002) with no impact on overall survival. Obtaining a stable MMR through time is considered a prognostic factor that protects against cytogenetic relapse. Our population showed a cytogenetic relapse free survival of 95% at 10 years.

Conclusion: Molecular monitoring by RQ-PCR is at present the most important tool for CML patients follow-up that had obtained CCR. The 95% of the patients treated with imatinib continue in CCR. Obtaining a stable and sustained MMR showed to be a predictor for CCR durability.

Key words: Chronic myeloid leukemia, Tyrosine kinase inhibitors, FUNDALEU, Minimal residual disease, RQ-PCR.

El notable avance que se produjo con la introducción de los inhibidores de cinasa de tirosina, que se inició con el imatinib en el año 2001, se acompañó de importantes progresos en el monitoreo exacto y sensibilidad de la respuesta al tratamiento. En alrededor de 75% de los pacientes, a los dos años de tratamiento se logra la remisión citogenética completa, lo que implica ausencia en la detección del cromosoma Ph1/abl/Ph1a.¹ El objetivo principal es alcanzar la remisión citogenética completa porque se ha demostrado su repercusión en la supervivencia.¹ Una vez que se consigue es imprescindible detectar la enfermedad mínima residual mediante el monitoreo molecular cuantitativo en tiempo real para identificar tempranamente a los pacientes con riesgo de recaída citogenética. La ELN 2009² considera que no alcanzar una respuesta molecular mayor a 18 meses implica una respuesta subóptima al tratamiento y que continuar con el tratamiento elegido, subir la dosis o cambiar a otro inhibidor de cinasa de tirosina es una de las opciones sugeridas porque la falla, y no la respuesta subóptima hasta ahora han demostrado su efecto en la supervivencia. Sin embargo, la respuesta óptima al tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina no solo se debe al excelente resultado del fármaco en sí, sino a diversos factores que rodean al paciente, como: el apego al tratamiento, óptimo seguimiento mediante técnicas citogenéticas y moleculares para adaptar el cambio de tratamiento en tiempos adecuados, trabajo del hematólogo especialista con equipos multidisciplinarios y seguimiento de guías de tratamiento, que en la actualidad son puntos indispensables aplicables en la nueva era de los inhibidores de cinasa de tirosina. En

esta descripción se detallan los resultados del seguimiento y monitoreo molecular de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica Ph1 (+) en fase crónica tratados en nuestra institución con inhibidores de cinasa de tirosina.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo y transversal efectuado de diciembre de 1999 a septiembre de 2010 en pacientes tratados con inhibidores de cinasa de tirosina (87) con diagnóstico de leucemia mieloide crónica Ph1 (+) en fase crónica. Los estudios citogenéticos y moleculares se centralizaron en FUNDALEU. Veintisiete pacientes (31%) se trataron previamente con interferón antes de recibir imatinib y 60 (69%) recibieron imatinib como primera línea. El 55% de los pacientes tuvo al diagnóstico un puntaje de Sokal de riesgo bajo. En el Cuadro 1 se describen las características de los pacientes.

Todos los pacientes se encontraban en fase crónica, definida según los criterios convencionales.¹ Todos los

Cuadro 1. Características de los pacientes

Característica	n=87	%
Mediana de edad	50 (15 - 78)	
Sexo masculino	43	49%
Sokal		
Alto	13	15%
Intermedio	26	30%
Bajo	48	
Antecedentes de		
Tratamiento con imatinib		
Primera línea	60	69%
IM post IFN	27	31%
Tratamiento actual		
Imatinib	73	
Desatinib segunda línea	7	
Nilotinib segunda línea	3	
Sin tratamiento	2	
Tratamiento de inducción LMA		
(CB)	1	
IFN	1	
Mediana de tiempo desde el		
inicio de imatinib hasta el		
presente (meses)	62 (14-98)	
Mediana de tiempo desde el		
inicio de imatinib hasta la remisión		
citogenética completa	9 (3-24)	
(meses)		

* FUNDALEU, Centro de Internación e Investigación Clínica Angélica Ocampo. Buenos Aires, Argentina.

Recibido: noviembre, 2010. Aceptado: diciembre, 2010.

Correspondencia: Dra. Carolina Pavlovsky. Centro de Internación e Investigación Clínica Angélica Ocampo. José E. Uriburu 1450 / 1520 - C1114AAN, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: cpavlovsky@fundaleu.org.ar

Este artículo debe citarse como: Pavlovsky C, Fernández I, Pavlovsky MA, Sackmann F, Remaggi G, Pavlovsky S. Diez años de seguimiento y monitoreo de 87 pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con inhibidores de cinasa de tirosina: experiencia en FUNDALEU, Buenos Aires, Argentina. Rev Hematol Mex 2011;12(1):11-16.

pacientes iniciaron su tratamiento con imatinib a una dosis de 400 mg al día. El diagnóstico se confirmó mediante un estudio citogenético convencional por bandeo G y estudio molecular cualitativo o cuantitativo. Luego de obtenerse la remisión citogenética completa, cada seis meses se realizó el monitoreo molecular. A partir del año 2005 en FUNDALEU se utiliza la técnica de PCR en tiempo real, mediante el método estandarizado a nivel internacional. En 41 pacientes (48%) se realizó dosaje plasmático de imatinib para evaluar la absorción de éste.

Monitoreo de la enfermedad

Para confirmar la remisión citogenética completa (Ph 0%) se realizó fluorescencia *in situ* (FISH) en sangre periférica. Los análisis se efectuaron siguiendo el protocolo convencional con sondas comerciales específicas para BCR (22q11) y ABL (9q34) loci (LSI bcr/abl Dual Fusion Probe-Vysis-Abbott Molecular Inc. Des Plaines IL) que analizó 400 núcleos en cada caso.¹

Para medir los niveles de transcriptos BCR-ABL cada seis meses se realizó una PCR en tiempo real en sangre periférica. Para lograr mayor sensibilidad ante la enfermedad mínima residual, las muestras siempre se procesaron en las 2-5 horas posteriores a la extracción. Para la amplificación se utilizó el método de Taqman (PE Applied Biosystems, USA) siguiendo el protocolo estandarizado del gen BCR-ABL establecido por el programa europeo (EAC).² Los resultados se expresaron como porcentajes de la razón del ABL como gen control y nuestro laboratorio los convirtió a la escala internacional (IS). El factor de conversión específico fue validado por el laboratorio de referencia en Adelaida, Australia.³ (IS% bcr-abl.)

Concentraciones plasmáticas de imatinib: se obtuvieron mediante LC-MS/MS-tandem mass spectrometry (Esp TermoFinnigan TSQQuantum). Se consideró como concentración plasmática óptima IPL>1002 ng/mL.

Criterios de respuesta, definición

Remisión citogenética completa: 0% de células Ph (+) en las metafases analizadas por bandeo G. Recaída citogenética: pérdida de la remisión citogenética completa, y una o más metafases Ph(+). Respuesta molecular mayor: %BCR-ABL/ABL: <0,1% (IS).⁴ Respuesta molecular completa: <0,01%. Para el análisis se consideraron las respuestas moleculares mayores y completas sostenidas por lo menos durante los últimos 24 meses, con evaluaciones

semestrales. Ante un aumento en el nivel de transcriptos, de 1 o 2 log, se repitió la PCR en tiempo real entre el segundo y tercer mes. Ante la confirmación se solicitó un estudio de mutaciones del dominio cinasa (realizado en un laboratorio externo) y un estudio citogenético para evaluar el estado de la enfermedad. Se considera un nivel plasmático de imatinib óptimo al mayor de 1002 ng/mL.¹

Método estadístico

Para comparar dos grupos de variables continuas se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y de variables categóricas y binarias, prueba de la χ^2 o Fisher. La recaída citogenética se estimó a través de curvas de Kaplan-Meier. La supervivencia libre de recaída citogenética se estimó mediante el método de Kaplan-Meier.^{2,3} Se consideró desde el diagnóstico hasta la pérdida de la remisión citogenética completa. Se realizó análisis univariado para identificar factores pronósticos predictores de recaída citogenética aplicando el *logrank test*. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

La mediana de seguimiento desde el inicio del imatinib hasta la última actualización fue de 62 meses (rango 14-98). La mediana de edad de todos los pacientes incluidos fue de 50 años (rango 15-78). Como primera línea de tratamiento, 60 (69%) pacientes recibieron imatinib de manera continua y 27 (31%) después del interferón. De los 87 pacientes en seguimiento, 86 (99%) obtuvieron remisión citogenética completa, con una mediana de tiempo desde el inicio del imatinib hasta la remisión citogenética completa de nueve meses (rango 3-24). Se diagnosticaron 87 pacientes con leucemia mieloide crónica y se siguieron en nuestra institución, 86 (99%) alcanzaron remisión citogenética completa y uno remisión completa mayor. En la actualidad, 73 de 87 (84%) pacientes continúan en tratamiento con imatinib, 12 (14%) cambiaron de tratamiento a un inhibidor de cinasa de tirosina de segunda generación (4 por falla, 3 por respuesta subóptima molecular y 5 por intolerancia). De los pacientes que fallaron, uno tuvo la mutación G250E que es resistente a múltiples inhibidores de cinasa de tirosina; en la actualidad recibe tratamiento con IFN. El otro paciente tuvo una transformación a crisis blástica con diagnóstico de sarcoma granulocítico en tratamiento de inducción para leucemia mieloide aguda. Dos

pacientes decidieron suspender el tratamiento con imatinib sin indicación médica por motivos personales; se obtuvo una respuesta molecular mayor. Las dos pacientes viven, sin otro dato de seguimiento.

Evolución de los pacientes en remisión citogenética completa

De los 86 pacientes en remisión citogenética completa, 63 (73%) obtuvieron una respuesta molecular mayor estable. Se dividieron en dos grupos según la obtención de respuesta molecular mayor: quienes tuvieron respuesta molecular mayor sostenida lograron una supervivencia libre de recaída citogenética a 10 años significativamente más prolongada (100 vs 65%, $P=0.000$, Figura 1) sin repercusión en la supervivencia global. Cuatro pacientes que perdieron la remisión citogenética completa se encontraban en el grupo que nunca había logrado una respuesta molecular mayor. No alcanzar una respuesta molecular mayor estable determina mayor riesgo de recaída citogenética (4 sin respuesta molecular mayor vs 0 en respuesta molecular mayor). Obtener una respuesta molecular mayor sostenida en el tiempo se considera un factor pronóstico favorable para recaída citogenética.

Con la dosis de imatinib de 400 mg al día desde la primera evaluación molecular realizada con PCR en tiempo real y con seguimiento semestral, se observa un incremento de la respuesta molecular mayor de 48 a 73%. Se comprueba que un grupo de 23 pacientes tuvo respuesta subóptima,³ sin conseguir respuesta molecular mayor a

lo largo del seguimiento. Debido al riesgo de perder la remisión citogenética completa, este grupo se monitoreó y se repitió el estudio molecular ante cambios de más de un logaritmo; se llevó un estricto control del apego al tratamiento y medición de las concentraciones plasmáticas de imatinib. La medición de las concentraciones plasmáticas de imatinib se realizó en 41 pacientes, 37 (90%) tuvieron un nivel plasmático de imatinib mayor de 1002 ng/mL; 85% pertenecían al grupo de respuesta molecular mayor (Cuadro 2).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con concentraciones plasmáticas de imatinib mayores de 1002 ng/mL, según el estatus molecular. Se analizaron las características clínicas asociadas con la pérdida de la remisión citogenética completa. En el análisis univariado (Cuadro 2) se observan los diferentes factores pronósticos con repercusión en la pérdida de la remisión citogenética completa. El único factor pronóstico estadísticamente significativo fue la obtención de respuesta molecular mayor a $P=0.000$.

DISCUSIÓN

Entre 75 y 90% de los pacientes con leucemia mieloide crónica-fase crónica alcanzan remisión citogenética

Cuadro 2. Riesgo de pérdida de la remisión citogenética completa según factores pronósticos, análisis univariado

Variable	<i>n</i> = 86	Recaída citogenética	<i>p</i>
Género			
Femenino	43	3	0.29
Masculino	43	1	
Edad			
Menor de 60 años	65	4	0.24
Mayor de 60 años	21	0	
Tratamientos previos a			
Imatinib	60	2	0.40
Imatinib primera línea	26	2	
IFN previo a imatinib			
Obtención de respuesta molecular mayor			
Si	63	0%	0.00
No	23	4%	
Riesgo de Sokal			
Bajo	47	2	0.21
Intermedio-alto	39	2	

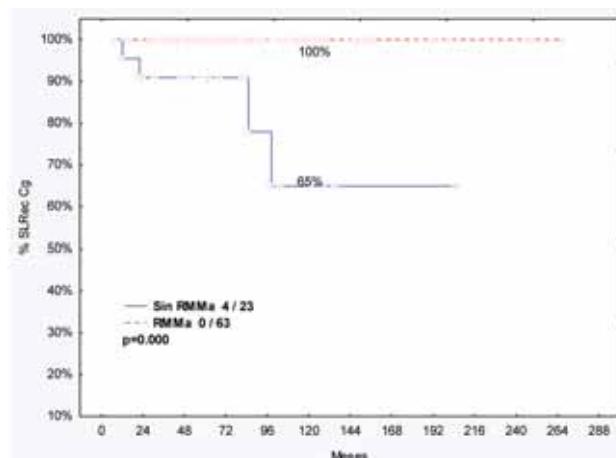


Figura 1. Supervivencia libre de recaída citogenética según la respuesta molecular obtenida.

completa durante el tratamiento con imatinib a dosis de 400 mg al día.¹ Debido a que con imatinib se logran altas tasas de remisión citogenética completa, el objetivo del tratamiento es hoy en día conseguir respuestas moleculares. Sin embargo, la profundidad y tiempo en que debe obtenerse la respuesta molecular es aún un tema de debate. Algunos estudios describieron que la obtención de la respuesta molecular mayor está asociada con la duración más prolongada de la remisión y supervivencia libre de progresión.² No conseguir una respuesta molecular mayor a 18 meses se considera respuesta subóptima al tratamiento con imatinib, según las recomendaciones de la ELN.³ El seguimiento del estudio IRIS a siete años muestra los resultados moleculares convertidos a la escala internacional con un incremento de la respuesta molecular mayor de 13 a 86% desde el tercer mes de tratamiento al mes 72. A 18 meses los pacientes que no habían alcanzado respuesta molecular mayor tuvieron una supervivencia libre de evento de 89% comparada con 98% con respuesta molecular mayor ($p=0.01$).³ La probabilidad de perder la remisión citogenética completa en quienes tuvieron respuesta molecular mayor fue de 3 vs 26% en pacientes en remisión citogenética completa, pero sin respuesta molecular mayor. El último análisis del IRIS, con ocho años de seguimiento, confirma que ningún paciente con respuesta molecular mayor obtenida a 12 meses, progresó a fases avanzadas. Estos datos sugieren

que alcanzar una respuesta molecular mayor sería un factor seguro de protección para pacientes tratados con imatinib en primera línea. Con base en el conocimiento de que la cantidad de pacientes analizada en nuestra institución es limitada, se confirma que quienes no alcanzan respuesta molecular mayor tienen más riesgo de recaída citogenética (4/23 vs 0/63, $P=0.000$). Si la respuesta molecular mayor se confirma y mantiene en el tiempo de manera continua le confiere estabilidad a la remisión citogenética completa; esto fue reportado por Palandri y sus colaboradores⁴ y confirmado en nuestra población. Similares resultados se observaron en 276 pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con imatinib (74% altas dosis) y analizados por el MDACC. Alcanzar una respuesta molecular mayor continua y con duración de más de 12 meses, se asoció con mayor supervivencia libre de progresión.⁵ En nuestra población el nivel de transcriptos BCR-ABL disminuyó con el tiempo y mejoró la respuesta molecular mayor desde que comenzó a ser evaluada mediante PCR en tiempo real en nuestra institución (de 48 a 73%). Un grupo de pacientes permaneció con respuesta subóptima. Marín y su grupo analizaron a pacientes con respuesta subóptima y describieron que tienen mayor riesgo de perder la remisión citogenética completa que los que nunca habían obtenido respuesta molecular mayor;⁶ sin embargo, no hubo diferencias en la supervivencia.

Los estudios farmacocinéticos para evaluar las concentraciones de imatinib en plasma son una herramienta útil que se correlaciona con la respuesta clínica del paciente y permite identificar a los pacientes con mal apego al tratamiento, exceso de toxicidad o con respuesta subóptima.⁷ En nuestro estudio se observó una correlación entre la respuesta molecular mayor y la concentración plasmática de imatinib óptimo; los resultados no fueron estadísticamente significativos, quizás por el bajo número de pacientes evaluados. La descripción de la experiencia de nuestro centro con el tratamiento con inhibidores de cinasa de tirosina muestra que la obtención de respuesta molecular mayor es un factor de buen pronóstico para la persistencia de remisión citogenética completa. El estudio de PCR en tiempo real estandarizado en la escala internacional es, en la actualidad, el método de elección para monitorear la enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia mieloide crónica en remisión citogenética completa.

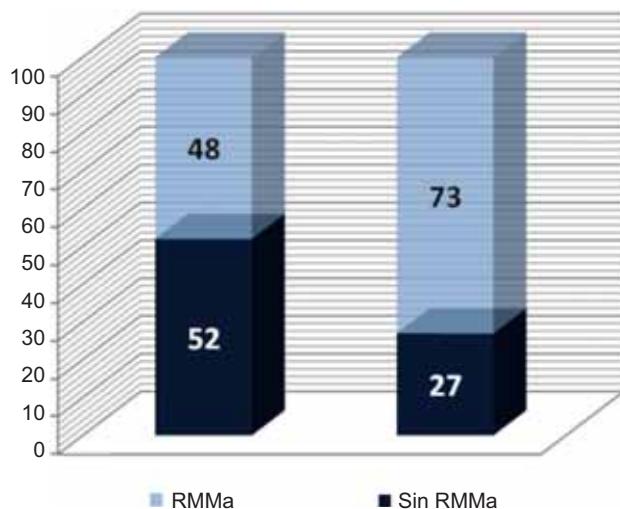


Figura 2. Evolución de la respuesta molecular en el tiempo

REFERENCIAS

1. Druker B, Guilhot F, O'Brien S, et al. Five-year follow-up of imatinib therapy for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase shows sustained responses and high overall survival. *N Engl J Med* 2006;355:2408-2417.
2. Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, et al. Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: Incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008;26:3358-3363.
3. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27:6041- 6051.
4. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1988;51:1441-1446.
5. Pinkel D, Straum T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83(9):2934-2938.
6. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2318-2357.
7. Branford S, Fletcher L, Cross NC, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 2008;112:3330-3338.
8. Picard S, Titier K, Etienne G, et al. Thorough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008;109:3496-3499.
9. Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481.
10. Peto R, Pike M, Armitage P, et al. Design and analysis of a randomized clinical trial requiring prolonged observation of each patient. II Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977;35:1-39.
11. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
12. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;349:1424-1432.
13. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the international randomized study of interferon versus ST1571 (IRIS). *Blood* 2010.
14. Palandri F, Iacobucci I, Soverini S, et al. Treatment of Ph1ladelPh1a- Positive Chronic Myeloid Leukemia with Imatinib: Importance of a Stable Molecular Response. *Clin Cancer Res* 2009;15:1059-1063.
15. Kantarjian H, O'Brien S, Shan J, et al. Cytogenetic and molecular responses an outcome in chronic myelogenous leukemia: need for new response definitions? *Cancer* 2008;115:837-845.
16. Marin D, Milojkovic D, Olavarria E, et al. European LeukemiaNet criteria for failure or sub-optimal response reliably identify patients with CML in early chronic phase treated with imatinib whose eventual outcome is poor. *Blood* 2008;112:4437-4444.
17. Branford S, Hughes TP. Practical considerations for monitoring patients with chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 2010;47(4):327-334.