

Leucemia aguda promielocítica en niños

Norma López-Santiago* y Rogelio Paredes-Aguilera

Departamento de Hematología, Instituto Nacional de Pediatría, SSA, México D. F., México

RESUMEN

La leucemia aguda promielocítica (LAP) es una variedad de leucemia mieloide clasificada por la FAB como el subtipo M3 y que es totalmente diferente al resto de las leucemias, con características morfológicas perfectamente bien definidas que permiten una fácil identificación, y en el 99% de los casos una alteración cromosómica perfectamente bien definida: la traslocación equilibrada entre los cromosomas 15 y 17 que dan lugar al gene de fusión $t(15;17)(q22;q11-12)$. En las últimas décadas, a partir del descubrimiento del mecanismo de acción del ácido transretinoico (ATRA) en la LPA, se han establecido las bases moleculares para construir un modelo de terapia de diferenciación. Esta terapia, mediante el "desbloqueo" del mecanismo de la diferenciación celular, induce la diferenciación terminal de la célula leucémica convirtiéndose en la primera terapia "blanco" dirigida a revertir el mecanismo patogénico de la enfermedad.

Palabras clave:
Leucemia promielocítica,
ácido transretinoico

SUMMARY

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a variety of myeloid leukemia classified by the French-American-British (FAB) as subtype M3. This subtype is totally different from the other leukemias, with well-defined morphological characteristics that allow easy identification. In 99% of cases, there is a well-defined chromosomal alteration: the balanced reciprocal translocation between chromosomes 15 and 17, giving rise to gene fusion $t(15;17)(q22;q11-12)$. In recent decades, from the discovery of the mechanism of action of all-trans retinoic acid (ATRA) in APL, the molecular basis for constructing a model of differentiation therapy has been established. This therapy, using the "unblock" mechanism of cell differentiation, induces terminal differentiation of leukemic cell therapy, becoming the first "target" directed to reverse the pathogenic mechanism of the disease.

Key words:
Promyelocytic leukemia, all-trans retinoic acid,
target-directed therapy

Introducción

Los cambios emergentes en la terapia de las leucemias en los últimos 15 años inician, tal vez, con la identificación de moléculas que pueden unirse a receptores específicos, y modificar en forma sustancial el comportamiento de la célula. Tal es el caso de la leucemia promielocítica aguda (LAP), que históricamente fue una de las variedades de leucemia más agresivas y con mayor riesgo de mortalidad temprana durante su evolución, porque la presencia de fenómenos hemorrágicos graves que se presentaban en las primeras horas después del ingreso de los pacientes a los servicios de urgencias, impactaban negativamente en el pronóstico a corto plazo; la identificación de una alteración molecular que sobreexpresa un receptor capaz de ser modificado, dio origen al interés cada vez mayor de buscar blancos moleculares capaces de ser utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades, en particular de neoplasias malignas, en esta revisión se refiere particularmente al ácido trans-retinóico y su impacto en la evolución y supervivencia de pacientes con LAP.

Epidemiología

La LAP es una variedad de leucemia mieloide clasificada por la FAB como el subtipo M3 y que es totalmente diferente al resto de las leucemias,¹ con características morfológicas perfectamente bien definidas que permiten una fácil identificación, y en 99% de los casos una alteración cromosómica perfectamente bien definida: la traslocación equilibrada entre los cromosomas 15 y 17 que dan lugar al gene de fusión $t(15;17)(q22;q11-12)$.

De acuerdo al grupo alemán en un estudio multicéntrico se reporta una incidencia de 5-13% de LAP en pacientes con leucemia aguda mieloblástica (LAM),² al igual que en diversos estudios de Estados Unidos de Norte América reportan una incidencia similar que va de 5-13%.³⁻⁵

En el estudio de Douer³ realizado en la Universidad del Sur de California, en donde incluyó un grupo de pacientes de origen latino, la frecuencia de LAP fue de 40%, comparada con una incidencia de las demás variedades de LAM que fue de 5-25%. En comparación otros autores que estudian población latina

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Norma López-Santiago. Instituto Nacional de Pediatría, Departamento de Hematología, Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, 04530 México D. F., México, Tel: (55) 1084 0900, Ext 1329/1483. Correo electrónico: nolsa99@yahoo.com

reportan incidencias similares: Avvisati G y cols.⁷ reporta incidencia de 0.6/1,000,000 de habitantes con picos de incidencia en primavera y otoño. Preston-Martin⁸ en el análisis de diferentes estudios realizados a poblaciones hispanas en EUA, reportó incidencia de 24-38% comparado con 7-8% en no hispanos. En México la alta incidencia de LAP parece concordar con lo observado en otros países con una incidencia que va de 20-30%, con mayor incidencia en pacientes jóvenes.⁹

Patogénesis

La fusión del gen *PML* del cromosoma 15 con el gen *RAR α* del cromosoma 17, y deponiendo del sitio de ruptura del gen *PML*, da lugar a la aparición de diferentes transcritos: *bcr1*, *bcr2* y *bcr3*, los dos primeros se conocen como isoformas largas (L) en *bcr2* como variable (V) y *bcr3* como isoforma corta (S). Esta fusión, identificable con fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH) y/o reacción en cadena de polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) está presente en $\geq 95\%$ de los casos de LAP, sin embargo es importante recordar que el gen *RAR α* puede unirse a otros genes, dando origen a productos diferentes, tal es el caso de la fusión a *PLZF*, *NPM*, *NUMA* y *STAT5b*, cuya importancia radica en la diferente sensibilidad que confieren a ácido all-trans retinoico (ATRA), particularmente con el gen *PLZF* cuya expresión se caracteriza por conferir resistencia a ATRA.^{10,11}

En condiciones normales PML se localiza en el núcleo junto con otras proteínas como p53, pRb, DAXX y CBP en los conocidos "cuerpos nucleares PML" y al igual que ellos se considera una proteína supresora de tumor con actividad en el control de la estabilidad genómica, controla la inducción de apoptosis p53-dependiente, la supresión de crecimiento y la senescencia celular en respuesta a radiación ionizante y transformación oncogénica y se requiere para la represión transcripcional mediada por otros supresores de tumor como Rb y Mad. Por su parte *RAR α* es un miembro de la familia RA que actúa como un factor de transcripción ligando-inducible por unión a elementos de respuesta específica (RARE) en la región promotora de genes blanco, en su ausencia se forman heterodímeros con el receptor X del retinoide (RXR) y recluta un complejo co-represor conteniendo deacetilasa de histonas (HDAC) que induce condensación de la cromatina y represión transcripcional. Las concentraciones normales de RA (1×10^9 M) son capaces de liberar un complejo de nuclear de correpresores del *RAR*-RXR que alista coactivadores con actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) que resulta en la hiperacetilación de histonas en los sitios RARE remodelando la cromatina y la actividad transcripcional de los genes blanco de *RAR α* .

Al formarse la proteína anormal PML-*RAR α* funciona como un receptor aberrante de retinoide, alterando las propiedades de unión al DNA y como un represor de RA. Esta última situación favorece la formación de homodímeros de PML-*RAR α* con RXR y con otras proteínas quiméricas que se unen en forma híbrida a la desacetilasa de histonas (HDAC) formando un complejo correpresor con mayor afinidad, además de unirse a enzimas metiladoras Dnmt1 y Dnmt3a resultando en mutilación del promotor RA en los blastos de LAP.

Por otra parte las isoformas de PML-*RAR α* parecen tener estrecha relación con características clínicas y biológicas particulares al momento del diagnóstico. De tal forma que las isoformas S se relacionan con hiperleucocitosis, expresión de CD34 y CD2 y morfología M3v, y la respuesta a ATRA como monodroga reportó ser menor en estas isoformas, comparado con la isoforma L, esta situación parece haberse modificado con la adición de quimioterapia administrada simultáneamente, sin embargo el peor pronóstico sigue siendo para los transcritos S.¹²

Características clínicas

La LAP representa un subtipo único de leucemia por sus características clínicas y biológicas. Durante largo tiempo fue considerada "la más maligna de todas la leucemias" debido al corto periodo que transcurría entre el momento en que el paciente llegaba al hospital y el desarrollo de complicaciones fatales, lo que ahora se sabe es debido a tres características bien identificadas: la acumulación de premyelocitos en la médula ósea, la presencia de hipofibrinogenemia que es exacerbada por el uso de quimioterapia, y la presencia de una traslocación cromosómica bien identificada y sus variantes t(15;17)(q22;q11-12).¹³

En diversos estudios que incluyen a población pediátrica se han identificado algunas características comunes: la edad de presentación más frecuente es en la adolescencia, aunque se reportan casos aislados en niños entre uno y dos años sin presentar diferencias entre género; menos de la mitad de los pacientes tenía fiebre al momento del diagnóstico, en contraste con >70% de los pacientes que se presentaron con manifestaciones hemorrágicas importantes y aun graves al momento del diagnóstico; las visceromegalias no fueron un hallazgo importante. En los exámenes de laboratorio es notable que la mayoría de los pacientes tenía cuentas de leucocitos por debajo de 10,000/mm³, asociado a plaquetas menores de 40,000/mm³, pero más de 90% de ellos con manifestaciones de hemorragia y alteraciones de las pruebas de coagulación. La variedad morfológica predominante fue la hipergranular con un mínimo de <10% de la variedad hipogranular, pero todos con la t(15;17). Aunque no todos los estudios tienen el análisis de las diferentes isoformas, la predominante fue *bcr1* en más de la mitad de los pacientes y en segundo lugar *bcr3*, de llamar la atención lo referido anteriormente en relación con los transcritos, en este caso no pareciera correlacionar con carga tumoral ni con la respuesta inicial a ATRA.^{14,15}

Diagnóstico

El diagnóstico se establece mediante la identificación de más de 20% de premyelocitos en MO, cuyas características morfológicas son inconfundibles ya que clásicamente se presentan como una célula grande, hipergranular y en la que frecuentemente identificamos el apilamiento de estos gránulos dando lugar a los conocidos bastones de Auer que se distribuyen generalmente en cúmulos dentro de la misma célula: la célula astillada o de Fagot, situación muy importante porque su identificación permite iniciar el tratamiento oportuno que limita las complicaciones hemorrágicas. Hay que recordar la forma hipogranular de

premielocitos, que en ocasiones puede representar dificultad diagnóstica y retrasar el tratamiento oportuno.

La identificación de CD33, CD13 positivos con CD34, CD117 y HLA-DR heterogéneo y con frecuencia negativos y un CD11b negativo se asocian a la presencia del gen de fusión PLM/RAR α , con mucho mayor certeza la identificación del anticuerpo monoclonal PG-M3 porque éste se une directamente a la porción amino terminal de la proteína PML. Las técnicas son muy útiles porque permiten la toma de decisiones en forma temprana y el inicio de ATRA antes de que aparezcan complicaciones fatales, sin embargo no sustituyen la identificación cromosómica y/o molecular del gene.^{16,17}

Es indispensable identificar la presencia del receptor alfa del ácido retinoico que confirme la utilidad de ATRA en el tratamiento, esto puede ser por cariotipo e identificación de bandas G, FISH o RT-PCR. Aunque ninguna de estas técnicas se sustituye entre sí y deben considerarse complementarias, es importante que por cualquiera de ellas se logre establecer la presencia de PLM/RAR α .¹⁷

Tratamiento

En las décadas de los años setenta y ochenta, a partir de estudios realizados *in vitro* con derivados de las vitaminas A y D, se demostró la posibilidad de inducir diferenciación terminal *in vitro* trabajando con líneas celulares de leucemia mieloide, principalmente HL60.¹⁸ El ácido retinoico (RA) uno de los agentes de diferenciación más estudiados y potentes, es un derivado natural de la vitamina A y juega un papel fundamental en la diferenciación tisular específica. La concentración plasmática de RA es de 10⁻⁶ M aproximadamente y puede inhibir la proliferación celular e inducir la diferenciación de células normales y leucémicas *in vitro*. Se requieren concentraciones más altas para inducir diferenciación granulocítica *in vivo* o en líneas celulares de leucemia mieloide, tales como la HL60 o PLB985. El ácido all-transretinoico (ATRA) y el ácido 13-cis retinoico (13-cis RA), dos isómeros del RA, inhiben la proliferación clonal de células KG1 y ambos agentes inducen diferenciación de las células HL60 y U-937. La concentración plasmática de ATRA de origen natural es de 10⁻⁸ M y la concentración fisiológica intracelular es de 10⁻⁹ M aproximadamente. En ausencia del ligando (RA), el receptor α del RA (RAR α) se encuentra firmemente asociado con correpressores nucleares haciendo al DNA inaccesible al complejo transcripcional de la RNA polimerasa II en los promotores, lo que conduce a una represión transcripcional. En las últimas décadas, a partir del descubrimiento del mecanismo de acción del RA en la LPA se han establecido las bases moleculares para construir un modelo de terapia de diferenciación. Esta terapia, mediante el "desbloqueo" del mecanismo de la diferenciación celular, induce la diferenciación terminal de la célula leucémica convirtiéndose en la primera terapia "blanco" dirigida a revertir el mecanismo patogénico de la enfermedad.

El receptor del ácido retinoico alfa (RAR α) es un activador de la transcripción dependiente de ligando a través de su dominio dedo de Zinc (Zn), se fija como un heterodímero con RXR a una secuencia consenso de DNA bien definida que se halla en los promotores de los genes que responden al AR

(RARE). Los retinoides ejercen su acción a través de dos clases de receptores nucleares, los receptores del ácido retinoico (RAR) y los receptores de retinoides X (RXR). El ejemplo de la acetilación de histonas anormal mejor estudiado es el asociado con la LPA, en el cual la proteína PML/RAR α es capaz de ligar y reprimir constitutivamente a los promotores de genes diana del RA. Esta inhibición se produce como consecuencia de una mayor afinidad por parte de PML/RAR α , es un complejo inhibidor que incluye diversas subunidades como N-CoR (Nuclear Receptor Corepressor), SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors), Sin3A e histonas desacetilasas.¹⁹ También es probable que la elevada expresión de la proteína de fusión PML/RAR α pueda secuestrar funcionalmente a cofactores del RAR α o fijarse a genes críticos en lugar del RAR α . En presencia de dosis farmacológicas de ATRA, la proteína de fusión PML/RAR α libera los correpressores y estimula la transcripción de genes diana, que permiten la regulación del desarrollo normal mieloide. Por otra parte, la proteína de fusión es degradada y se incrementa la expresión del RAR α silvestre lo que restablece las vías de señalización de los retinoides y pone fin al secuestro de los cofactores del RAR α .^{20,21}

La introducción de ATRA en 1987 como agente de diferenciación²² y compuestos de arsénico en 1992 como inductores de diferenciación y apoptosis,²³ produjo no sólo tasas de remisión completa más altas debido a una disminución rápida de las hemorragias que ponen en peligro la vida del paciente, sino también mayor duración de la remisión completa continua cuando se combinaba con quimioterapia. De hecho uno de los primeros signos de respuesta al ATRA en LPA, es la disminución en las manifestaciones hemorrágicas y la corrección de los parámetros de laboratorio durante el monitoreo seriado. La dosis total diaria de ATRA es generalmente 45 mg/m² dividido en tres dosis iguales. El tiempo requerido para inducir la remisión completa es de 30-40 días, aunque tasas similares de remisión (80-92 %) se han obtenido con dosis más bajas del medicamento, 20-25 mg/m² y no se observó diferencia estadísticamente significativa en los días requeridos para alcanzar la remisión completa, cuando se comparó el grupo de dosis bajas vs dosis convencional (34.4 \pm 10.6 días vs 37.4 \pm 12.1 días respectivamente).^{24,25} Como han demostrado diversos estudios multicentro, entre los que destacan los del grupo francoeuropeo, español e italiano, los mejores resultados se obtienen con la administración simultánea de ATRA y quimioterapia desde el momento del diagnóstico, seguidas de mantenimiento con metotrexate y 6-mercaptopurina y la administración intermitente de ATRA, con lo que se logran tasas de supervivencia a largo plazo (y probablemente curación) en \geq 70% de los enfermos.²⁶⁻³⁰

Estudios *in vitro* demostraron que el trióxido de arsénico (AS₂O₃) es efectivo contra la línea celular NB4 de LPA y células frescas de LPA, porque induce no sólo diferenciación sino también apoptosis, como puede constatarse por la disminución en la viabilidad de las células, incremento en la fracción G1 del ciclo celular en el análisis del contenido de DNA por citometría de flujo y el incremento en la expresión de anexina V en la superficie de la membrana. Estudios *in vivo* han demostrado que este agente es capaz de inducir diferenciación parcial y apoptosis en LPA, particularmente en pacientes en recaída refractaria al ATRA.³¹ Algunos de los temas contro-

versiales que se encuentran actualmente en investigación, destacan la intensidad y el tipo de consolidación, el papel del Ara-C y la necesidad o no de utilizar antracíclicos en el tratamiento de inducción/consolidación, así como el uso de nuevos derivados del RA (ATRA liposomal, ácido 9-cis retinoico (9-cis RA) y derivados sintéticos).^{15,32} En algunos estudios recientes, se han utilizado el 9-cis RA y el derivado sintético Am80 para el tratamiento de las recaídas informándose cierta eficacia. La tricostatina A (TSA) y los derivados del ácido butírico actúan inhibiendo las histonas desacetilasas (HDAC), cuya eficacia ha sido probada en el tratamiento de la LPA y posiblemente representan una herramienta farmacológica prometedora en el tratamiento de otras LAM.

Referencias

1. **Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Fladrin G, Galton DA, et al.** Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leucemia. A report of the french-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-625.
2. **Buchner T, Urbanitz D, Hiddemann W, Ruhl H Ludwig WD, et al.** Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leucemia (AML): Two multicenter studies of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1985;3:1583.
3. **Schifer CA, Lee EJ, Tomiyasu T Wiernik PH, Testa JR.** Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in patients with de novo nonlymphocytic leucemia. *Blood* 1989;73:263.
4. **Mayer RJ, Davis DR, Schifer CA, Berg DT, Powel BL, Schulman P, Omura GA, et al.** For the cancer and leukemia group B: Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994;331:896-901.
5. **Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, et al.** The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;40:203-206.
6. **Douer D, Preston-Martin S, Chang E, Nichols PW, et al.** High Frequency of acute promyelocytic leukemia among latinos with acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:308-313.
7. **Avvisati G, Mele A, Stazi MA, Vegna ML, et al.** Epidemiology of acute promyelocytic leucemia in Italy. *Ann Oncol* 1991;2:405-408.
8. **Preston-Martin S, Douer D, Pagoda JM.** The descriptive epidemiology of acute promyelocytic leucemia (APL) in US and its ethnic diversity. *Gac Med Mex* 2002;138(Sup 1);S-84-85.
9. **Ruiz AG.** Promyelocytic leucemia in mexican mestizos. *Blood* 1997;89:348-349.
10. **Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D.** The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood rev* 2003;17:71-97.
11. **Sirulnik A, Melnick A, Zelent A, Licht JD.** Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia and APL variants. *Best Pract Res Clin Hematol* 2003;16:387-408.
12. **Lo Coco F, Ammatuna E.** The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *American Society of Hematology. Hematology* 2006:156-161.
13. **Zhou GBZhang J, Wang ZI, Chen SJ, Chen Z.** Treatment of acute promyelocytic leukaemia with all-trans retinoic acid and arsenic trioxide: a paradigm of synergistic molecular targeting therapy. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2007;362:959-971.
14. **Test AM, Al-Hadad SA, Al-Jadiry MFF, Moledt ML, Mandelli F, Foà.** Impact of international collaboration on the prognosis of childhood acute promyelocytic leukemia in Iraq. *Hematologica* 2006;91:509-512.
15. **Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, et al.** GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children *Blood* 2005;106:447-453
16. **Falini B, Flegli L, Fagioli M, Lo Coco F, et al.** Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal antibody PG-M3 (Anti-PML). *Blood* 1997;90:4046-4053.
17. **Sanz MA, Tallman MS, Lo Coco F.** Practice Points, Consensus, and Controversial Issues in the Management of Patients with Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia. *The Oncologist* 2005;10:806-814.
18. **Breitman TR, Selonick SE, Collins SS.** Induction of differentiation of Human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2936-2940.
19. **Redner RL, Wang J, Liu J.** Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. *Blood* 1999;94:417-428.
20. **Melnick A, Licht JD.** Deconstructing a disease: RAR α . Its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;93:3167-3215.
21. **Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, et al.** Acute promyelocytic leukemia: From genetics to treatment. *Blood* 1994;83:10-25.
22. **Huang ME, Ye YC, Wang ZY.** Treatment of 4 APL patients with all-trans retinoic acid. *Chin J Intern Med* 1987;26:330-332.
23. **Wang ZY, Chen Z.** Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukemia. *Lancet Oncol* 2000;1:101-106.
24. **Castaigne S, Lefebvre P, Chommiene C, et al.** Effectiveness and pharmacokinetics of low dose all-trans retinoic acid (25 mg/m²), in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1993;82:3560-3563.
25. **Chen GQ, Shen ZX, Wu F et al.** Pharmacokinetics and efficacy of low dose all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1996;10:825-828.
26. **Fenaux P, Chastang C, Degos L.** Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) by a combination of all-trans retinoic acid (ATRA) and chemotherapy. *Leukemia* 1994;8:S42-S47.
27. **Biondi A, Rovelli A, Cantù Rajnoldi A, et al.** Acute promyelocytic leukemia in children: experience of the Italian Pediatric Hematology and Oncology Group (AIEOP). *Leukemia* 1994;8:S66-S70.
28. **Willemze R, Suci S, Mandelli F, et al.** Treatment of patients with acute promyelocytic leukemia. The EORTC-LCG experience. *Leukemia* 1994;8:S48-S55.
29. **Head DR, Kopecky KJ, Willman C, Appelbaum FR.** Treatment outcome with chemotherapy in acute promyelocytic leukemia: The Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Leukemia* 1994;8:S38-S41.
30. **Avvisati G, Lo Coco F, Diverio D, et al.** AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: A Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. *Blood* 1996;88:1390-1398.
31. **Fox E, Razzouk BI, Widemann BC, Xiao S, et al.** Phase 1 trial and pharmacokinetic study of arsenic trioxide in children and adolescents with refractory or relapsed acute leukemia, including acute promyelocytic leukemia or lymphoma. *Blood* 2009;111:566-573.
32. **Botton S, Coiteux V, Chevet S, Rayon C, et al.** Outcome of Childhood Acute Promyelocytic Leukemia With All-Trans-Retinoic Acid and Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:1404-1412.