



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Análisis del valor pronóstico del perfil  
de expresión génica en la leucemia mieloblástica aguda  
de riesgo citogenético intermedio según la opción  
terapéutica post-remisión**

Montserrat Torredadell Burriel



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

ANÁLISIS DEL VALOR PRONÓSTICO DEL PERFIL DE  
EXPRESIÓN GÉNICA EN LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA  
AGUDA DE RIESGO CITOGENÉTICO INTERMEDIO SEGÚN  
LA OPCIÓN TERAPÉUTICA POST-REMISIÓN

Montserrat Torreadell Burriel



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**ANÁLISIS DEL VALOR PRONÓSTICO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA  
LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA DE RIESGO CITOGÉNICO INTERMEDIO SEGÚN  
LA OPCIÓN TERAPÉUTICA POST-REMISIÓN**

Tesis presentada por:

Montserrat Torredadell Burriel

Para aspirar al grado de Doctor en Medicina

Tesis dirigida por:

Dr. Jordi Esteve Reyner y Dra. Mireia Camós Guijosa

Facultad de Medicina  
Universitat de Barcelona  
Barcelona 2018



## DEDICATORIA

Als meus pares

Al Rafa i en Pau



ÍNDICE

ÍNDICE

## ÍNDICE

## Índice

Agradecimientos.....	9
Abreviaturas y acrónimos.....	15
Glosario de genes.....	21
I. Introducción.....	27
1- Leucemia mieloide aguda (LMA).....	29
1.1 Hematopoyesis fisiológica.....	29
1.2 Definición.....	30
1.3 Epidemiología.....	31
1.4 Diagnóstico clínico y de laboratorio.....	31
1.5 Clasificación.....	34
1.6 Mecanismos de leucemogénesis.....	37
1.6.1 Hematopoyesis clonal.....	43
1.6.2 Evolución clonal.....	44
1.6.3 Reordenamientos cromosómicos en LMA .....	46
1.6.4 Mutaciones en LMA .....	52
1.7 Pronóstico.....	58
1.8 Expresión génica.....	72
1.9 Tratamiento.....	76
II. Hipótesis y objetivos del estudio.....	89
III. Métodos.....	95
IV. Resultados.....	105
V. Discusión.....	123
VI. Conclusiones.....	133
VII. Bibliografía.....	137
VIII. Anexos.....	155
1- Artículo publicado con los resultados del trabajo de tesis.....	157
2- Material suplementario del artículo.....	169
3- Trabajos relacionados con la tesis.....	174

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

En primer lloc voldria donar les gràcies als meus directors de tesi, al Dr. Jordi Esteve i a la Dra. Mireia Camós, perquè sense ells no hagués arribat fins aquí.

Jordi, gràcies per acompanyar-me i ajudar-me tant durant tot aquest camí. Vaig tenir la sort de tenir-te com a tutor del “dispe” i que m’acollissis dins el grup mieloide, on a més d’aprendre moltíssim i començar aquest treball, vaig trobar grans persones. Gràcies per la teva paciència, per les mil trobades per aquesta tesi, però sobre tot gràcies per la teva amistat.

Mireia, la teva ajuda ha estat essencial perquè aquesta tesi fos possible. Gràcies pels teus consells, sempre encertats i per tot el temps dedicat. A més sóc molt afortunada de tenir-te també com amiga i companya, per la teva intel·ligència, pel teu sentit de l’humor, pel teu compromís amb tot el que fas i amb els altres, ets una persona fantàstica!. Moltes gràcies per tot!

Aquesta tesi tampoc hagués estat possible sense les meves companyes del grup mieloide, la Dra. Marta Pratcorona i la Dra. Marina Díaz-Beyá , i el Dr. Alfons Navarro. Gràcies Marta, per la teva ajuda sempre que l’he necessitat i per tots els moments compartits, i els que vindran!. Marina, tu has tenido mucho que ver con esta tesis, muchas gracias por estar siempre dispuesta a echarme una mano y por ese buen hacer tuyo en todos los sentidos. Gràcies Alfons per la teva ajuda i fer-ho tot tan fàcil.

La meva trajectòria professional ha tingut dues cases en les que he trobat a molts companys i amics que també tenen tot el meu agraïment.

A l’Hospital Clínic:

A la meva estimada Unitat d’Hematopatologia, gràcies al Dr. Josep Lluís Aguilar, Dra. María Rozman, Dra. Neus Villamor, Dra. Marta Aymerich i Dra. Dolors Colomer per descobrir-me el món del diagnòstic, que encara m’entusiasma, i pel vostre tracte sempre afectuós.

Gràcies també a Sílvia Fuentes i a tot l’equip d’infermeria de l’escola per ensenyar-me a treballar en un laboratori, per la seva amabilitat i fer-me sentir com a casa.

A la Dra. Anna Carrió i a la Dra. Dolors Costa per la seva disponibilitat i amabilitat.

Gràcies a tots els adjunts del Servei d’Hematologia, ha estat un luxe aprendre amb tots ells per la seva excel·lència professional i personal. Gracias al Dr. Francisco Cervantes y

## AGRADECIMIENTOS

al Dr. Armando López-Guillermo, recuerdo con gran cariño mi rotación por el Hospital de Día. Gràcies al Dr. Francesc Bosch, al Dr. Joan Bladé, al Dr. Benet Nomededeu, al Dr. Enric Carreras, a la Dra. Montse Rovira, a la Dra. Carmen Martínez, al Dr. Álvaro Urbano i al Dr. Francesc Fernández, per la vostra capacitat docent i ser sempre tan accessibles. I no em puc oblidar de les meves primeres adjuntes Anna Ferrer i Sílvia Montoto, gràcies per la vostra generositat i paciència.

També tinc un gran record de la residència gràcies a les meves co-residents, Anna, Carla i Leo, sou unes companyes excel·lents, i gràcies també als meus resis grans i petits, Carme, Eva, Laura, Maite, Ana, Miquel, Santi, Josep Maria, Abel, Olga, Gonzalo i Laia. No vull descuidar-me tampoc del Pedro, Rosita, Maria José, Anabel, M<sup>a</sup> del Mar.. que fan una feina excel·lent i que tan em van ajudar.

A l'Hospital Sant Joan de Déu:

Al Dr. Jesús Estella i a la Dra. Teresa Toll, gràcies per incloure'm en el vostre equip, sou uns grans mestres.

A la Susana Rives, de la que aprenc cada dia en l'àmbit professional i personal. Gràcies Susana!

A l'Albert Català, company de tesi i mieloide, gràcies per compartir aquest camí i ajudar-me sempre fins i tot a molts kilòmetres de distància.

A Rubén Berrueco, admiro el entusiasmo que pone en todo lo que hace. Gracias por tus ánimos y tu amistad.

A l'Anna Ruiz, gràcies per tantes coses!, sobre tot per fer-me sentir com a casa quan vaig arribar.

A la Susanna Gassiot, tinc molta sort de tenir-te de companya, gràcies per la teva implicació des del primer minut i pel bon humor que sempre t'acompanya.

Gràcies Camino, Seli, Rosa, i Justo per ensenyar-me com treballa un veritable equip, i per transmetre tota la vostra saviesa a les "noves generacions": Emili, Lídia, Yasmina i Cèlia, que també fan una feina excel·lent.

Gràcies Nerea, la meva altra companya de tesis, pel teu suport i per l'alegria que sempre comuniqués.

A Sandra i Elena, que han portat llum al lab i moltes ganes de treballar.

## AGRADECIMIENTOS

Gràcies a les companyes de transplantament: Dra. Isabel Badell, Dra. Júlia Marsal, Dra. Izascun Elorza, sou un gran equip.

Gràcies a tots els companys i màsters amb els que he compartit aquesta etapa pels vostres ànims: Lourdes Calvente, Roberta Malatesta, Montse Mesegue, Anna Alonso, Maria Trabazo, Maria Solsona, Isabela Oltean, Georgina Moron, Nacho Isola, Ignacio Muñoz-Seca y Nuria Conde.

A la meva família i amics:

Moltes gràcies als meus pares, que m'han ensenyat les coses més importants, per mi sou un exemple a seguir. Gràcies per sempre estar presents i pendents, us estimo molt.

A les meves germanes, Maria i Ari, he tingut molta sort de tenir-vos al costat, sou genials e imprescindibles per mi.

Als meus nebots i nebodes, que són l'alegria de les nostres famílies.

Al Rafa i a la Espen, per tot els anys compartits. Als meus cunyats Espe, Míriam, Jordi i Javichu pels seus ànims i suport.

A l'Abraham, per ser tan bon amic i el millor padrí de nocces!. Gràcies per estar sempre que t'hem necessitat.

A la Txell i al Jaume i família, per la seva amistat, sou molt importants per mi.

Al Rafa, no hi ha prou espai en aquesta tesi per agrair-te tot el que fas per mi. Gràcies pel teu recolzament, per la teva comprensió, per ajudar-me incondicionalment i per les nostres xerrades interminables. Gràcies per fer-me tan feliç!

Gràcies Pau per la teva paciència durant aquest temps en que la mama ha estat molt a l'ordinador. Moltes gràcies per la teva tendresa i per l'alegria que sempre transmetes. Em dones força i pau.

## AGRADECIMIENTOS



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AMSLG: German-Austrian AML Study Group

AloTPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo

ARSA-T: anemia refractaria con sideroblastos en anillo con trombocitosis

ATRA: *all-trans-retinoic acid*

AutoTPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

CBF: *core-binding factor*

CETLAM: Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias agudas y síndromes Mielodisplásicos

CHIP: *Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential*

CID: coagulopatía intravascular diseminada

CLP: *common lymphoid progenitor*, progenitor linfoide común

CMP: *common myeloid progenitor*, progenitor mieloide común

CN: cariotipo normal

qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

ELN: *European Leukemia Net*

ERM: enfermedad residual mínima

FAB: grupo francés-americano-británico

FC: factor de transcripción

FDA: *Food and Drug Agency*, agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FLT3-ITD: *fms-related tyrosine kinase 3- Internal tandem duplication*

GMP: *granulocyte-monocyte progenitors*, progenitores granulocíticos/monocíticos

GO: gemtuzumab ozogamicina

HDAC: histona deacetil-transferasas

HiDAC: *high-dose Ara-C*, dosis altas de ARA-C

HR: *hazard ratio*

HSC: *Hematopoietic stem cell*, célula madre hematopoyética

Ida: idarrubicina

LGA: *leukemia gene-atlas*

LLA: leucemia linfoblástica aguda

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

LMA: leucemia mieloide aguda

LMA-CN: leucemia mieloide aguda con cariotipo normal

LMA-RI: leucemia mieloide aguda de riesgo citogenético intermedio

LMC: leucemia mieloide crónica

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

lnc-RNA: *long non-coding RNA*

LPA: leucemia promielocítica aguda

LSC: *leukemic stem cells*

MEP: *megakaryocyte-erythroid progenitors*, progenitores eritroides/megacariocíticos

MILE: *microarray Innovations in Leukemia*

MPO: Mieloperoxidasa

miR: microRNA maduro

MLL-PTD: *MLL partial tandem duplication*

MPP: *multipotential progenitor*, progenitor multipotencial

MRC: *Medical Research Council (Grupo cooperativo del Reino Unido)*

NA: no aplica

NCRI: *National Cancer Research Institute*

ncRNAs: RNAs no codificantes

NGS: *next-generation sequencing*

NS: Negro Sudán

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: *polymerase chain reaction*

PEG: perfil de expresión génica

RC: remisión completa

RCi: remisión con recuperación hematológica incompleta

RC1: primera remisión completa

SG: supervivencia global

SLE: supervivencia libre de evento

SLR: supervivencia libre de recaída

SNC: sistema nervioso central

SMD: síndrome mielodisplásico

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

SWOG/ECOG: Southwest Oncology Group /Eastern Cooperative Oncology Group

TCGA: *The Cancer Genome Atlas Project*

TKIs: inhibidores de tirosin quinasas

2-HG: 2-hidroxiglutarato

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS





GLOSARIO DE GENES

<i>Símbolo#</i>	<i>Nombre</i>	<i>Localización</i>	<i>Otros símbolos</i>
<i>ABL1</i>	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	9q34.12	<i>ABL, JTK7, C-ABL, p150, v-abl</i>
<i>ABCG2</i>	ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)	4q22.1	
<i>AFDN</i>	afadin, adherens junction formation factor	6q27	<i>MLLT4</i>
<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1	14q32.33	<i>AKT</i>
<i>ALDH2</i>	aldehyde dehydrogenase 2 family member	12q24.12	
<i>ASXL1</i>	additional sex combs like 1, transcriptional regulator	20q11.21	
<i>ASXL2</i>	additional sex combs like 2, transcriptional regulator	2p23.3	
<i>BAALC</i>	BAALC, MAP3K1 and KLF4 binding	8q22.3	
<i>BAG5</i>	BCL2 associated athanogene 5	14q32.33	
<i>BAX</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator	19q13.33	
<i>BCR</i>	BCR, RhoGEF and GTPase activating protein	22q11.23	
<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor	Xp11.4	
<i>BIRC3</i>	baculoviral IAP repeat containing 3	11q22.2	
<i>CBFB</i>	core-binding factor beta subunit	16q22.1	
<i>CBL</i>	CBL proto-oncogene	11q23.3	
<i>CEBPA</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	19q13.11	
<i>CREBBP</i>	CREB-binding protein	16p13.3	
<i>CSF3R</i>	colony stimulating factor 3 receptor	1p34.3	
<i>DEK</i>	DEK proto-oncogene	6q22.36p22.3	
<i>DOT1L</i>	<i>DOT1-like histone H3K79 methyltransferase</i>	19p13.3	
<i>DNMT3A</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	2q23.3	
<i>ELL</i>	elongation factor for RNA polymerase II	19p13.11	
<i>ENG</i>	Endoglin	9q34.11	
<i>ERG</i>	ERG, ETS transcription factor	21q22.2	
<i>EZH2</i>	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	7q36.1	
<i>ETV6</i>	ETS variant 6	12p13.2	<i>TEL</i>
<i>FIP1L1</i>	factor interacting with PAPOLA and CPSF1	4q12	
<i>FLT3</i>	fms-related tyrosine kinase 3	13q12.2	
<i>GATA2</i>	GATA binding protein	3q21.3	
<i>PTGRD2</i>	prostaglandin D2 receptor2	11q12.2	<i>GPR44</i>
<i>HOX</i>	homeobox		

GLOSARIO DE GENES

<i>IDH1</i>	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), cytosolic	2q34	
<i>IDH2</i>	isocitrate dehydrogenase 2(NADP+), mitochondrial	15q26.1	
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene tyrosine kinase	4q12	
<i>KMT2A</i>	lysine methyltransferase 2A	11q23.3	<i>MLL, ALL-1, TRX1</i>
<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogen, GTPase	12p12.1	
<i>MECOM</i>	MDS1 and EVI1 complex locus	3q26.2	
<i>MEIS</i>	meis homeobox 1		
<i>MKL1</i>	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1	22q13.1-q32.2	
<i>MLF1</i>	myeloid leukemia factor 1	3q25.32	
<i>MLLT1</i>	MLLT1, super elongation complex subunit	19p13.3	
<i>MLLT3</i>	MLLT3, super elongation complex subunit	9q21.3	
<i>MLLT10</i>	MLLT10, histone methyltransferase DOT1L cofactor	10p12.31	
<i>MN1</i>	MN2 proto-oncogene, transcriptional factor	22q12.1	
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	8q24.21	<i>c-MYC</i>
<i>MYH11</i>	<i>myosin heavy chain 11</i>	16p13.11	
<i>NF1</i>	neurofibromin 1	17q11.2	
<i>NRAS</i>	NRAS proto-oncogene, GTPase	1p13.2	
<i>NSD1</i>	Nuclear receptor binding SET domain protein 1	5q35.3	
<i>NUP98</i>	nucleoporin 98	11p15.4	
<i>NUP214</i>	nucleoporin 214	9q34.13	
<i>NPM1</i>	nucleophosmin 1	5q35.1	
<i>PDGFRA</i>	platelet derived growth factor receptor alpha	4q12	
<i>PICALM</i>	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	11q14.2	<i>CALM</i>
<i>PI3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	3q26.32	<i>PI3K</i>
<i>PLSCR1</i>	phospholipid scramblase 1	3q24	
<i>PML</i>	promyelocytic leukemia	15q24.1	
<i>PRAM1</i>	PML-RARA regulated adaptor molecule 1	19p13.2	
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog	10q23.31	
<i>PTPN11</i>	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	12q24.13	
<i>RAB27B</i>	RAB27B, member RAS oncogene family	18q21.2	
<i>RAD21</i>	RAD21 cohesin complex component	8q24.11	
<i>RARA</i>	retinoic acid receptor alpha	17q21.2	
<i>RBM15</i>	RNA binding motif protein 15	1p13.3	

GLOSARIO DE GENES

<i>RUNX1</i>	runt-related transcription factor 1	8q21.3	<i>AML1, CBF A2</i>
<i>RUNX1T1</i>	RUNX1 translocation partner 1	21q22.12	<i>ETO</i>
<i>SF3B1</i>	splicing factor 3b subunit 1	2q33.1	
<i>SMC1A</i>	structural maintenance of chromosomes 1A	Xp11.22	
<i>SMC3</i>	structural maintenance of chromosomes 3	10q25.2	
<i>SPARC</i>	secreted protein, acidic, cysteine-rich	5q33.1	
<i>SRSF2</i>	serine/arginine-rich splicing factor 2	17q25.2	
<i>STAG1</i>	stromal antigen 1	3q22.3	
<i>STAG2</i>	stromal antigen 2	Xq25	
<i>TET1</i>	tet methylcytosine dioxygenase 1	10q21.3	
<i>TET2</i>	tet methylcytosine dioxygenase 2	4q24	
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	17p13.1	<i>p53</i>
<i>TP53INP1</i>	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	8q22.1	
<i>U2AF1</i>	U2 small nuclear RNA auxiliary factor	21q22.3	
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1	11p13	
<i>ZFR</i>	Zinc finger RNA binding protein	5p13.3	
<i>ZRSR2</i>	zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2	Xp22.2	

#Según nomenclatura HUGO (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>)





## I. INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Leucemia mieloide aguda

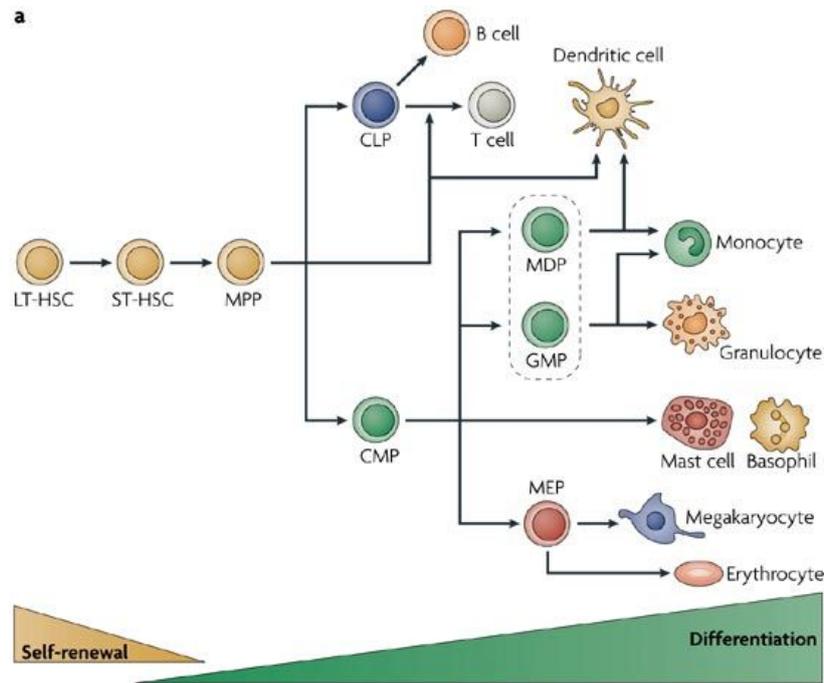
#### 1.1 Hematopoyesis fisiológica

La hematopoyesis se produce en diferentes órganos y/o tejidos a lo largo de los primeros meses de vida embrionaria. Se inicia en el saco vitelino y de forma progresiva se va desplazando principalmente al hígado y marginalmente al bazo durante el segundo trimestre. Durante la fase fetal tardía las células madre hematopoyéticas migran a la médula ósea que será el principal órgano responsable de la hematopoyesis durante toda la vida del individuo.

Todas las células hematopoyéticas se originan a partir de una célula madre pluripotencial (Figura 1) que tiene capacidad de auto-renovación y diferenciación a todas las líneas maduras sanguíneas. La hematopoyesis normal es un proceso dinámico, controlado por factores de crecimiento que estimulan la señalización y proliferación celular, así como por factores de transcripción que permiten la diferenciación en un sentido de línea y la formación de células totalmente diferenciadas y por tanto funcionales<sup>1,2</sup>. La leucemia se produce cuando se pierde este equilibrio entre proliferación y diferenciación.

Figura 1. Hematopoyesis fisiológica<sup>2</sup>. HSC: célula madre hematopoyética; MPP: progenitor multipotencial; CLP: progenitor linfoide común; CMP: progenitor mieloide común; MEP: progenitores eritroides/megacariocíticos; GMP: progenitores granulocíticos/monocíticos.

## I. INTRODUCCIÓN



### 1.2 Definición

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad en la que se produce una expansión clonal de células neoplásicas de estirpe mieloide denominadas blastos, cuyo origen radica en la transformación maligna de progenitores hematopoyéticos<sup>3</sup>. Se ha demostrado que la LMA está organizada de manera jerárquica y que se origina de una célula progenitora primitiva<sup>4,5</sup>. Como consecuencia de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas<sup>6,7</sup>, las células hematopoyéticas pierden la capacidad de diferenciarse normalmente y de responder de manera normal a los reguladores de la proliferación celular<sup>2</sup>. Por lo tanto se produce una expansión clonal de blastos mieloides en la médula ósea, sangre periférica u otros tejidos de blastos mieloides, dando lugar a una insuficiencia medular<sup>8</sup>.

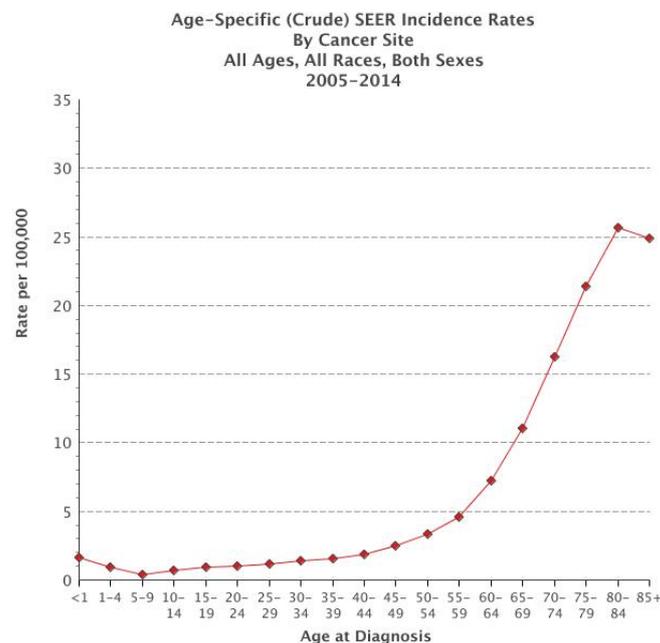
## I. INTRODUCCIÓN

### 1.3 Epidemiología

La leucemia es el octavo cáncer más frecuente en el hombre y en la mujer y es la sexta causa de muerte por cáncer en el hombre y la séptima en la mujer<sup>9</sup>.

La LMA presenta una incidencia global de 4,1 casos por 100000 habitantes año, aunque la incidencia aumenta con la edad (Figura 2), con una mediana de edad al diagnóstico superior a los 65 años (<http://seer.cancer.gov/statfacts/>).

Figura 2. Incidencia de la LMA según la edad de los pacientes (<http://seer.cancer.gov/statfacts/>).



### 1.4 Diagnóstico clínico y de laboratorio

#### 1.4.1 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la LMA se basa en la identificación de blastos en sangre periférica, médula ósea u otro tejido. Los mieloblastos se definen teniendo en cuenta varias características morfológicas, como un alto ratio núcleo/citoplasma, nucléolos visibles, y normalmente, pero no invariablemente, cromatina nuclear fina. La forma del núcleo es variable, las características citoplasmáticas incluyen un grado de basofilia variable y la presencia o no de gránulos o bastones de Auer<sup>10</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

Para el diagnóstico se requiere un 20% de blastos o más en médula ósea o sangre periférica, excepto en los casos de LMA con translocación t(8;21), inversión inv(16), t(16;16) o t(15;17), en los que se diagnostica la LMA con un recuento menor de blastos<sup>11,12</sup>.

El diagnóstico de sarcoma mieloide o granulocítico se caracteriza por la presencia de blastos en otros tejidos; es sinónimo de LMA y para su diagnóstico no se tiene en cuenta el número de blastos en médula ósea y en sangre periférica.

### 1.4.2 Diagnóstico clínico

Los síntomas y signos clínicos que presentan los pacientes con LMA se deben generalmente a la insuficiencia medular, secundaria en parte a la infiltración de la médula ósea por los blastos y también a un bloqueo de la diferenciación mieloide; por otro lado, otros síntomas pueden explicarse por la invasión de órganos extramedulares, por la existencia de coagulopatía, de leucostasis o bien por trastornos metabólicos relacionados con la proliferación.

#### 1.4.2.1 Insuficiencia medular

El bloqueo en el proceso de diferenciación mieloide normal y la infiltración de la médula ósea por los blastos leucémicos provoca una insuficiencia medular que se traduce en mayor o en menor grado en citopenias de las diferentes líneas hematopoyéticas. Como consecuencia, las infecciones secundarias a la neutropenia y las hemorragias por la trombocitopenia y/o alteraciones de la coagulación constituyen algunas de las complicaciones clínicas más relevantes en el diagnóstico en los pacientes con LMA.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.4.2.2 Afectación extramedular

Las leucemias con diferenciación monocítica son las que con mayor frecuencia presentan manifestaciones clínicas extramedulares. Aunque cualquier territorio puede verse afectado por la leucemia, existen algunos órganos como la piel, el sistema nervioso central (SNC) o las mucosas que son infiltrados más frecuentemente. Aquellas tumoraciones formadas por células leucémicas que aparecen en tejidos extramedulares se denominan cloromas o sarcomas granulocíticos, y en ocasiones son la primera manifestación de la LMA.

### 1.4.2.3 Coagulopatía

Las hemorragias en los pacientes con LMA pueden ser desencadenadas o agravadas por la quimioterapia y son secundarias en parte a la presencia de una coagulopatía intravascular diseminada (CID) o una fibrinólisis anormal como ocurre típicamente en la leucemia promielocítica aguda (LPA) y en algunos casos de LMA monocítica. En la LPA la causa de la coagulopatía es compleja debido a la combinación de las citocinas liberadas por los blastos, una hiperfibrinólisis y una CID<sup>13</sup>. La hiperfibrinólisis de la LPA se explicaría fundamentalmente por una sobreexpresión de anexina II en los promielocitos leucémicos, lo que daría lugar un exceso en la formación de plasmina y un consiguiente aumento de la fibrinólisis<sup>14,15</sup>.

### 1.4.2.4 Leucostasis

La leucostasis es una complicación infrecuente pero grave, que suele presentarse en pacientes con una elevada cifra de leucocitos. Consiste en el acúmulo de blastos leucémicos que ocupan la luz vascular en la microcirculación, con o sin presencia de fibrina. El mecanismo patogénico de la leucostasis es probablemente complejo, y en él interviene un daño directo de la célula endotelial, probablemente mediado por citocinas

## I. INTRODUCCIÓN

liberadas durante la interacción entre blastos leucémicos y el endotelio vascular<sup>16</sup>. Tras la lesión endotelial se produciría una migración de los blastos al espacio perivascular. Parece por tanto que la capacidad de los blastos de responder a unas citocinas quimiotácticas y la expresión de determinadas moléculas de adhesión, como CD54 o CD56 son probablemente más importantes en la patogenia de la leucostasis que el número de blastos circulante<sup>17,18</sup>. Las principales manifestaciones clínicas de la leucostasis se dan a nivel del SNC y van desde la cefalea al coma; las manifestaciones respiratorias incluyen el distrés respiratorio o la hipoxemia.

### 1.4.2.5 Trastornos metabólicos

Las alteraciones metabólicas son frecuentes en el contexto de la LMA, ya sea al diagnóstico o durante el tratamiento y son secundarias a la propia leucemia y a la toxicidad de los tratamientos empleados.

Así, el síndrome de lisis tumoral se debe a la liberación masiva de metabolitos intracelulares al espacio intravascular como consecuencia del rápido recambio celular y la apoptosis espontánea o inducida por el tratamiento quimioterápico. Esto ocurre sobre todo en leucemias con hiperleucocitosis y/o grandes visceromegalias o masas abdominales. Analíticamente se observa hiperuricemia, hiperpotasemia, hiperfosfatemia, hipocalcemia e insuficiencia renal y las manifestaciones clínicas derivadas son los síntomas neuromusculares y arritmias.

### 1.5 Clasificación:

La primera clasificación de la LMA fue propuesta por el grupo francés-americano-británico (FAB) en el año 1976. Es un sistema de clasificación que se basó inicialmente en criterios morfológicos y citoquímicos, y posteriormente se incorporaron criterios

## I. INTRODUCCIÓN

inmunológicos. Esta clasificación divide las LMA en 9 subtipos de M0 a M7 y busca identificar el equivalente leucémico de las células mieloides para cada estadio de diferenciación<sup>19-21</sup>.

Tabla 1. Clasificación FAB de las LMA<sup>19</sup>.

Subtipo FAB	Denominación	% de casos	Comportamiento citoquímico	
			MPO/NS	Esterasas inespecíficas
<b>M0*</b>	LMA con diferenciación mínima	<5	-	-**
<b>M1</b>	LMA sin maduración	15-20	+	-
<b>M2</b>	LMA con maduración	15-25	+	-
<b>M3</b>	Leucemia aguda promielocítica	5-10	+	-
<b>M4</b>	Leucemia aguda mielomonocítica	20	+	-
<b>M4 Eo</b>	Leucemia aguda mielomonocítica con eosinofilia	5-10	+	+
<b>M5</b>	Leucemia monocítica	10-20	-	+
<b>M6</b>	Eritroleucemia	3-5	+	-
<b>M7*</b>	Leucemia aguda megacarioblástica	<5	-	+***

MPO: Mieloperoxidasa. NS: Negro Sudán.

\*Subtipos definidos posteriormente incorporando criterios inmunológicos.

\*\*Las células son positivas para algún antígeno mielóide por inmunofenotipo.

\*\*\*Las células son positivas para alfa-naftil-acetato-esterasa y para el factor VIII o la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa y negativas para la naftil-butirato-esterasa

### Clasificación de la OMS

La clasificación de la OMS es la más reciente y es una clasificación de consenso que integra toda la información que nos aporta la morfología, inmunofenotipo, genética y las características clínicas y moleculares para definir entidades clínicamente significativas. Recientemente se ha realizado una actualización de esta clasificación, ver Tabla 2<sup>22,23</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Clasificación OMS de la LMA 2016<sup>23</sup>.

<b>LMA con anomalías genéticas recurrentes</b>
<p>LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>  LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>  Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>  LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>*  LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>  LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i>  LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>  LMA con mutación de <i>NMP1</i>§  LMA con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i>§  LMA con <i>BCR-ABL1</i>**  LMA con <i>RUNX1</i> mutado**</p>
<b>LMA no clasificable por los criterios anteriores</b>
<p>LMA mínimamente diferenciada  LMA sin maduración  LMA con maduración  Leucemia mielomonocítica aguda  Leucemia aguda monoblástica y monocítica  Leucemia pura eritroide  Leucemia aguda megacarioblástica  Leucemia aguda de basófilos  Panmielosis aguda con mielofibrosis</p>
<b>Sarcoma mieloide</b>
<b>LMA con cambios relacionados con mielodisplasia</b>
<b>Neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento</b>
<b>Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down</b>
<p>Mielopoyesis anormal transitoria  Leucemia mieloide aguda asociada con el síndrome de Down</p>

\*Se deben reportar las otras translocaciones que implican *KMT2A (MLL)*: por ejemplo, LMA con t(6;11)(q27;q23.3), *MLLT4-KMT2A*; LMA con t(11;19)(q23.3;p13.3), *KMT2A-MLLT1*; LMA con t(11;19)(q23.3;p13.1), *KMT2A-ELL*; LMA con t(10;11)(p12;q23.3), *MLLT10-KMT2A*.

§ El diagnóstico se realiza independientemente de la presencia o ausencia de mielodisplasia.

\*\*Entidades provisionales.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.6 Mecanismos de leucemogénesis

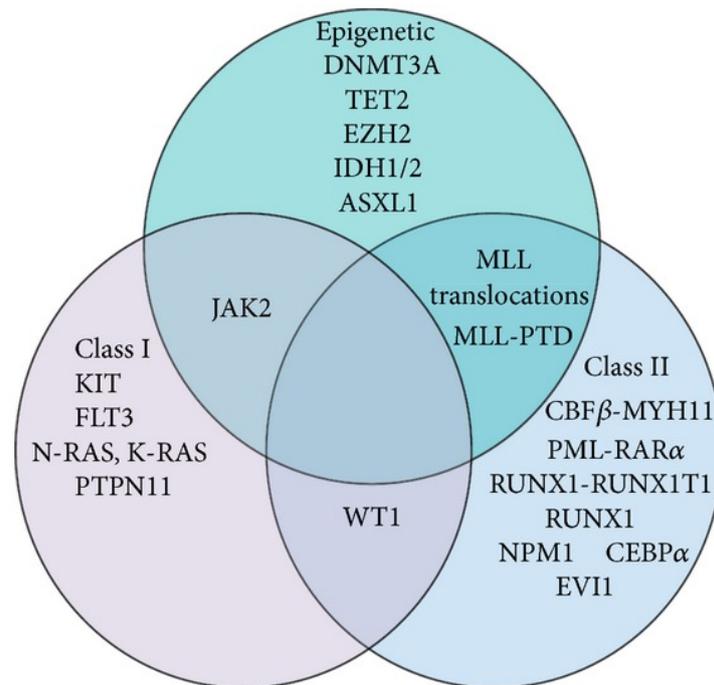
La transformación leucémica de la célula hematopoyética se origina por una serie de cambios genéticos que producen una pérdida del control de proliferación, un bloqueo en la diferenciación, resistencia a las señales apoptóticas y un aumento en la capacidad de auto-renovación.

En la patogénesis de la LMA se han implicado múltiples alteraciones moleculares, pero las más frecuentes son las translocaciones cromosómicas y mutaciones que, en general, pueden producir un aumento de la función del gen implicado o, por el contrario, una pérdida o disminución de su función. En otras ocasiones se produce una anomalía a nivel epigenético, con el resultado del silenciamiento o activación de una determinada diana celular.

La observación de que los reordenamientos cromosómicos que se dirigen a los factores de transcripción hematopoyéticos (*PML-RAR*, *CBF $\beta$ -MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*) se acompañan con frecuencia de mutaciones en las proteínas de señalización (*FLT3*, *c-KIT*, *N-RAS*, *K-RAS* y *PTPN11*), condujo a la propuesta de un modelo de leucemogénesis de doble *hit* de la LMA que implicaba la cooperación de las mutaciones que confieren una ventaja proliferativa (mutaciones de clase I) y aquellas que inducen un bloqueo en la diferenciación mieloide (mutaciones de clase II)<sup>24</sup>. Sin embargo, con la secuenciación del genoma y un mejor conocimiento de las alteraciones moleculares subyacentes en las LMA, se ha hecho evidente que la situación es mucho más compleja<sup>25,26</sup>. El descubrimiento de mutaciones en reguladores epigenéticos como *DNMT3A*, *TET2* o *EZH2* sugiere que al menos existe un tercer grupo de mutaciones que debería añadirse al modelo de doble *hit*<sup>27</sup> (Figura 3).

## I. INTRODUCCIÓN

Figura 3. Mutaciones involucradas en la leucemogénesis en la LMA<sup>27</sup>. Al clásico modelo de doble *hit* en el que las mutaciones de clase I y clase II cooperan en la leucemogénesis, se ha añadido un tercer grupo de mutaciones en genes relacionados con la epigenética.



Uno de los estudios recientes que ha contribuido al conocimiento de la patogénesis de la LMA, es el realizado dentro del proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) que analizó el perfil genómico de 200 pacientes con LMA *de novo*, y detectó mutaciones recurrentes en 23 genes, algunos ya conocidos como *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *IDH1* e *IDH2*, y otros recientemente implicados en la leucemogénesis como son *EZH2*, *U2AF1*, *SMC1A* y *SMC3*. Los autores observaron que el número de mutaciones iniciadoras de leucemia (mutaciones *driver*) era relativamente bajo, que existía al menos una mutación genética recurrente en cada paciente y que la mayoría se podían agrupar dentro de categorías funcionales específicas (Figura 4), y tenían implicaciones en el desarrollo de la enfermedad (Tabla 3). Estas 8 categorías incluyen genes que codifican factores de transcripción, supresores de tumores, relacionados con el proceso de metilación de

## I. INTRODUCCIÓN

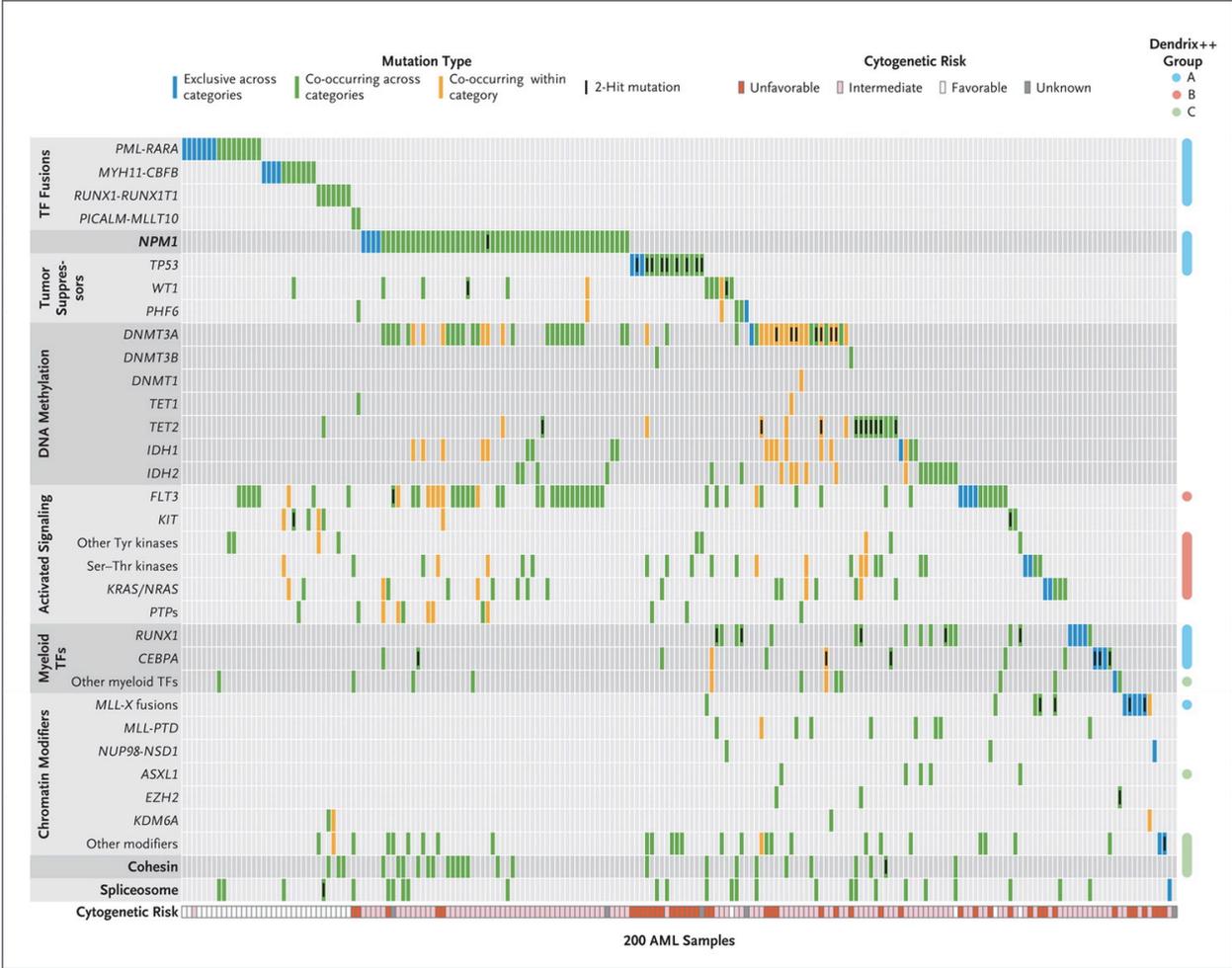
DNA, de señalización, modificadores de la cromatina, pertenecientes al complejo de cohesina, al complejo del spliceosoma, y *NPM1*.

También se observó que existen patrones de cooperación y exclusividad entre las alteraciones y demostraron que algunas mutaciones frecuentes en la LMA (*DNMT3A*, *NMP1*, *CEBPA*, *IDH1/2* y *RUNX1*) eran mutuamente excluyentes de los reordenamientos que involucran a factores de transcripción, sugiriendo que estas mutaciones podrían estar implicadas en el inicio de la LMA del mismo modo que los genes de fusión. Por otro lado, se identificaron patrones de mutua exclusividad para mutaciones en genes de ciertas clases biológicas, incluyendo aquellos que codifican el complejo cohesina, proteínas del spliceosoma, proteínas de señalización y proteínas modificadoras de histonas, sugiriendo que una mutación en esas vías es en general suficiente en la patogénesis de la leucemia.

Por otro lado, dentro del proyecto TCGA y basándose en el análisis de la frecuencia alélica, pudieron definir la composición clonal de la LMA, observando que más de la mitad de los pacientes exhibían al menos un subclon además de un clon fundador de leucemia (el clon que muestra la frecuencia del alelo variante más alta)<sup>25</sup>. Estos hallazgos están en consonancia con otros estudios de evolución clonal que comentaremos más adelante.

I. INTRODUCCIÓN

Figura 4. Organización de las mutaciones en categorías de genes relacionados<sup>25</sup>.



## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Categorías funcionales de los genes más frecuentemente afectados en la LMA y su papel en la leucemogénesis. Adaptado de Bullinger et al<sup>28</sup>.

Categoría funcional	Genes	Papel en la Leucemogénesis	Incidencia (%)
<b>Genes de señalización</b>	Quinasas ( <i>FLT3, KIT</i> ), fosfatasa ( <i>PTPN11</i> ), o miembros de la familia RAS ( <i>KRAS, NRAS</i> )	La activación de la señalización confiere una ventaja proliferativa a través de las vías de RAS/RAF, JAK/STAT y PI3K/AKT	59
<b>Genes asociados a la metilación del DNA</b>	<i>DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2</i>	La desregulación de la metilación del DNA produce una alteración de la transcripción de genes relevantes para la leucemia: las mutaciones de IDH tienen un impacto sobre la metilación del DNA a través de la producción del oncometabolito 2-hidroxiglutarato y la alteración de <i>TET2</i>	44
<b>Fusiones y mutaciones de genes que codifican para factores de transcripción (FC) mieloides</b>	Fusiones de FC [t(8;21), inv(16)/t(16;16)]	Una alteración en la función de los FC produce una desregulación de la transcripción y una alteración de la diferenciación hematopoyética	18
	Mutaciones de FC ( <i>RUNX1, CEBPA</i> )		22
<b>Genes modificadores de la cromatina</b>	Mutaciones ( <i>ASXL1, EZH2</i> ) o fusiones de <i>KMT2A</i>	La desregulación de la modificación de la cromatina (por ejemplo, la metilación de histona H3K79 metiltransferasa) conduce a una desregulación de la transcripción.	30
<b>Gen de la Nucleofosmina (<i>NPM1</i>)</b>	<i>NPM1</i>	<i>NPM1</i> es una proteína que se desplaza del núcleo al citoplasma. La deslocalización al citoplasma de la proteína mutada y de las proteínas que interaccionan con ella es un evento crítico en la patogénesis de la leucemia	27

## I. INTRODUCCIÓN

<b>Genes supresores de tumores</b>	<i>TP53, WT1, PHF6</i>	Las mutaciones conducen a la desregulación transcripcional y deterioro de la degradación a través de <i>MDM2</i> y <i>PTEN</i>	16
<b>Genes del complejo del spliceosoma</b>	<i>SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2</i>	La alteración de la función del spliceosoma y del procesamiento del RNA produce patrones de <i>splicing</i> aberrantes	14
<b>Genes del complejo de cohesina</b>	<i>STAG2, RAD21</i>	Las mutaciones pueden producir una alteración de la segregación cromosómica y de la regulación transcripcional	13

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.6.1. Hematopoyesis clonal

En estudios recientes de grandes cohortes se han identificado mutaciones recurrentes en los reguladores epigenéticos (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*) y menos frecuentemente en genes del spliceosoma (*SF3B1*, *SRSF2*), en la sangre de pacientes de edad avanzada con expansión hematopoyética clonal<sup>29-33</sup>. Estas mutaciones preleucémicas están presentes en células ancestrales. Por ejemplo, se demostró que las células madre hematopoyéticas mutantes *DNMT3A* preleucémicas tienen una ventaja de repoblación multilinaje sobre las células madre hematopoyéticas no mutadas, y su detección en muestras en remisión completa (RC) indicó su potencial para ser resistentes y sobrevivir a la quimioterapia<sup>34</sup>. Por lo tanto, los clones preleucémicos hematopoyéticos pueden persistir en el tiempo, sobrevivir al tratamiento de la leucemia, conducir a una mayor expansión clonal durante la remisión y eventualmente llevar a la recaída<sup>34-36</sup>.

Recientemente se ha propuesto el término "hematopoyesis clonal de potencial indeterminado" (*Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential, CHIP*) para describir la presencia de mutaciones somáticas asociadas a malignidad hematológica en la sangre o la médula ósea, en ausencia de criterios diagnósticos convencionales para una neoplasia hematológica<sup>37</sup>. La prevalencia de la hematopoyesis clonal aumenta con la edad y se puede encontrar en aproximadamente el 10% de individuos entre 70 y 80 años de edad, y también se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar una neoplasia hematológica<sup>29,30</sup>. Los datos preliminares indican que la tasa de transformación de la hematopoyesis clonal de potencial indeterminado en una enfermedad hematológica es de 0,5% a 1 % al año, similar a la tasa de progresión de otros estados premalignos, como la progresión de la gammapatía monoclonal de significado indeterminado al mieloma múltiple.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.6.2. Evolución clonal

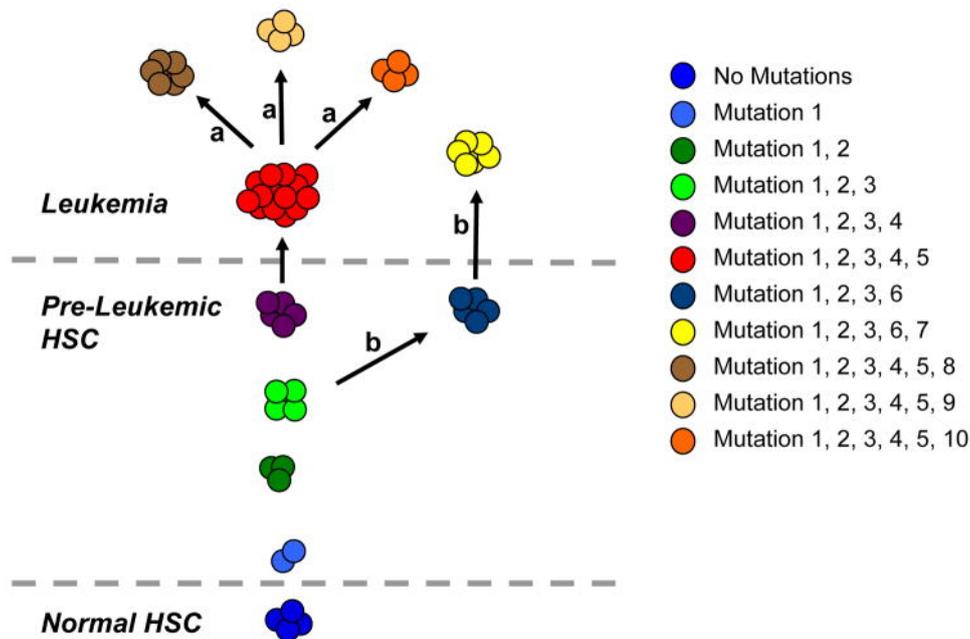
Según la teoría que prevalece actualmente, una célula iniciadora de la leucemia con capacidad de auto-renovación daría lugar a una prole de células malignas poco diferenciadas, adquiriendo una organización jerárquica similar a la que presenta la hematopoyesis fisiológica (modelo de la *stem cell* leucémica). La transformación maligna se puede producir en una célula madre primitiva o en células más diferenciadas, que adquieren características propias de una célula madre<sup>38</sup>.

Se han propuesto diferentes modelos para la progresión clonal desde la célula madre hematopoyética al clon leucémico. Se ha sugerido que una mutación iniciadora puede ocurrir dentro del contexto de una célula madre hematopoyética que ya tiene varias mutaciones aleatorias benignas acumuladas a lo largo del tiempo<sup>39</sup>. Esta mutación (*driver*) confiere una ventaja a esta célula y prolifera, originando un clon que contiene todas las mutaciones benignas (*passengers*). Cada evento adicional durante la replicación de estas células puede cooperar contribuyendo a la progresión del subclon; por lo tanto, los clones genéticamente más tardíos y alterados son cada vez más dominantes y más frecuentes que los clones iniciales y menos alterados. Por otro lado, en estudios recientes se ha demostrado que en algunas leucemias agudas existen múltiples subclones de células madre preleucémicas dentro de una arquitectura clonal compleja<sup>40</sup>. Se han sugerido diferentes posibilidades para la generación de estos clones adicionales: mutaciones adicionales en el clon leucémico dominante que genera subclones distintos, o un clon preleucémico común con diferente evolución que genera un clon leucémico diferente. En última instancia, la población total de células leucémicas

## I. INTRODUCCIÓN

incluye subclones múltiples con una relación genética compleja, y mutaciones tanto comunes como divergentes<sup>36,40</sup>.

Figura 5. Modelo de heterogeneidad clonal en la leucemia aguda<sup>40</sup>. La leucemia está constituida por distintas subpoblaciones con un clon leucémico dominante (rojo). (a) Se producen mutaciones en el clon dominante y se generan subclones distintos (marrón, tostado y naranja). (b) Un clon pre-leucémico común experimenta una evolución divergente para generar un clon leucémico distinto, pero relacionado (amarillo).

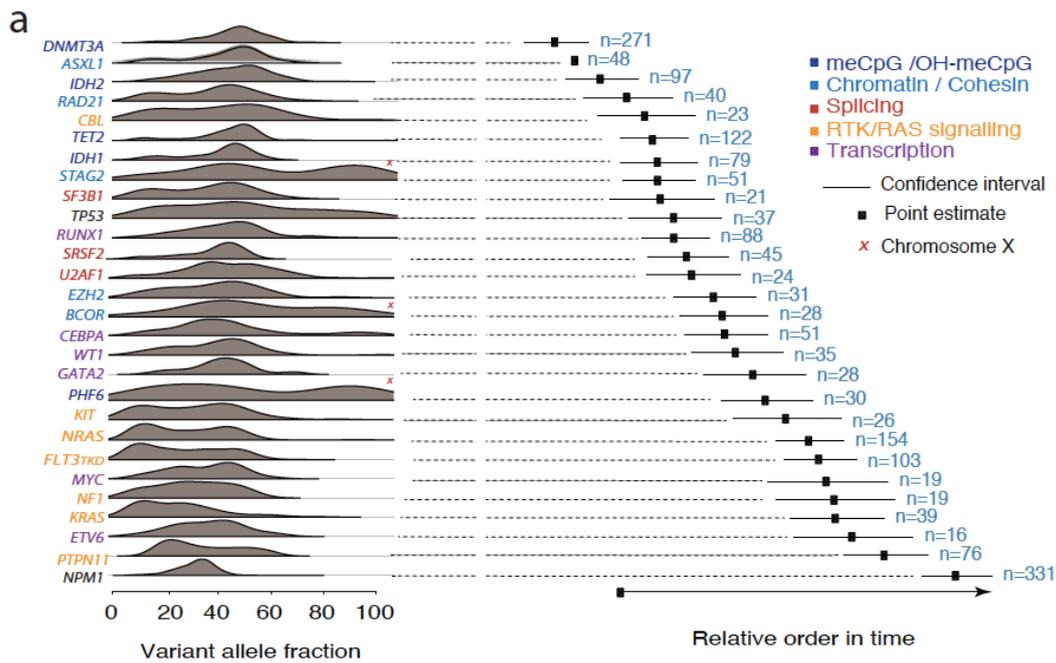


En un estudio reciente, Papaemmanuil *et al.*<sup>41</sup> describen la composición clonal de casos de LMA a través del análisis de la frecuencia alélica de mutaciones puntuales (Figura 6). Como hemos comentado en el apartado anterior, las mutaciones en *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH1/2* y *TET2*, genes que codifican modificadores epigenéticos, son adquiridas de forma temprana y se encuentran frecuentemente en personas de edad avanzada con hematopoyesis clonal y confieren un aumento de riesgo de padecer neoplasias hematológicas. En este estudio, las mutaciones en estos genes estaban típicamente en los clones fundadores y no se encontraban de forma aislada, sugiriendo que no son suficientes para iniciar la leucemia. Las mutaciones en los genes de las vías tirosin-

## I. INTRODUCCIÓN

quinasas-RAS ocurren tarde. Las mutaciones de *NPM1* normalmente son eventos secundarios y ocurren frecuentemente después de las mutaciones en *DNMT3A*, *IDH1* o *NRAS*.

Figura 6. Orden de adquisición de mutaciones basado en análisis de la frecuencia alélica<sup>41</sup>.



### 1.6.3. Reordenamientos cromosómicos en LMA

Dentro de las alteraciones moleculares descritas implicadas en la patogénesis de la LMA, son frecuentes las translocaciones o inversiones cromosómicas, que se encuentran en el 50% y en el 30% de las LMA en niños y en adultos jóvenes respectivamente.

Las translocaciones cromosómicas balanceadas producen la formación de genes de fusión que de forma recurrente incluyen genes que codifican para factores de transcripción de la hematopoyesis, como *RARA*, *RUNX1* o *CBF $\beta$*  (subunidades del complejo *Core Binding Factor* (CBF)), reguladores epigenéticos (*MLL* [*KMT2A*], *NSD1*, *CREBBP* [*KAT3A*]) y componentes del *nuclear pore complex* (*NUP98*, *NUP214*).

## I. INTRODUCCIÓN

En la clasificación de la OMS, algunos de estos reordenamientos cromosómicos y los genes de fusión resultantes se designan como anomalías genéticas recurrentes y su presencia es suficiente para realizar el diagnóstico de LMA, sin tener en cuenta el número de blastos en médula ósea.

### 1.6.3.1. Alteraciones del complejo de transcripción CBF

El complejo de transcripción CBF, imprescindible para la hematopoyesis normal, está formado por la interacción de la proteína RUNX1, codificada por un gen en el cromosoma 21q22, y la proteína CBF $\beta$ , codificada en 16q22. Las dos subunidades funcionan como un activador transcripcional heterodimérico, con la actividad de unión a ADN presente en *RUNX1*. La desorganización del complejo, secundaria a las translocaciones t(8;21), la inversión inv(16) y la t(16;16), se observa en el 15% de los casos de LMA<sup>42,43</sup>. La t(8;21)(q22;q22) con reordenamiento *RUNX1-RUNX1T1* (10% de las LMA) y la inv(16) y la t(16;16)(p13;q22) con reordenamiento *CBF $\beta$ -MYH11* (5% de las LMA) se incluyen, junto a la t(15;17), en la categoría citogenética de buen pronóstico.

Las proteínas de fusión resultantes de estas translocaciones se asocian de forma aberrante a complejos correpresores con actividad deacetiladora de histonas (histona deacetil-transferasas, HDAC), conduciendo a la inhibición de la transcripción de genes específicos de la hematopoyesis<sup>44,45</sup>, y produciendo un bloqueo de la diferenciación granulocítica.

Las LMA con alteración del CBF están asociadas con frecuencia a mutaciones en genes de señalización (*NRAS*, *KIT*, *NF1*, *FLT3*, *RAS*).

Recientemente se ha demostrado mediante estudios de secuenciación masiva que el espectro de mutaciones cooperantes es diferente en los dos subtipos de LMA-CBF. Así,

## I. INTRODUCCIÓN

en la LMA con reordenamiento *RUNX1-RUNX1T1* se detectan de forma recurrente mutaciones en genes modificadores de cromatina (42-44%) que incluyen *ASXL2* y mutaciones en genes del complejo de la cohesina (18-20%), prácticamente ausentes en las LMA con reordenamiento *CBF $\beta$ -MYH11*<sup>46</sup>.

### 1.6.3.2. Leucemia promielocítica aguda con reordenamiento de *RAR $\alpha$*

La leucemia promielocítica aguda (LPA; LMA FAB-3), que involucra al gen *RAR $\alpha$*  en 17q12, representa el 10-15% de las LMA<sup>47</sup>. En la gran mayoría de los casos se produce la translocación t(15;17)(q22;q21), que genera la proteína PML-RAR $\alpha$ . Sin embargo, existen casos más raros de LPA que presentan otras translocaciones, que típicamente implican a la proteína RAR $\alpha$  (ver Tabla 4)<sup>48</sup>.

En condiciones fisiológicas, RAR $\alpha$  es un receptor hormonal nuclear que, en ausencia de su ligando, inhibe la transcripción reclutando correpresores y proteínas HDAC. La unión del ácido 9-cis-retinoico a RAR $\alpha$  libera los factores represores y activa la transcripción de genes clave para la diferenciación mieloide<sup>49</sup>. La proteína anómala PML-RAR $\alpha$  en la LPA altera la respuesta normal de RAR $\alpha$  al ácido retinoico, de manera que las concentraciones fisiológicas de éste no consiguen liberar los correpresores. En los pacientes con LPA tratados con dosis farmacológicas de ácido *all-trans-retinoico* (ATRA), se libera el mecanismo represor y se induce la diferenciación de los promielocitos atípicos<sup>50</sup>.

Aunque la formación de PML-RAR $\alpha$  es el evento necesario para el inicio de la LPA (*driver mutation*), se han descrito mutaciones añadidas de otros genes, como la duplicación interna en tándem del gen *FLT3* (*FLT3-ITD*, 35% de los casos), que probablemente contribuyen a acelerar la enfermedad<sup>36,51,52</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 4. Translocaciones descritas en la LPA<sup>48</sup>.

Citogenética	Proteínas de fusión	Frecuencia
t(15;17)(q22;q21)	PML/RARA	98%
t(11;17)(q23;q21)	ZBTB16 (PLZF)/RARA	0,8%
t(5;17)(q35;q21)	NPM1/RARA	Baja
t(11;17)(q13;q21)	NUMA/RARA	Baja
der(17)	STAT5B/RARA	Baja
der (17)	PRKAR1a/RARA	Baja
t(X;17)(p11;q12)	BCOR/RARA	Baja
t(4;17)(q12;q21)	FIP1L1/RARA	Baja

### 1.6.3.3. Otros reordenamientos recurrentes en la LMA

Existen otros reordenamientos recurrentes en la LMA, algunos de ellos recogidos en la clasificación de la OMS de 2016 (Tabla 5).

Tabla 5. Otras alteraciones genéticas recurrentes en la LMA recogidas en la clasificación de la OMS de 2016. Adaptado de Bullinger *et al*<sup>28</sup>.

Reordenamiento	Frecuencia (%)	Interacciones genéticas e impacto clínico
<b>t(9;11)(p21.3;q23.3); MLL3-KMT2A</b>	1	<p>Su frecuencia disminuye en edad avanzada</p> <p>Mutaciones concurrentes: <i>NRAS</i> (20%), <i>FLT3-TKD</i> (10%), <i>FLT3-ITD</i> (5%)</p> <p>Alteraciones cromosómicas concurrentes: +8/+8q (30%)</p> <p>Asociado con riesgo intermedio; en el 40% se produce una desregulación de <i>MECOM</i> (<i>EVI1</i>), que se asocia con mal pronóstico</p> <p>Asociada a neoplasias relacionadas con el tratamiento</p> <p>Terapia dirigida en desarrollo clínico (inhibidores de DOT1L)</p> <p>Otras translocaciones que involucran al gen <i>KMT2A</i>: LMA con t(6;11)(q27;q23.3);<i>MLL4-KMT2A</i>; LMA con t(11;19)(q23.3;q13.3);<i>KMT2A-MLL1</i>; LMA con t(11;19)(q23.3;q13.1);<i>KMT2A-</i></p>

## I. INTRODUCCIÓN

		<i>ELL</i> ; LMA con <i>t(10;11)(p12;q23.3)</i> ; <i>MLL10-KMT2A</i> La <i>t(6;11)</i> se asocia con <i>FLT3</i> -ITD (10%), <i>FLT3</i> -TKD (10%), desregulación de <i>MECOM (EVI1)</i> en el 80% de los casos <i>t(v;11q23.3)</i> en general se asocia a mal pronóstico y a neoplasias relacionadas con el tratamiento
<b><i>t(6;9)/p23;q34.1</i>; <i>DEK-NUP214</i></b>	1	Mutaciones concurrentes: <i>FLT3</i> -ITD (70%), <i>KRAS</i> (20%). Se puede considerar el uso de inhibidores de <i>FLT3</i> si está presente la mutación Asociado a mal pronóstico
<b><i>inv(3)(q21.3q26.2)</i> o <i>t(3;3)(q21.3;q26.2)</i>; <i>GATA2, MECOM</i></b>	1	Mutaciones concurrentes: <i>NRAS</i> (30%), <i>PTPN11</i> (20%), <i>SF3B1</i> (20%), <i>KRAS</i> (15%), <i>GATA2</i> (15%), <i>ETV6</i> (15%), <i>PHF6</i> (15%), <i>RUNX1</i> (10%), <i>BCOR</i> (10%), <i>ASXL1</i> (10%), <i>NF1</i> (10%) Alteraciones cromosómicas concurrentes: -7 (70%), cariotipo complejo (20%) Asociado a muy mal pronóstico
<b>LMA con <i>BCR-ABL1</i></b>	<1	Reconocida como entidad provisional Típicamente <i>BCR-ABL1 p210</i> : anomalías adicionales como -7, +8, +der(22)t(9;22) en aproximadamente 25-60% de los pacientes Los pacientes deberán recibir tratamiento con inhibidores de tirosin-quinasa
<b><i>t(1;22)(p13.3;q13.3)</i>; <i>RBM15-MKL1</i></b>	Raro	Sólo en niños; en LMA con diferenciación megacarioblástica

*FLT3*-TKD: mutaciones del dominio tirosin-quinasa del gen *FLT3*. *FLT3*-ITD: mutaciones internas en tándem de *FLT3*. DOT1L: *DOT1-like histone H3K79 methyltransferase*.

Se han descrito otros reordenamientos balanceados (Tabla 6), los cuales, a pesar de considerarse cambios iniciadores de leucemia, actualmente no se pueden definir formalmente como entidades de la enfermedad, principalmente porque son muy poco frecuentes y su impacto clínico no está bien establecido<sup>28</sup>.

Tabla 6. Reordenamientos génicos poco frecuentes (<1%) en LMA. Adaptado de Bullinger et al.<sup>28</sup>.

	<b>Base de datos AMLSG (n=9360)</b>	<b>Base de datos Mitelman (n=17197)</b>
<i>t(1;3)(p36.32;q21)</i> ; <i>PRDM16-RPN1</i>	n=15	n=16

## I. INTRODUCCIÓN

	<p>Edad mediana al diagnóstico: 63 años</p> <p>Alteraciones cromosómicas añadidas: 5q-(25%), -7/7q- (12%), sin otras alteraciones en el 50%.</p> <p>Mal pronóstico</p>	<p>Edad mediana al diagnóstico: 65 años</p> <p>Alteración cromosómica frecuente: 5q-</p> <p>Mal pronóstico</p>
<p>t(2;3)(p21;q26.2); <i>THADA-MECOM</i></p>	<p>n=8</p> <p>Afecta a adultos jóvenes; edad mediana: 42 años</p> <p>Alteración cromosómica secundaria: -7 (50%)</p> <p>SG a los 3 años: 40%</p>	<p>n=6</p> <p>Edad mediana: 43 años</p> <p>Alteración cromosómica secundaria: -7</p> <p>Mal pronóstico</p>
<p>t(3;5)(q25.1;q35.1); <i>NPM1-MLF1</i></p>	<p>n=10</p> <p>Edad mediana: 45 años</p> <p>Alteración aislada en 7 de los 10 pacientes; anomalía adicional: +8</p> <p>SG a los 3 años: 20%</p>	<p>n=19</p> <p>Afecta a adultos jóvenes</p> <p>Más frecuente como alteración aislada</p> <p>Displasia frecuente</p> <p>Supervivencia mediana pobre (1 año)</p>
<p>t(3;12)(q26.2;p13); <i>MECOM-ETV6</i></p>	<p>n=7</p> <p>Edad mediana: 40 años</p> <p>Alteraciones cromosómicas adicionales: -7 en 3 de los 7 pacientes</p> <p>SG a los 3 años: 30%</p>	<p>n=46</p> <p>Edad mediana: 49 años</p> <p>Alteraciones cromosómicas adicionales: -7/7q-, 5q-; alteración secundaria en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC); en el 50% como anomalía aislada</p> <p>Mal pronóstico</p>
<p>t(3;21)(q26.2;p22); <i>RUNX1-MECOM</i></p>	<p>n=13</p> <p>Edad mediana: 53 años</p> <p>Alteraciones cromosómicas adicionales: -7, anomalía aislada en 60%</p> <p>SG a los 3 años: 10%</p>	<p>n=39</p> <p>Edad mediana: 49 años</p> <p>Frecuente en crisis blástica de LMC y LMA relacionadas con el tratamiento</p> <p>Alteraciones cromosómicas adicionales: -7, 5q-; Mal pronóstico (SG mediana: 4 meses)</p>
<p>t(4;12)(q12;p13); <i>PDGFRA-ETV6</i></p>	<p>N=10</p> <p>Pacientes de edad avanzada (mediana de edad: 70 años)</p> <p>Sobre todo en cariotipos complejos (60%)</p> <p>Mal pronóstico</p>	<p>NA</p> <p>No se describen pacientes con LMA y <i>PDGFRA-ETV6</i></p>
<p>t(8;16)(p11.2;p13.3); <i>KAT6A-CREBBP</i></p>	<p>n=8</p> <p>Edad mediana, 50 años</p>	<p>n=126</p> <p>Predominio femenino</p> <p>Eritrofagocitosis y CID</p>

## I. INTRODUCCIÓN

	Cariotipo complejo en 6 de 8 pacientes Mal pronóstico	LMA relacionadas con el tratamiento en 25% Mal pronóstico
t(10;11)(p12.3;q14.2); <i>PICALM-MLL10</i>	n=12 Adultos jóvenes (edad mediana: 35 años) Frecuente como anomalía aislada, pero también en cariotipos complejos (25%) SG a los 3 años: 25%	n=7 Frecuente infiltración del SNC Anomalías adicionales: 5q-, +8 Mal pronóstico
t(12;22)(p13;q12.1); <i>ETV6-MN1</i>	n=6 Edad mediana: 45 años Se asocia a cariotipos complejos con anomalías adicionales Pronóstico no bien definido	n=7 Epidemiología poco conocida Anomalía adicional: +8

AMSLG: German-Austrian AML Study Group. SG: supervivencia global. NA: no aplica.

### 1.6.4. Mutaciones en LMA

#### 1.6.4.1. Mutaciones en vías de transducción de señales

El gen *FLT3*, localizado en 13q12, codifica una proteína de clase III de los receptores tirosin-quinasa que tiene un importante papel en la hematopoyesis normal. La unión de FLT3 a su ligando activa una serie de procesos intracelulares de señalización que incrementan la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Un tercio de los pacientes con LMA presentan una mutación de este gen, de ellos un 25% muestran una duplicación interna en tándem en el dominio yuxtamembrana (*FLT3-ITD*) y un 7% mutaciones puntuales en el dominio tirosin-quinasa (*FLT3-TKD*)<sup>53</sup>. Las dos mutaciones producen una activación constitutiva del receptor, pero con implicaciones pronósticas diferentes. El significado pronóstico de *FLT3-TKD* es controvertido y varía según los estudios<sup>54</sup>, pero la presencia de *FLT3-ITD* implica un aumento del riesgo de recaída y peor supervivencia global (SG), especialmente en aquellos casos en los que se produce una pérdida de expresión del alelo germinal. La carga alélica de *FLT3-ITD* modula el efecto negativo de esta mutación. Así los pacientes

## I. INTRODUCCIÓN

con mutación de *NPM1* y *FLT3* con ratio bajo (<0,5) de alelo mutado tienen un pronóstico similar a los pacientes con un *FLT3* no mutado<sup>55</sup>.

En múltiples estudios se ha establecido que otros genes que codifican para componentes de la vía de señalización incluyendo *RAS*, *ckIT*, *CBL*, *NF1* y *PTPN11* están mutados de forma recurrente en la LMA. Aunque las mutaciones de *KRAS* no tienen relevancia pronóstica<sup>56</sup>, una serie de estudios han puesto de manifiesto la asociación entre la mutación de *ckIT* y las leucemias CBF, en las que predice una peor evolución<sup>57</sup>.

### 1.6.4.2. Mutaciones en *CEBPA*, *NPM1* y *RUNX1*

Las LMA con mutaciones en los genes que codifican para la proteína de unión al *enhancer/CCAAT* alfa (*CEBPA*) y para nucleofosmina (*NPM1*) fueron reconocidas como entidades provisionales en la clasificación de la OMS de 2008 y constituyen, dentro de la LMA y especialmente dentro del grupo de riesgo intermedio, subgrupos pronósticos relevantes<sup>58,59</sup>.

*CEBPA* codifica para un factor de transcripción imprescindible en la regulación de la mielopoyesis. Las mutaciones en este gen se han encontrado en un 10% de las LMA de cariotipo normal (LMA-CN), pero también se han visto en el contexto de cariotipos con alteraciones asociadas, como la delección del cromosoma 9q (del9q). Las mutaciones en *CEBPA* son excluyentes con la presencia de reordenamientos cromosómicos. Las mutaciones se localizan en las regiones amino y carboxi-terminal y producen la pérdida de la proteína de longitud completa (p42) y la formación de una isoforma de *CEBPA* (p30) truncada. Los pacientes pueden tener una o dos mutaciones. Actualmente parece claro que sólo los pacientes con mutaciones bialélicas tienen un pronóstico favorable<sup>60,61</sup>. Además, estas LMA se asocian a mutaciones en *GATA2* y típicamente no presentan *FLT3*-ITD<sup>62,63</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

Las mutaciones del gen *NPM1*, descubiertas por Fallini y colaboradores en 2005, representan la lesión molecular más frecuente identificada en la LMA hasta el momento<sup>59</sup>. Se observan en un tercio de los casos de LMA, llegando al 50% en los pacientes con LMA-CN. Las mutaciones de *NPM1* consisten en la inserción de 4 bases de pares en el exón 12 del gen. Se han descrito alrededor de 40 tipos de mutaciones diferentes (las mutaciones tipo A, B y D incluyen el 90% de los casos), que implican la región C-terminal de la proteína y que producen la pérdida de residuos de triptófano y la generación de una señal nuclear de exportación causando una deslocalización de nucleofosmina del nucléolo al citoplasma. El análisis de largas series de pacientes han demostrado que los pacientes jóvenes con mutación de *NPM1* sin mutación de *FLT3*-ITD tienen mejor pronóstico y no se beneficiarían de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (aloTPH) en primera remisión completa (RC1)<sup>64,65</sup>. En cambio, aquellos casos en los que coexiste la mutación de *NPM1* con *FLT3*-ITD y/o la mutación en el gen de la DNA metiltransferasa 3 (*DNMT3A*), presentan un riesgo de recaída aumentado y una peor evolución<sup>66</sup>.

*RUNX1* se encuentra mutado principalmente en pacientes de riesgo citogenético intermedio con LMA-CN<sup>67</sup> y en un 10% de casos de síndrome mielodisplásico (SMD)<sup>68</sup>. Se han descrito mutaciones germinales de *RUNX1* que predisponen a LMA en asociación con trombopatías (*Familial Platelet Disorder*)<sup>69</sup>. En pacientes adultos con LMA, las mutaciones de *RUNX1* se distribuyen a lo largo del gen y pueden ser bialélicas. Suelen ser mutuamente excluyentes de las translocaciones recurrentes y mutaciones que implican a *NPM1* y *CEBPA*, pero suelen estar asociadas con el subtipo LMA M0 de la FAB, trisomía 13, la duplicación parcial en tándem del gen *MLL* (*MLL*-PTD), mutaciones en *IDH2* y mutaciones en *ASXL1*<sup>70</sup>. En múltiples estudios en pacientes jóvenes con LMA se

## I. INTRODUCCIÓN

ha descrito que la mutación de *RUNX1* es un factor pronóstico independiente de evolución clínica adversa<sup>71-73</sup>.

### 1.6.4.3. Mutaciones en modificadores epigenéticos

#### 1.6.4.3.1. Metilación del DNA

DNMT3A es una metiltransferasa que produce la metilación del DNA, convirtiendo la citosina en 5-metilcitosina, y está mutada aproximadamente en el 30% de las LMA de riesgo citogenético intermedio. Se asocia con mucha frecuencia a mutaciones de *NPM1* y *FLT3-ITD*: el gen *DNMT3A* está mutado en la mitad de las LMA *NPM1+*, y la mayoría (80%) de los pacientes con mutación de *DNMT3A* tienen *NPM1* mutado. Las mutaciones de *DNMT3A* son mayoritariamente heterocigotas y en el 60% de casos se localizan en el dominio catalítico (en el *hotspot* R882). El mecanismo mediante el cual el gen *DNMT3A* mutado contribuye a la transformación leucémica no es bien conocido. En estudios recientes se sugiere que la proteína que se forma como consecuencia de la mutación R882 interfiere en la función de la forma salvaje del gen *DNMT3A* residual, con una reducción de la actividad enzimática y una hipometilación focal en zonas CpGs específicas de las células leucémicas. Los mecanismos moleculares subyacentes a las mutaciones en *DNMT3A* no-R882 no son bien conocidos, pero ambos tipos de mutaciones se han asociado mal pronóstico en algunos estudios<sup>66,74,75</sup>.

#### 1.6.4.3.2. Hidroximetilación del DNA

Las mutaciones en los genes *TET2*, *WT1* y de las enzimas isocitrato deshidrogenasa *IDH1* e *IDH2* son mutuamente excluyentes, pero las LMA con estas mutaciones presentan perfiles de metilación del DNA comunes<sup>76,77</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

*TET2*, mutado en el 8-27% de las LMA, es la enzima que regula el inicio de la demetilación del DNA, convirtiendo 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina. En algunos estudios se ha relacionado con peor pronóstico<sup>78</sup>.

Las mutaciones en *IDH1* afectan al residuo 132 (R132) y se encuentran en un 7% de las LMA, particularmente en aquellos casos con cariotipo normal y *NPM1* mutado. *IDH2* está mutado en el 9% de las LMA, con mutaciones en los codones R140 (7%) y R172 (2%). Las mutaciones R140 se asocian con la mutación de *NPM1* y con una evolución clínica favorable; en cambio, la mutación de *IDH2* R172 predice mal pronóstico en algunos estudios<sup>79,80</sup>. Las enzimas IDH catalizan el paso de isocitrato a  $\alpha$ -ketoglutarato, generando NADPH. Las mutaciones en *IDH* no sólo reducen la formación de  $\alpha$ -ketoglutarato, sino que también generan un “oncometabolito”, el 2-hidroxiglutarato (2-HG). Competitivamente el 2-HG inhibe la actividad de las enzimas dependientes de  $\alpha$ -ketoglutarato como las enzimas TET. Recientemente, se ha descrito que WT1 regula la unión de TET2 al DNA.<sup>76,81</sup> Así, las mutaciones en *WT1* (9% de las LMA) son un mecanismo adicional en la alteración de la función de TET2. Estos datos ponen en evidencia la importancia de la desregulación del eje IDH/WT1/TET2 en la patogenia de la LMA, que podría ocurrir en un tercio de los casos en adultos jóvenes.

### 1.6.4.4. Mutaciones en genes del spliceosoma

El spliceosoma es un complejo formado por subunidades de RNA y de proteínas, que se encuentra implicado en el procesamiento del pre-ARN mensajero, previo a la traducción proteica. Los genes que codifican para proteínas implicadas en el spliceosoma se encuentran recurrentemente mutados (50%) en pacientes con SMD<sup>82</sup>; los genes más frecuentemente implicados son *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2* y *ZRSR2*. Las mutaciones del spliceosoma se consideran iniciadoras, mutuamente excluyentes y se asocian con

## I. INTRODUCCIÓN

diferentes fenotipos de la enfermedad. Las mutaciones somáticas de *SF3B1* se encuentran casi exclusivamente en pacientes con anemia refractaria con sideroblastos en anillo con o sin trombocitosis (ARSA y ARSA-T, respectivamente)<sup>83,84</sup>. Además, la gran mayoría de los pacientes con mutación en *SF3B1* tienen una evolución clínica favorable, siendo infrecuente la transformación a LMA. En cambio, los pacientes con mutaciones de *SRSF2* presentan una enfermedad más agresiva, con mayor riesgo de transformación leucémica y peor supervivencia. Se han detectado mutaciones en *SRSF2* en aproximadamente una quinta parte de los casos de LMA transformados a partir de una neoplasia mieloproliferativa y, en particular, en un 40% a 50% de los pacientes con leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), en los que se asocian con frecuencia con mutaciones de *TET2*. Las mutaciones somáticas de *U2AF1* han sido reportadas en varios subtipos de SMD y se asocian a un alto riesgo de evolución leucémica y una corta supervivencia<sup>68</sup>.

Aunque las mutaciones del spliceosoma también se pueden detectar en pacientes con LMA recién diagnosticados, en un estudio sobre una cohorte de 194 pacientes con LMA, se ha concluido que las alteraciones en *SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2* y *ZRSR2* deben considerarse patognomónicas de LMA secundaria a SMD<sup>85</sup>.

### 1.6.4.5. Mutaciones en genes del complejo cohesina

El complejo cohesina es una estructura compuesta por SMC1A, SMC3, RAD21 y STAG1 o STAG2, que está implicado en el intercambio de cromátidas durante la anafase, la regulación de la reparación del ADN, y el control de la transcripción<sup>86</sup>. Las mutaciones en este complejo se asocian a cariotipos normales y no complejos. En un estudio reciente se ha observado que estas mutaciones se producen en un 6% de los pacientes (excluyendo aquellos con LPA), son mutuamente excluyentes y frecuentemente

## I. INTRODUCCIÓN

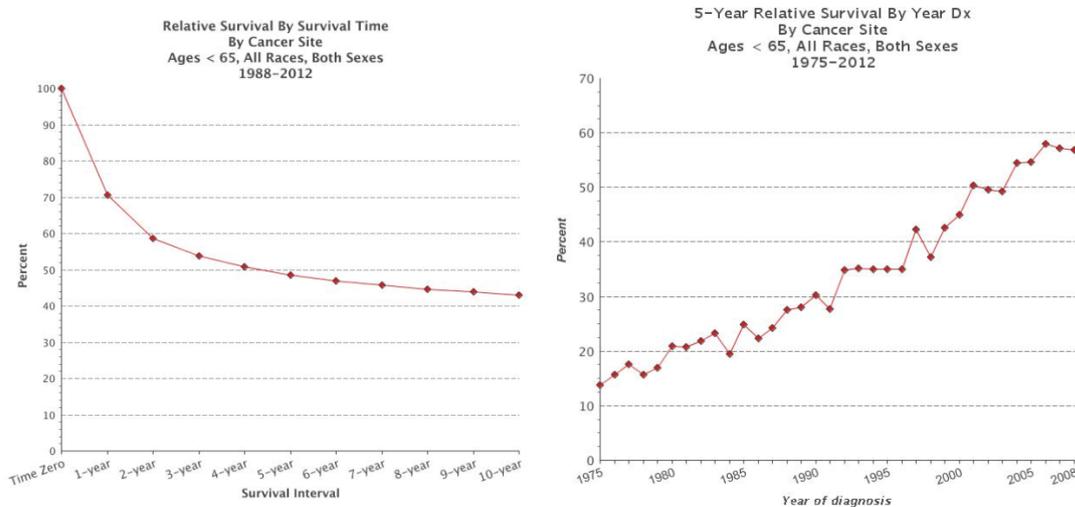
asociadas a mutaciones de *NPM1* y no tienen impacto en el pronóstico<sup>87</sup>. Además, estas mutaciones también se detectan en un 10-15% de los SMD y en un 20% de las LMA secundarias, asociándose con mutaciones en *RUNX1*, *BCOR* y *ASXL1*<sup>88</sup>.

### 1.7. Pronóstico:

La LMA es una enfermedad muy grave y sin la administración de tratamiento su pronóstico es infausto en pocas semanas.

En general la supervivencia relativa a los 5 años (periodo analizado 1988-2012) es de 31.5%. Sin embargo, en los pacientes menores de 65 años, que se tratan de forma intensiva, la supervivencia relativa a los 5 años es mejor, de un 48,5%. Por otro lado, se observa una clara mejoría de la supervivencia en el transcurso de los años (Figura 7).

Figura 7. Supervivencia relativa de los pacientes afectados de LMA en los pacientes <65 años y dependiendo del año de diagnóstico (<http://seer.cancer.gov/faststats>).



En general, el pronóstico de los pacientes con LMA varía en función de diversos parámetros, unos dependientes del paciente y otros de las características biológicas de la propia enfermedad.

De los factores que dependen del paciente destaca el incremento de edad como factor pronóstico adverso y las comorbilidades asociadas<sup>89-91</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

Respecto a los factores que dependen de la biología intrínseca de la LMA se incluyen el cariotipo, las alteraciones moleculares y nivel de expresión de determinados genes, así como la respuesta al tratamiento medida por la enfermedad residual mínima.

### 1.7.1 Edad

El pronóstico de los pacientes empeora con la edad, y afecta tanto a la capacidad de obtención de la RC como al riesgo de recaída. En aquellos pacientes menores de 60 años, la tasa de RC es del 75%, mientras que en los mayores de 60 años es del 45-50%. Esta diferencia también se observa en la SG, que es del 35-40% en pacientes menores de 60 años e inferior al 15% en pacientes mayores de 60 años.

Existen múltiples factores que contribuyen al peor pronóstico de los pacientes con LMA de edad avanzada: una mayor frecuencia de comorbilidades y contraindicaciones de tratamiento citotóxico intensivo, un peor estado general en la mayoría de los casos, una mayor incidencia de LMA secundaria post-SMD o post tratamiento quimioterápico por otra neoplasia y una mayor frecuencia de anomalías citogenéticas adversas con una menor frecuencia de las favorables<sup>92</sup>.

### 1.7.2 Comorbilidades

La comorbilidad se define como la presencia de condiciones debilitantes o enfermedades asociadas que podrían complicar el curso de la leucemia. Las comorbilidades se asocian a una mala tolerancia al tratamiento y un elevado riesgo de complicaciones.

Para evaluar las comorbilidades, se describió un sistema de clasificación, *Charlson Comorbidity Index*, que asignaba una ponderación diferente a 19 antecedentes

## I. INTRODUCCIÓN

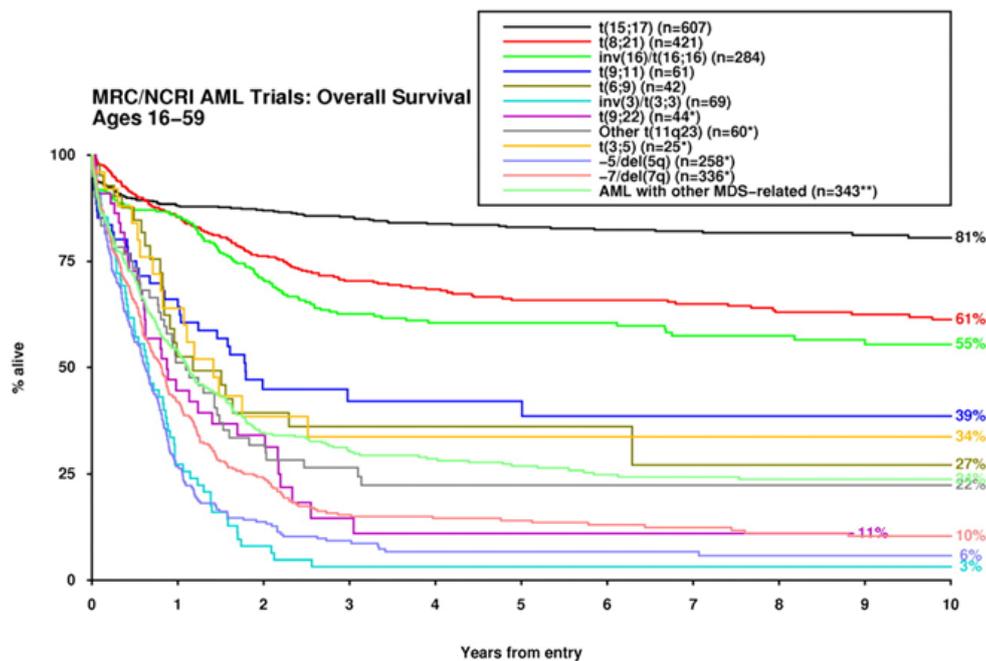
patológicos o enfermedades asociadas. De esta forma se establecía una ratio entre el riesgo de mortalidad en presencia y en ausencia de la comorbilidad<sup>93</sup>.

También hay estudios que han demostrado que las comorbilidades predicen el resultado post-trasplante. En base a estos estudios se generó un índice de comorbilidad específico que incluye enfermedades asociadas y aspectos biológicos. Este índice ha sido validado en pacientes con LMA<sup>94,95</sup>.

### 1.7.3 Cariotipo:

Aproximadamente la mitad de los pacientes adultos con LMA presentan alteraciones cromosómicas recurrentes. El cariotipo en el momento del diagnóstico es uno de los factores pronósticos más importantes en los pacientes con LMA (Figura 8). La citogenética distingue tres grupos con diferente pronóstico en cuanto a SG y tasa de recaída: subgrupo citogenético de riesgo favorable, de riesgo desfavorable y de riesgo citogenético intermedio<sup>96-100</sup>.

Figura 8. Supervivencia global de pacientes afectados de LMA de acuerdo con la clasificación citogenética del grupo MRC. Pacientes de edades 16-59 años, tratados con protocolos terapéuticos de los grupos cooperativos MRC/NCRI<sup>96</sup>.



## I. INTRODUCCIÓN

La estratificación pronóstica de la LMA en función de las anomalías citogenéticas presenta algunas diferencias según el grupo cooperativo (Tabla 7).

Tabla 7. Estratificación pronóstica de la LMA en función de las anomalías citogenéticas, según diferentes grupos cooperativos<sup>96,99</sup>.

MRC	SWOG/ECOG
<b>Riesgo favorable</b>	
t(15;17)(q22;q21)*	t(15;17)(q22;q21)*
t(8;21)(q22;q22)*	t(8;21)(q22;q22)*
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)*	inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)/del(16q)^
<b>Riesgo intermedio</b>	
Entidades citogenéticas no clasificadas ni como favorables ni como adversas.	Cariotipo normal
	+8
	-Y
	del(12p)
	+6
<b>Riesgo adverso</b>	
anomalías (3q) [excepto t(3;5)(q21~25;q31~35)]	anomalías 3q
inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)	
add(5q), del(5q), -5	-5/del(5q)
-7, add(7q)/del(7q)	-7/del(7q)
t(6;11)(q27;q23)	
t(10;11)(p11~13;q23)	
t(11q23) [excepto t(9;11)(p21~22;q23) y t(11;19)(q23;p13)]	anomalías 11q
t(9;22)(q34;q11)	t(9;22)(q34;q11)
-17/abn(17p)	anomalías 17p
	anomalías 20q
	anomalías 21q
	anomalías 21q
	t(6;9)
Complejo (≥ 4 alteraciones)	Complejo (≥ 3 alteraciones)

MRC: Medical Research Council<sup>96</sup>

SWOG/ECOG: Southwest Oncology Group /Eastern Cooperative Oncology Group<sup>99</sup>

\* Con o sin alteraciones añadidas

^Sin cariotipo complejo o del(9q)

## I. INTRODUCCIÓN

### **1.7.3.1. Subgrupo citogenético con pronóstico favorable**

El grupo de LMA consideradas de buen pronóstico incluye la LPA y las leucemias con translocaciones que involucran al CBF. Los pacientes con un perfil citogenético favorable presentan una supervivencia a largo plazo superior al 60%.

### **1.7.3.2. Subgrupo citogenético con pronóstico desfavorable**

En este grupo están incluidos, entre otros, los cariotipos complejos, la deleción de los cromosomas 5 y/ó 7 y las anomalías del cromosoma 3q y el cariotipo monosómico. El cariotipo monosómico, definido como 2 o más monosomías, o una única monosomía en presencia de anomalías estructurales, permite la identificación de un subgrupo de pacientes con LMA con un pronóstico extremadamente adverso<sup>101</sup>.

Este grupo de leucemias se caracterizan por una pobre respuesta a la quimioterapia y un alto riesgo de recidiva, lo que se traduce en una supervivencia inferior al 20%.

### **1.7.3.3. Subgrupo citogenético con pronóstico intermedio**

Este subgrupo representa el 50% de los pacientes e incluye las entidades citogenéticas no clasificadas ni como favorables ni como adversas y aquellos casos con citogenética normal. En los últimos años, como veremos más adelante, se han descrito alteraciones moleculares con valor pronóstico que ayudan a definir mejor el riesgo de este grupo tan heterogéneo. La SG a los 10 años de estos pacientes se encuentra alrededor del 40%.

### 1.7.4. Alteraciones moleculares

En los últimos años se han detectado múltiples anomalías moleculares con diferente impacto pronóstico, que podrían ayudar a refinar la estratificación de los pacientes con LMA y en la aplicación de un tratamiento dirigido adaptado al riesgo<sup>102,103</sup>; en la Tabla 8 se resumen las principales.

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 8. Prevalencia y pronóstico de las mutaciones en LMA en pacientes jóvenes (16-60 años). Adaptado de Grimwade *et al.* y Bullinger *et al.*<sup>26,28</sup>.

Gen mutado	Frecuencia %	Mutaciones / alteraciones cromosómicas asociadas	Pronóstico
<i>NPM1</i>	25-30	<i>DNMT3A</i> , <i>FLT3</i> -ITD, genes del complejo cohesina, <i>NRAS</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> <sup>R140</sup> , <i>PTPN11</i> , <i>TET2</i> , CN	Favorable en ausencia de <i>FLT3</i> -ITD y <i>DNMT3A</i> mutado
<i>FLT3</i> -ITD	20	<i>NPM1</i> , <i>DNMT3A</i> , CN, t(15;17)/ <i>PML-RARA</i> , t(6;9)/ <i>DEK-NUP214</i> , t(5;11)/ <i>NUP98-NSD1</i>	Adverso si <i>NPM1</i> germinal y ratio alto de <i>FLT3</i> -ITD ( $\geq 0.5$ )
<i>FLT3</i> -TKD	7-8	inv(16)/ <i>CBFB-MYH11</i> , t(15;17)/ <i>PML-RARA</i> , <i>NPM1</i>	Variable según el estudio
<i>CEBPA</i> bialélico	1-5	<i>GATA2</i> , <i>WT1</i> , <i>CSF3R</i> , CN	Favorable
<i>RUNX1</i>	5-20	<i>SRSF2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>MLL</i> , <i>IDH2</i> , -7/7q, +13	Adverso
<i>ASXL1</i>	5-18	<i>RUNX1</i> , <i>IDH2</i> <sup>R140</sup> , t(8;21)/ <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , +8, -7/7q-	Adverso
<i>TP53</i> *	5-20	Cariotipo complejo, cariotipo monosómico, -5/-5q, -7/-7q, -17/17p	Adverso
<i>DNMT3A</i>	15-30	<i>NPM1</i> , <i>FLT3</i> -ITD, <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , CN	Variable según el estudio y las mutaciones asociadas. Particular mal pronóstico: <i>DNMT3A</i> <sup>mut</sup> / <i>NPM1</i> <sup>mut</sup> / <i>FLT3</i> -ITD <sup>pos</sup>
<i>TET2</i>	5-25	<i>NPM1</i> , CN	En algunos estudios se asocia a una menor supervivencia
<i>IDH1</i>	6-10	<i>NPM1</i> , CN	Posible efecto adverso en LMA <i>FLT3</i> -ITD-neg
<i>IDH2</i> <sup>R140</sup>	5-15	<i>NPM1</i> , CN	Favorable
<i>IDH2</i> <sup>R172</sup>	1-4	Mutuamente exclusivo con la mutación de <i>NPM1</i>	Variable según el estudio
<i>NRAS</i>	15	<i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> bialélico, inv(16)/ <i>CBFB-MYH11</i> , t(v;11q23.3), inv(3)/t(3;3)	Genotipo <i>NPM1</i> <sup>mut</sup> / <i>NRAS</i> <sup>G12/13</sup> asociado a evolución favorable en un estudio

## I. INTRODUCCIÓN

Gen mutado	Frecuencia %	Mutaciones / alteraciones cromosómicas asociadas	Pronóstico
<i>KRAS</i>	5	inv(16)/ <i>CBFB-MYH11</i> , 11q23/ <i>MLL-X</i>	No significativo
<i>KIT</i>	4	t(8;21)/ <i>RUNX1/RUNX1T1</i> , inv(16)/ <i>CBFB-MYH11</i>	Peor en LMA-CBF
<i>MLL-PTD</i>	5	+11, CN, <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i>	Adverso
Spliceosoma ( <i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i> )	No establecida	Hematopoyesis clonal	Pendiente confirmar su significado clínico, pero en algunos estudios asociado a mal pronóstico
Genes del complejo cohesina ( <i>STAG2</i> , <i>RAD21</i> , <i>SMC1A</i> , <i>SMC3</i> )	No establecida	<i>NPM1</i> , t(8;21)	Pendiente confirmar su significado clínico

CN; cariotipo normal. \*Incluye mutaciones y deleciones del gen.

En un estudio reciente de Papaemmanuil *et al.*<sup>104</sup> sobre 1540 pacientes con LMA, se han identificado 11 categorías moleculares con implicaciones pronósticas (ver Tabla 9 y Figura 9), combinando el análisis de 111 mutaciones en genes asociados a neoplasia mieloide con datos citogenéticos y clínicos. Además de los subgrupos de LMA ya definidos previamente, emergen tres nuevas categorías: LMA con mutaciones en genes que modifican la cromatina y en genes del spliceosoma, o ambos (en el 18% de los pacientes); LMA con mutaciones en *TP53*, aneuploidías cromosómicas o ambas (en 13%); y, provisionalmente, LMA con mutaciones de *IDH2*<sup>R172</sup> (en 1%).

El subgrupo de LMA con mutaciones en genes modificadores de la cromatina, del spliceosoma o ambos, está definido por las mutaciones en genes que regulan la cromatina (*ASXL1*, *STAG2*, *BCOR*, *MLL-PTD*, *EZH2* y *PHF6*), el *splicing* de RNA (*SRSF2*, *S3B1*, *U2AF1* y *ZRSR2*) o la transcripción (*RUNX1*). Los pacientes incluidos en este

## I. INTRODUCCIÓN

subgrupo son de edad avanzada con un recuento leucocitario bajo, con frecuencia tienen antecedentes de displasia y presentan un mal pronóstico.

El grupo de pacientes con mutaciones en *TP53*, aneuploidías cromosómicas o ambas, de forma similar al subgrupo previo, no está definido por una sola alteración genética. Dichos pacientes presentan aneuploidías (-5/5q-, -7/7q-, -17/-17p-, -12/12p), que están correlacionadas entre ellas y con la presencia de mutaciones en *TP53*. Presentan una edad avanzada y de forma más frecuente LMA secundarias y muestran una peor evolución clínica.

También se identificó un pequeño subgrupo de pacientes con mutaciones en *IDH2*<sup>R172</sup>; esta categoría se estableció como provisional, en base a su mutua exclusividad con la mutación de *NPM1* y a no presentar otras alteraciones asociadas al resto de subgrupos genómicos.

Tabla 9. Clasificación genómica de la LMA. Adaptado de Papaemmanuil *et al.*<sup>104</sup>.

Subgrupo genómico	Frecuencia (%) N=1540
LMA con mutación de <i>NPM1</i>	418 (27)
LMA con mutaciones en genes modificadores de la cromatina, del spliceosoma o ambos†	275 (18)
LMA con mutaciones en <i>TP53</i> , aneuploidías cromosómicas, o ambos††	199 (13)
LMA con <i>inv(16)(p13.1q22)</i> o <i>t(16:16)(p13.1;q22)</i> ; <i>CBFB-MYH11</i>	81 (5)
LMA con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i>	66 (4)
LMA con <i>t(15;17)(q22;q12)</i> ; <i>PML-RARA</i>	60 (4)
LMA con <i>t(8;21)(q22;q22)</i> ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	60 (4)
LMA con reordenamiento de <i>MLL</i> ; <i>t(v;11)(v;q23)</i>	44 (3)
LMA con <i>inv(3)(q21q26.2)</i> o <i>t(3;3)(q21q26.2)</i> ; <i>GATA2</i> , <i>MECOM (EVI1)</i>	20 (1)
LMA con mutaciones en <i>IDH2</i> <sup>R172</sup> sin otras alteraciones asociadas al resto de subgrupos genómicos	18 (1)
LMA con <i>t(6;9)(p23;q34)</i> ; <i>DEK-NUP214</i>	15 (1)

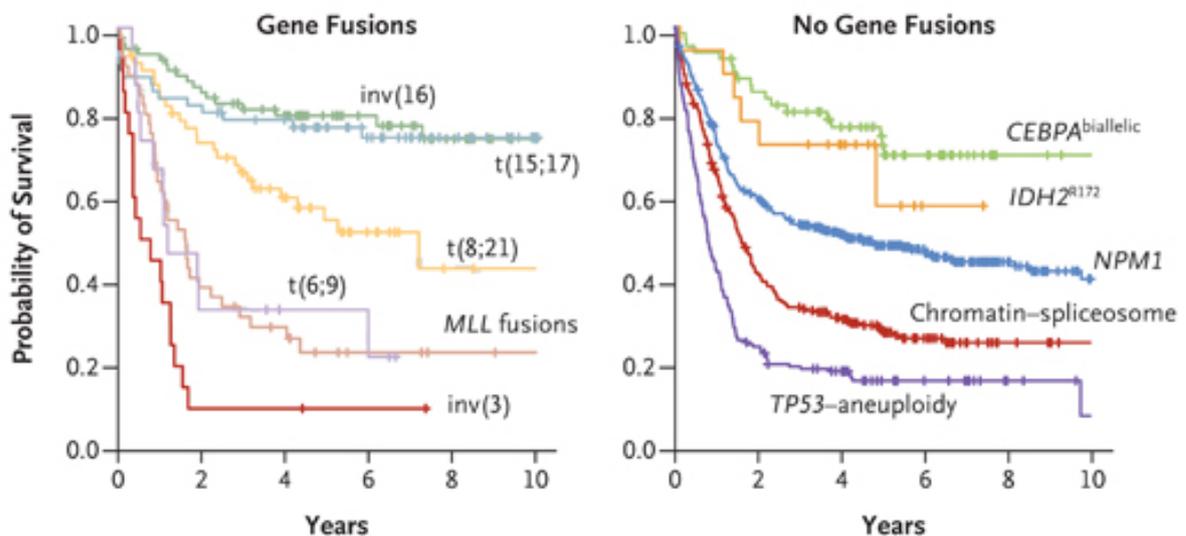
## I. INTRODUCCIÓN

<b>LMA con mutaciones <i>driver</i> sin otras alteraciones asociadas al resto de subgrupos genómicos</b>	166 (11)
<b>LMA sin mutaciones <i>driver</i> detectadas</b>	62 (4)
<b>LMA que cumple criterios para <math>\geq</math> dos subgrupos genómicos</b>	56 (4)

† La clasificación en este grupo requiere una mutación *driver* o más en *RUNX1*, *ASXL1*, *STAG2*, *BCOR*, *MLL-PTD*, *EZH2*, *PHF6*, *SRSF2*, *S3B1*, *U2AF1* y *ZRSR2*. En presencia de otras alteraciones asociadas al resto de subgrupos genómicos, como *inv(16)*, *t(15;17)*, *t(8;21)*, *t(6;9)*, reordenamientos de *MLL*, cariotipo complejo o mutaciones en *TP53*, *NPM1* o *CEBPA<sup>bialélico</sup>*, se requerirán 2 o más mutaciones de genes modificadores de la cromatina-spliceosoma.

†† La clasificación en este grupo requiere mutación en *TP53*, cariotipo complejo o, en ausencia de alteraciones definitorias de categoría, una o más de las siguientes: *-7/7q-*, *-5/5q*, *-4/4q*, *-9q*, *-12/12p*, *-17/-17p*, *-18/18q*, *-20/20q*, *+11/11q*, *+13*, *+21* o *+22*.

Figura 9. Supervivencia global según las categorías genómicas establecidas por Papaemmanuil *et al.*<sup>104</sup>.



Un grupo de expertos de ámbito internacional, en nombre de la *European LeukemiaNet* (ELN), propuso un sistema de clasificación pronóstica de los pacientes con LMA que además ayudara a guiar el tratamiento. Esta primera clasificación, escrita en 2010, correlacionaba la citogenética y algunas alteraciones moleculares con datos clínicos<sup>105</sup>. El aspecto más novedoso de la clasificación de la ELN es que dividió a los pacientes con

## I. INTRODUCCIÓN

LMA-CN en subgrupos genéticos según el estado mutacional de *NPM1*, *FLT3* y *CEBPA*.

En múltiples estudios se ha comprobado la capacidad predictiva de esta clasificación<sup>56,106-108</sup>.

Recientemente se ha publicado una actualización de esta clasificación (ver Tabla 10), teniendo en cuenta los últimos datos publicados, en la que se categoriza a los pacientes en 3 subgrupos de riesgo: favorable, intermedio y adverso. A diferencia de la clasificación anterior, los pacientes con mutación bialélica de *CEBPA* se consideran de riesgo favorable independientemente de las alteraciones citogenéticas asociadas, ya que se ha observado que la coexistencia de estas mutaciones con alteraciones cromosómicas no modifica su efecto pronóstico<sup>109-111</sup>. Además, en el subgrupo de riesgo favorable se han incluido a los pacientes con *NPM1* mutado, pero sin *FLT3*-ITD o con un ratio de alelo mutado bajo<sup>55,112,113</sup>. Por otro lado, también hay cambios en el subgrupo de riesgo adverso, que ahora incluye a aquellos pacientes con *NPM1* germinal y con un ratio alto de *FLT3*-ITD<sup>112</sup> y aquellos pacientes con mutaciones de *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53* y cariotipos monosómicos<sup>12</sup>.

Tabla 10. Estratificación pronóstica de la LMA según la clasificación de la ELN 2017<sup>12</sup>.

Grupo genético	Subgrupos
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Mutación <i>NPM1</i> sin <i>FLT3</i> -ITD o con <i>FLT3</i> -ITD con ratio de alelo mutado bajo*
	Mutación bialélica de <i>CEBPA</i>
<b>Intermedio</b>	Mutación <i>NPM1</i> y <i>FLT3</i> -ITD con ratio de alelo mutado alto
	<i>NPM1</i> germinal sin <i>FLT3</i> -ITD o con <i>FLT3</i> -ITD con ratio de alelo mutado bajo (sin alteraciones genéticas de pronóstico adverso)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>

## I. INTRODUCCIÓN

	Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
<b>Adverso</b>	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM (EVI1)</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); <i>KMT2A (MLL)</i> reordenado
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	-5 o del(5q); -7; -17/anomalías de 17p (abn(17p))
	Cariotipo complejo‡, cariotipo monosómico‡
	<i>NPM1</i> germinal y con <i>FLT3</i> -ITD con ratio alto de alelo mutado**
	<i>RUNX1</i> mutado
	<i>ASXL1</i> mutado
	<i>TP53</i> mutado

\*Ratio alélico de *FLT3* bajo: <0,5, determinado por análisis de fragmentos en DNA.

\*\*Ratio alélico de *FLT3* alto: ≥0,5, determinado por análisis de fragmentos en DNA.

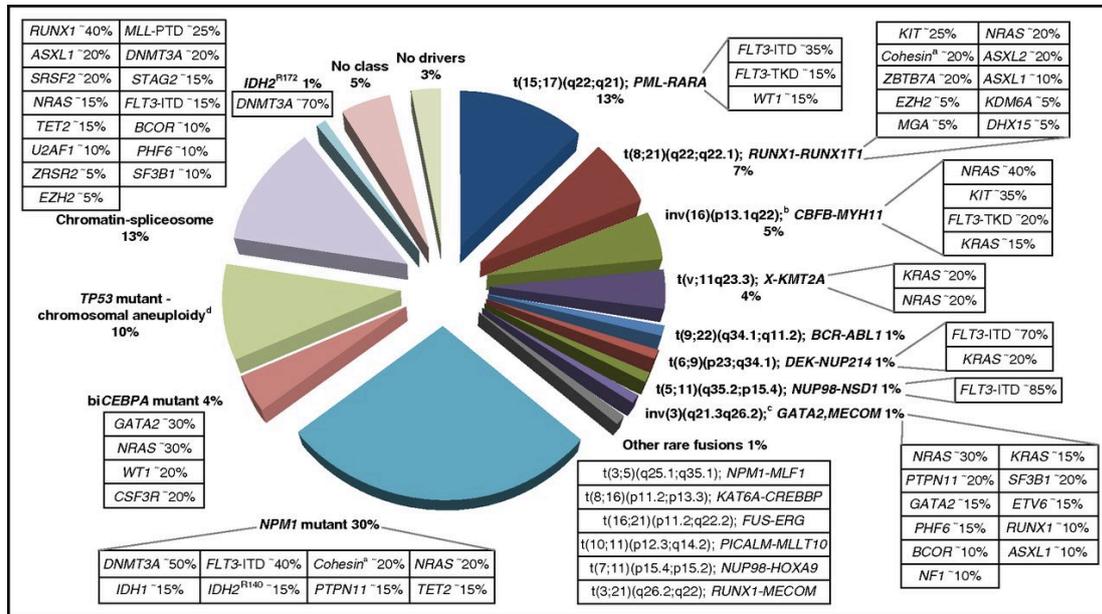
‡Cariotipo complejo: tres o más alteraciones cromosómicas que no incluyan las translocaciones o inversiones recurrentes definidas por la OMS: t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(15;17), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) o t(3;3); LMA con *BCR-ABL1*.

‡Cariotipo monosómico: presencia de una monosomía (excluyendo la pérdida de X y de Y) con al menos otra monosomía adicional o una alteración cromosómica estructural asociada (excluyendo las LMA-CBF).

En suma, con el análisis de grandes cohortes de pacientes y el estudio de patrones de exclusividad mutua entre las características citogenéticas y moleculares, la mayoría de los casos de LMA se pueden clasificar (ver Figura 10)<sup>12,26,46,104</sup>. Aun así, la alta complejidad resultante de múltiples interacciones entre varias mutaciones con un impacto pronóstico diferente conduce a una amplia diversidad de diferentes subgrupos moleculares que se opone a la formulación de un sencillo modelo de pronóstico basado en la detección de mutaciones.

## I. INTRODUCCIÓN

Figura 10. Distribución de la LMA en adulto joven (<65 años) según subgrupos definidos por las alteraciones citogenéticas y moleculares subyacentes (gráfico circular); las mutaciones colaboradoras asociadas más frecuentes se muestran en las casillas respectivas. Las frecuencias mutacionales derivan de la integración de datos de estudios previos. Adaptado de las recomendaciones 2017 de la *European LeukemiaNet (ELN)*<sup>12,26,46,104</sup>.



### 1.7.5. Enfermedad residual mínima

Los factores pronósticos comentados hasta el momento corresponden a variables detectables en el momento del diagnóstico, pero la determinación precisa de la cinética de reducción de la población leucémica durante el tratamiento, que conocemos conceptualmente como análisis de la enfermedad residual mínima o medible (ERM), es un factor pronóstico con gran potencial predictivo del fracaso o éxito del tratamiento. La determinación de la ERM se entiende como la detección de células leucémicas por encima de un cierto punto de corte, definido para cada metodología aplicada para medirla. Existen diferentes técnicas para medir la ERM, siendo las más utilizadas en la actualidad la citometría de flujo multiparamétrica, basada en la caracterización de un fenotipo aberrante asociado a la población leucémica, y las técnicas moleculares,

## I. INTRODUCCIÓN

incluyendo la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), la PCR digital y tecnologías basadas en la secuenciación masiva<sup>114</sup>. Las técnicas moleculares nos permiten monitorizar la presencia de dianas moleculares específicas de leucemia como los genes de fusión *CBF* (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*), la mutación de *NPM1*, *BCR-ABL1* o genes sobreexpresados en LMA como *BAALC* y *WT1*. Estas técnicas nos ayudan a identificar los pacientes con mayor riesgo de recaída, en los que es aconsejable intensificar el tratamiento. En consecuencia, la monitorización de la ERM permite refinar la estratificación pronóstica basada en variables iniciales y contribuye a una mejor aplicación del tratamiento adaptado al riesgo<sup>115</sup>. Varios estudios avalan la utilidad del uso de la ERM en LMA<sup>116</sup>.

### 1.7.6. Expresión aberrante de genes individuales

Además de las mutaciones, se ha identificado como marcador pronóstico en la LMA la expresión desregulada de genes implicados en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular como *BAALC*, *ERG*, *MN1*, *WT1* y *EVI1*.

#### 1.7.6.1. Expresión de *BAALC*

El gen *BAALC* (*Brain and Acute leukemia, cytoplasmatic*) se localiza en 8q22.3 y codifica para una proteína de función desconocida muy conservada a lo largo de la evolución. La función de *BAALC* en el sistema hematopoyético, así como su contribución en la leucemogénesis no es bien conocida<sup>117</sup>. Se ha propuesto que *BAALC* produce un bloqueo de la diferenciación mieloide y, por lo tanto, necesitaría una segunda mutación que proporcione una ventaja proliferativa para inducir la leucemia.

## I. INTRODUCCIÓN

La elevada expresión de *BAALC* se descubrió originalmente en un estudio de perfil de expresión génica de LMA con trisomía 8, pero posteriormente también se encontró en otras LMA y en la leucemia linfoblástica aguda (LLA)<sup>118</sup>.

La expresión elevada de *BAALC* se ha correlacionado con mutaciones como *FLT3*-ITD, *MLL*-PTD, mutaciones en *RUNX1* y en *WT1* y altos niveles de expresión de *ERG*, *MN1* y del microRNA mir-3151, y se ha relacionado con mal pronóstico, especialmente en LMA-CN<sup>119-121</sup>. Además, la sobreexpresión de *BAALC* está asociada a un perfil de expresión génica específico, con aumento de expresión de genes involucrados en resistencia a fármacos (*MDR1*) y a marcadores de *stem cell* hematopoyética (CD34, CD133, KIT)<sup>122</sup>.

### 1.7.6.2. Expresión de *MN1*

El gen *MN1* se localiza en 22q11 y codifica para un complejo co-activador de la transcripción<sup>123</sup>.

La sobreexpresión de *MN1* es un factor pronóstico independiente en pacientes con LMA y citogenética normal, asociado a una mala respuesta a la quimioterapia de inducción y a una supervivencia libre de enfermedad (SLE) y una SG más cortas<sup>124,125</sup>.

También encontramos una elevada expresión de *MN1* en leucemias con inv(16)/t(16;16), donde actuaría como evento secundario en el proceso de leucemogénesis<sup>126,127</sup>.

### 1.7.6.3. Expresión de *ERG*

*ERG* está localizado en 21q22. Este gen pertenece a la familia de factores de transcripción ETS y actúa como oncogen y está sobreexpresado en pacientes con leucemia<sup>128</sup>. La sobreexpresión de *ERG* está asociada a un peor pronóstico, especialmente en LMA con mutación de *NPM1* sin *FLT3*-ITD<sup>129,130</sup>.

### 1.7.6.4. Expresión de *EVI1*

## I. INTRODUCCIÓN

Localizado en 3q26.2, codifica para una proteína que está involucrada en la regulación de factores de transcripción críticos para la hematopoyesis y es esencial para la autorrenovación de las células madre hematopoyéticas<sup>131</sup>. En la LMA de riesgo intermedio, la sobreexpresión de *EVI1* está asociada a peor pronóstico<sup>132</sup>. El aLoTPH en primera RC parece proporcionar una mejor supervivencia<sup>133</sup>.

### 1.8. Expresión génica

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías que permiten el estudio global del genoma, y pueden analizar tanto el número de copias génicas, la presencia de mutaciones, o el perfil de expresión génica de una determinada patología.

El estudio del perfil de expresión génica (PEG) o del transcriptoma mediante la tecnología de los *microarrays* ha sido una herramienta indispensable en el estudio de las neoplasias hematológicas, incluyendo las leucemias<sup>134</sup>. La aplicación del PEG en la leucemia aguda ha mostrado utilidades diagnósticas, pronósticas y terapéuticas<sup>135,136</sup>. Así, el análisis no supervisado de los datos obtenidos permite agrupar las muestras según su similitud en la expresión de genes y descubrir, de esta manera, subtipos de enfermedades con perfiles génicos diferenciados (*class discovery*). En cambio, con el análisis supervisado se comparan subtipos previamente definidos; de esta manera se pueden construir perfiles predictivos de un determinado subtipo, que permitirán la detección de casos biológicamente homólogos en muestras independientes (*class prediction*). Por otro lado, también se pueden identificar PEG asociados con pronóstico, y con respuesta o resistencia a diferentes tratamientos e identificar nuevas dianas diagnósticas o terapéuticas.

El primer estudio realizado en pacientes con leucemia aguda fue llevado a cabo por Golub *et al.*<sup>137</sup>, que observó como un PEG determinado permitía distinguir las leucemias

## I. INTRODUCCIÓN

de estirpe mieloide de las LLA. Posteriormente, otros trabajos realizados con *microarrays* confirmaban las diferencias biológicas entre algunos subgrupos morfológicos de LMA<sup>138,139</sup> y algunos subtipos citogenéticos conocidos, como la LPA, las LMA-CBF y las leucemias con reordenamiento del gen *MLL*<sup>119,140-143</sup>. En 2005 se inició un programa de investigación multicéntrico internacional, el estudio *Microarray Innovations in Leukemia (MILE)*, dirigido a la identificación de biomarcadores basados en PEG en 2143 pacientes con leucemia y displasia mieloide<sup>144</sup>. En una primera fase, de forma retrospectiva, se incluyeron 542 casos de LMA y se clasificaron, con una especificidad del 99%, todos los subtipos de leucemia. La segunda fase prospectiva del estudio, con 1152 casos, también alcanzó esa alta especificidad para distinguir entre LMA con cariotipo complejo, LMA-CN y LMA con otras anomalías, t(15;17), inv(16), t(8;21) y t(11q23).

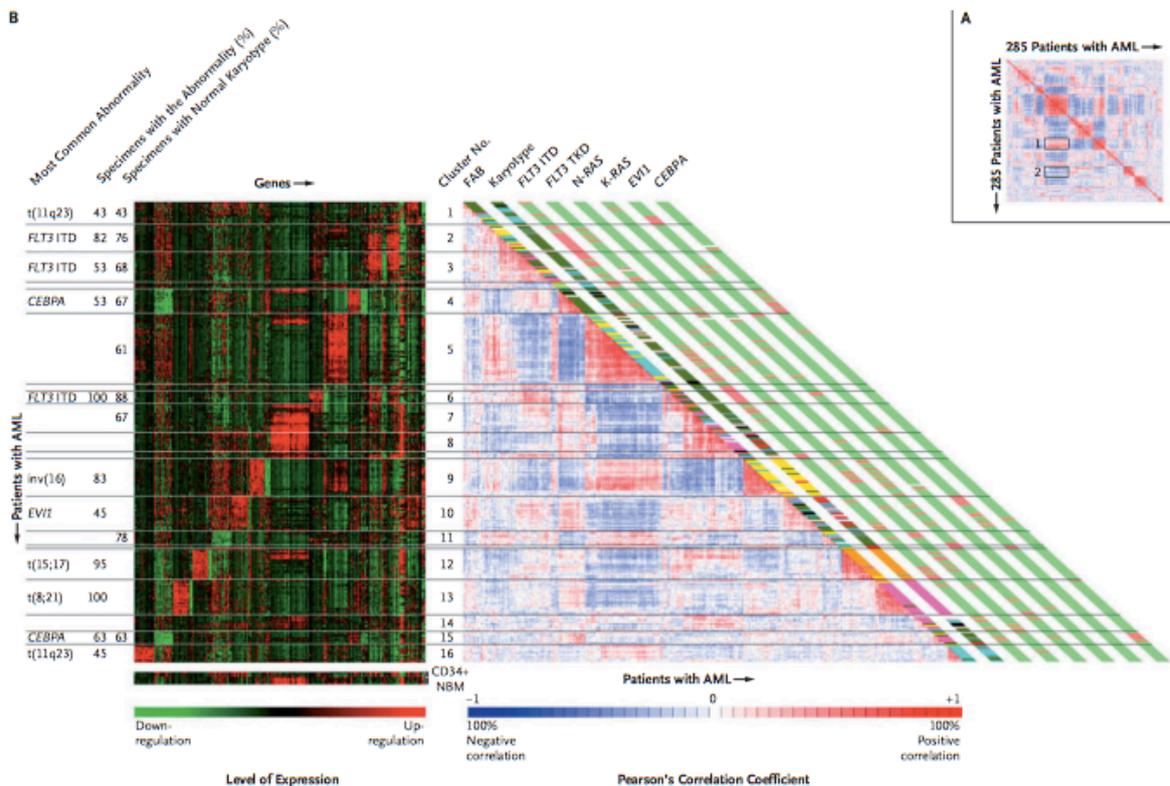
Otros estudios también han identificado perfiles específicos en casos de LMA-CN definidos por mutaciones en diferentes genes como *NPM1*<sup>145</sup>, *CEBPA*<sup>61</sup>, *FLT3*<sup>146</sup>, *IDH2*<sup>147</sup>, *TET2*<sup>148</sup>, *ASXL1*<sup>149</sup> y *RUNX1*<sup>73</sup>. Sin embargo, también se ha demostrado que no todas las alteraciones tienen un perfil de expresión sólido, y se ha sugerido que de forma general los PEG más robustos se asocian a mutaciones iniciadoras (*driver*), por ejemplo, en *CEBPA* y *NPM1*<sup>150</sup>.

Su aplicación en la leucemia aguda también ha permitido reconocer nuevos subgrupos con diferente evolución clínica<sup>151</sup>. En este sentido, un estudio fundamental es el realizado por Valk *et al.* con 285 muestras de pacientes con LMA. Mediante un análisis no supervisado seleccionando 2856 genes, diferenciaron 16 grupos o *clusters* de expresión génica diferente, la mayoría de los cuales correlacionaban con alteraciones citogenéticas/moleculares conocidas (ver Figura 11). Sin embargo, en cinco de los 16

## I. INTRODUCCIÓN

*clusters* no se encontró una correlación con una anomalía molecular definida hasta la fecha, con lo que se identificaban nuevos subtipos de LMA con perfiles de expresión génica característicos. Además, estos subgrupos se traducían en diferencias significativas en la SG de los pacientes.

Figura 11. Análisis no supervisado mediante agrupamiento jerárquico de 285 casos de LMA. Adaptado de Valk.<sup>151</sup>



Por otro lado, algunos estudios demostraron que el nivel de expresión de un conjunto determinado de genes se correlacionaba con una peor evolución de los pacientes<sup>152</sup>. Así, Bullinger y cols. identificaron un perfil de expresión de 133 genes que permitía estratificar a los pacientes en dos grupos con diferente pronóstico<sup>153</sup>. El valor pronóstico de esta firma génica fue confirmado en un estudio con pacientes con LMA-CN<sup>154</sup>. En otro estudio<sup>155</sup>, se identificaron 66 genes que ofrecían información pronóstica adicional en

## I. INTRODUCCIÓN

los pacientes con LMA y cariotipo normal. También, un meta-análisis realizado en 4 cohortes de LMA independientes identificó una firma génica que incluía 24 genes, lo que permitía refinar la clasificación según el riesgo para LMA propuesta por la *European LeukemiaNet*<sup>156</sup>.

Dos estudios clave demostraron que las subpoblaciones celulares de LMA enriquecidas en células madre leucémicas (*Leukemic Stem Cells*, LSC) tenían una firma de expresión génica distinta y que dichos perfiles tenían valor pronóstico<sup>157,158</sup>. Concretamente, Eppert *et al.* observaron que el perfil de LSC compartía algunas características con el de las células madre hematopoyéticas normales<sup>158</sup>. De forma interesante, ambas firmas fueron predictivas de supervivencia y compartían genes como *MECOM*, *ERG*, *FLT3* y *BAALC*, que ya se habían asociado a mal pronóstico en la LMA. En un estudio independiente, Metzeler *et al.* validaron el valor pronóstico del PEG de tipo LSC en pacientes con LMA-CN; aquellos con un score de LSC de mayor riesgo presentaban una menor tasa de respuesta, de SLE y de SG. Además, estos pacientes presentaban un mayor porcentaje de blastos en médula ósea, *FLT3*-ITD, mutaciones en *WT1* y *RUNX1*, sobreexpresión de *BAALC*, *ERG* y mir-155. Por otro lado, dicho PEG también se asociaba con un perfil de expresión de microRNA específico<sup>159</sup>. Estos estudios apoyan la teoría de la célula madre leucémica para la patogénesis de LMA e indican que las características biológicas a nivel celular y transcriptómico son relevantes en la evolución clínica.

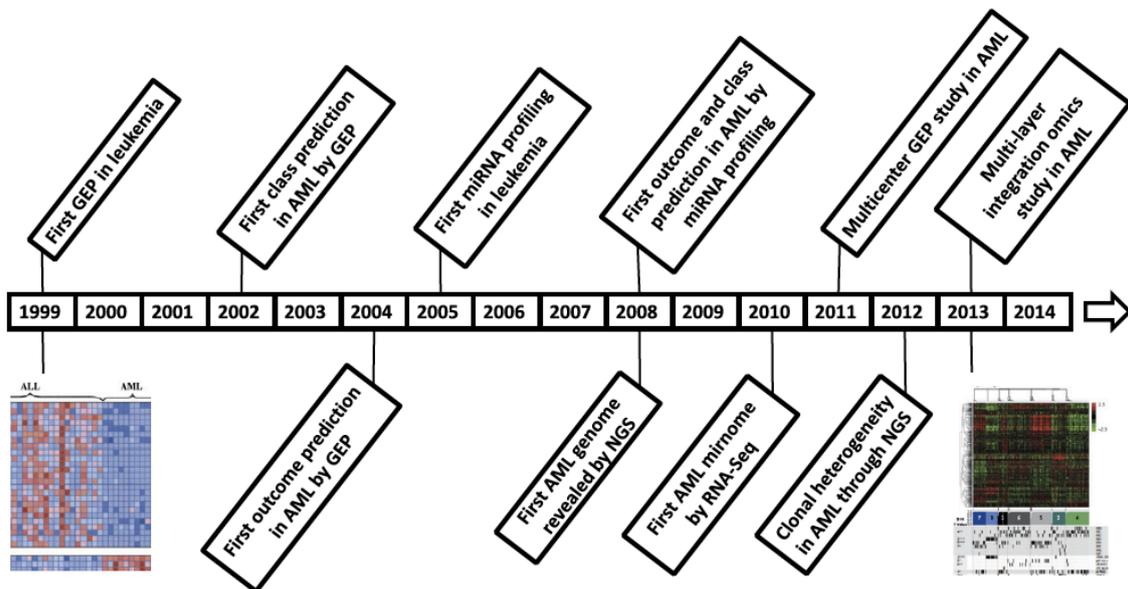
Otros estudios para predecir el pronóstico se han centrado en los estudios de PEG de RNA no codificante como los microRNA y los RNA largos no codificantes (*long non-coding RNA*, *lnc-RNA*). La mayoría de estos estudios se han realizado en pacientes con CN y aportan información pronóstica independiente<sup>160-162</sup>. En otros estudios se han

## I. INTRODUCCIÓN

identificado firmas génicas asociadas a la respuesta al tratamiento de inducción<sup>163</sup> o fármacos específicos<sup>164</sup>.

Durante los últimos 15 años, los PEG se han convertido en una plataforma de gran valor para investigar el transcriptoma de la LMA (Figura 12), aunque actualmente se está extendiendo el uso de la tecnología RNA-seq, un método de secuenciación masiva<sup>165</sup>, para estos estudios. Pero la integración de los datos *ómicos* obtenidos mediante diferentes aproximaciones incluyendo los de *microarrays* puede ayudar a conocer mejor la patogénesis de la LMA<sup>25</sup> y también al desarrollo de nuevos esquemas pronósticos<sup>104</sup>, y en un futuro el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces.

Figura 12. Cronología de algunos hitos del estudio del transcriptoma en LMA, que empezó en 1999 con el estudio de Golub *et al.*<sup>137</sup>, y recientemente alcanzó otro momento destacado con la publicación del estudio TCGA<sup>25</sup>. Adaptado de Shivarov<sup>134</sup>.



GEP: *gene expression profiling*, perfil de expresión génica, NGS: *next generation sequencing*.

### 1.9 Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con LMA debe ajustarse teniendo en cuenta las características del paciente: edad, estado general y enfermedades asociadas<sup>166</sup>. La

## I. INTRODUCCIÓN

evaluación de estos factores de riesgo nos ayudará a identificar a aquellos pacientes candidatos o no a recibir un tratamiento intensivo<sup>92</sup>. El tratamiento tiene dos fases: la primera es el tratamiento de inducción, cuyo objetivo es la obtención de la RC, y la segunda es el tratamiento de consolidación/post-remisión, cuya finalidad es evitar la recidiva.

### 1.9.1. Pacientes candidatos a tratamiento intensivo

#### 1.9.1.1. Tratamiento de inducción

El tratamiento de inducción estándar consiste en una quimioterapia con esquema "3+7", basado en una combinación de tres días de un antraciclínico (fundamentalmente, daunorrubicina 60-90 mg/m<sup>2</sup> ó idarrubicina 12 mg/m<sup>2</sup>) y 7 días de citarabina (100-200 mg/m<sup>2</sup> en infusión continua IV). Con este esquema, la mayoría de pacientes jóvenes (<60 años), entre un 60 y un 80%, alcanzan una RC inicial<sup>105,167,168</sup>.

No se ha demostrado beneficio del uso de análogos de purinas (fludarabina, clofarabina), ni de la estrategia conocida como *priming* o quimiosensibilización mediante G-CSF y tampoco de la adición de un tercer agente (etopósido) durante esta primera fase del tratamiento.

#### 1.9.1.2 Terapias dirigidas.

En los últimos años se han desarrollado nuevos compuestos en el tratamiento de la LMA, entre ellos cabría destacar las moléculas que se dirigen a dianas específicas de la enfermedad, como los inhibidores de FLT3 y de IDH1/2<sup>169</sup>.

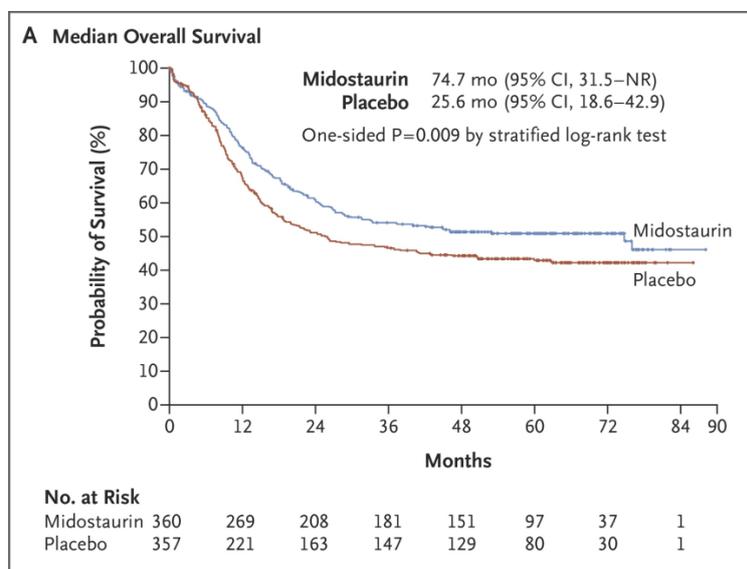
Más concretamente, en el tratamiento de la LMA existen múltiples moléculas inhibitoras de tirosin-quinasas que han demostrado su eficacia a nivel *in vitro* en diferentes estudios y algunas de ellas como midostaurin, lestaurtinib, sorafenib, quizartinib, gilteritinib y crenolanib se encuentran en fases avanzadas de ensayos

## I. INTRODUCCIÓN

clínicos (fases II/III)<sup>170-176</sup>. Recientemente se ha aprobado el uso de una de ellas, midostaurin, combinado con quimioterapia intensiva, en aquellos pacientes con *FLT3* mutado.<sup>177</sup>

Los resultados de combinar midostaurin o placebo con el tratamiento de inducción y de consolidación intensivos, en pacientes con LMA y *FLT3* mutado de 18 a 60 años, se evaluaron en el ensayo RATIFY<sup>177</sup>. En un total de 717 pacientes, se aleatorizó el uso de midostaurin vs. placebo: 360 pacientes fueron asignados al grupo de midostaurin y 357 al grupo placebo. El uso de midostaurin aumentó la SG (*hazard ratio*, HR: 0,78; p=0,009), y la SLE (HR: 0,78; p=0,002), independientemente de si los pacientes recibieron o no un aloTPH (Figura 13).

Figura 13. Supervivencia global de los pacientes en el ensayo RATIFY, que evaluó los resultados del tratamiento con midostaurin o placebo en pacientes con LMA y *FLT3* mutado<sup>177</sup>.



### 1.9.1.3. Tratamiento consolidación/post-remisión

El tratamiento de consolidación o post-remisión comprende todo el tratamiento adicional administrado con el fin de evitar una recidiva leucémica, sea la administración

## I. INTRODUCCIÓN

de ciclos de quimioterapia adicionales, basados por lo general en dosis altas de citarabina, un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (autoTPH), o un aloTPH. El tratamiento post-remisión se ajusta en función de los hallazgos citogenéticos y moleculares al diagnóstico y la respuesta al tratamiento determinada fundamentalmente a nivel molecular en los pacientes con marcadores moleculares identificados (*NPM1*, *CBF*) o mediante análisis mediante citometría multiparamétrica del inmunofenotipo de médula ósea (Tabla 11).

Tabla 11. Tratamiento post-remisión en pacientes con LMA (adaptado de las recomendaciones del 2017 del grupo de la ELN<sup>105</sup>).

Grupo genético ELN	Grupos moleculares	Tratamiento post-CR1 recomendado
<b>Favorable</b>	<i>t(8;21)/RUNX1(AML1)-RUNX1(ETO)</i> <i>inv(16)/CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mut sin <i>FLT3-ITD</i> ó <i>FLT3-ITD</i> con ratio bajo Mutación bialélica de <i>CEBPA</i>	HiDAC  Papel autoTPH? Considerar aloTPH si ERM+ Impacto de los inhibidores de tirosin-quinzas (TKIs)?
<b>Intermedio</b>	<i>NPM1</i> mut <i>FLT3-ITD</i> con ratio alto <i>NPM1</i> germinal sin <i>FLT3-ITD</i> ó <i>FLT3-ITD</i> con ratio bajo <i>t(9;11)(p21;q23);MLL2(AF9)-KMT2A(MLL)</i>	AloTPH en RC1  Papel autoTPH? Considerar NO aloTPH si ERM-? Impacto de los TKIs?
<b>Adverso</b>	<i>inv(3)/t(3;3)/RPN1-EVI1</i> <i>t(6;9)/DEK-NUP214(CAN)</i> -5/del(5q), -7, anomalías (17p), cariotipo monosómico o complejo <i>t(v;11q23)/Otros reordenamientos MLL</i> <i>NPM1</i> germinal con <i>FLT3-ITD</i> con ratio alta <i>RUNX1</i> mutado <i>ASXL1</i> mutado <i>TP53</i> mutado	AloTPH en RC1  AloTPH en fase avanzada? Mantenimiento post aloTPH? Tratamiento experimental

HiDAC: *high doses Ara-C*

## I. INTRODUCCIÓN

### *1.9.1.3.1. Consolidación con quimioterapia intensiva*

Los regímenes de consolidación incluyen citarabina a altas dosis sin otros fármacos y poliquimioterapia con resultados similares.

La administración de hasta 4 ciclos de altas dosis de citarabina (HiDAC), 1000-3000 mg/m<sup>2</sup>, normalmente 6 dosis por ciclo, es ampliamente utilizada. Sin embargo, en estudios recientes se ha cuestionado que los regímenes de citarabina a 3000 mg/m<sup>2</sup> sean más efectivos que los regímenes con dosis intermedias a 1000 a 1500 mg/m<sup>2</sup>, con o sin antraciclínico asociado<sup>178</sup>. Así, en un estudio aleatorizado que incluyó 933 pacientes, de 15 a 60 años, comparando una consolidación con mitoxantrone y citarabina a 3000 mg/m<sup>2</sup> (cada 12 horas durante 6 días) vs. una quimioterapia similar, pero con dosis intermedias de citarabina a 1000 mg/m<sup>2</sup> para la consolidación, no se observaron diferencias en el resultado<sup>179</sup>. De forma similar, en un estudio con múltiples aleatorizaciones en inducción, la comparación del tratamiento post-remisión entre citarabina 3000 mg/m<sup>2</sup> y 1500 mg/m<sup>2</sup> (n=657), no demostró diferencias en la supervivencia<sup>180</sup>. Además, ninguno de estos estudios ha demostrado un beneficio evidente al utilizar regímenes con altas dosis de citarabina en pacientes con LMA de riesgo citogenético favorable.

Todavía es una cuestión a debate el número óptimo de ciclos que debe tener el tratamiento de consolidación. En la mayoría de los estudios se administran de 2 a 4 ciclos después de alcanzar la RC.

La quimioterapia intensiva post-remisión ha demostrado tener beneficio en subtipos de riesgo más favorable. En cambio, en pacientes de alto riesgo, especialmente en pacientes ancianos no tiene un beneficio claro<sup>181</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

### *1.9.1.3.2. Quimioterapia intensiva seguida de trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos*

El tratamiento post-remisión también incluye el uso de quimioterapia a altas dosis seguida de un autoTPH usando, por lo general, progenitores de médula ósea o, más recientemente, células CD34 positivas obtenidas de la sangre periférica<sup>182</sup>. En un estudio aleatorizado se observó que el autoTPH ofrecía una mejor supervivencia libre de recaída (SLR) que la consolidación con quimioterapia, pero con una SG similar<sup>183</sup>. En otros estudios retrospectivos también se ha demostrado que el autoTPH se asocia a una mejor SLE y SLR que la quimioterapia. Este efecto es especialmente evidente en pacientes de riesgo favorable e intermedio (principalmente según los criterios de la ELN de 2010) donde el resultado después del autoTPH es equiparable al aloTPH en términos de SG<sup>109,184,185</sup>.

Los resultados de este procedimiento podrían mejorar limitando su uso a aquellos pacientes sin ERM.

### *1.9.1.3.3. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos*

La LMA es la indicación más frecuente de aloTPH, con un aumento anual del 10% en los trasplantes realizados en todo el mundo<sup>186,187</sup>. La mayor disponibilidad de donantes HLA idénticos y fuentes alternativas, como donantes haploidénticos sin depleción linfocitaria T y de sangre de cordón, ha hecho que la gran mayoría de pacientes dispongan de un donante. Además, los acondicionamientos no-mieloablativos o de intensidad reducida (RIC) permiten realizar aloTPH en pacientes mayores, de hasta 65-70 años.

La decisión de realizar un aloTPH depende del riesgo-beneficio estimado (mortalidad no relacionada con la recaída/morbilidad vs. reducción del riesgo de recaída), basado en las

## I. INTRODUCCIÓN

características citogenéticas y moleculares, así como en los factores relacionados con el paciente, el donante y el procedimiento<sup>188-191</sup>. Los pacientes con LMA de riesgo genético favorable no son candidatos, *a priori*, a recibir un aloTPH en primera RC<sup>55,112,113,188,191,192</sup>. El aloTPH está recomendado cuando la incidencia de recaída esperada sin el procedimiento es superior al 30-40%. Así, los pacientes con alto riesgo genético, con un alto riesgo de recidiva tras la quimioterapia, pueden beneficiarse de realizar un trasplante alogénico en primera RC. En este sentido, el aloTPH es la única opción curativa en los pacientes refractarios.

El tratamiento óptimo post-remisión en los pacientes de riesgo intermedio no está bien establecido. En este grupo de pacientes, el estudio de nuevos biomarcadores puede ayudar a definir mejor el pronóstico y por tanto facilitar la decisión sobre si ofrecer o no un aloTPH en primera RC. Además, la incorporación de nuevos agentes como los inhibidores de FLT3 podría llevar a reconsiderar indicaciones ya establecidas.

El seguimiento de la ERM por citometría de flujo o qRT-PCR también puede ayudar a guiar el tratamiento. Aquellos pacientes con ERM persistente o con ERM que reaparece de forma precoz, pueden recibir tratamiento de rescate y trasplante antes de una recaída hematológica, o directamente el trasplante, dependiendo de la probabilidad de respuesta con el tratamiento de rescate. Aunque el aloTPH a menudo produce resultados superiores a la quimioterapia, no anula el efecto negativo de la genética adversa o la ERM pretrasplante<sup>185,193</sup>. Los pacientes sin ERM o genética no favorable, pero con alto riesgo de mortalidad no relacionada con recaída, podrían beneficiarse de quimioterapia o autoTPH en primera RC<sup>194,195</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.9.1.4 Otros fármacos:

1.9.1.4.1. Gemtuzumab ozogamicina. El papel de gemtuzumab ozogamicina (GO), que conjuga un anticuerpo dirigido a CD33 con una toxina (calicheamicina), es controvertido. Existen dos estudios aleatorizados que usan una dosis única de GO durante la quimioterapia en pacientes con LMA *de novo* menores de 60 años y que no demuestran de forma general un aumento de la SG<sup>196,197</sup>. Sin embargo, ambos estudios sugieren que la adición de GO se asocia a una mayor SLE en el subgrupo de pacientes de riesgo favorable con alteraciones del CBF. En el segundo estudio (MRC-AML15), se observó además una mejor evolución en aquellos casos con citogenética de riesgo intermedio. Por otro lado, dos estudios en pacientes ancianos, en los que se administraba GO durante la inducción, demostró una mejor supervivencia debido a un menor número de recaídas en aquellos pacientes con citogenética favorable y de riesgo intermedio<sup>197,198</sup>. Un meta-análisis con 3325 pacientes con LMA no tratada (edad 18-84 años) de 5 estudios aleatorizados, incluyendo los anteriormente citados, confirmó que el GO combinado con una quimioterapia de inducción estándar mejora la SG de los pacientes de riesgo citogenético favorable e intermedio<sup>199</sup>. En cambio, un estudio en pacientes de 61 a 75 años encontró una menor supervivencia en la rama con GO, reflejando una mayor mortalidad temprana en aquellos pacientes entre 70 y 75 años<sup>200</sup>. La dosis y el esquema de administración de GO son críticos para una óptima relación beneficio-toxicidad. Actualmente GO sólo está disponible en ensayos clínicos y mediante programas de uso compasivo patrocinado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA).

1.9.1.4.2. CPX-351. CPX-351 consiste en una formulación lipídica de citarabina y daunorrubicina en una proporción sinérgica molar de 5:1<sup>201</sup>. Los estudios de fase 2

## I. INTRODUCCIÓN

sugirieron un efecto beneficioso del agente en el tratamiento de primera línea de la LMA secundaria y relacionada con el tratamiento, y en los pacientes con LMA recaída de peor pronóstico<sup>202</sup>. Posteriormente se realizó un ensayo fase 3 aleatorizado, con 309 pacientes de 60 a 75 años de edad con LMA de alto riesgo, definida como LMA relacionada con el tratamiento y LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, que comparaba CPX-351 con una inducción "3+7". En este estudio se confirmó que CPX-351 produce una tasa de respuestas superior (RC/RC con recuperación hematológica incompleta (RCi), 47,4% vs. 33,3%, p=0,016), y una SG más larga que la inducción "3+7" (HR: 0,69; p=0,005 con medianas de 9,6 vs. 6 meses, tasas de supervivencia a los 2 años de 31% y 12%, respectivamente)<sup>203</sup>. CPX-351 puede mejorar el tratamiento de los pacientes ancianos con características de alto riesgo<sup>204</sup>.

### 1.9.2. Pacientes no candidatos a tratamiento intensivo

Las alternativas terapéuticas en aquellos pacientes no candidatos a tratamiento intensivo son: tratamiento de soporte, tratamiento de baja intensidad, o fármacos en investigación incluidos en ensayos clínicos.

El tratamiento de baja intensidad incluye el tratamiento con dosis bajas de citarabina o con agentes hipometilantes. El tratamiento con dosis bajas de citarabina, en general, se tolera bien y consigue unas tasas de RC alrededor del 15 al 25%, pero con una SG muy baja (5-6 meses de mediana)<sup>205</sup>.

Los agentes hipometilantes que han demostrado mejorar la evolución de los pacientes en ensayos clínicos aleatorizados son decitabina y azacitidina. En un estudio aleatorizado se observó un incremento de la mediana de la SG (7,7 vs. 5,0 meses) en los pacientes que recibían decitabina vs. dosis bajas de citarabina<sup>206</sup>. El ensayo AZA-AML-

## I. INTRODUCCIÓN

001 comparó la azacitidina con 3 tratamientos estándar en pacientes de  $\geq 65$  años con  $>30\%$  de blastos: dosis bajas de citarabina (158 pacientes), 3+7 (44 pacientes), o tratamiento de soporte (45 pacientes); la azacitidina aumentó la mediana de supervivencia (10,4 vs. 6,5 meses)<sup>207</sup>. Además, la azacitidina parece particularmente útil en los pacientes con LMA y citogenética adversa<sup>208</sup>. Para observar la máxima respuesta con decitabina o azacitidina pueden necesitarse hasta 6 ciclos de tratamiento, aunque aquellos pacientes sin respuesta después de 3 ciclos es improbable que respondan con ciclos adicionales<sup>209</sup>.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.9.3. Nuevos tratamientos

El tratamiento de la LMA es un importante campo en la investigación de nuevos fármacos<sup>167,210,211</sup>. Los nuevos tratamientos en desarrollo preclínico y clínico se pueden categorizar como: inhibidores de proteínas quinasa<sup>212</sup>, moduladores epigenéticos<sup>213,214</sup>, nuevos agentes citotóxicos<sup>215</sup>, inhibidores mitocondriales, tratamientos dirigidos a proteínas oncogénicas, inmunoterapia incluyendo anticuerpos y terapia celular<sup>216</sup> y terapias dirigidas al microambiente. Resumimos los más destacados en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12. Nuevos fármacos en desarrollo clínico.

<b>Diana molecular</b>	<b>Fármacos</b>
<b>HDAC (histona deacetilasa)</b>	Panobinostat, vorinostat, pracinostat
<b>POLO-2</b>	Volasertib
<b>MDM2</b>	Idasanutlin, HDM201, S-3032b
<b>cKIT</b>	TKIs (dasatinib)
<b>RAS</b>	Inhibidores de PI3K+MEK
<b>MLL</b>	Inhibidores de DOT1L (EPZ5676)
<b>FLT3</b>	Sorafenib, midostaurin, quizartinib, gilterinib, crenolanib
<b>IDH2</b>	AG-221 (enasidenib)
<b>IDH1</b>	AG120:FT2102
<b>CDKs</b>	Palbociclib (CDK4/6), alvocidib (CDK9)
<b>Topoisomerase 2</b>	Vosaroxin
<b>BCL-2</b>	Venetoclax
<b>Hedgehog sig-SMO</b>	Glasdegib
<b>NAE (NEDD8-activating enzyme)</b>	Pevonedistat

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 13. Inmunoterapia en LMA.

	<b>Agente</b>
<b>Anticuerpos monoclonales</b> <b>AntiCD33 (<i>naked</i>)</b> <b>AntiCD33 conjugado</b>	Gemtuzumab Ozogamycin Vadastuximab talirine (SGN-CD33A) Tlacotuzumab (JNJ-56022473)
<b>AntiCD123</b> <b>Biespecífico/dual CD3/CD33</b>	
<b>Inhibidores de <i>checkpoints</i></b>	Durvalumab (antiPD-L1)
<b>Vacunas</b> <b>AntiWT1</b>	
<b>Células CART</b> <b>AntiCD123, antiCD33, antiFLT3</b>	

## I. INTRODUCCIÓN

## II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

La leucemia mieloide aguda de riesgo citogenético intermedio constituye un grupo heterogéneo desde el punto de vista biológico y pronóstico. La elección del tratamiento post-remisión, basada en una estrategia terapéutica adaptada al riesgo, es por tanto particularmente difícil en esta categoría, en especial por lo que se refiere a la identificación de pacientes candidatos a un trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos en una fase precoz del tratamiento. Por ello, es necesaria la identificación de nuevos biomarcadores que mejoren la comprensión de los mecanismos de leucemogénesis subyacentes en estos pacientes y que, además, sirvan de guía en la elección de la terapia post-remisión.

La hipótesis de esta tesis se basa en la capacidad del análisis del perfil de expresión génica para identificar genes y vías de funcionalismo celular asociadas al pronóstico en pacientes con LMA de riesgo intermedio. La incorporación de estos genes en la evaluación pronóstica de la LMA puede contribuir a una elección más racional del tratamiento post-remisión de los enfermos incluidos en esta categoría.

Por otra parte, el análisis pronóstico de los perfiles de expresión génica puede proporcionar una información adicional a la derivada del estado mutacional de diversos genes recurrentemente mutados en la LMA, cuya complejidad y posibilidad de múltiples interacciones hace difícil la asignación pronóstica basada meramente en mutaciones individuales.

## II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Identificar nuevos genes cuyo nivel de expresión tenga un impacto pronóstico en la evolución de los pacientes con LMA y citogenética de riesgo intermedio.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión génica en un grupo de pacientes adultos con LMA de riesgo citogenético intermedio tratados homogéneamente.

1.1 Estudiar el perfil de expresión génica mediante *microarrays* o *arrays* de alta densidad de la población a estudio.

1.1.1 Análisis no supervisado de los datos.

1.1.2 Análisis supervisado del perfil de expresión distintivo según el resultado del autotrasplante (recidiva vs respuesta prolongada), con selección de un grupo de genes reducido con valor predictivo máximo del resultado de dicho procedimiento.

1.2 Validar la capacidad predictiva de este grupo de genes, y de una selección de genes descritos en la literatura, mediante la técnica de PCR cuantitativa con tarjetas microfluídicas (*arrays* de baja densidad) en un subgrupo de pacientes de características similares.

1.3 Estudiar, mediante análisis multivariado, el valor pronóstico del perfil de expresión génica obtenido de manera conjunta con otras variables pronósticas (edad, cifra de leucocitos al diagnóstico, hallazgos citogenéticos, estado mutacional de *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*).

1.4 Validar el perfil de expresión obtenido en una serie de pacientes independiente, incluidos en una plataforma pública que incluya datos de expresión génica e

## II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

información clínica suficiente para realizar un análisis de supervivencia significativo.

## II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



### III.MÉTODOS

### III.MÉTODOS

#### 1. Diseño general del estudio:

Se trata de un estudio retrospectivo caso-control, de análisis del perfil de expresión génica en una serie de pacientes con LMA de riesgo intermedio en edad adulta, con el objetivo final de identificar genes cuya expresión posea un impacto pronóstico en la evolución de los pacientes.

**Objetivo 1:** Análisis de la expresión génica en un grupo de pacientes adultos con LMA de riesgo citogenético intermedio tratados homogéneamente.

- 1ª fase: Análisis del perfil de expresión génica mediante *arrays* de alta densidad en pacientes con LMA sometidos a autoTPH según resultado del procedimiento.

- 2ª fase: Validación del valor predictivo de un conjunto de genes obtenidos en la 1ª fase y de genes previamente descritos en la literatura, en un segundo subgrupo de pacientes de las mismas características, mediante análisis del nivel de expresión con PCR cuantitativa "a tiempo real".

- 3ª fase: Análisis multivariado del pronóstico de la firma génica obtenida en el resultado del autoTPH de manera conjunta con otras variables pronósticas clínicas y biológicas (alteraciones citogenéticas, estado mutacional de *FLT3 (FLT3-ITD, NPM1 y CEBPA)*).

- 4ª fase: Validación de nuestros hallazgos pronósticos en una cohorte independiente de pacientes, incluidos en el repositorio público del *Leukemia Gene Atlas (LGA)*, <http://www.leukemiagene-atlas.org/LGAtlas>).

#### 2. Sujetos del estudio:

- **Objetivo 1:** Pacientes diagnosticados de LMA según criterios de la OMS, en el Hospital Clínic de Barcelona, o en otros centros del grupo cooperativo CETLAM, en el periodo comprendido desde el año 1988 hasta 2010 y en los que se dispusiera de material adecuado obtenido en el momento del diagnóstico. Se seleccionaron aquellos pacientes

### III.MÉTODOS

que habían recibido tratamiento de inducción estándar basado en una combinación de antraciclínicos y citarabina (protocolos LAM-88, LAM-94, LAM-99, LAM-03) y habían alcanzado la RC.

Se excluyeron específicamente aquellos pacientes con:

- Leucemia aguda promielocítica y leucemias-CBF
- Citogenética adversa según categoría del grupo MRC (cariotipo complejo, asociada a delección/monosomía cromosomas 5 y/o 7, asociada a alteraciones 3q26)
- Leucemia secundaria a mielodisplasia o síndrome mieloproliferativo crónico
- Contraindicación de quimioterapia intensiva

Así, para la primera fase del análisis se incluyeron 40 pacientes con LMA de riesgo citogenético intermedio sometidos a autoTPH en primera RC, con un seguimiento mínimo de 2 años. Esta cohorte contenía una proporción similar de pacientes con una respuesta prolongada y de pacientes que, por el contrario, presentaron una recidiva posterior.

La validación del conjunto de genes seleccionados en esta primera fase y de otros genes pronósticos previamente descritos en la literatura se realizó en un subgrupo de 49 pacientes con LMA de riesgo citogenético intermedio, algunos tratados con aloTPH como tratamiento post-remisión.

Para la validación de nuestros hallazgos pronósticos, utilizamos datos de una cohorte independiente de 79 pacientes con LMA de cariotipo normal que recibieron tratamiento intensivo, incluidos en el repositorio público del *Leukemia Gene Atlas* (LGA, <http://www.leukemiagene-atlas.org/LGAtlas>).

#### **3. Variables a analizar:**

Se analizaron las siguientes variables:

### III. MÉTODOS

#### 3.1. Variables clínico-hematológicas:

3.1.1. Al diagnóstico: edad, género, cifra de leucocitos, grado de infiltración medular, infiltración extramedular, subtipo FAB/OMS, citogenética, alteraciones moleculares (*FLT3-ITD*, mutaciones de *NPM1*, mutaciones de *CEBPA*).

3.1.2. Evolutivas: tratamiento de inducción recibido, número de ciclos para alcanzar la RC, tratamiento post-remisión, intervalo diagnóstico-trasplante, tipo de trasplante (autólogo/alogénico), régimen de acondicionamiento (radioterapia, régimen atenuado), fuente de progenitores hematopoyéticos (médula ósea/sangre periférica), donante (hermano HLA-idéntico/otro), número de células CD34+ del inóculo, depleción linfocitaria, recidiva, fecha de muerte o último contacto, causa de muerte, duración de la respuesta, supervivencia.

#### 4. Métodos:

- **Objetivo 1:** Análisis de la expresión génica en un grupo de pacientes adultos con LMA de riesgo citogenético intermedio tratados homogéneamente.

Objetivo 1.1: Análisis del perfil de expresión génica mediante *arrays* de alta densidad:

- Análisis de la calidad del RNA de las muestras a utilizar con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

- Uso de la plataforma U133A plus 2.0 de Affymetrix. La obtención de cRNA, su amplificación, fragmentación e hibridación se realizó siguiendo la metodología de Affymetrix.

- Lectura y normalización de la señal obtenida mediante la metodología *RMA* del paquete *Affy* (*Bioconductor Project*).

### III.MÉTODOS

- Análisis no supervisado (*unsupervised analysis*) de los datos mediante el método de representación de agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) y *principal component analysis*, mediante el software *TM4 Microarrays Software Suite* y *Limma* (Bioconductor).
- Análisis supervisado (*supervised analysis*) de las muestras incluidas según respuesta al autoTPH, comparando la firma génica de aquellos pacientes con una respuesta prolongada (definida como una RC de más de 2 años de duración) vs. recaída precoz (RC<2 años) mediante *TM4 Microarrays Software Suite* y *Limma* (Bioconductor).
- Selección de un conjunto de genes con mayor capacidad de diferenciación de los dos grupos de muestras, con  $p < 0.01$  y fold-change  $> 0.5$  como puntos de corte.

#### Objetivo 1.2: Validación de los resultados mediante *arrays* de baja densidad en una serie independiente de pacientes:

Validación de los resultados del análisis anterior (conjunto de genes predictivos del resultado del autoTPH), así como de una selección de otros genes con valor pronóstico descritos en la literatura, en un subgrupo independiente de pacientes. La validación se realizó por PCR cuantitativa a tiempo real (7900, Applied biosystems), con *arrays* de expresión de baja densidad (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando *primers* y sondas específicas diseñadas según el conjunto de genes a explorar y análisis con método  $2^{-ddCt}$ , utilizando el gen *GAPDH* como control y la mediana de expresión de todas las muestras como calibrador. Seleccionamos para el análisis los genes expresados en más del 10% de los pacientes. La expresión se analizó con el *software* BRB Array Tools version 4.2.0 (Richard Simon & BRB-ArrayTools Development Team, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). Se

### III.MÉTODOS

utilizó la herramienta Class Comparison para identificar aquellos genes diferencialmente expresados entre los pacientes respondedores y no respondedores. Para identificar aquellos genes cuya expresión se correlacionaba con la supervivencia se usó la herramienta Survival Analysis.

El punto de corte de los niveles de expresión de los genes que resultaron pronósticos que permitía diferenciar a los pacientes según su evolución se obtuvo con el paquete informático MaxStat del software R<sup>217</sup>. Se consideraron niveles de expresión génica alta o baja aquellos valores por encima o por debajo, respectivamente, del punto de corte calculado.

#### Objetivo 1.3: Análisis de otros factores biológicos individuales con valor pronóstico:

- Duplicación en tándem del gen *FLT3*: se utilizó una estrategia de RT-PCR previamente descrita<sup>218</sup> y se analizó el producto de amplificación mediante su lectura en un secuenciador automático. En caso de detección de la mutación, se analizó el tamaño (número de pares de bases) y la ratio de mutación, mediante la lectura del área bajo la curva de los picos mutado y germinal.

- Mutación del gen *NPM1*: se utilizó una RT-PCR previamente descrita<sup>219</sup> y se analizó el producto amplificado mediante electroforesis capilar.

- Mutación del gen *CEBPA*: a partir de DNA genómico se realizó la amplificación del gen en cuatro fragmentos mediante PCR<sup>220</sup>, seguida de su secuenciación directa mediante el método Sanger.

### III.MÉTODOS

Objetivo 1.4: Validar el perfil de expresión obtenido en una serie de pacientes independiente.

Validamos el impacto pronóstico del perfil de expresión obtenido en una serie de pacientes con LMA con cariotipo normal, incluidos en el repositorio público *Leukemia Gene Atlas* (LGA, <http://www.leukemiagene-atlas.org/LGAtlas>). Esta plataforma pública incluye datos de expresión génica e información clínica suficiente para realizar un análisis de supervivencia.

#### **5. Análisis estadístico de los datos:**

El análisis estadístico tuvo como objeto:

5.1 Identificar aquellos genes que se encontraban diferencialmente expresados en los pacientes según la respuesta, y aquellos genes cuya expresión se correlacionaba con la supervivencia.

5.2 Comparación de las principales características clínicas y biológicas de los subgrupos pronósticos derivados del análisis de expresión génica.

5.3 Análisis multivariado del valor pronóstico, que incluyó las principales variables de reconocido valor pronóstico (edad, sexo, cifra de leucocitos al diagnóstico, número de ciclos para alcanzar la RC, *FLT3-ITD*, mutación *NPM1*, mutación de *CEBPA*), junto con la asignación de la categoría de riesgo según el análisis de expresión génica descrito.

Los análisis del punto 5.1 han sido descritos en el apartado 4. Los análisis contemplados en los puntos 5.2 y 5.3 fueron realizados mediante el paquete informático SPSS v22 (SPSS, Chicago, IL, USA). Se incluyó la comparación de frecuencias mediante el test de chi-cuadrado o el test exacto de Fisher. Para variables cuantitativas se utilizó el test de

### III.MÉTODOS

Student y para el análisis de datos no paramétricos el test U de Mann-Whitney. Se obtuvieron curvas de supervivencia para todos los genes que resultaron pronósticos utilizando el punto de corte de expresión identificado mediante el paquete informático Maxstat del software R. La supervivencia global (SG) se calculó como el periodo desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del fallecimiento o del último control y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) desde la fecha de la remisión completa (RC) hasta la fecha de recaída, muerte o último control. Ambos parámetros se estimaron con el método de Kaplan y Meier y las diferencias entre grupos se compararon con el test de log-rank. El análisis multivariado se llevó a cabo mediante el método de regresión de Cox. Para todos los análisis el valor de la  $p$  se consideró estadísticamente significativo por debajo de 0,05.

### III.MÉTODOS



#### IV.RESULTADOS

#### IV.RESULTADOS

En este trabajo analizamos 89 pacientes con LMA-RI con el objetivo de encontrar nuevos biomarcadores para guiar la terapia posterior a la remisión. En nuestra serie la sobreexpresión de *BAALC*, *MN1*, *SPARC* y *HOPX* se correlacionó con refractariedad. Por otro lado, observamos que la sobreexpresión de *BAALC* o *ALDH2* correlacionaba con un SG más corta, mientras que la sobreexpresión de *GPR44* o *TP53INP1* se correlacionó con una mayor supervivencia. Un *score* combinando la expresión de estos cuatro genes permite distinguir pacientes de bajo riesgo y alto riesgo en nuestra cohorte y en una cohorte independiente de pacientes de un repositorio público. Nuestra firma de 4 genes puede añadir información pronóstica y guiar el tratamiento post-remisión de los pacientes con LMA-RI.

Los resultados de este trabajo se han publicado en febrero de 2018 en la revista *Leukemia & Lymphoma*<sup>221</sup>.

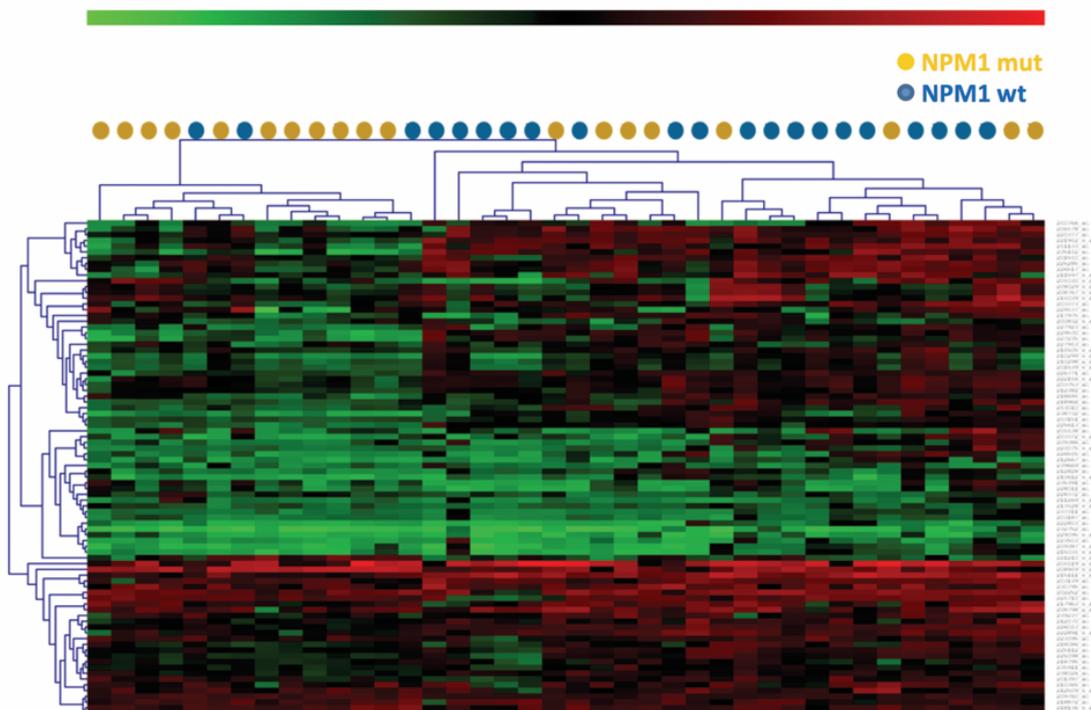
#### IV.RESULTADOS

Los principales resultados de este trabajo son:

##### ***Firma de expresión génica asociada a la respuesta al tratamiento post-remisión basado en estrategias no-aloTPH***

Para identificar genes predictivos de quimiosensibilidad y de respuesta tras el tratamiento post-remisión, analizamos el perfil de expresión génica de 40 pacientes diagnosticados de LMA (subgrupo A) en primera RC, tratados con protocolos del grupo CETLAM con quimioterapia y con un tratamiento post-remisión que no incluyera aloTPH (32 pacientes recibieron un autoTPH y 8 recibieron altas dosis de citarabina). El análisis no supervisado global agrupó los pacientes en dos ramas, de 14 y 26 pacientes, A y B respectivamente. Estas dos ramas tenían diferente proporción de pacientes con mutación de *NPM1*, la mayoría de ellos en la rama A (77% vs. 31%,  $p=0,02$ )(Figura 14), pero sin diferente pronóstico.

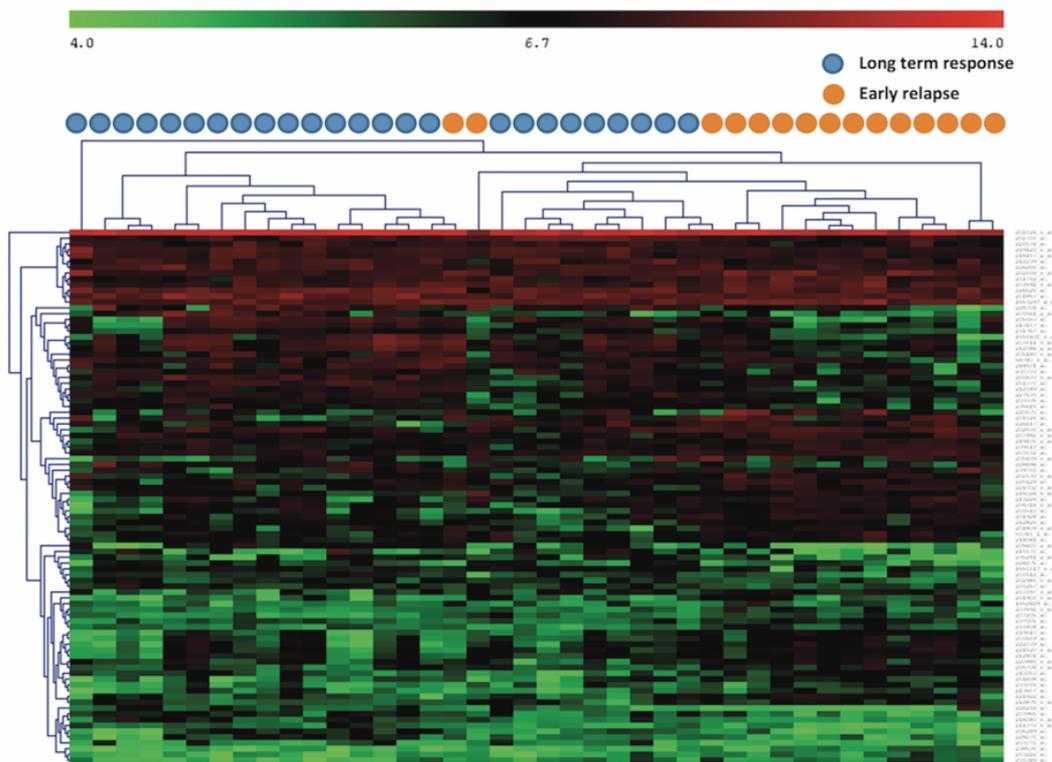
Figura 14. Análisis no supervisado del perfil de expresión génica realizado en 40 pacientes (subgrupo A).



#### IV.RESULTADOS

El análisis supervisado comparando los pacientes con respuesta mantenida vs. recaída precoz identificó una firma de 92 *probe* sets que correspondían a 75 genes diferencialmente expresados (Figura 15 y Tabla 14). Entre ellos, *HOXA4* y *HOXB2* se sobreexpresaron en pacientes de evolución favorable, mientras que *ENG*, *CDC7*, *CSF3R*, *ALDH2* y *RETN* se sobreexpresaron en el grupo desfavorable.

Figura 15. Análisis supervisado según la respuesta al tratamiento post-remisión. Círculos azules: largos respondedores, círculos naranja: recaída precoz.



IV.RESULTADOS

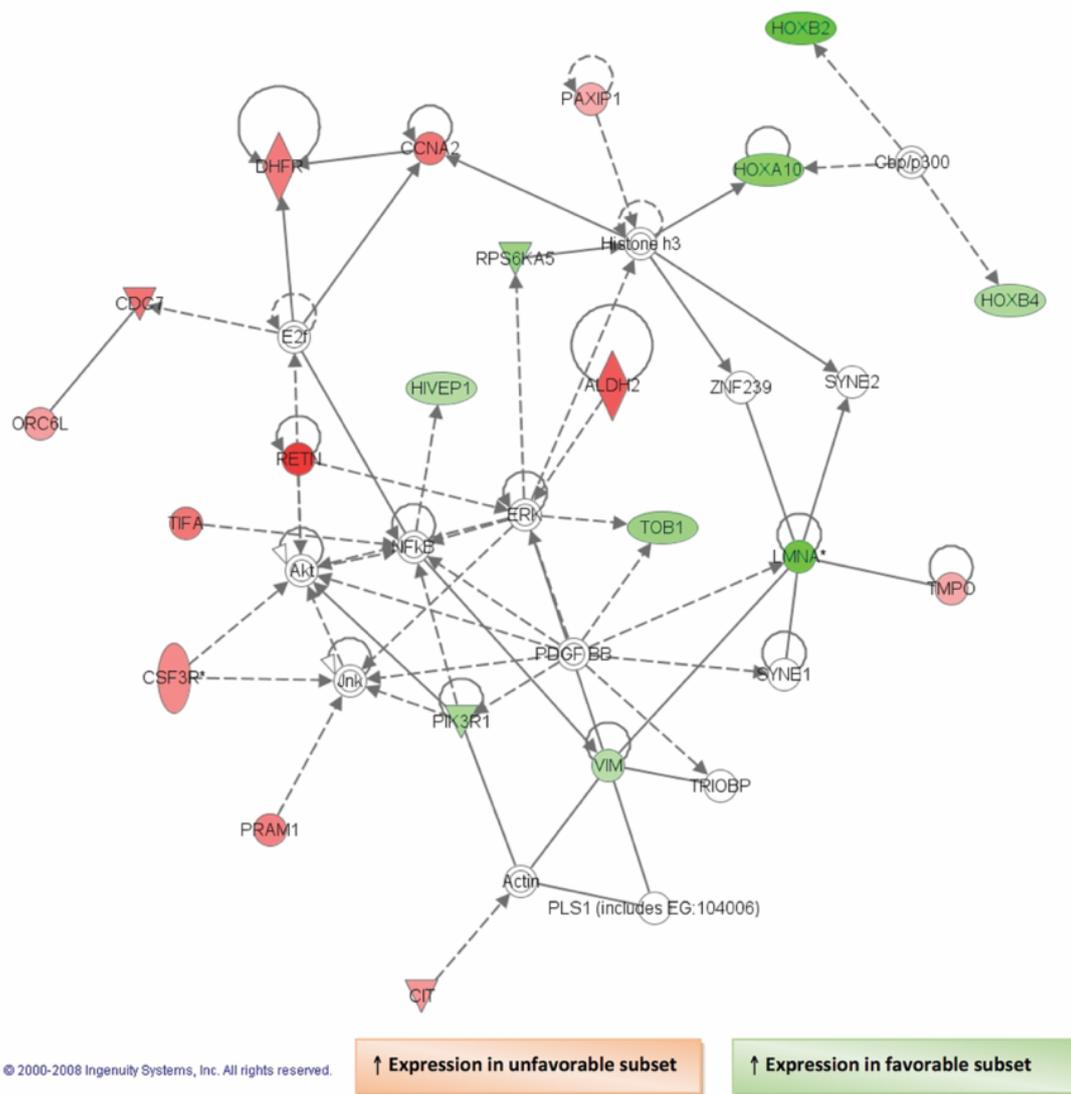
Tabla 14. Lista de genes expresados diferencialmente según la respuesta. Los criterios de selección de los genes fueron una  $p < 0,01$  y  $fold-change > 0,5$  como puntos de corte.

Genes sobreexpresados en largos respondedores n=35 genes	Genes infraexpresados en largos respondedores n=40 genes
<p>ADAM8 AHNAK ANXA8/ANXA8L1/ANXA8L2 APH1A APOC2/APOC4 ARHGEF3 BAG5 C9orf21 CDC42SE1 ERGIC1 FADS3 FL103577 HIVEP1 HOXA10 HOXA4 HOXB2 HOXB4 HOXB5 KCTD1 KIAA0649 KLRB1 LMNA LOC286052 PGGT1B PHYH PIK3R1 PSEN2 RAB27B RPS6KA5 SDSL SLC45A3 TOB1 VIM ZBTB33 ZFR</p>	<p>ALDH2 AMPD3 BZRAP1 C20orf27 CD21orf25 CCNA2 CDC7 CDCA8 CEACAM4 CEP152 CIT CPNE2 CSF3R CTDSP1 DHFR DNA2L ENG ETV6 FSTLE GALNT3 GPSM2 GRAMD1A KNTC1 LOC146909 LOC445075 ORC6L PAXIP1 PDSS1 PKP4 PLSCR1 POLE POL PRAM1 RETN TAF5 TIFA TMPO TROAP TRPM2 TSPAN14</p>

#### IV.RESULTADOS

Por otro lado, se analizaron las vías celulares que contenían los genes diferencialmente expresados según la respuesta al tratamiento post-remisión. Las vías involucradas se identificaron utilizando el software Ingenuity (IPA®) (Figura 16, Figura 17, Figura 18). En rojo se indican los genes sobreexpresados en el grupo desfavorable mientras que en verde se indican los genes infraexpresados en este grupo pronóstico. La intensidad de los colores de las moléculas verde y roja indica el grado de regulación hacia abajo o hacia arriba, respectivamente.

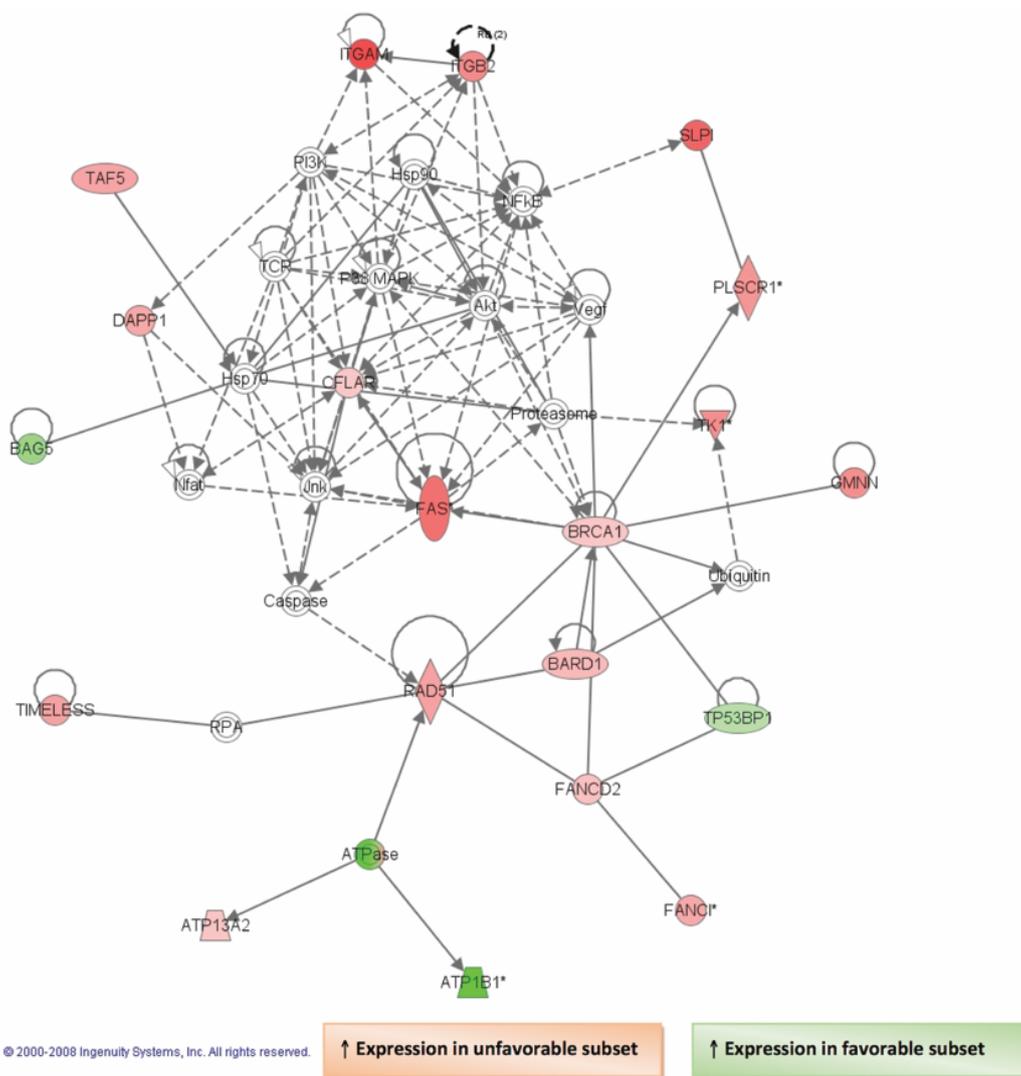
Figura 16. Red de genes, incluidos varios genes *HOX*, relacionados con la respuesta al tratamiento en la serie global (40 pacientes).



#### IV.RESULTADOS

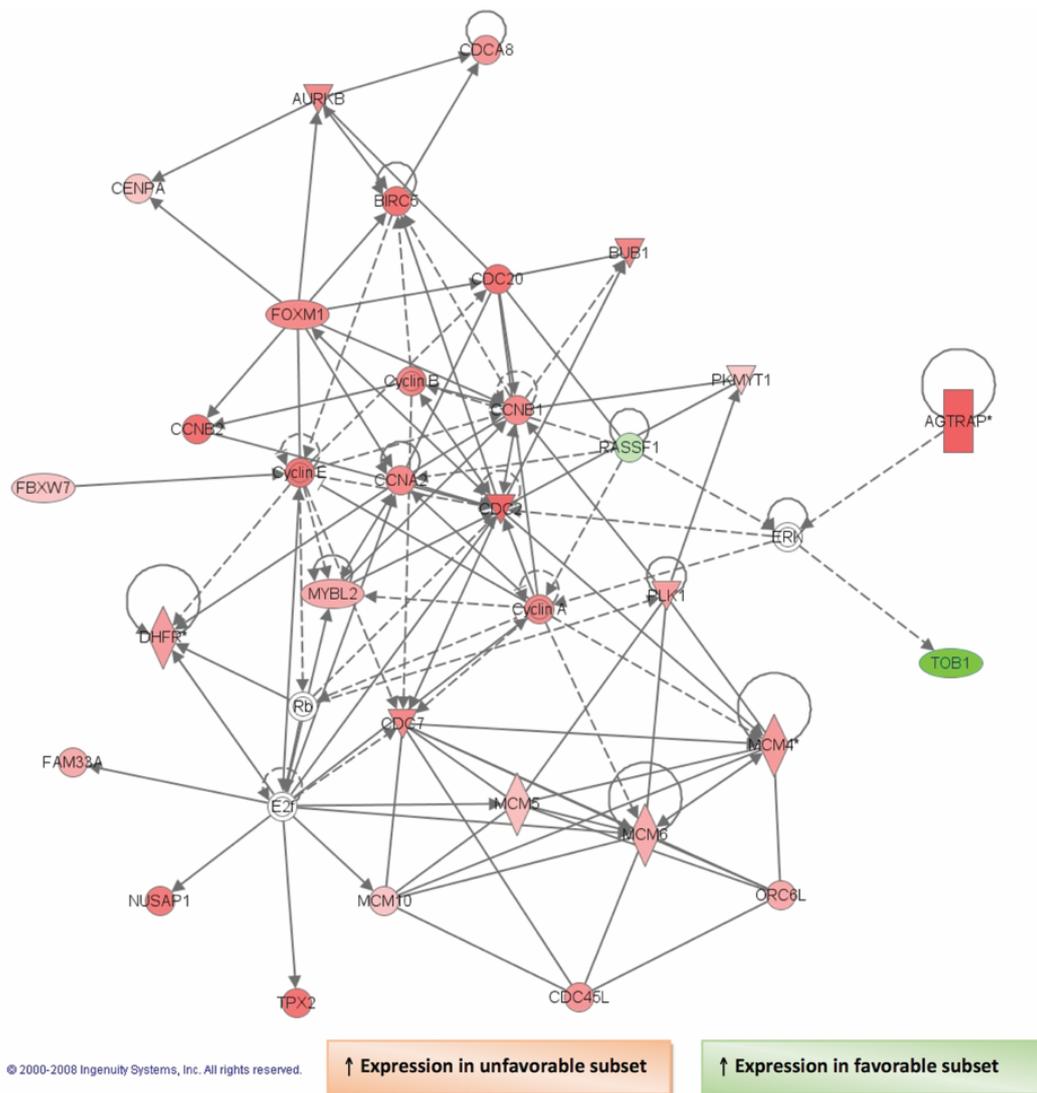
Dado el efecto pronóstico conocido de las mutaciones de *NPM1* y *FLT3-ITD*, se restringió el análisis a aquellos pacientes sin mutaciones en estos genes (n=19), la mayoría de ellos también sin mutación de *CEBPA*. En este subgrupo se identificaron 293 genes con expresión diferenciada según la evolución con el tratamiento post-remisión. Entre éstos, genes involucrados en apoptosis (*FAS*, *CFLAR*, *FAS*, *DAPP1* and *BRCA1*) y ciclo celular (*CDC7*, *CDC2*, *CCNA2*) estaban sobreexpresados en el grupo desfavorable.

Figura 17. Red de genes involucrados en vías de apoptosis en los pacientes con genotipo *NPM1wt* y sin *FLT3-ITD*.



#### IV.RESULTADOS

Figura 18. Red de genes involucrados en vías de proliferación celular en los pacientes con genotipo *NPM1wt* y sin *FLT3-ITD*.



Observamos que había 19 genes que se correlacionaban con la respuesta, tanto en la serie global como en el subgrupo *NPM1wt/FLT3-ITDneg* (Tabla 15). En contraste con la firma característica de los pacientes con *NPM1mut*, la expresión de los genes *HOX* fue baja en la cohorte *NPM1wt/FLT3-ITDneg* y no se correlacionó con la respuesta.

#### IV.RESULTADOS

Tabla 15. Lista de 19 genes diferencialmente expresados según la respuesta al tratamiento tanto en la serie global como en el subgrupo de pacientes *NPM1wt/FLT3-ITDneg*.

<i>LOC442075</i>	<i>LOC146909</i>	<i>TMPO</i>	<i>PSEN2</i>
<i>PLSCR1</i>	<i>ORC6L</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>BAG5</i>
<i>RETN</i>	<i>KNTC1</i>	<i>CEP152</i>	<i>ERGIC1</i>
<i>ENG</i>	<i>TROAP</i>	<i>POLQ</i>	<i>SLC45A3</i>
<i>PD531</i>	<i>CDC7</i>	<i>TOB1</i>	

#### ***Identificación de una firma pronóstica de 4 genes***

Para la validación de los resultados se estudiaron 187 genes en una serie adicional de 49 pacientes (subgrupo B)(Tabla 16) con LMA-RI mediante PCR cuantitativa con *arrays* de expresión de baja densidad (TaqMan® Low Density Arrays, Applied Biosystems). La mayoría de estos genes, 132, fueron seleccionados por su expresión diferencial en el estudio de *arrays* de alta densidad (Tabla 17). Además se incluyeron 55 genes por su papel oncogénico o pronóstico en la LMA descrito en la literatura (Tabla 18).

IV.RESULTADOS

Tabla 16. Principales características de los pacientes incluidos en el estudio. El subgrupo A corresponde a los pacientes incluidos en el estudio de PEG. El subgrupo B constituye una cohorte de LMA-RI independiente en la que se analizaron un grupo de genes seleccionados con valor pronóstico, resultantes del estudio de PEG, y genes con valor pronóstico descrito previamente en la literatura.

	<b>Subgrupo A</b> n (%)	<b>Subgrupo B</b> n (%)	
	n=40	n=49	p
<b>Características al diagnóstico</b>			
<b>Edad, años, mediana, (extremos)</b>	52 (17-68)	56 (22-71)	0,216
<b>Sexo (masculino/femenino)</b>	27/13 (67,5/32,5)	22/27 (44,9/55,1)	0,053
<b>Subtipo FAB</b>			
M1/M2	15 (37,5)	21 (42,8)	
M4/M5	20 (50)	24 (49)	
M6	3 (7,5)	0 (0)	
Otros	2 (5)	4 (8,2)	
<b>Leucocitos al diagnóstico, x10<sup>9</sup>/L mediana (extremos)</b>	38,9 (0,9-179)	28 (1,3-192)	0,220
<b>Citogenética</b>			0,5
Cariotipo normal	29 (72,5)	32 (65,3)	
Otras alteraciones de riesgo intermedio	11 (27,5)	17 (34,7)	
<b>Características moleculares</b>			
Mutación de <i>NPM1</i>	18 (45)	26 (53,1)	0,668
<i>FLT3</i> -ITD	7 (17,5)	20 (40,9)	0,021
Mutación bialélica de <i>CEBPA</i> *	4/13	2/13	0,370
<b>Categoría de riesgo según ELN<sup>a</sup></b>			0,274
Favorable	18	14	
Intermedio-I	16	25	
Intermedio-II	6	10	
<b>Tratamiento recibido</b>			
<b>Protocolo (grupo CETLAM)</b>			
CETLAM94	9 (22,5)	2 (4,1)	0,001
CETLAM99	17 (42,5)	11 (22,4)	
CETLAM2003	12 (30)	21 (42,8)	
Otros	2 (5)	15 (30,6)	
<b>Tratamiento post-remisión (RC1)</b>			
AloTPH	0 (0)	14 (28,6)	<0,0001
<b>Tratamiento no basado en alo-TPH</b>			
Quimioterapia basada en HiDAC	8 (22,5)	24 (49)	
AutoTPH	32 (77,5)	10 (20,4)	
TPH singénico	0 (0)	1 (2)	

IV.RESULTADOS

<sup>a</sup>ELN: *European LeukemiaNet*. \*Referido a los pacientes con genotipo *NPM1wt/FLT3-ITD* ausente. Las p valor estadísticamente significativas están en cursiva.

Tabla 17. Lista de los 132 genes diferencialmente expresados en el estudio del subgrupo de pacientes A.

<i>ADAM8</i>	<i>CDK1</i>	<i>FANCD2</i>	<i>KCTD1</i>	<i>PKM2</i>	<i>SCAPER</i>
<i>AHNAK</i>	<i>CEACAM4</i>	<i>FAS</i>	<i>KIAA0649</i>	<i>PKMYT1</i>	<i>SGMS1</i>
<i>ALDH2</i>	<i>CENPA</i>	<i>FBXO9</i>	<i>KIAA1715</i>	<i>PLAGL2</i>	<i>SIRPA</i>
<i>AMPD3</i>	<i>CENPM</i>	<i>FOXM1</i>	<i>LAPTM4A</i>	<i>PLK1</i>	<i>SLC45A3</i>
<i>ANXA8L2</i>	<i>CEP152</i>	<i>FSTL3</i>	<i>LMNA</i>	<i>PLK4</i>	<i>SPAG5</i>
<i>APH1A</i>	<i>CIRBP</i>	<i>FXVD6</i>	<i>LRG1</i>	<i>PLSCR1</i>	<i>SRGN</i>
<i>ARHGAP19</i>	<i>COMMD6</i>	<i>GALNT3</i>	<i>LST1</i>	<i>POLE</i>	<i>SUPT3H</i>
<i>ASAP1</i>	<i>CSF3R</i>	<i>GMNN</i>	<i>MCM4</i>	<i>PRAM1</i>	<i>TMED4</i>
<i>ATAD2</i>	<i>CSTA</i>	<i>GPR44</i>	<i>MKI67</i>	<i>PRR11</i>	<i>TMPO</i>
<i>AURKB</i>	<i>CTDSPL</i>	<i>GPSM1</i>	<i>MKNK1</i>	<i>PSEN2</i>	<i>TNFSF13B</i>
<i>BAG5</i>	<i>DDAH2</i>	<i>GPSM2</i>	<i>MRC1/MRC1L1</i>	<i>PTPN22</i>	<i>TOB1</i>
<i>BUB1</i>	<i>DHFR</i>	<i>GRAMD1A</i>	<i>MXD4</i>	<i>PXK</i>	<i>TP53INP1</i>
<i>C11orf31</i>	<i>DNMT1</i>	<i>H3F3B</i>	<i>MYBL2</i>	<i>PYGL</i>	<i>TPSB2/TPSAB1</i>
<i>C21orf57</i>	<i>DPH5</i>	<i>HIST1H2BD</i>	<i>NCAPD3</i>	<i>RAB27B</i>	<i>TPX2</i>
<i>C2CD2</i>	<i>DSN1</i>	<i>HIST2H4A/HIST2H4B</i>	<i>NCAPG2</i>	<i>RACGAP1</i>	<i>TRIM25</i>
<i>C7orf41</i>	<i>ECT2</i>	<i>HMGB2</i>	<i>NGFRAP1</i>	<i>RETN</i>	<i>TRIM45</i>
<i>CCNA2</i>	<i>ENG</i>	<i>HOXA10</i>	<i>NIPSNAP1</i>	<i>RNASE2</i>	<i>TROAP</i>
<i>CCNB2</i>	<i>ERGIC1</i>	<i>HOXA4</i>	<i>ORC6L</i>	<i>RNASE3</i>	<i>VIM</i>
<i>CDC42SE1</i>	<i>ESPL1</i>	<i>HOXB2</i>	<i>PAQR7</i>	<i>RP9</i>	<i>YPEL1</i>
<i>CDC7</i>	<i>ETV6</i>	<i>HOXB4</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>RPS6KA1</i>	<i>YPEL5</i>
<i>CDCA2</i>	<i>F11R</i>	<i>HOXB5</i>	<i>PGGT1B</i>	<i>RPS6KA5</i>	<i>ZBTB33</i>
<i>CDCA8</i>	<i>FAM107B</i>	<i>KCNMB4</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>RRM2</i>	<i>ZNF143</i>

#### IV.RESULTADOS

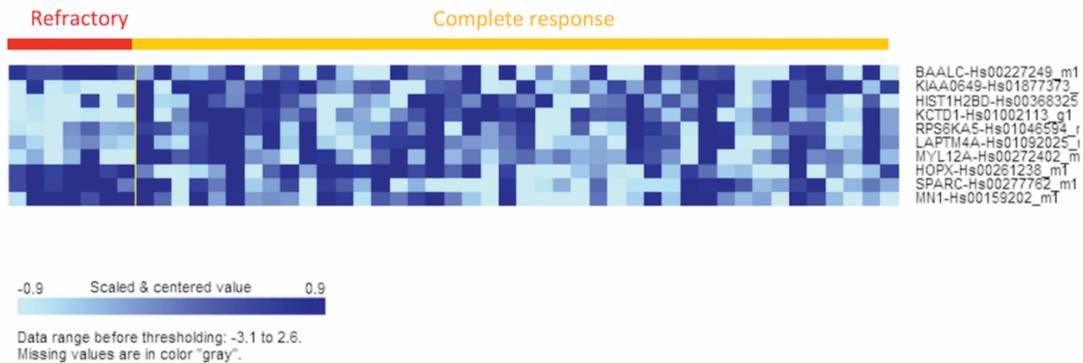
Tabla 18. Lista de 55 genes adicionales seleccionados según su función oncogénica y/o valor pronóstico en la LMA.

<i>ABCG2</i>	<i>ERG</i>	<i>KIAA0922</i>	<i>PTEN</i>
<i>AKT1</i>	<i>FAM38B</i>	<i>LGALS3</i>	<i>RAB13</i>
<i>BAALC</i>	<i>FHL1</i>	<i>LOXL1</i>	<i>RUNX1</i>
<i>BAX</i>	<i>FLT3</i>	<i>MARVELD1</i>	<i>SCD</i>
<i>BCAT1</i>	<i>FOXO3</i>	<i>MECOM</i>	<i>SLC25A37</i>
<i>BIRC3</i>	<i>GNG2</i>	<i>MEIS1</i>	<i>SOCS2</i>
<i>BMF</i>	<i>GOLGA8A-B</i>	<i>MIR155HG</i>	<i>SPARC</i>
<i>CD109</i>	<i>GUCY1A3</i>	<i>MN1</i>	<i>STON2</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>HBG1/HBG2</i>	<i>MRC1/MRC1L1</i>	<i>SYNJ2</i>
<i>CDX2</i>	<i>HIST1H3D</i>	<i>NGFRAP1</i>	<i>TCF4</i>
<i>CEBPA</i>	<i>HIST2H2AA3/HIST2H2AA4</i>	<i>PBX3</i>	<i>TM4SF1</i>
<i>CREBBP</i>	<i>HOPX</i>	<i>PDE4B</i>	<i>WBP5</i>
<i>CS</i>	<i>HOXA7</i>	<i>PIM1</i>	<i>WT1</i>
<i>CXCR4</i>	<i>HOXA9</i>	<i>PRAM1</i>	

Realizamos un análisis de *class comparison* con el software BRB Array Tools para identificar los genes diferencialmente expresados según la respuesta a la quimioterapia de inducción. Así, los pacientes que no alcanzaron la RC mostraban una sobreexpresión de los genes *BAALC*, *MN1*, *HOPX* y *SPARC* (Figura 19).

#### IV.RESULTADOS

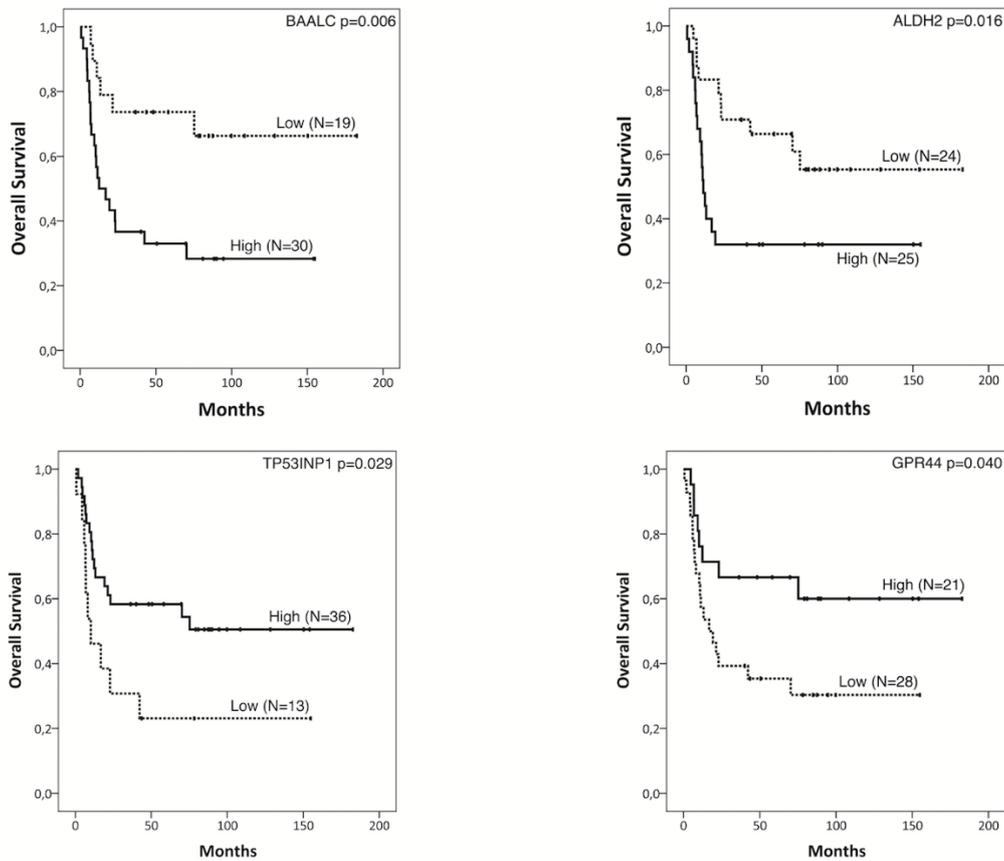
Figura 19. Mapa de calor con los 10 genes diferencialmente expresados en pacientes que no alcanzan la RC después de la quimioterapia de inducción estándar de primera línea.



También analizamos el impacto sobre la supervivencia de la expresión de los genes seleccionados mediante la herramienta Survival Analysis de BRB Array Tools. Utilizando el punto de corte obtenido con el software MaxStat, se realizó un análisis univariado y se identificaron 4 genes asociados con la SG. Los pacientes con elevada expresión de *BAALC* o *ALDH2* tuvieron una SG más corta (SG a 5 años  $33\pm 8,6\%$  vs.  $73,7\pm 10,1\%$ ,  $p=0,006$ ;  $32\pm 9,3\%$  vs.  $66,4\pm 9,7\%$ ,  $p=0,016$ , respectivamente). Por el contrario, los pacientes con alta expresión de *GPR44* y de *TP53INP1* mostraron una mejor evolución (SG a 5 años  $66,7\pm 10,3\%$  vs.  $35,4\pm 9,1\%$ ,  $p=0,04$ ;  $58,3\pm 8,2\%$  vs.  $23,1\pm 11,7\%$ ,  $p=0,029$ , respectivamente)(Figura 20). De esta firma de 4 genes, *ALDH2*, *GPR44* y *TP53INP1* fueron identificados en el estudio de PEG en la primera cohorte de pacientes estudiados (subgrupo A), mientras que *BAALC* se agregó para el análisis en el subgrupo B por su valor pronóstico conocido en la LMA.

#### IV.RESULTADOS

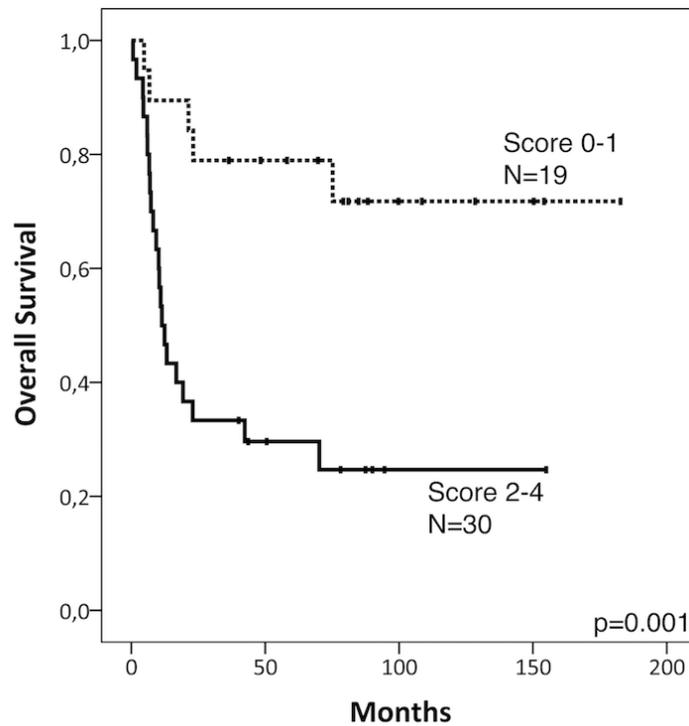
Figura 20. Supervivencia global según el nivel de expresión de los genes *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* y *TP53INP1* en el subgrupo B.



Dado el valor pronóstico de *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* y *TP53INP1*, realizamos un *score* según el efecto combinado de estos genes. Definimos la alta expresión de *BAALC* y *ALDH2* y la baja expresión de *GPR44* y *TP53INP1* como factores de alto riesgo. Así, los pacientes se clasificaron en dos grupos: *score* de bajo riesgo (0-1 factores) y *score* de alto riesgo (2-4 factores). La SG a los 5 años de los dos grupos de riesgo fue de  $78,9 \pm 9,4\%$  y  $29,6 \pm 8,4\%$  ( $p=0,001$ ), respectivamente (Figura 21). Además, la LFS fue significativamente inferior en pacientes con *score* de alto riesgo ( $33,3 \pm 9,6\%$  vs.  $70,7 \pm 11,2\%$ ,  $p=0,003$ ).

#### IV.RESULTADOS

Figura 21. Supervivencia global según el score de 4 genes en el subgrupo B.



En el análisis multivariado que incluyó las principales variables clínico-biológicas, el *score* se confirmó como factor pronóstico independiente (OR: 5,85; 95%IC: 2,16-15,8;  $p=0,001$  para la SG y HR=3,1, 95%IC: 1,1-8,7;  $p=0,03$  para la LFS) junto con la edad. La presencia de *FLT3*-ITD impactó de forma independiente en la LFS y mostró una tendencia estadísticamente significativa para la SG (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis multivariado para la supervivencia global en el subgrupo B

Parámetro	P	HR <sup>a</sup>	95%IC <sup>b</sup>
Edad	0,011	1,051	1,017-1,086
Score <sup>c</sup> (alto riesgo, ≥2 características adversas)	0,001	5,846	2,157-15,841
<i>FLT3</i> -ITD	0,068	2,202	0,943-5,141
Mutación de <i>NPM1</i>	0,187	0,526	0,202-1,366
Sexo	0,274	1,585	0,695-3,618
Número de ciclos para la RC	0,098	0,902	0,798-1,019
Leucocitos al diagnóstico	0.162	1.005	0.998-1.012

<sup>a</sup>HR: *hazard ratio*.

<sup>b</sup>IC: Intervalo de confianza

<sup>c</sup>Score según el nivel de expresión de *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* y *TP53INP1*.

#### ***Validación del score de 4 genes pronóstico en un conjunto de datos independiente***

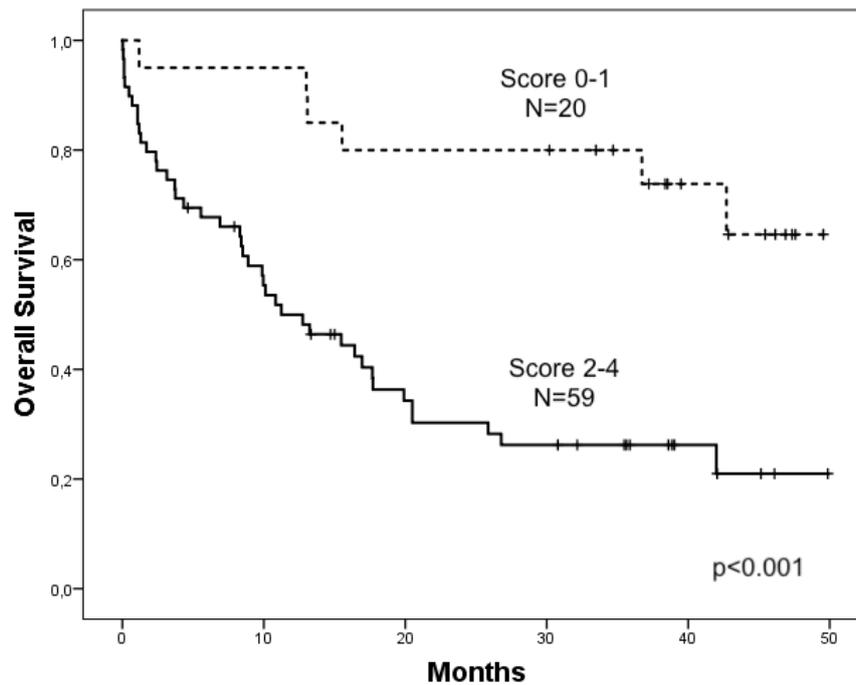
En primer lugar, analizamos el valor pronóstico de la expresión de *BAALC*, *ALDH2*, *TP53INP1* y *GPR44* individualmente utilizando datos públicos de expresión génica del repositorio *Leukemia Gene Atlas* (<http://www.leukemiagene-atlas.org/LGAtlas>). Los datos fueron obtenidos de 79 pacientes con LMA-CN (GSE 12417), analizados con *microarrays* HG-U133 plus 2.0 y previamente publicados<sup>155</sup>. Utilizamos el punto de corte de los niveles de expresión de los genes que resultó pronóstico, obtenido con el paquete MaxStat, para analizar el valor pronóstico de todos los genes de forma individual y confirmamos el impacto de los altos niveles de *BAALC* en esta cohorte. Además, los

#### IV.RESULTADOS

pacientes con baja expresión de *TP53INP1* y *GPR44* tenían un pronóstico significativamente peor.

En un segundo paso, validamos nuestro *score* pronóstico en esta cohorte de pacientes, con una SG a 5 años de  $21,0 \pm 6,8\%$  frente a  $64,6 \pm 12,4\%$  en pacientes de alto y bajo riesgo, respectivamente ( $p < 0,001$ ; HR = 4,45; IC del 95%: 1,86 a 10,6).

Figura 22. Validación del *score* en una cohorte independiente de 79 pacientes adultos con LMA de cariotipo normal utilizando datos de expresión génica del repositorio público *Leukemia Gene Atlas*.



V. DISCUSIÓN

V.DISCUSIÓN

## V. DISCUSIÓN

## V. DISCUSIÓN

La categoría LMA-RI comprende un grupo heterogéneo de pacientes con diferente pronóstico en el que la asignación de la terapia óptima post-remisión no está bien definida. El perfil mutacional de un conjunto limitado de genes se ha convertido en la herramienta estándar para asignar pacientes a diferentes estrategias posteriores a la remisión, incluida la indicación de aloTPH en RC1. No obstante, la alta complejidad resultante de múltiples interacciones entre varias mutaciones con un impacto pronóstico diferente conduce a una gran diversidad de diferentes subgrupos moleculares, lo que impide la formulación de un modelo de pronóstico simple basado en el cribado mutacional. Un ejemplo de esto se ha demostrado recientemente en un estudio realizado en 223 pacientes que albergan una mutación en el gen *NPM1*, con la distinción de hasta 150 subgrupos moleculares diferentes tras el análisis de 50 genes adicionales recurrentemente mutados en la enfermedad<sup>26</sup>. En este contexto, otras aproximaciones para predecir pronóstico, como los estudios basados en los PEG de RNAm y de RNA no codificante como los microRNA y los RNA largos no codificantes, pueden contribuir a anticipar la respuesta al tratamiento a partir de la caracterización biológica de la LMA al diagnóstico. Dichos estudios permiten el análisis de un gran número de genes con potencial valor pronóstico y podrían eludir algunas de las limitaciones derivadas de la evaluación pronóstica basada simplemente en la detección mutacional en un número limitado de genes<sup>134,152,162,222,223</sup>.

A partir de estas premisas, nuestro trabajo tuvo como objetivo buscar nuevos biomarcadores capaces de predecir el resultado del tratamiento post-remisión en pacientes con LMA-RI. Para ello, analizamos una serie de 89 pacientes afectados de una LMA dentro de la categoría citogenética intermedia diagnosticados y tratados en el Hospital Clínic de Barcelona y en otros centros del grupo cooperativo CETLAM, de

## V. DISCUSIÓN

acuerdo con protocolos de tratamiento homogéneo. En un análisis en dos pasos basado en el perfil de expresión génica, pudimos identificar una firma génica asociada con una respuesta duradera después del tratamiento post-remisión basado en estrategias que no incluyen un aloTPH en fase precoz. Además, construimos un *score* de 4 genes con un importante impacto pronóstico en pacientes con LMA-RI, de forma independiente de la presencia de mutaciones con valor pronóstico contrastado en la LMA-RI como las mutaciones de *NPM1* y *FLT3-ITD*.

Aunque estudios previos han abordado el valor pronóstico del PEG en diferentes subtipos de LMA<sup>153,155</sup> y otros grupos han identificado firmas genéticas predictivas para la respuesta al tratamiento de inducción<sup>163</sup> o a fármacos específicos<sup>164</sup>, nosotros diseñamos un enfoque experimental diferente. Nuestro estudio de PEG se centró principalmente en la búsqueda de una firma génica distintiva asociada a una respuesta prolongada en el grupo de pacientes con LMA-RI que recibieron un tratamiento que no incluyó un aloTPH en primera RC.

Así, para la primera fase del análisis se incluyeron 40 pacientes con LMA-RI sometidos a autoTPH en su mayoría o quimioterapia de consolidación con HiDAC. El análisis supervisado comparando los pacientes con respuesta mantenida vs. recaída reveló la expresión diferencial de 75 genes, incluida la sobreexpresión de varios genes homeobox como *HOXA10*, *HOXB2* y *HOXA4* en pacientes de evolución favorable, mientras que los pacientes que presentaban una recaída temprana mostraron sobreexpresión de determinados genes implicados en la proliferación y apoptosis. Este hallazgo probablemente se relaciona, en parte, con el mayor porcentaje de pacientes con mutaciones de *NPM1* en el subgrupo favorable, una mutación genética conocida por presentar un perfil de expresión específico con un aumento de la expresión de los genes

## V. DISCUSIÓN

homeobox<sup>145</sup>. Con el fin de evitar el efecto de la mutación de *NPM1*, repetimos un análisis restringido al subgrupo de pacientes *NPM1wt/FLT3-ITDneg*, la mayoría de los cuales carecían también de la mutación de *CEBPA* ("genotipo triple negativo"), y obtuvimos una firma compuesta de 293 genes expresados diferencialmente. De manera interesante, el análisis ontogénico derivado de esta firma reveló que varios genes implicados en el control del ciclo celular (*CDC7*, *CDC2* y *CDC5*) y la apoptosis (*CFLAR*, *FAS*, *DAPP1* y *BRCA1*) tenían una alta expresión en el subgrupo desfavorable. Este grupo de genotipo "triple negativo" podría resultar de particular interés, ya que la ausencia de mutaciones favorables (*NPM1*, *CEBPA*) y de pronóstico adverso (*FLT3-ITD*) confiere un alto grado de incertidumbre con respecto al pronóstico y el tratamiento post-remisión óptimo. Los resultados mostrados por PEG en este subgrupo molecular apoyarían un contexto biológico heterogéneo y un pronóstico diverso, con la existencia de un subgrupo de mejor pronóstico, que podría ser capaz de lograr una respuesta prolongada después de la quimioterapia con dosis altas de citarabina o autoTPH, sin necesidad de aloTPH. Sin embargo, el número relativamente bajo de pacientes incluidos en nuestro estudio limita la solidez de estos hallazgos.

Para la validación de los resultados obtenidos se estudió una serie adicional de 49 pacientes con LMA-RI, en la que se analizaron genes seleccionados por su expresión diferencial en el estudio de *arrays* de alta densidad o por su papel oncogénico o pronóstico descrito en la literatura. Esta segunda parte del análisis permitió la identificación de 4 genes (*BAALC*, *ALDH2*, *TP53INP1* y *GPR44*) asociados con la SG. Dado el valor pronóstico independiente mostrado por estos cuatro genes, diseñamos un *score* con los niveles de expresión de dichos genes, capaz de segregar grupos de pacientes con pronósticos marcadamente diferenciados: por un lado un subgrupo de buen pronóstico

## V. DISCUSIÓN

(caracterizado por no presentar factores de riesgo o presentar un solo factor de riesgo) y un subgrupo de mayor riesgo ( $\geq 2$  factores de riesgo). Cabe destacar que este *score* mostró un fuerte impacto pronóstico (HR=5.846, IC 95%: 2,157-15,841), independientemente de otras mutaciones con importante valor pronóstico en LMA.

En una etapa posterior, se confirmó el valor pronóstico de nuestro *score* en una serie de 79 pacientes con LMA-CN completamente independiente, cuyos datos se obtuvieron de una base de datos de expresión génica pública (<http://www.leukemiagenetlas.org/LGAtlas>) ( $p < 0,001$ ; HR=4,45, 95%CI: 1,86-10,6). Este hecho sugiere que los biomarcadores propuestos tienen un verdadero potencial valor clínico para predecir quimiosensibilidad.

Paralelamente, analizamos el PEG asociado a refractariedad a la quimioterapia de inducción estándar de primera línea. Así, los pacientes que no alcanzaron la RC mostraban una sobreexpresión de los genes *BAALC*, *MN1*, *HOPX* y *SPARC*. Cabe destacar que la sobreexpresión de *BAALC*, *MN1* y *SPARC* se había descrito previamente como un factor de pronóstico negativo para la respuesta en LMA-RI<sup>119,224-227</sup>. Para conocer los mecanismos subyacentes a la resistencia al tratamiento secundaria a la sobreexpresión de estos genes son necesarios estudios funcionales, pero existen estudios que aportan algunos datos indirectos. Concretamente, se ha observado que los casos con sobreexpresión de *BAALC*<sup>122</sup> y de *HOPX*<sup>227</sup> presentan un aumento de expresión de genes involucrados en la resistencia a fármacos, lo que es concordante con la menor respuesta al tratamiento observada en estos pacientes.

En cambio, el papel en la leucemia de *SPARC*, un gen que codifica para una proteína que regula la interacción entre las células y la matriz extracelular<sup>228,229</sup>, es controvertido. Este

## V. DISCUSIÓN

gen se encuentra diferencialmente expresado dependiendo del subtipo de leucemia estudiada<sup>225,230</sup>. La dificultad para asignar una función específica a la proteína SPARC probablemente está relacionada con las diversas funciones que puede desempeñar tanto intracelularmente en las células malignas como extracelularmente en el microambiente<sup>231</sup>. En el caso de la LMA-CN, se ha demostrado que su sobreexpresión promueve la proliferación<sup>225,231</sup>.

En línea con estudios anteriores, identificamos algunos genes implicados en programas de *stemness*, como *BAALC*, *ALDH2* y *HOPX*. En este sentido, se ha demostrado una alta expresión de *BAALC* y *HOPX* en firmas génicas enriquecidas en LSC<sup>122,157,158,227</sup>. Del mismo modo, la alta actividad de la enzima ALDH se ha descrito como un marcador de célula madre hematopoyética y en LMA se ha correlacionado con un peor pronóstico<sup>232-235</sup>. Específicamente, la sobreexpresión de la isoenzima ALDH2 se ha correlacionado con proliferación y resistencia a medicamentos<sup>236</sup>, pero no se había descrito previamente como un factor de pronóstico adverso hasta la publicación de este trabajo. En un estudio muy reciente de dos amplias cohortes independientes de pacientes con LMA tratados intensivamente, también se ha asociado la alta expresión de *ALDH2* con mal pronóstico<sup>237</sup>.

En nuestro estudio, una baja expresión de *TP53INP1* y *GPR44* se asoció con un peor resultado. A destacar, *TP53INP1* es un supresor tumoral localizado en 8q22 y un *target* conocido de miR-155, un microRNA cuya sobreexpresión se correlaciona con inmadurez, una firma génica *stem cell-like* y un peor pronóstico en la LMA<sup>159,161</sup>. En varios estudios se ha demostrado que *TP53INP1* se encuentra infraexpresado en diferentes tipos de cáncer, pero no se había descrito previamente en pacientes con LMA<sup>238,239</sup>.

## V. DISCUSIÓN

Una limitación de este estudio está relacionada con el tamaño relativamente pequeño de la muestra. Sin embargo, para mejorar el valor pronóstico clínico del análisis mediante PEG, elegimos un subgrupo muy específico de pacientes con LAM-RI tratados de forma similar, en RC tras la quimioterapia de inducción estándar para LMA y que habían recibido una terapia post-remisión estándar, que consistía principalmente en un autoTPH. Se excluyó explícitamente el aloTPH para evitar la interferencia ejercida por este procedimiento. Además validamos nuestros hallazgos en una cohorte independiente.

Otra potencial debilidad radica en la elección de puntos de corte arbitrarios del nivel de expresión de los genes propuestos para asignar a los pacientes a una categoría pronóstica determinada. La dicotomización del efecto pronóstico de la expresión génica puede suponer una simplificación excesiva del efecto biológico ejercido a través de este mecanismo, que puede tener un comportamiento más asimilable a un efecto continuo. Sin embargo, esta limitación es habitual en los estudios de expresión génica y complica la traslación directa de los resultados. Así, la aplicación clínica generalizada requeriría la estandarización del método de determinación y de los valores de riesgo.

**En resumen**, nuestro estudio basado en la correlación del perfil de expresión génica con la respuesta al tratamiento post-remisión nos permitió identificar un *score* de expresión de 4 genes con un fuerte valor pronóstico en LMA-RI, independientemente de las mutaciones genéticas más frecuentes observadas en este subgrupo molecular. De forma interesante, algunos de estos genes son característicos de firmas de tipo LSC. Además, dado que el *score* pronóstico se generó a partir de dos cohortes de pacientes diferentes enriquecidas con pacientes sometidos a autoTPH, esta herramienta de pronóstico podría utilizarse para seleccionar pacientes que podrían beneficiarse de dicho

## V. DISCUSIÓN

procedimiento e identificar a los pacientes con un alto riesgo de recaída después del autoTPH. En definitiva, este *score* simple de 4 genes podría usarse para refinar la evaluación pronóstica y podría guiar el tratamiento posterior a la remisión en la categoría heterogénea de LMA-RI.

***Líneas en desarrollo originadas a partir de los resultados del trabajo de tesis***

**A) Estudios en población de pacientes adultos con LMA**

- Análisis del valor pronóstico de la expresión de los 4 genes (*BAALC*, *ALDH2*, *TP53INP1* y *GPR44*) en las distintas categorías de riesgo definidas por la última clasificación de la *European LeukemiaNet*.<sup>12</sup>
- Impacto pronóstico en nuevos “escenarios” terapéuticos: aloTPH, quimioterapia intensiva junto a inhibidores de FLT3 como midostaurina, quimioterapia intensiva asociada a GO.

**B) Análisis en población pediátrica con LMA**

- Se dispone de una serie de 45 pacientes pediátricos con LMA *de novo* tratados homogéneamente en los que se analizará la firma génica obtenida en los pacientes adultos, así como variables clínico-biológicas de reconocido valor pronóstico. Además, está previsto ampliar el estudio en pacientes diagnosticados en otros centros del grupo de la Sociedad Española de Hematología y Oncología pediátrica (SEHOP).

## VI. CONCLUSIONES

VI.CONCLUSIONES

## VI. CONCLUSIONES

## VI. CONCLUSIONES

- Mediante el presente trabajo de tesis, hemos podido confirmar la capacidad de los estudios de expresión génica para identificar nuevos biomarcadores y añadir información pronóstica adicional al estudio mutacional en pacientes adultos con LMA y citogenética de riesgo intermedio.
- Así, en nuestra serie de pacientes con LMA-RI que recibieron un tratamiento que no incluyó un alo-TPH en primera RC, identificamos una firma génica asociada con una respuesta prolongada.
- La sobreexpresión de *BAALC*, *MN1*, *HOPX* y *SPARC* se asoció con refractariedad al tratamiento de inducción.
- Los niveles altos de *BAALC* y *ALDH2* permitieron identificar pacientes con peor supervivencia global. En cambio, la expresión elevada de *TP53INP1* y *GPR44* se correlacionó con una supervivencia más prolongada.
- El score resultante del nivel de expresión de estos 4 genes (*BAALC*, *ALDH2*, *TP53INP1* y *GPR44*) permite segregar a los pacientes de bajo riesgo de recaída de aquellos pacientes de alto riesgo de recaída y podría usarse para refinar la evaluación pronóstica y guiar el tratamiento posterior a la remisión en los pacientes con LMA-RI.

## VI. CONCLUSIONES



## VII. BIBLIOGRAFÍA

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).
2. Rosenbauer, F. & Tenen, D. G. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 105–117 (2007).
3. Estey, E. & Dohner, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**, 1894–1907 (2006).
4. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
5. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).
6. Jan, M. *et al.* Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* **4**, 149ra118 (2012).
7. Corces, M. R., Chang, H. Y. & Majeti, R. Preleukemic Hematopoietic Stem Cells in Human Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **7**, 263 (2017).
8. Lowenberg, B., Downing, J. R. & Burnett, A. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **341**, 1051–1062 (1999).
9. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 7–30 (2017).
10. Mufti, G. J. *et al.* Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* **93**, 1712–1717 (2008).
11. Swerdlow, S. H. *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue* **4th**, (2008).
12. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
13. Arbutnot, C. & Wilde, J. T. Haemostatic problems in acute promyelocytic leukaemia. *Blood Rev.* **20**, 289–97 (2006).
14. Menell, J. S. *et al.* Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **340**, 994–1004 (1999).
15. Mantha, S., Tallman, M. S. & Soff, G. A. What's new in the pathogenesis of the coagulopathy in acute promyelocytic leukemia? *Curr. Opin. Hematol.* **23**, 121–6 (2016).
16. Porcu, P. *et al.* Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leuk. Lymphoma* **39**, 1–18 (2000).
17. Kuo, K. H. M. *et al.* A retrospective observational study of leucoreductive strategies to manage patients with acute myeloid leukaemia presenting with hyperleucocytosis. *Br. J. Haematol.* **168**, 384–394 (2015).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

18. Novotny, J. R., Nüchel, H. & Dührsen, U. Correlation between expression of CD56/NCAM and severe leukostasis in hyperleukocytic acute myelomonocytic leukaemia. *Eur. J. Haematol.* **76**, 299–308 (2006).
19. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* **33**, 451–8 (1976).
20. Bennett, J. M. *et al.* Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann. Intern. Med.* **103**, 460–2 (1985).
21. Bennett, J. M. *et al.* Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br. J. Haematol.* **78**, 325–9 (1991).
22. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–51 (2009).
23. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
24. Kelly, L. M. & Gilliland, D. G. Genetics of myeloid leukemias. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **3**, 179–98 (2002).
25. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2059–74 (2013).
26. Grimwade, D., Ivey, A. & Huntly, B. J. P. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* **127**, 29–41 (2016).
27. Conway O'Brien, E., Prideaux, S. & Chevassut, T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv. Hematol.* **2014**, 103175 (2014).
28. Bullinger, L., Döhner, K. & Döhner, H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J. Clin. Oncol.* **35**, 934–946 (2017).
29. Genovese, G. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2477–2487 (2014).
30. Jaiswal, S. *et al.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
31. Busque, L. *et al.* Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* **44**, 1179–1181 (2012).
32. McKerrell, T. *et al.* Leukemia-Associated Somatic Mutations Drive Distinct Patterns of Age-Related Clonal Hemopoiesis. *Cell Rep.* **10**, 1239–1245 (2015).
33. Xie, M. *et al.* Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* **20**, 1472–1478 (2014).
34. Shlush, L. I. *et al.* Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **506**, 328–333 (2014).
35. Ding, L. *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481**, 506–510 (2012).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

36. Welch, J. S. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264–78 (2012).
37. Steensma, D. P. *et al.* Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* **126**, 9–16 (2015).
38. Magee, J. A., Piskounova, E. & Morrison, S. J. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell* **21**, 283–296 (2012).
39. Welch, J. S. S. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264–78 (2012).
40. Jan, M. & Majeti, R. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene* **32**, 135–40 (2013).
41. Papaemmanuil, E., Döhner, H. & Campbell, P. J. Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **375**, 900–901 (2016).
42. Speck, N. A. & Gilliland, D. G. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 502–13 (2002).
43. Blyth, K., Cameron, E. R. & Neil, J. C. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 376–87 (2005).
44. Goyama, S. & Mulloy, J. C. Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: Current knowledge and future prospects. *Int. J. Hematol.* **94**, 126–133 (2011).
45. Steffen, B., Müller-Tidow, C., Schwäble, J., Berdel, W. E. & Serve, H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **56**, 195–221 (2005).
46. Duployez, N. *et al.* Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* **127**, 2451–2459 (2016).
47. Mrózek, K., Heerema, N. A. & Bloomfield, C. D. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* **18**, 115–36 (2004).
48. Adams, J. & Nassiri, M. Acute Promyelocytic Leukemia: A Review and Discussion of Variant Translocations. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **139**, 1308–13 (2015).
49. Pandolfi, P. P. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 769–75 (2001).
50. Lo-Coco, F. & Hasan, S. K. Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **27**, 3–9 (2014).
51. Kogan, S. C. Mouse models of acute promyelocytic leukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **313**, 3–29 (2007).
52. Kelly, L. M. *et al.* PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8283–8 (2002).
53. Levis, M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2013**, 220–226 (2013).
54. Mead, A. J. *et al.* FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **110**, 1262–70 (2007).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

55. Pratcorona, M. *et al.* Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* **121**, 2734–8 (2013).
56. Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S. P. & Bloomfield, C. D. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* **109**, 431–48 (2007).
57. Mrózek, K., Marcucci, G., Paschka, P. & Bloomfield, C. D. Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* **20**, 711–8 (2008).
58. Pabst, T. *et al.* Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* **27**, 263–70 (2001).
59. Falini, B. *et al.* Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.* **352**, 254–66 (2005).
60. Taskesen, E. *et al.* Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* **117**, 2469–75 (2011).
61. Wouters, B. J. *et al.* Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* **113**, 3088–3091 (2009).
62. Greif, P. A. *et al.* GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood* **120**, 395–403 (2012).
63. Green, C. L. *et al.* Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: Impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2739–2747 (2010).
64. Schlenk, R. F. *et al.* Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1909–1918 (2008).
65. Kühnl, A. & Grimwade, D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int. J. Hematol.* **96**, 153–63 (2012).
66. Gale, R. E. *et al.* Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2072–83 (2015).
67. Lam, K. & Zhang, D.-E. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **17**, 1120–39 (2012).
68. Cazzola, M., Della Porta, M. G. & Malcovati, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* **122**, 4021–34 (2013).
69. Schlegelberger, B. & Heller, P. G. RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin. Hematol.* **54**, 75–80 (2017).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

70. Mangan, J. K. & Speck, N. A. RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Crit. Rev. Oncog.* **16**, 77–91 (2011).
71. Tang, J.-L. *et al.* AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* **114**, 5352–61 (2009).
72. Schnittger, S. *et al.* RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis. *Blood* **117**, 2348–57 (2011).
73. Gaidzik, V. I. *et al.* RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1364–72 (2011).
74. Ley, T. J. *et al.* DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2424–2433 (2010).
75. Ribeiro, A. F. T. *et al.* Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* **119**, 5824–31 (2012).
76. Rampal, R. *et al.* DNA Hydroxymethylation Profiling Reveals that WT1 Mutations Result in Loss of TET2 Function in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep.* **9**, 1841–1855 (2014).
77. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
78. Zhang, T.-J. *et al.* TET2 expression is a potential prognostic and predictive biomarker in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J. Cell. Physiol.* (2018). doi:10.1002/jcp.26373
79. Boissel, N. *et al.* Differential prognosis impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* **117**, 3696–3697 (2011).
80. Green, C. L. *et al.* The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* **118**, 409–412 (2011).
81. Wang, Y. *et al.* WT1 Recruits TET2 to Regulate Its Target Gene Expression and Suppress Leukemia Cell Proliferation. *Mol. Cell* **57**, 662–673 (2015).
82. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–9 (2011).
83. Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1384–95 (2011).
84. Papaemmanuil, E. *et al.* Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122**, 3616–27; quiz 3699 (2013).
85. Lindsley, R. C. *et al.* Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* **125**, 1367–76 (2015).
86. Leeke, B., Marsman, J., O’Sullivan, J. M. & Horsfield, J. A. Cohesin mutations in myeloid malignancies: underlying mechanisms. *Exp. Hematol. Oncol.* **3**, 13 (2014).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

87. Thol, F. *et al.* Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *Blood* **123**, 914–20 (2014).
88. Thota, S. *et al.* Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood* **124**, 1790–8 (2014).
89. Appelbaum, F. R. *et al.* Age and acute myeloid leukemia. *Blood* **107**, 3481–5 (2006).
90. Juliusson, G. *et al.* Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* **113**, 4179–87 (2009).
91. Giles, F. J. *et al.* The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **136**, 624–7 (2007).
92. Liersch, R., Müller-Tidow, C., Berdel, W. E. & Krug, U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults - biological significance and clinical use. *Br. J. Haematol.* **165**, 17–38 (2014).
93. Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L. & MacKenzie, C. R. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J. Chronic Dis.* **40**, 373–83 (1987).
94. Sorror, M. L. *et al.* Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* **106**, 2912–2919 (2005).
95. Sorror, M. L. *et al.* Hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index as an outcome predictor for patients with acute myeloid leukemia in first remission: combined FHCRC and MDACC experiences. *Blood* **110**, 4606–4613 (2007).
96. Grimwade, D. *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354–65 (2010).
97. Grimwade, D. *et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* **92**, 2322–33 (1998).
98. Berger, R. *et al.* Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: a study of 343 patients. *Cancer Genet. Cytogenet.* **28**, 293–9 (1987).
99. Slovak, M. L. *et al.* Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* **96**, 4075–83 (2000).
100. Byrd, J. C. *et al.* Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**, 4325–36 (2002).
101. Breems, D. A. *et al.* Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4791–7 (2008).
  102. Patel, J. P. & Levine, R. L. How do novel molecular genetic markers influence treatment decisions in acute myeloid leukemia? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012**, 28–34 (2012).
  103. Marcucci, G., Haferlach, T. & Döhner, H. Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. *J. Clin. Oncol.* **29**, 475–486 (2011).
  104. Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2209–2221 (2016).
  105. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453–74 (2010).
  106. Röllig, C. *et al.* Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2758–65 (2011).
  107. Alpermann, T. *et al.* Evaluation of the proposed reporting system of the European LeukemiaNet and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **37**, 197–200 (2013).
  108. Patel, J. P. *et al.* Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1079–89 (2012).
  109. Schlenk, R. F. *et al.* The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood* **122**, 1576–82 (2013).
  110. Haferlach, C. *et al.* AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* **114**, 3024–32 (2009).
  111. Micol, J. B. *et al.* The role of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations and no FLT3 internal tandem duplication. *Blood* **114**, 4601–4602 (2009).
  112. Gale, R. E. *et al.* The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 2776–84 (2008).
  113. Schlenk, R. F. *et al.* Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* **124**, 3441–9 (2014).
  114. Grimwade, D. & Freeman, S. D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for ‘prime time’? *Blood* **124**, 3345–3355 (2014).
  115. Buccisano, F. *et al.* Cytogenetic and molecular diagnostic characterization

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood* **116**, 2295–2303 (2010).
116. Inaba, H. *et al.* Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **30**, 3625–32 (2012).
  117. Heuser, M. *et al.* Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia* **26**, 532–536 (2012).
  118. Tanner, S. M. *et al.* BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13901–13906 (2001).
  119. Weber, S. *et al.* BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **4**, e173 (2014).
  120. Baldus, C. D. *et al.* BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* **102**, 1613–1618 (2003).
  121. Díaz-Beyá, M. *et al.* The expression level of BAALC-associated microRNA miR-3151 is an independent prognostic factor in younger patients with cytogenetic intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* **5**, e352–e352 (2015).
  122. Langer, C. *et al.* High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood* **111**, 5371–5379 (2008).
  123. Grosveld, G. C. MN1, a novel player in human AML. *Blood Cells, Mol. Dis.* **39**, 336–339 (2007).
  124. Heuser, M. *et al.* High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* **108**, 3898–3905 (2006).
  125. Langer, C. *et al.* Prognostic Importance of *MN1* Transcript Levels, and Biologic Insights From *MN1* -Associated Gene and MicroRNA Expression Signatures in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3198–3204 (2009).
  126. Carella, C. *et al.* MN1 overexpression is an important step in the development of *inv(16)* AML. *Leukemia* **21**, 1679–1690 (2007).
  127. Heuser, M. *et al.* MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood* **110**, 1639–1647 (2007).
  128. Sashida, G., Bazzoli, E., Menendez, S., Stephen D., N. & Nimer, S. D. The oncogenic role of the ETS transcription factors MEF and ERG. *Cell Cycle* **9**, 3457–3459 (2010).
  129. Marcucci, G. *et al.* High Expression Levels of the *ETS* -Related Gene, *ERG* , Predict Adverse Outcome and Improve Molecular Risk-Based Classification of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3337–3343 (2007).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

130. Metzeler, K. H. *et al.* *ERG* Expression Is an Independent Prognostic Factor and Allows Refined Risk Stratification in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Analysis of *ERG*, *MN1*, and *BAALC* Transcript Levels Using Oligonucleotide Microarrays. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5031–5038 (2009).
131. Kataoka, K. *et al.* *Evi1* is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. *J. Exp. Med.* **208**, 2403–2416 (2011).
132. Rockova, V. *et al.* Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood* **118**, 1069–1076 (2011).
133. Gröschel, S. *et al.* High *EVI1* Expression Predicts Outcome in Younger Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia and Is Associated With Distinct Cytogenetic Abnormalities. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2101–2107 (2010).
134. Shivarov, V. & Bullinger, L. Expression profiling of leukemia patients: Key lessons and future directions. *Exp. Hematol.* **42**, 651–660 (2014).
135. Bacher, U., Kohlmann, A. & Haferlach, T. Gene expression profiling for diagnosis and therapy in acute leukaemia and other haematologic malignancies. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 637–646 (2010).
136. Bullinger, L. & Valk, P. J. M. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6296–6305 (2005).
137. Golub, T. R. *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531–7 (1999).
138. Haferlach, T. *et al.* Gene expression profiling as a tool for the diagnosis of acute leukemias. *Semin. Hematol.* **40**, 281–95 (2003).
139. Haferlach, T. *et al.* AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes, Chromosom. Cancer* **43**, 113–127 (2005).
140. Schoch, C. *et al.* Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10008–10013 (2002).
141. Kohlmann, A. *et al.* Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes, Chromosom. Cancer* **37**, 396–405 (2003).
142. Gutiérrez, N. C. *et al.* Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **19**, 402–9 (2005).
143. Haferlach, T. *et al.* Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood* **106**, 1189–98 (2005).
144. Haferlach, T. *et al.* Clinical Utility of Microarray-Based Gene Expression Profiling in the Diagnosis and Subclassification of Leukemia: Report From the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2529–2537 (2010).
145. Verhaak, R. G. W. *et al.* Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* **106**, 3747–3754 (2005).
146. Bullinger, L. *et al.* An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood* **111**, 4490–4495 (2008).
  147. Marcucci, G. *et al.* IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2348–55 (2010).
  148. Metzeler, K. H. *et al.* TET2 Mutations Improve the New European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1373–1381 (2011).
  149. Metzeler, K. H. *et al.* ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* **118**, 6920–6929 (2011).
  150. Kohlmann, A. *et al.* Gene expression profiling in AML with normal karyotype can predict mutations for molecular markers and allows novel insights into perturbed biological pathways. *Leukemia* **24**, 1216–1220 (2010).
  151. Valk, P. J. M. *et al.* Prognostically Useful Gene-Expression Profiles in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1617–1628 (2004).
  152. Miller, B. G. & Stamatoyannopoulos, J. A. Integrative meta-analysis of differential gene expression in acute myeloid leukemia. *PLoS One* **5**, e9466 (2010).
  153. Bullinger, L. *et al.* Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1605–1616 (2004).
  154. Radmacher, M. D. *et al.* Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype : a Cancer and Leukemia Group B study Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leuk. *Blood* **108**, 1677–1683 (2009).
  155. Metzeler, K. H. *et al.* An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* **112**, 4193–4201 (2008).
  156. Li, Z. *et al.* Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the european LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: An international collaborative study. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1172–1181 (2013).
  157. Gentles, A. J., Plevritis, S. K., Majeti, R. & Alizadeh, A. A. Association of a Leukemic Stem Cell Gene Expression Signature With Clinical Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA* **304**, 2706 (2010).
  158. Eppert, K. *et al.* Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat. Med.* **17**, 1086–1093 (2011).
  159. Metzeler, K. H. *et al.* A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia* **27**, 2023–2031 (2013).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

160. Rücker, F. G. *et al.* Altered miRNA and gene expression in acute myeloid leukemia with complex karyotype identify networks of prognostic relevance. *Leukemia* 353–361 (2012). doi:10.1038/leu.2012.208
161. Marcucci, G. *et al.* Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2086–93 (2013).
162. Díaz-Beyá, M. *et al.* MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leukemia* **28**, 804–812 (2014).
163. Heuser, M. *et al.* Gene-expression profiles and their association with drug resistance in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* **90**, 1484–92 (2005).
164. Raponi, M. *et al.* A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 2589–96 (2008).
165. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63 (2009).
166. Pulte, D. *et al.* Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int. J. Cancer* **139**, 1289–1296 (2016).
167. Longo, D. L., Döhner, H., Weisdorf, D. J., Bloomfield, C. D. & Leukemia, A. M. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1136–1152 (2015).
168. Dombret, H. & Gardin, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* **127**, 53–61 (2016).
169. Kayser, S. & Levis, M. J. Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **180**, 484–500 (2018).
170. Sawyers, C. L. Finding the next Gleevec: FLT3 targeted kinase inhibitor therapy for acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **1**, 413–5 (2002).
171. DiNardo, C. D., Stone, R. M. & Medeiros, B. C. Novel Therapeutics in Acute Myeloid Leukemia. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* **37**, 495–503 (2017).
172. Stone, R. M. *et al.* Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood* **105**, 54–60 (2005).
173. O’Farrell, A.-M. *et al.* An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5465–76 (2003).
174. Smith, B. D. *et al.* Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **103**, 3669–3676 (2004).
175. Pratz, K. W. *et al.* A pharmacodynamic study of sorafenib in patients with relapsed and refractory acute leukemias. *Leukemia* **24**, 1437–1444 (2010).
176. Pratz, K. W. *et al.* A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood* **113**, 3938–3946 (2009).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

177. Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 454–464 (2017).
178. Lowenberg, B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 26–28 (2013).
179. Schaich, M. *et al.* Cytarabine Dose of 36 g/m<sup>2</sup> Compared With 12 g/m<sup>2</sup> Within First Consolidation in Acute Myeloid Leukemia: Results of Patients Enrolled Onto the Prospective Randomized AML96 Study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2696–2702 (2011).
180. Burnett, A. K. *et al.* Optimization of Chemotherapy for Younger Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results of the Medical Research Council AML15 Trial. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3360–3368 (2013).
181. Itzykson, R. *et al.* Impact of post-remission therapy in patients aged 65-70 years with de novo acute myeloid leukemia: a comparison of two concomitant randomized ALFA trials with overlapping age inclusion criteria. *Haematologica* **96**, 837–44 (2011).
182. Zittoun, R. A. *et al.* Autologous or Allogeneic Bone Marrow Transplantation Compared with Intensive Chemotherapy in Acute Myelogenous Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **332**, 217–223 (1995).
183. Vellenga, E. *et al.* Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood* **118**, 6037–6042 (2011).
184. Pffirmann, M. *et al.* Prediction of post-remission survival in acute myeloid leukaemia: a post-hoc analysis of the AML96 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 207–214 (2012).
185. Cornelissen, J. J. *et al.* Comparative analysis of the value of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in acute myeloid leukemia with monosomal karyotype versus other cytogenetic risk categories. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2140–6 (2012).
186. Gratwohl, A. *et al.* One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet. Haematol.* **2**, e91-100 (2015).
187. Passweg, J. R. *et al.* Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant.* **50**, 476–82 (2015).
188. Cornelissen, J. J. *et al.* The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 579–90 (2012).
189. Majhail, N. S. *et al.* Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **21**, 1863–1869 (2015).
190. Sureda, A. *et al.* Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant.* **50**, 1037–1056 (2015).
191. Cornelissen, J. J. & Blaise, D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood* **127**, 62–70 (2016).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

192. Ho, A. D. *et al.* Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant FLT3-ITD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **22**, 462–9 (2016).
193. Araki, D. *et al.* Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease-Based Definition of Complete Remission? *J. Clin. Oncol.* **34**, 329–36 (2016).
194. Cornelissen, J. J. *et al.* Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40-60 years. *Leukemia* **29**, 1041–50 (2015).
195. Gorin, N.-C. *et al.* Autologous stem cell transplantation for adult acute leukemia in 2015: time to rethink? Present status and future prospects. *Bone Marrow Transplant.* **50**, 1495–502 (2015).
196. Petersdorf, S. H. *et al.* A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 4854–4860 (2013).
197. Burnett, A. K. *et al.* Identification of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit From the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial. *J. Clin. Oncol.* **29**, 369–377 (2011).
198. Castaigne, S. *et al.* Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **379**, 1508–1516 (2012).
199. Hills, R. K. *et al.* Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* **15**, 986–996 (2014).
200. Amadori, S. *et al.* Sequential Combination of Gemtuzumab Ozogamicin and Standard Chemotherapy in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Results of a Randomized Phase III Trial by the EORTC and GIMEMA Consortium (AML-17). *J. Clin. Oncol.* **31**, 4424–4430 (2013).
201. Lancet, J. E. *et al.* Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood* **123**, 3239–3246 (2014).
202. Cortes, J. E. *et al.* Phase II, multicenter, randomized trial of CPX-351 (cytarabine:daunorubicin) liposome injection versus intensive salvage therapy in adults with first relapse AML. *Cancer* **121**, 234–242 (2015).
203. Lancet, J. E. *et al.* Final results of a phase III randomized trial of CPX-351 versus 7+3 in older patients with newly diagnosed high risk (secondary) AML. *J. Clin. Oncol.* **34**, 7000 (2016).
204. Wei, A. H. & Tiong, I. S. Midostaurin, enasidenib, CPX-351, gemtuzumab ozogamicin, and venetoclax bring new hope to AML. *Blood* **130**, 2469–2474 (2017).
205. Burnett, A. K. *et al.* A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Cancer* **109**, 1114–1124 (2007).
206. Kantarjian, H. M. *et al.* Multicenter, Randomized, Open-Label, Phase III Trial of Decitabine Versus Patient Choice, With Physician Advice, of Either Supportive Care or Low-Dose Cytarabine for the Treatment of Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2670–2677 (2012).
  207. Dombret, H. *et al.* International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with  $\geq 30\%$  blasts. *Blood* **126**, 291–299 (2015).
  208. Döhner, H. *et al.* Overall Survival in Older Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) with  $\geq 30\%$  Bone Marrow Blasts Treated with Azacitidine By Cytogenetic Risk Status: Results of the AZA-AML-001 Study. *Blood* **124**, 621 LP-621 (2014).
  209. Estey, E. H. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* **27**, 1803–12 (2013).
  210. Stein, E. M. & Tallman, M. S. Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood* **127**, 71–78 (2016).
  211. Estey, E., Levine, R. L. & Lowenberg, B. Current challenges in clinical development of “targeted therapies”: the case of acute myeloid leukemia. *Blood* **125**, 2461–2466 (2015).
  212. Grunwald, M. R. & Levis, M. J. FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition as a Paradigm for Targeted Drug Development in Acute Myeloid Leukemia. *Semin. Hematol.* **52**, 193–9 (2015).
  213. Abdel-Wahab, O. & Levine, R. L. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 3563–3572 (2013).
  214. Gallipoli, P., Giotopoulos, G. & Huntly, B. J. P. Epigenetic regulators as promising therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **6**, 103–119 (2015).
  215. Ravandi, F. *et al.* Vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukaemia (VALOR): a randomised, controlled, double-blind, multinational, phase 3 study. *Lancet Oncol.* **16**, 1025–1036 (2015).
  216. Lichtenegger, F. S., Krupka, C., Köhnke, T. & Subklewe, M. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin. Hematol.* **52**, 207–14 (2015).
  217. Hothorn, T. & Lausen, B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput. Stat. Data Anal.* **43**, 121–137 (2003).
  218. Thiede, C. *et al.* Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* **99**, 4326–35 (2002).
  219. Boissel, N. *et al.* Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* **106**, 3618–20 (2005).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

220. Frohling, S. CEBPA Mutations in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia and Normal Cytogenetics: Prognostic Relevance and Analysis of Cooperating Mutations. *J. Clin. Oncol.* **22**, 624–633 (2004).
221. Torreadell, M. *et al.* A 4-gene expression prognostic signature might guide post-remission therapy in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 1–11 (2018). doi:10.1080/10428194.2017.1422859
222. Bacher, U., Kohlmann, A. & Haferlach, T. Current status of gene expression profiling in the diagnosis and management of acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* **145**, 555–568 (2009).
223. Marcucci, G. *et al.* MicroRNA Expression in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1919–1928 (2008).
224. Haferlach, C. *et al.* Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosom. Cancer* **51**, 257–265 (2012).
225. Alachkar, H. *et al.* SPARC promotes leukemic cell growth and predicts acute myeloid leukemia outcome. *J. Clin. Invest.* **124**, 1512–1524 (2014).
226. Heuser, M. *et al.* The multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) was identified as one of the most highly up-regulated genes in high BAALC expressers, which is consistent with the resistant disease associated with these patients. *Blood* **110**, 1639–1647 (2007).
227. Lin, C.-C. *et al.* Higher HOPX expression is associated with distinct clinical and biological features and predicts poor prognosis in *de novo* acute myeloid leukemia. *Haematologica* **102**, 1044–1053 (2017).
228. Brekken, R. A. & Sage, E. H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol.* **19**, 816–27 (2001).
229. Tai, I. T. & Tang, M. J. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist. Updat.* **11**, 231–46 (2008).
230. DiMartino, J. F. *et al.* Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. *Leukemia* **20**, 426–432 (2006).
231. Tirado-Gonzalez, I. *et al.* CRISPR/Cas9 edited NSG mice as PDX models of human leukemia to address the role of niche-derived SPARC. *Leukemia* 1–17 (2017). doi:10.1038/leu.2017.346
232. Blume, R. *et al.* The molecular signature of AML with increased ALDH activity suggests a stem cell origin. *Leuk. Lymphoma* 1–10 (2018). doi:10.1080/10428194.2017.1422862
233. Smith, C. *et al.* Aldehyde dehydrogenases in acute myeloid leukemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1310**, 58–68 (2014).
234. Cheung, A. M. S. *et al.* Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* **21**, 1423–1430 (2007).
235. Gerber, J. M. *et al.* A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38- cells

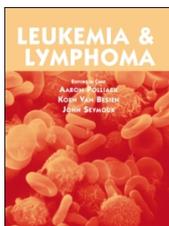
## VII. BIBLIOGRAFÍA

- in acute myeloid leukemia. *Blood* **119**, 3571–3577 (2012).
236. Moreb, J. S. *et al.* The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem. Biol. Interact.* **195**, 52–60 (2012).
  237. Angenendt, Linus, Bormann, Eike, M. J.-H. Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2) Expression Predicts a Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. in *ASH 59th Annual Meeting & Exposition. Atlanta, GA. December 9-12. Abstract 1386.* (ASH 59th Annual Meeting & Exposition. Atlanta, GA. December 9-12, 2017). at <<https://ash.confex.com/ash/2017/webprogram/Paper101960.html>>
  238. Zhang, J. *et al.* microRNA-155 acts as an oncogene by targeting the tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 602–610 (2014).
  239. Shahbazi, J., Lock, R. & Liu, T. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 enhances p53 function and represses tumorigenesis. *Front. Genet.* **4**, 1–7 (2013).
  240. Creutzig, U. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel. *Blood* **120**, 3167–3205 (2012).





ANEXO 1. ARTÍCULO PUBLICADO CON LOS RESULTADOS DEL TRABAJO DE TESIS



Leukemia & Lymphoma



ISSN: 1042-8194 (Print) 1029-2403 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ilal20>

## A 4-gene expression prognostic signature might guide post-remission therapy in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia

Montserrat Torredadell, Marina Díaz-Beyá, Susana G. Kalko, Marta Pratcorona, Josep Nomdedeu, Alfons Navarro, Bernat Gel, Salut Brunet, Jorge Sierra, Mireia Camós & Jordi Esteve

To cite this article: Montserrat Torredadell, Marina Díaz-Beyá, Susana G. Kalko, Marta Pratcorona, Josep Nomdedeu, Alfons Navarro, Bernat Gel, Salut Brunet, Jorge Sierra, Mireia Camós & Jordi Esteve (2018): A 4-gene expression prognostic signature might guide post-remission therapy in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia, *Leukemia & Lymphoma*, DOI: [10.1080/10428194.2017.1422859](https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1422859)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1422859>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 02 Feb 2018.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 52

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ilal20>

## A 4-gene expression prognostic signature might guide post-remission therapy in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia

Montserrat Torredadell<sup>a,b</sup> , Marina Díaz-Beyá<sup>c,d</sup> , Susana G. Kalko<sup>e</sup> , Marta Pratcorona<sup>d,e,f</sup> , Josep Nomdedeu<sup>f</sup> , Alfons Navarro<sup>g</sup> , Bernat Gel<sup>g</sup> , Salut Brunet<sup>f</sup> , Jorge Sierra<sup>f</sup> , Mireia Camós<sup>a,b,\*</sup>  and Jordi Esteve<sup>c,d,\*</sup> 

<sup>a</sup>Hematology Laboratory, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu University of Barcelona, Esplugues de Llobregat, Spain; <sup>b</sup>National Biomedical Research Institute on Rare Diseases (CIBER ER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>c</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>d</sup>Josep Carreras Leukemia Research Institute (IJC), Barcelona, Spain; <sup>e</sup>Bioinformatics Platform, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; <sup>f</sup>Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; <sup>g</sup>Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

### ABSTRACT

In intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia (IRC-AML) patients, novel biomarkers to guide post-remission therapy are needed. We analyzed with high-density arrays 40 IRC-AML patients who received a non-allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation-based post-remission therapy, and identified a signature that correlated with early relapse. Subsequently, we analyzed selected 187 genes in 49 additional IRC-AML patients by RT-PCR. *BAALC*, *MN1*, *SPARC* and *HOPX* overexpression correlated to refractoriness. *BAALC* or *ALDH2* overexpression correlated to shorter overall survival (OS) (5-year OS: 33 ± 8.6% vs. 73.7 ± 10.1%,  $p = .006$ ; 32 ± 9.3% vs. 66.4 ± 9.7%,  $p = .016$ ), whereas *GPR44* or *TP53INP1* overexpression correlated to longer survival (5-year OS: 66.7 ± 10.3% vs. 35.4 ± 9.1%,  $p = .04$ ; 58.3 ± 8.2% vs. 23.1 ± 11.7%,  $p = .029$ ). A risk-score combining these four genes expression distinguished low-risk and high-risk patients (5-year OS: 79 ± 9% vs. 30 ± 8%, respectively;  $p = .001$ ) in our cohort and in an independent set of patients from a public repository. Our 4-gene signature may add prognostic information and guide post-remission treatment in IRC-AML patients.

### ARTICLE HISTORY

Received 10 February 2017  
Revised 14 December 2017  
Accepted 23 December 2017

### KEYWORDS

AML; GEP; intermediate-risk

### Introduction

The prognosis of acute myeloid leukemia (AML) is highly diverse and is mainly determined by associated cytogenetic and molecular features [1–5]. Risk stratification according to genetic characteristics at diagnosis constitutes the basis of most current risk-adapted treatment protocols to assign post-remission therapy, in special the indication of an allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (alloHSCT) in first complete remission (CR1) [4]. However, prognosis and optimal post-remission therapy cannot be established precisely in many subgroups of patients, especially in those allocated in the highly heterogeneous category of intermediate-risk cytogenetics (IRC-AML). Prognostic stratification in IRC-AML is mainly based on mutational

status of three genes with a well-established prognostic impact, such as *NPM1*, *FLT3* internal tandem duplication (*FLT3*-ITD) and *CEBPA* double mutation (*CEBPAdm*). Nonetheless, prognosis assessment in patients within this cytogenetic group might be particularly difficult due to complex interactions among gene mutations with different prognostic impact, concurrence of multiple mutations with uncertain prognosis beyond *NPM1*, *FLT3*-ITD and *CEBPA*, or modulation of prognostic value by additional molecular features such as allelic burden of specific mutations [6–8]. Thus, gene mutation profiling in this type of AML, similarly to most cancer types, shows the extreme genomic complexity of the disease, with a virtually unique mutation profile in every patient. Therefore, the search

**CONTACT** Jordi Esteve  jesteve@clinic.cat  Hematology Department, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

\*These authors share the senior authorship of this study.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

of new biomarkers which could compile these underlying mutational gene networks and could anticipate chemosensitivity and response to main post-remission options might be of a great clinical interest in this cytogenetic group.

Gene expression profiling (GEP) enables the study of the expression of the entire genome and has allowed the discovery of gene expression signatures predictive of response to standard AML chemotherapy beyond gene mutation screening. Several studies have shown that GEP can identify new prognostic relevant subclasses, especially in normal karyotype AML (NK-AML) [9–15]. Furthermore, GEP studies identified a stem-cell signature associated with inferior outcome in NK-AML patients [16,17]. However, prognostic value of different biomarkers might strongly depend on post-remission therapy, which differs among different AML protocols, in special regarding the indication of alloHSCT in CR1.

Thereby, the aim of our study was to identify a gene expression signature predictive of response to post-remission therapy in IRC-AML patients. For this purpose, we analyzed the GEP in a group of IRC-AML patients who received a non-alloHSCT based post-remission therapy in CR1, consisting of an autologous hematopoietic stem-cell transplantation (autoHSCT) in the vast majority. Genes that showed prognostic value in this GEP analysis, together with other genes previously associated with prognosis, were specifically analyzed in a non-selected independent cohort of IRC-AML patients, allowing us the identification of a 4-gene signature associated with outcome.

## Materials and methods

### Patients included in the study

For the analysis of prognostic value of GEP, we selected 40 patients diagnosed with MRC-defined IRC-AML [5] during interval 1996–2008 who achieved CR1 after intensive chemotherapy following clinical trials of Spanish AML cooperative group CETLAM and who underwent a non-alloHSCT post-CR strategy (subset A). Subsequently, we analyzed the prognostic value of gene expression levels of a selected group of genes in a second subset of 49 IRC-AML patients (subset B), that included also patients treated with alloHSCT as post-remission therapy, to confirm our results in a non-biased population of IRC-AML patients. The main characteristics of these two sets of patients are summarized in Table 1.

For validation of our prognostic findings, we used data of an independent cohort of 79 NK-AML patients

who received intensive treatment, contained in the public repository of the Leukemia Gene Atlas (LGA, <http://www.leukemiagene-atlas.org/LGAtlas>) [14,18]. This public platform includes gene expression data and sufficient clinical information to conduct a meaningful survival analysis.

### High-density array study

Total RNA was isolated from bone marrow in most cases by standard methods. In all cases, integrity of RNA was examined with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). One microgram of RNA was reverse transcribed to cDNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Global gene expression was examined with oligonucleotide HGU133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA), and gene expression measures were normalized using *RMA* methodology from the *Affy* package (Bioconductor project). Unsupervised and supervised comparisons were performed using *TM4 Microarrays Software Suite* and *Limma* software (Bioconductor) [19]. Supervised analysis was based on patients' outcome, comparing the gene signature of long-term responders (defined as a CR duration lasting for more than 2 years,  $n = 25$ ) with that of patients presenting with early relapse (CR <2 years,  $n = 15$ ). The median follow-up in long-term responders was 49.3 months (25–135 months). Those genes with a significant  $p$  value <.01 and log-fold change >.5 were selected for validation in an independent cohort of patients (subset B).

### Mutational analysis

*NPM1* and *FLT3*-ITD mutations were analyzed on DNA as previously described [20,21]. *CEBPA* mutational status was studied by PCR and direct sequencing as reported [22].

### Low density array study

To validate the prognostic value of 132 genes identified in the GEP analysis (Supplementary Table S1) and other 55 known prognostic genes previously reported (Supplementary Table S2), we performed quantitative PCR using TaqMan<sup>®</sup> Low Density Arrays (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an independent cohort of IRC-AML patients (subset B). Data were analyzed with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, using GAPDH as housekeeping gene and the median expression value of all samples as calibrator. We selected those genes expressed in more than 10% of patients for the analysis.

**Table 1.** Main characteristics of patients included in the study.

	Subset A <i>n</i> (%) <i>n</i> = 40	Subset B <i>n</i> (%) <i>n</i> = 49	<i>p</i>
<b>Diagnostic features</b>			
Median age, years (range)	52 (17–68)	56 (22–71)	.216
Gender (male/female)	27/13 (67.5/32.5)	22/27 (44.9/55.1)	.053
<b>FAB subtype</b>			
M1/M2	15 (37.5)	21 (42.8)	
M4/M5	20 (50)	24 (49)	
M6	3 (7.5)	0 (0)	
Other	2 (5)	4 (8.2)	
Leukocyte count at diagnosis, $\times 10^9/L$ median (range)	38.9 (0.9–179)	28 (1.3–192)	.220
<b>Cytogenetics</b>			
Normal karyotype	29 (72.5)	32 (65.3)	.5
Other intermediate-risk abnormality	11 (27.5)	17 (34.7)	
<b>Molecular features</b>			
<i>NPM1</i> mutation	18 (45)	26 (53.1)	.668
<i>FLT3</i> -ITD	7 (17.5)	20 (40.9)	.021
<i>CEBPA</i> double mutation <sup>a</sup>	4/13	2/13	.370
<b>ELN risk category</b>			
Favorable	18	14	.274
Intermediate-I	16	25	
Intermediate-II	6	10	
<b>Treatment received</b>			
<b>Protocol (CETLAM group)</b>			
CETLAM94	9 (22.5)	2 (4.1)	.001
CETLAM99	17 (42.5)	11 (22.4)	
CETLAM2003	12 (30)	21 (42.8)	
Other	2 (5)	15 (30.6)	
<b>Post-remission therapy (CR1)</b>			
Allogeneic HSCT based therapy	0 (0)	14 (28.6)	<.0001
<b>Non Allogeneic HSCT based therapy</b>			
High-dose cytarabine-based chemotherapy	8 (22.5)	24 (49)	
Autologous HSCT	32 (77.5)	10 (20.4)	
Syngeneic HSCT	0 (0)	1 (2)	

Subset A corresponds to patients included in the gene-expression profile analysis (GEP). Subset B constitutes an independent cohort of IRC-AML used for the analysis of a selected group of genes with prognostic value resulting from the GEP study.

ELN: European Leukemia Net; HSCT: hematopoietic stem-cell transplantation; CR1: first complete remission.

<sup>a</sup>Among patients with a *NPM1*wt/absent *FLT3*-ITD genotype. Statistically significant *p* values are shown in italics.

The 187 genes analyzed by quantitative PCR are listed in [Supplementary Tables S1 and S2](#).

### Statistical analysis

Data obtained from Low Density Array study were analyzed with BRB-Array Tools version 4.2.0 (Richard Simon & BRB-Array Tools Development Team, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) software and SPSS v.22.0 (Chicago, IL). We used the Class Comparison Tool from BRB-Array Tools to identify those differentially expressed genes among responders and refractory patients. This tool uses univariate parametric and non-parametric tests to find genes that are differentially expressed between two or more phenotype classes and multivariate permutation tests to control the number of false discoveries.

Additionally, the Survival Analysis Tool was used to identify genes whose expression correlated with survival. This method fits proportional hazards models

relating survival to each gene, one gene at a time, and computes the *p*-value for each gene for testing the hypothesis that survival time is independent of the expression level for that particular gene. This method uses the Cox proportional hazards model and the Efron method of handling ties, a regression model in which the hazard function for an individual is a function of predictor variables; the predictor variables are introduced as log expression levels.

Kaplan–Meier survival curves were then drawn for all genes predicted to show a survival risk either above or below average risk, using cutoff points of gene expression levels identified by MaxStat package of R software [23].

Overall survival (OS) was calculated from diagnosis to death and leukemia-free survival (LFS) from CR to relapse or death. Both OS and LFS were estimated with Kaplan–Meier tests and the comparison of between groups of patients was performed with log-rank test. Finally, a multivariate analysis for OS was

performed using the Cox proportional hazards model including age, white blood cell count at diagnosis, number of cycles to CR, gender, mutational status of *NPM1*, *FLT3-ITD*, and a score value resulting from the gene expression level of four selected genes with prognostic impact on survival.

## Results

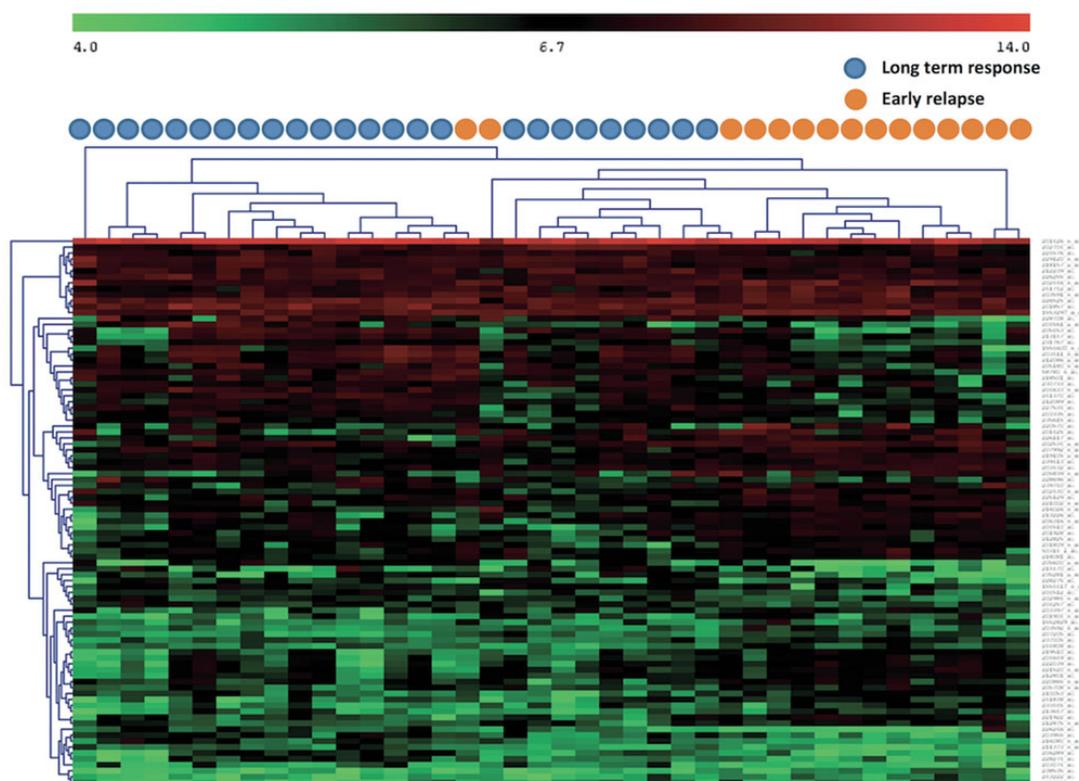
### Gene expression signature associated to outcome after non-alloHSCT post-remission therapy

First, we analyzed the GEP of the 40 patients included in subset A of patients in search of a gene signature accounting for chemosensitivity and predictive of outcome after standard AML post-remission therapy, excluding alloHSCT (32 patients received an autologous HSCT and 8 received high-dose cytarabine). An unsupervised analysis of GEP using largest variability genes grouped these patients into two differentiated arms of 14 and 26 patients, respectively. These two

arms (A and B) differed in the proportion of patients with *NPM1* mutations, more prevalent in arm A (77% vs. 31%,  $p = .02$ ; [Supplementary Figure S1](#)). By contrast, the distribution of the GEP according to these two arms did not show prognostic value.

When a supervised analysis according to outcome (i.e. long-term responders vs. early relapsers) was performed, a signature of 92 probe sets corresponding to 75 genes whose expression differed according to response after non-alloHSCT post-CR1 therapy was identified ([Figure 1](#) and [Supplementary Table S3](#)). Specifically, homeobox genes *HOXA10*, *HOXB2* and *HOXA4* were overexpressed in the favorable group, whereas genes such as *ENG*, *CDC7*, *CSF3R*, *ALDH2* and *RETN* showed a higher expression in the unfavorable group.

Given the known prognosis of *NPM1* and *FLT3-ITD* mutations, we also performed an analysis restricted to 19 patients without mutations in these two genes (*NPM1*wt/*FLT3-ITD*neg genotype), most of them also lacking *CEBPA*dm. In this subgroup, 293 genes were



**Figure 1.** Heatmap containing a distinctive gene signature according to long-term outcome (long-term responders –blue circle- vs. early relapsers –orange circles-) after non-alloHSCT-based post-remission therapy obtained in the supervised study. Differently expressed genes in both groups of patients are listed in [Supplementary Table 2](#).  $N = 92$  probe sets (75 genes) with  $p < .01 + \log$  fold-change  $> .5$ .

differentially expressed according to outcome (Supplementary Table S4). Thus, several genes involved in cell cycle control (*CDC7*, *CDC2* and *CDC5*) and apoptosis (*CFLAR*, *FAS*, *DAPP1* and *BRCA1*) were highly expressed in the unfavorable subset.

Of note, 19 genes correlated with patient outcome in both the overall series and the *NPM1*wt/*FLT3*-ITDneg subgroup (Supplementary Table S5). In contrast to the characteristic signature of *NPM1*mut patients, expression of *HOX* genes was low in the *NPM1*wt/*FLT3*-ITDneg cohort and did not correlate with outcome (data not shown).

#### Identification of a 4-gene expression prognostic score

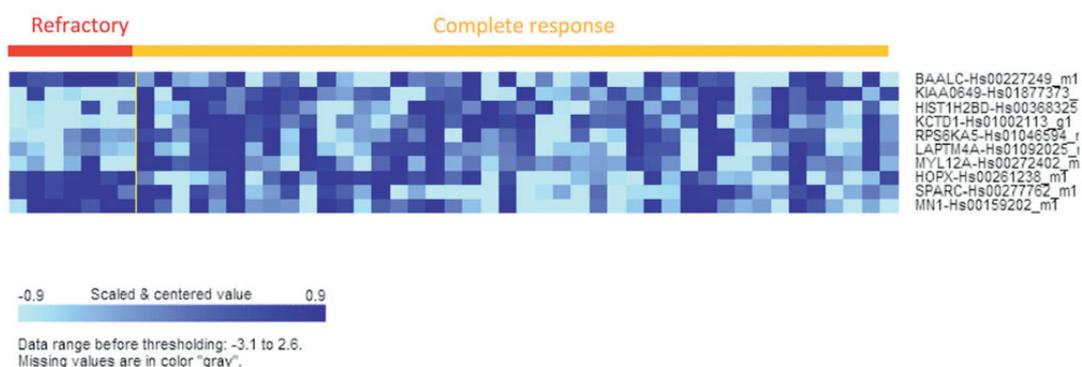
We subsequently analyzed the prognostic value of the expression level of 187 individual genes, measured by real-time PCR using Taqman<sup>®</sup> Low Density Arrays, in an additional series of 49 unselected IRC-AML (Table 1). Most of these genes, 132, were selected based on their differential expression according to outcome in our previous GEP study (listed in Supplementary Table S1), but we also included other 55 genes with a known oncogenic role and/or previously reported prognostic value in AML (listed in Supplementary Table S2).

First, we searched for genes predictive of response to frontline induction chemotherapy, based on a standard 3 + 7 regimen, performing a class comparison analysis with BRB-Array Tools. Noticeably, refractoriness to initial induction therapy was associated with a 10-gene signature characterized, among others, by the overexpression of *BAALC*, *MN1*, *HOPX1* and *SPARC* (Figure 2).

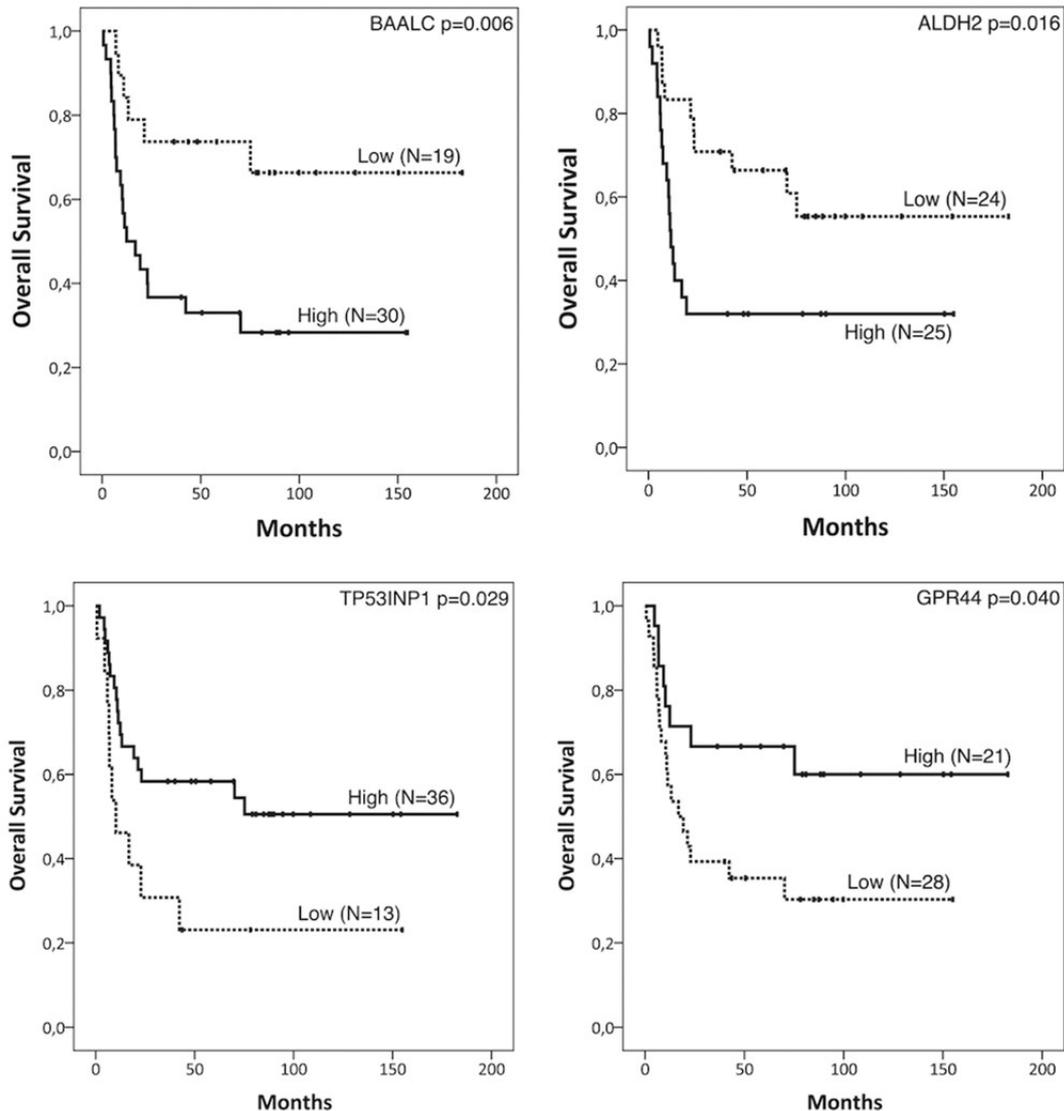
For survival analysis, we performed a multivariate permutations test with the Survival Analysis package

from BRB-Array Tools and used the cut-off level obtained with the MaxStat package to analyze the univariate prognostic value of all individual genes. After this analysis, four different genes were associated with OS. Thus, patients with high *BAALC* and *ALDH2* expression showed a shorter OS (5-year OS:  $33 \pm 8.6\%$  vs.  $73.7 \pm 10.1\%$ ,  $p = .006$ ;  $32 \pm 9.3\%$  vs.  $66.4 \pm 9.7\%$ ,  $p = .016$ , respectively; Figure 3). On the contrary, patients with higher *GPR44* and tumor protein *p53*-induced nuclear protein 1 gene (*TP53INP1*) expression showed a better survival (5-year OS:  $66.7 \pm 10.3\%$  vs.  $35.4 \pm 9.1\%$ ,  $p = .04$ ;  $58.3 \pm 8.2\%$  vs.  $23.1 \pm 11.7\%$ ,  $p = .029$ , respectively; Figure 3). Out of this 4-gene signature, *ALDH2*, *GPR44* and *TP53INP1* were among the genes identified in the GEP study in subset A of patients (Supplementary Table S1), while *BAALC* was added for the analysis in subset B for its previously reported prognostic value in AML [24–27].

Based on these results, we built up a risk score combining the relative expression level of these four genes (i.e. *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* and *TP53INP1*). We defined high *BAALC* and *ALDH2* expression and low *GPR44* and *TP53INP1* as high-risk factors. Patients were classified into two groups according to the number of high-risk factors: a low-risk gene score (0–1 factor) and a high-risk gene score (2–4 factors). Survival was markedly different between both risk groups, with a 5-year OS of  $29.6 \pm 8.4\%$  vs.  $78.9 \pm 9.4\%$  in high- and low-risk patients, respectively ( $p = .001$ ; Figure 4(a)). Moreover, LFS was significantly lower in patients with high-risk score ( $33.3 \pm 9.6$  vs.  $70.7 \pm 11.2\%$ ,  $p = .003$ , data not shown). A multivariate analysis for survival confirmed the independent prognostic value of the 4-gene expression score (HR = 5.8, 95%CI: 2.1–15.8;  $p = .001$  for OS and HR = 3.1, 95% CI: 1.1–8.7;  $p = .03$  for LFS), together with patient age.



**Figure 2.** Clustered heatmap of differentially expressed genes according to response to induction therapy showed a distinctive 10-gene signature in patients failing to achieve CR after frontline standard induction chemotherapy.



**Figure 3.** Overall survival according to expression level of *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* and *TP53INP1* genes in subset B.

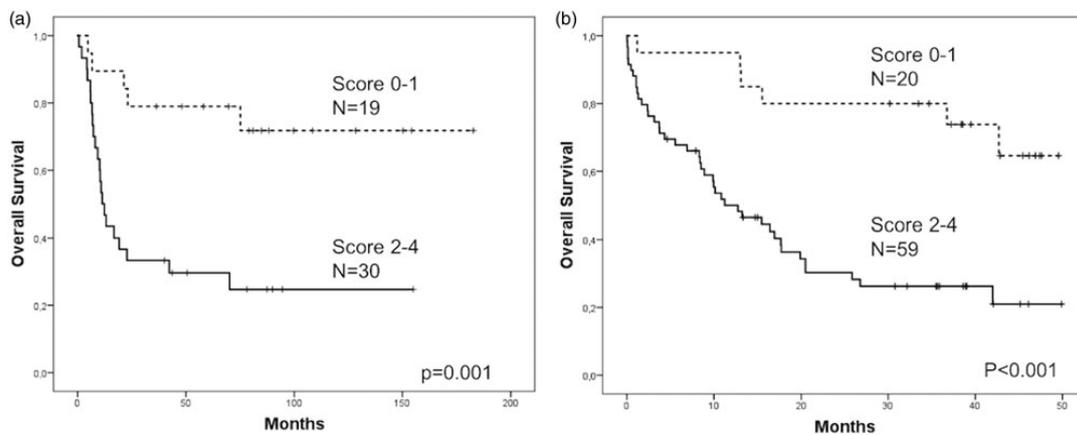
Presence of *FLT3-ITD* independently impacted on LFS and showed a statistical trend for OS (Table 2).

#### **Validation of 4-gene expression prognostic score in an independent data set**

First, we analyzed the prognostic value of the expression of *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* and *TP53INP1* individually using public gene expression arrays data from the LGA repository. The independent data set consisted of

79 NK-AML patients (GSE 12417), analyzed on HG-U133 plus 2.0 microarray and previously published [14]. We used the cutoff level obtained with the MaxStat package to analyze the univariate prognostic value of all individual genes and confirmed the impact of high levels of *BAALC* in this cohort. Furthermore, patients with low *GPR44* and *TP53INP1* expression did significantly worse (data not shown).

In a second step, we validated our 4-gene expression prognostic score in this cohort of patients (5-year



**Figure 4.** Overall survival according to a 4-gene expression risk score. High *BAALC* and *ALDH2* expression and low *GPR44* and *TP53INP1* were defined as high-risk factors. Patients were classified into two groups according to the number of high-risk factors: low-risk gene score (0–1 factor) and high-risk gene score (2–4 factors). (a) Outcome according to the 4-gene expression risk score in subset B. (b) Validation of the 4-gene expression risk score in an independent cohort of 79 adult normal karyotype AML patients using gene expression data contained in the public repository of the Leukemia Gene Atlas [18].

OS of  $21.0 \pm 6.8\%$  vs.  $64.6 \pm 12.4\%$  in high- and low-risk patients, respectively ( $p < .001$ ; HR = 4.45, 95%CI: 1.86–10.6, Figure 4(b)).

### Discussion

Our study was aimed at searching new biomarkers capable of predicting the outcome after standard post-remission therapy in a series of 89 IRC-AML patients. With a two-step analysis based on GEP, we were able to identify a gene signature associated with long response after non-alloHSCT-based post-remission treatment. Furthermore, we built a 4-gene expression score with a strong prognostic impact in IRC-AML patients beyond standard mutational screening. Interestingly, this 4-gene signature included genes such as *BAALC* and *ALDH2*, associated to hematopoietic stemness and previously reported as potential strong prognostic factors. We propose the 4-gene signature as a simple tool to refine prognosis that may help guiding post-remission treatment in IRC-AML subgroup of patients.

The IRC-AML category comprehends a largely heterogeneous group of patients with different outcome, and prognosis and assignment of optimal post-remission therapy are not well defined in these cases. Mutational profiling of a limited set of genes has emerged as the standard tool to allocate patients to different post-remission strategies, including indication of alloHSCT in CR1. Nonetheless, the high complexity resulting from multiple interactions among several

mutations with a different prognostic impact leads to a wide diversity of different molecular subgroups, which precludes formulation of a simple prognostic model based on mutational screening. An example of this has been recently shown in a study performed in 223 patients harboring a *NPM1* mutation, with distinction of 150 different molecular subgroups after mutational screening of 50 additional cooperating genes [28]. In that sense, an international study by Papaemmanuil et al. showed the genetic complexity of AML and proposed a new classification identifying 11 molecular categories with prognostic implications [29]. Other approaches to predict prognosis have focused on GEP studies of mRNA expression of coding genes and non-coding RNA profiling, such as microRNAs and long non-coding RNAs expression. This strategy may circumvent some of the limitations derived from prognostic assessment merely based on mutational screening [15,30–33]. GEP-based studies for outcome prediction allow the analysis of comprehensive number of genes with potential prognostic value, unraveling underlying mechanisms of chemosensitivity to most commonly used anti-leukemic agents. Although previous studies have addressed the prognostic value of GEP in different subtypes of AML and other groups had identified gene signatures that were predictive for the response to induction therapy [34] or to specific compounds [35], we designed a different experimental approach. Thus, our GEP study was focused mainly on the search of a distinctive gene signature associated to a prolonged response in the

group of IRC-AML patients who received a non-allo HSCT post-remission therapy.

A supervised analysis based on treatment outcome in the overall series disclosed the differential expression of 75 genes, including the overexpression of several homeobox genes such as *HOXA10*, *HOXB2* and *HOXA4*, whereas patients presenting an early relapse showed overexpression of determined genes involved in proliferation and apoptosis. This finding is probably, in part, related to the higher percentage of patients harboring *NPM1* mutations in the favorable subset, a mutation known to present a homeobox gene specific expression signature [36]. To overcome the effect of *NPM1* mutation, we repeated an analysis restricted to the subset of *NPM1*wt/*FLT3*-ITDneg patients, most of them also lacking *CEBPAdm* ('triple negative genotype'), and obtained a more clear-cut signature, composed of 293 differentially expressed genes (detailed in [Supplementary Table S4](#)). Interestingly, ontogenic enrichment analysis derived from this outcome associated signature revealed that several genes involved in cell cycle control (*CDC7*, *CDC2* and *CDC5*) and apoptosis (*CFLAR*, *FAS*, *DAPP1* and *BRCA1*) were highly expressed in the unfavorable subset. This group of 'triple negative' genotype might result of particular interest, since the absence of both favorable (*NPM1*, *CEBPAdm*) and poor-prognosis (*FLT3*-ITD) mutations confer a great degree of uncertainty regarding prognosis and optimal post-remission therapy. The results shown by GEP in this particular molecular subset would support a heterogeneous biological background and diverse prognosis, with the existence of a better prognosis subgroup, which could be able to achieve prolonged response after high-dose cytarabine (HiDAC)-based chemotherapy or autoHSCT. Nevertheless, the relatively low number of patients included in our study limits the robustness of these findings.

Prognostic value of those genes associated to treatment outcome in the transcriptome analysis was assessed in an independent cohort of patients, in combination with a group of genes with previously reported prognostic impact. This second part of the analysis allowed the identification of four genes (namely, *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* and *TP53INP1*), three of them previously captured in the patient subset A GEP analysis (*ALDH2*, *GPR44* and *TP53INP1*) and adding to the signature *BAALC* expression level for its recurrently reported prognostic value in AML. High *BAALC* expression was associated with adverse prognostic mutations and poor outcome, especially in CN-AML [24–27,37]. The combined measurement of the relative expression of the four genes generated a clinically useful risk

**Table 2.** Multivariate analysis for overall survival.

Parameter	<i>p</i>	HR	95% CI
Age	.011	1.051	1.017–1.086
Gene-expression risk score <sup>a</sup> (high risk, $\geq 2$ adverse features)	.001	5.846	2.157–15.841
<i>FLT3</i> -ITD	.068	2.202	0.943–5.141
<i>NPM1</i> mutation	.187	0.526	0.202–1.366
Gender	.274	1.585	0.695–3.618
Number of cycles to CR	.098	0.902	0.798–1.019
WBC	.162	1.005	0.998–1.012

HR: hazard ratio; CI: confidence interval; CR: complete remission; WBC: white blood cell count.

<sup>a</sup>Gene risk score according to expression level of *BAALC*, *ALDH2*, *GPR44* and *TP53INP1*.

score capable to segregate groups of patients with markedly differentiated outcome, with a good-prognosis subset (characterized by none or only one risk factor) and a higher-risk subset ( $\geq 2$  risk factors). Notably, this risk score showed a strong prognostic impact (HR = 5.846, 95% CI: 2.157–15.841,  $p = .001$ ), independent of other prognostically important mutations. Since this risk score was generated from two different patients' cohorts enriched with patients undergoing autoHSCT, this prognostic tool could be used to select patients who could benefit from such a procedure and to identify patients with a high relapse risk after autoHSCT. *NPM1* mutation and *FLT3*-ITD, well-established prognostic factors in IRC-AML, did not achieve statistically prognostic significance in multivariate analysis for OS, a finding probably related to the relatively limited sample size. Other potential reasons accounting for their lack of prognostic value are the association of *NPM1* mutations with the low-risk GEP score, and the possible role of alloHSCT in modifying the prognosis of patients with high-risk features such as *FLT3*-ITD AML. Nonetheless, *FLT3*-ITD showed a clear statistical trend towards a deleterious effect on survival in the multivariate analysis ([Table 2](#)), and an independent impact for LFS.

A complementary analysis was the study of the GEP associated to refractoriness to frontline standard induction chemotherapy, characterized by high expression of *BAALC*, *MN1*, *SPARC* and *HOPX* genes in patients failing to first induction therapy. Of note, overexpression of *BAALC*, *MN1* and gene had been previously described as a negative prognostic factor to response in IRC-AML [26,38,39].

In line with previous reports, our study identified certain genes involved in stemness programs, such as *BAALC*, *ALDH2* and *HOPX*. In this sense, high *BAALC* and *HOPX* expression were integrated in reported leukemia stem cell (LSC) poor-risk signatures [17,25,40]. Similarly, high ALDH enzyme activity in AML was described as a stem cell marker that correlated with

poor outcome [41]. Although *ALDH2* has not been previously reported as an adverse prognostic factor in AML patients, the overexpression of this isoenzyme has been correlated with proliferation and drug resistance [42,43].

In our study, a low expression of *TP53INP1* and *GPR44* was associated with poorer outcome. Interestingly, *TP53INP1* gene is a tumor suppressor located in 8q22, and a known target of miR-155, a microRNA whose overexpression correlates with immature, stem cell-like signature and poorer prognosis in AML [16,44]. Several studies have shown that *TP53INP1* is down-regulated in different types of cancer, although it has not been previously described in AML [45,46].

A limitation of this study is related to its relatively small sample size. However, to enhance the clinical prognostic value of a comprehensive GEP analysis, we chose a highly selected subset of IRC-AML patients responding to standard induction AML chemotherapy and undergoing standard post-remission therapy, mainly consisting of an autoHSCT, and explicitly excluding alloHSCT, to avoid the interference multicomponent effect exerted by this last procedure. Besides, the validation of 4-gene expression risk score of prognostic value in a completely independent cohort of patients from a public repository database, strongly suggest the true clinical potential value of these proposed biomarkers to predict chemosensitivity.

In summary, our study based on correlation of gene expression profile with post-remission-treatment outcome allowed us to identify a 4-gene expression score with a strong prognostic value in IRC-AML, independent of most frequent gene mutations observed in this molecular subgroup. Notably, some of these genes are characteristic of LSC signatures. This simple 4-gene score, which warrants further confirmation in larger studies, could be used to refine prognostic assessment and could guide post-remission treatment in the large and heterogeneous category of IRC-AML.

**Potential conflict of interest:** Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article online at <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1422859>.

### Funding

This research is supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias/Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) N-2004-FS041085, PI080158, PI13/00999, PI014/00450, PIE15/00028, RETICS RD06/0020/0004, RD12/0036/007, PI16/01027 and AGAUR 2014-SGR-1281. Marina Díaz-Beyá is supported by ISCIII (Río Hortega CM13/00205).

### ORCID

Montserrat Torredadell  <http://orcid.org/0000-0002-0027-3215>  
 Marina Díaz-Beyá  <http://orcid.org/0000-0001-9624-2597>  
 Susana G. Kalko  <http://orcid.org/0000-0002-6701-0233>  
 Marta Pratcorona  <http://orcid.org/0000-0001-6375-596X>  
 Josep Nomdedeu  <http://orcid.org/0000-0003-3399-346X>  
 Alfons Navarro  <http://orcid.org/0000-0001-6071-0926>  
 Bernat Gel  <http://orcid.org/0000-0001-8878-349X>  
 Salut Brunet  <http://orcid.org/0000-0003-0491-1672>  
 Jorge Sierra  <http://orcid.org/0000-0001-7546-326X>  
 Mireia Camós  <http://orcid.org/0000-0003-3658-7942>  
 Jordi Esteve  <http://orcid.org/0000-0002-8056-648X>

### References

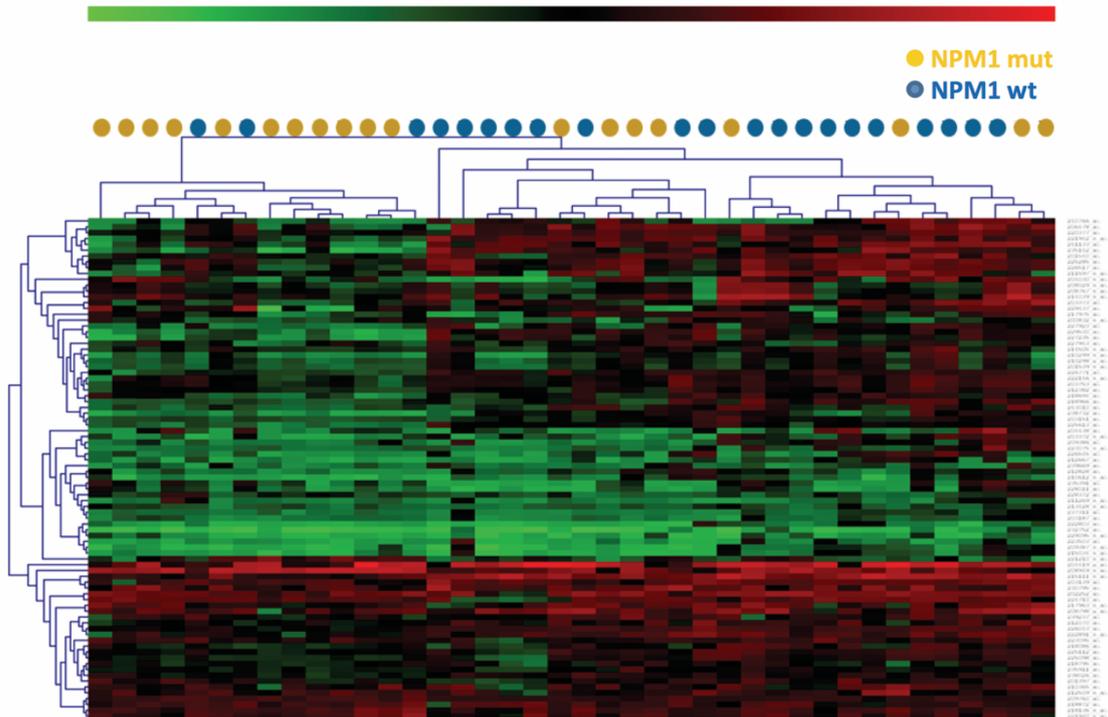
- [1] Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322–2333.
- [2] Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30:4515–4523.
- [3] Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115:453–474.
- [4] Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9:579–590.
- [5] Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116:354–365.
- [6] Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366:1079–1089.
- [7] Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013;121:2734–2738.
- [8] Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009;113:3088–3091.
- [9] Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1617–1628.

- [10] Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1605–1616.
- [11] Radmacher MD, Marcucci G, Ruppert AS, et al. Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2006;108:1677–1683.
- [12] Li Z, Herold T, He C, et al. Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *J Clin Oncol*. 2013;31:1172–1181.
- [13] Bullinger L, Döhner K, Kranz R, et al. An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood*. 2008;111:4490–4495.
- [14] Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD, et al. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;112:4193–4201.
- [15] Miller BG, Stamatoyannopoulos JA. Integrative meta-analysis of differential gene expression in acute myeloid leukemia. *PLoS One*. 2010;5:e9466.
- [16] Metzeler KH, Maharry K, Kohlschmidt J, et al. A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013;27:2023–2031.
- [17] Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med*. 2011;17:1086–1093.
- [18] Hebestreit K, Gröttrup S, Emden D, et al. Leukemia gene atlas—a public platform for integrative exploration of genome-wide molecular data. *PLoS One*. 2012;7:e39148.
- [19] Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, et al. TM4 microarray software suite. *Meth Enzymol*. 2006;411:134–193.
- [20] Boissel N, Renneville A, Biggio V, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005;106:3618–3620.
- [21] Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326–4335.
- [22] Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004;22:624–633.
- [23] Torsten H. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. In: Berthold L, editor. Vol. 43. *Computational statistics & data analysis*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.; 2003. p. 121–137.
- [24] Tanner SM, Austin JL, Leone G, et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:13901–13906.
- [25] Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*. 2008;111:5371–5379.
- [26] Weber S, Alpermann T, Dicker F, et al. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e173.
- [27] Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, et al. The expression level of BAALC-associated microRNA miR-3151 is an independent prognostic factor in younger patients with cytogenetic intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2015;5:e352.
- [28] Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127:29–41.
- [29] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374:2209–2221.
- [30] Bacher U, Kohlmann A, Haferlach T. Current status of gene expression profiling in the diagnosis and management of acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145:555–568.
- [31] Shivarov V, Bullinger L. Expression profiling of leukemia patients: key lessons and future directions. *Exp Hematol*. 2014;42:651–660.
- [32] Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, et al. MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28:804–812.
- [33] Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358:1919–1928.
- [34] Heuser M, Wingen LU, Steinemann D, et al. Gene-expression profiles and their association with drug resistance in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005;90:1484–1492.
- [35] Raponi M, Lancet JE, Fan H, et al. A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111:2589–2596.
- [36] Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106:3747–3754.
- [37] Heuser M, Berg T, Kuchenbauer F, et al. Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia*. 2012;26:532–536.
- [38] Haferlach C, Kern W, Schindela S, et al. Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia. *Genes Chromosom Cancer*. 2012;51:257–265.
- [39] Alachkar H, Santhanam R, Maharry K, et al. SPARC promotes leukemic cell growth and predicts acute

- myeloid leukemia outcome. *J Clin Invest.* 2014;124:1512–1524.
- [40] Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, et al. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA.* 2010;304:2706–2715.
- [41] Cheung AM, Wan TS, Leung JC, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia.* 2007;21:1423–1430.
- [42] Gerber JM, Smith BD, Ngwang B, et al. A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012;119:3571–3577.
- [43] Moreb JS, Ucar D, Han S, et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact.* 2012;195:52–60.
- [44] Marcucci G, Maharry KS, Metzeler KH, et al. Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients. *J Clin Oncol.* 2013;31:2086–2093.
- [45] Shahbazi J, Lock R, Liu T. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 enhances p53 function and represses tumorigenesis. *Front Genet.* 2013;4:80.
- [46] Zhang J, Cheng C, Yuan X, et al. microRNA-155 acts as an oncogene by targeting the tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:602–610.

## ANEXO 2. MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL ARTÍCULO

**Supplementary Figure 1.** Unsupervised analysis of gene-expression profile performed in 40 patients (subset A) with a different outcome (long responders, n=25; early relapse, in less than 2 years, n=15) following a non-alloHSCT post-CR1. Two main branches were distinguished, with evident *NPM1* mutation predominance in arm A, but without a clear-cut prognostic value.



VIII. ANEXOS

**Supplementary Table 1.** List of 132 genes present in the GEP signature with prognostic value in a cohort of non-allografted patients, and measured by real-time PCR using Taqman Low-Density Arrays.

<i>ADAM8</i>	<i>DDAH2</i>	<i>HOXB5</i>	<i>PRR11</i>	<i>YPEL1</i>
<i>AHNAK</i>	<i>DHFR</i>	<i>KCNMB4</i>	<i>PSEN2</i>	<i>YPEL5</i>
<i>ALDH2</i>	<i>DNMT1</i>	<i>KCTD1</i>	<i>PTPN22</i>	<i>ZBTB33</i>
<i>AMPD3</i>	<i>DPH5</i>	<i>KIAA0649</i>	<i>PXK</i>	<i>ZNF143</i>
<i>ANXA8L2</i>	<i>DSN1</i>	<i>KIAA1715</i>	<i>PYGL</i>	
<i>APH1A</i>	<i>ECT2</i>	<i>LAPTM4A</i>	<i>RAB27B</i>	
<i>ARHGAP19</i>	<i>ENG</i>	<i>LMNA</i>	<i>RACGAP1</i>	
<i>ASAP1</i>	<i>ERGIC1</i>	<i>LRG1</i>	<i>RETN</i>	
<i>ATAD2</i>	<i>ESPL1</i>	<i>LST1</i>	<i>RNASE2</i>	
<i>AURKB</i>	<i>ETV6</i>	<i>MCM4</i>	<i>RNASE3</i>	
<i>BAG5</i>	<i>F11R</i>	<i>MKI67</i>	<i>RP9</i>	
<i>BUB1</i>	<i>FAM107B</i>	<i>MKNK1</i>	<i>RPS6KA1</i>	
<i>C11orf31</i>	<i>FANCD2</i>	<i>MRC1/MRC1L1</i>	<i>RPS6KA5</i>	
<i>C21orf57</i>	<i>FAS</i>	<i>MXD4</i>	<i>RRM2</i>	
<i>C2CD2</i>	<i>FBXO9</i>	<i>MYBL2</i>	<i>SCAPER</i>	
<i>C7orf41</i>	<i>FOXM1</i>	<i>NCAPD3</i>	<i>SGMS1</i>	
<i>CCNA2</i>	<i>FSTL3</i>	<i>NCAPG2</i>	<i>SIRPA</i>	
<i>CCNB2</i>	<i>FXYP6</i>	<i>NGFRAP1</i>	<i>SLC45A3</i>	
<i>CDC42SE1</i>	<i>GALNT3</i>	<i>NIPSNAP1</i>	<i>SPAG5</i>	
<i>CDC7</i>	<i>GMNN</i>	<i>ORC6L</i>	<i>SRGN</i>	
<i>CDCA2</i>	<i>GPR44</i>	<i>PAQR7</i>	<i>SUPT3H</i>	
<i>CDCA8</i>	<i>GPSM1</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>TMED4</i>	
<i>CDK1</i>	<i>GPSM2</i>	<i>PGGT1B</i>	<i>TMPO</i>	
<i>CEACAM4</i>	<i>GRAMD1A</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TNFSF13B</i>	
<i>CENPA</i>	<i>H3F3B</i>	<i>PKM2</i>	<i>TOB1</i>	
<i>CENPM</i>	<i>HIST1H2BD</i>	<i>PKMYT1</i>	<i>TP53INP1</i>	
<i>CEP152</i>	<i>HIST2H4A/HIST2H4B</i>	<i>PLAGL2</i>	<i>TPSB2/TPSAB1</i>	
<i>CIRBP</i>	<i>HMGB2</i>	<i>PLK1</i>	<i>TPX2</i>	
<i>COMMD6</i>	<i>HOXA10</i>	<i>PLK4</i>	<i>TRIM25</i>	
<i>CSF3R</i>	<i>HOXA4</i>	<i>PLSCR1</i>	<i>TRIM45</i>	
<i>CSTA</i>	<i>HOXB2</i>	<i>POLE</i>	<i>TROAP</i>	
<i>CTDSPL</i>	<i>HOXB4</i>	<i>PRAMI</i>	<i>VIM</i>	

## VIII. ANEXOS

**Supplementary Table 1.** List of 132 genes present in the GEP signature with prognostic value in a cohort of non-allografted patients, and measured by real-time PCR using Taqman Low-Density Arrays.

<i>ADAM8</i>	<i>DDAH2</i>	<i>HOXB5</i>	<i>PRR11</i>	<i>YPEL1</i>
<i>AHNAK</i>	<i>DHFR</i>	<i>KCNMB4</i>	<i>PSEN2</i>	<i>YPEL5</i>
<i>ALDH2</i>	<i>DNMT1</i>	<i>KCTD1</i>	<i>PTPN22</i>	<i>ZBTB33</i>
<i>AMPD3</i>	<i>DPH5</i>	<i>KIAA0649</i>	<i>PXK</i>	<i>ZNF143</i>
<i>ANXA8L2</i>	<i>DSN1</i>	<i>KIAA1715</i>	<i>PYGL</i>	
<i>APH1A</i>	<i>ECT2</i>	<i>LAPTM4A</i>	<i>RAB27B</i>	
<i>ARHGAP19</i>	<i>ENG</i>	<i>LMNA</i>	<i>RACGAP1</i>	
<i>ASAP1</i>	<i>ERGIC1</i>	<i>LRG1</i>	<i>RETN</i>	
<i>ATAD2</i>	<i>ESPL1</i>	<i>LST1</i>	<i>RNASE2</i>	
<i>AURKB</i>	<i>ETV6</i>	<i>MCM4</i>	<i>RNASE3</i>	
<i>BAG5</i>	<i>F11R</i>	<i>MKI67</i>	<i>RP9</i>	
<i>BUB1</i>	<i>FAM107B</i>	<i>MKNK1</i>	<i>RPS6KA1</i>	
<i>C11orf31</i>	<i>FANCD2</i>	<i>MRC1/MRC1L1</i>	<i>RPS6KA5</i>	
<i>C21orf57</i>	<i>FAS</i>	<i>MXD4</i>	<i>RRM2</i>	
<i>C2CD2</i>	<i>FBXO9</i>	<i>MYBL2</i>	<i>SCAPER</i>	
<i>C7orf41</i>	<i>FOXM1</i>	<i>NCAPD3</i>	<i>SGMS1</i>	
<i>CCNA2</i>	<i>FSTL3</i>	<i>NCAPG2</i>	<i>SIRPA</i>	
<i>CCNB2</i>	<i>FXYD6</i>	<i>NGFRAP1</i>	<i>SLC45A3</i>	
<i>CDC42SE1</i>	<i>GALNT3</i>	<i>NIPSNAP1</i>	<i>SPAG5</i>	
<i>CDC7</i>	<i>GMNN</i>	<i>ORC6L</i>	<i>SRGN</i>	
<i>CDCA2</i>	<i>GPR44</i>	<i>PAQR7</i>	<i>SUPT3H</i>	
<i>CDCA8</i>	<i>GPSM1</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>TMED4</i>	
<i>CDK1</i>	<i>GPSM2</i>	<i>PGGT1B</i>	<i>TMPO</i>	
<i>CEACAM4</i>	<i>GRAMD1A</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TNFSF13B</i>	
<i>CENPA</i>	<i>H3F3B</i>	<i>PKM2</i>	<i>TOB1</i>	
<i>CENPM</i>	<i>HIST1H2BD</i>	<i>PKMYT1</i>	<i>TP53INP1</i>	
<i>CEP152</i>	<i>HIST2H4A/HIST2H4B</i>	<i>PLAGL2</i>	<i>TPSB2/TPSAB1</i>	
<i>CIRBP</i>	<i>HMGB2</i>	<i>PLK1</i>	<i>TPX2</i>	
<i>COMMD6</i>	<i>HOXA10</i>	<i>PLK4</i>	<i>TRIM25</i>	
<i>CSF3R</i>	<i>HOXA4</i>	<i>PLSCR1</i>	<i>TRIM45</i>	
<i>CSTA</i>	<i>HOXB2</i>	<i>POLE</i>	<i>TROAP</i>	
<i>CTDSPL</i>	<i>HOXB4</i>	<i>PRAMI</i>	<i>VIM</i>	

**Supplementary Table 1.** List of 132 genes present in the GEP signature with prognostic value in a cohort of non-allografted patients, and measured by real-time PCR using Taqman Low-Density Arrays.

Genes overexpressed in long-term responders n=35 genes	Genes underexpressed in long term responders n=40 genes
<p>ADAM8 AHNAK ANXA8/ANXA8L1/ANXA8L2 APH1A APOC2/APOC4 ARHGEF3 BAG5 C9orf21 CDC42SE1 ERGIC1 FADS3 FL103577 HIVEP1 HOXA10 HOXA4 HOXB2 HOXB4 HOXB5 KCTD1 KIAA0649 KLRB1 LMNA LOC286052 PGGT1B PHYH PIK3R1 PSEN2 RAB27B RPS6KA5 SDSL SLC45A3 TOB1 VIM ZBTB33 ZFR</p>	<p>ALDH2 AMPD3 BZRAP1 C20orf27 CD21orf25 CCNA2 CDC7 CDCA8 CEACAM4 CEP152 CIT CPNE2 CSF3R CTDSPL DHFR DNA2L ENG ETV6 FSTLE GALNT3 GPSM2 GRAMD1A KNTC1 LOC146909 LOC445075 ORC6L PAXIP1 PDSS1 PKP4 PLSCR1 POLE POL PRAM1 RETN TAF5 TIFA TMPO TROAP TRPM2 TSPAN14</p>

## VIII. ANEXOS

**Supplementary Table 4.** List of 293 genes differentially expressed in *NPM1wt/FLT3-ITDneg* patients in high density arrays. Archivo digital adjunto.

**Supplementary Table 5.** List of 19 genes differentially expressed according to treatment outcome both in the overall series and the *NPM1wt/FLT3-ITDneg* subset of patients, based on the transcriptome analysis performed with high-density arrays.

<i>LOC442075</i>	<i>LOC146909</i>	<i>TMPO</i>	<i>PSEN2</i>
<i>PLSCR1</i>	<i>ORC6L</i>	<i>PAXIP1</i>	<i>BAG5</i>
<i>RETN</i>	<i>KNTC1</i>	<i>CEP152</i>	<i>ERGIC1</i>
<i>ENG</i>	<i>TROAP</i>	<i>POLQ</i>	<i>SLC45A3</i>
<i>PD531</i>	<i>CDC7</i>	<i>TOB1</i>	

## Brief Report

### MYELOID NEOPLASIA

#### Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden *FLT3*-ITD mutation and concomitant *NPM1* mutation: relevance to post-remission therapy

Marta Pratcorona,<sup>1</sup> Salut Brunet,<sup>2</sup> Josep Nomdedéu,<sup>2</sup> Josep Maria Ribera,<sup>3</sup> Mar Tormo,<sup>4</sup> Rafael Duarte,<sup>5</sup> Lourdes Escoda,<sup>6</sup> Ramon Guàrdia,<sup>7</sup> M. Paz Queipo de Llano,<sup>8</sup> Olga Salameo,<sup>9</sup> Joan Bargay,<sup>10</sup> Carmen Pedro,<sup>11</sup> Josep Maria Martí,<sup>12</sup> Montserrat Torredadell,<sup>1</sup> Marina Díaz-Beyá,<sup>1</sup> Mireia Camós,<sup>13</sup> Dolores Colomer,<sup>1</sup> Montserrat Hoyos,<sup>2</sup> Jorge Sierra,<sup>2</sup> and Jordi Esteve,<sup>1</sup> on behalf of the Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas

<sup>1</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, Institut d'investigacions biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Hematology Department, Institut Català D'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>4</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, Valencia, Spain; <sup>5</sup>Hematology Department, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; <sup>6</sup>Hematology Department, Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain; <sup>7</sup>Hematology Department, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain; <sup>8</sup>Hematology Department, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; <sup>9</sup>Hematology Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>10</sup>Hematology Department, Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Spain; <sup>11</sup>Hematology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; <sup>12</sup>Hematology Department, Hospital Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain; and <sup>13</sup>Hematology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain

#### Key Points

- In intermediate-risk AML, effect of *FLT3* burden is modulated by *NPM1* mutation, especially in patients with a low ratio.
- Combined evaluation of *NPM1* mutation and *FLT3*-ITD burden might contribute to identify patients who benefit from early allogeneic HSCT.

Risk associated to *FLT3* internal tandem duplication (*FLT3*-ITD) in patients with acute myeloid leukemia (AML) may depend on mutational burden and its interaction with other mutations. We analyzed the effect of *FLT3*-ITD/*FLT3* wild-type (*FLT3*wt) ratio depending on *NPM1* mutation (*NPM1*mut) in 303 patients with intermediate-risk cytogenetics AML treated with intensive chemotherapy. Among *NPM1*mut patients, *FLT3*wt and low ratio (<0.5) subgroups showed similar overall survival, relapse risk, and leukemia-free survival, whereas high ratio (≥0.5) patients had a worse outcome. In *NPM1*wt AML, *FLT3*-ITD subgroups showed a comparable outcome, with higher risk of relapse and shortened overall survival than *FLT3*wt patients. Allogeneic stem cell transplantation in CR1 was associated with a reduced relapse risk in all molecular subgroups with the exception of *NPM1*mut AML with absent or low ratio *FLT3*-ITD. In conclusion, effect of *FLT3* burden is modulated by *NPM1* mutation, especially in patients with a low ratio. (*Blood*. 2013;121(14): 2734-2738)



## ORIGINAL ARTICLE

## Acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and *MYST3-CREBBP* rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting *RET* proto-oncogene

M Díaz-Beyá<sup>1,6</sup>, A Navarro<sup>2,6</sup>, G Ferrer<sup>1</sup>, T Díaz<sup>2</sup>, B Gel<sup>3</sup>, M Camós<sup>4</sup>, M Pratcorona<sup>1</sup>, M Torredell<sup>4</sup>, M Rozman<sup>5</sup>, D Colomer<sup>5</sup>, M Monzo<sup>2</sup> and J Esteve<sup>1</sup>

Acute myeloid leukemia (AML) with t(8;16)(p11;p13) (t(8;16) AML) has unique clinico-biological characteristics, but its microRNA pattern is unknown. We analyzed 670 microRNAs in seven patients with t(8;16) AML and 113 with other AML subtypes. Hierarchical cluster analysis showed that all t(8;16) AML patients grouped in an independent cluster. Supervised analysis revealed a distinctive signature of 94-microRNAs, most of which were downregulated, including miR-21 and cluster miR-17–92. The mRNA expression analysis of two known transcription factors of these microRNAs (*STAT3* and *c-Myc*, respectively) showed significant downregulation of *STAT3* ( $P=0.04$ ). A bioinformatic analysis showed that 29 of the downregulated microRNAs might be regulated by methylation; we treated a t(8;16) AML sample with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-dC) and trichostatin A and found that 27 microRNAs were re-expressed after treatment. However, there was no difference in methylation status between t(8;16) and other AML subtypes, either overall or in the microRNA promoter. Cross-correlation of mRNA and microRNA expression identified *RET* as a potential target of several microRNAs. A Renilla-luciferase assay and flow cytometry after transfection with pre-microRNAs confirmed that *RET* is regulated by miR-218, miR-128, miR-27b, miR-15a and miR-195. In conclusion, t(8;16) AML harbors a specific microRNA signature that is partially epigenetically regulated and targets *RET* proto-oncogene.

Leukemia (2013) 27, 595–603; doi:10.1038/leu.2012.278

**Keywords:** t(8;16) AML; MYST3; CREBBP; microRNA; RET; MOZ-CBP

## Refining the Diagnosis and Prognostic Categorization of Acute Myeloid Leukemia Patients with an Integrated Use of Cytogenetic and Molecular Studies

Dolors Costa<sup>a</sup> Anna Vidal<sup>a</sup> Ana Carrió<sup>a</sup> Concha Muñoz<sup>a</sup> Amparo Arias<sup>a</sup>  
Cándida Gómez<sup>a</sup> Daniela Berneaga<sup>a</sup> Dolors Colomer<sup>a</sup> María Rozman<sup>a</sup>  
Marta Pratcorona<sup>b</sup> Montserrat Torredadell<sup>b</sup> Marina Díaz-Beyá<sup>b</sup> Jordi Esteve<sup>b</sup>  
Elías Campo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hematopathology Section, Hospital Clínic, and <sup>b</sup>Hematology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Catalonia, Spain

### Key Words

Acute myeloid leukemia · Chromosomal abnormalities · FLT3-ITD · Fluorescence in situ hybridization · Karyotype · Nucleophosmin gene

### Abstract

Significant progress in the understanding of the genetic basis of acute myeloid leukemia (AML) has been made during the last 30 years. The aim of the present study was to assess whether the detection of recurrent gene rearrangements by fluorescent in situ hybridization (FISH) studies and NPM1 and FLT3 gene mutations by molecular studies added clinically relevant information to the karyotype in 113 AML patients. Thus, FISH and molecular studies were found to add new information in 22 and 55% of the patients, respectively, particularly in cases with normal karyotype (NK) or when a cytogenetic analysis failed. Patients with NK changed their genetic risk group to favorable in 27 and 29% of cases using FISH and molecular biology studies, respectively. Our results demonstrate that molecular biology and FISH studies provide relevant information in AML and should be routinely performed.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

### Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disorder of hematopoietic stem and progenitor cells. The diagnosis of AML is generally established on the basis of a minimum blast percentage of 20% in bone marrow and/or peripheral blood. Nonetheless, the presence of several well-defined chromosomal abnormalities such as t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12) and inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1q22) are a sufficient criterion for AML diagnosis, regardless of the number of blast cells. Approximately half of the patients diagnosed with AML have normal karyotype (NK). Among them, mutations in nucleophosmin (NPM1) and fms-related tyrosine kinase-internal tandem duplication (FLT3-ITD) are found in approximately half and one third of patients, respectively [1–4].

Prognosis of AML is highly diverse and can be established by combining cytogenetic information and gene mutations. Recurrent genetic abnormalities such as t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1; t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA; inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1q22)/CBFB-

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2012 S. Karger AG, Basel  
0001-5792/13/1292-0065\$38.00/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/aha](http://www.karger.com/aha)

Dolors Costa  
Hematopathology Section  
Hospital Clínic, Villarroel 170  
ES-08036 Barcelona, Catalonia, (Spain)  
E-Mail [dcosta@clinic.ub.es](mailto:dcosta@clinic.ub.es)

