



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio de las alteraciones genéticas para validar y refinar su impacto pronóstico en leucemia mieloide aguda

Alex Bataller Torralba

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Tesis doctoral

Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina

Estudio de las alteraciones genéticas
para validar y refinar su impacto
pronóstico en leucemia mieloide aguda

Alex Bataller Torralba

Director de tesis
Dr. Jordi Esteve Reyner

Programa de doctorado
Medicina e Investigación Traslacional

2022

A quien corresponda,

Yo, Jordi Esteve Reyner, como director, autorizo a Alex Bataller Torralba para la presentación de su tesis doctoral.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several vertical strokes and a diagonal line crossing them.

Dr. Jordi Esteve Reyner

Agradecimientos

Als meus pares, a la meva germana, als meus amics i a la Berta.

Índice

INTRODUCCIÓN	3
1. Leucemia mieloide aguda	15
1.1. Definición y etiopatogenia	15
1.2. Epidemiología	18
1.3. Diagnóstico	19
1.4. Biología y aspectos genéticos	21
1.4.1. Genética de la LMA	21
1.4.2. Jerarquía y organización clonal	40
1.4.3. Microambiente tumoral e inmunología	42
1.5. Clasificación	45
1.6. Tratamiento	47
1.6.1. Tratamiento de la LMA no promielocítica en primera línea en pacientes elegibles para aloTPH	47
1.6.2. Tratamiento de la LPA en primera línea	52
1.6.3. Tratamiento de la LMA primera línea en pacientes no elegibles para aloTPH	52
1.6.4. Tratamiento de la LMA R/R	54
1.6.5. Nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas	55
2. Aspectos pronósticos de la LMA	57
2.1. Edad y comorbilidad	57
2.2. Alteraciones citogenéticas	57
2.2.1. Clasificación citogenética MRC revisada	58
2.3. Alteraciones moleculares	60
2.3.1. Clasificación ELN 2010	60
2.3.2. Clasificación ELN 2017	62

2.3.3. Clasificación y protocolo adaptado al riesgo CETLAM-12	66
2.4. Papel pronóstico de la enfermedad mínima/medible residual (EMR)	67
2.4.1. EMR por citometría de flujo multiparamétrica	68
2.4.2. EMR por técnicas moleculares	68
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
1. Hipótesis	73
2. Objetivos	74
METODOLOGÍA	75
1. Pacientes a estudio	77
2. Variables a estudio	77
3. Análisis estadístico	79
RESULTADOS	81
1. Primer artículo	83
1.1. Resumen del primer artículo	84
1.2. Artículo	85
1.3. Material suplementario del primer artículo	95
2. Segundo artículo	115
2.1. Resumen del segundo artículo	116
2.2. Artículo	117
2.3. Material suplementario del segundo artículo	131
DISCUSIÓN	163
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	181

Glosario

Abreviatura	Significado
AloTPH	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
AutoTPH	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
ARCH	<i>Aging-related clonal hematopoiesis</i>
ATO	Trióxido de arsénico
ATRA	Ácido all-trans retinoico
CAR-T	<i>Chimeric antigen receptor T-cell</i>
CBF	<i>Core binding factor</i>
CETLAM	Grupo cooperativo para el estudio de las leucemias agudas y mielodisplasias
CF	Citometría de flujo
CHIP	<i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DfN	<i>Different from normal</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
EMR	Enfermedad medible residual
FAB	Grupo Francés-Americano-Británico
FDA	<i>U.S. Food and drug administration</i>
FM	Fracaso molecular
GO	Gemtuzumab ozogamicina
HemR	Recaída hematológica
HiDAC	Altas dosis de citarabina (AraC)
LAIP	<i>Leukemia-associated immunophenotype</i>
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMA R/R	Leucemia mieloide aguda recaída o refractaria
LPA	Leucemia promielocítica
LSC	Leukemic stem cell
MRC	<i>Medical Research Council</i>
MSC	Células mieloides supresoras

NGS	<i>Next generation sequencing</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RC	Remisión completa
RC1	Primera remisión completa
RT-qPCR	<i>Real-time quantitative PCR</i>
SMD	Síndrome mielodisplásico
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de evento
IAR	Incidencia acumulada de recaída
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>

Introducción

1. Leucemia mieloide aguda

1.1. Definición y etiopatogenia

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica heterogénea caracterizada por la infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos por células hematológicas con un bloqueo en la diferenciación celular, así como con una proliferación descontrolada. Se ha postulado que su origen yace en la adquisición de alteraciones citogenéticas, genéticas y/o epigenéticas por parte de un progenitor hematopoyético, lo que conlleva a la aparición y progresión de esta enfermedad¹. Este progenitor (célula madre leucémica; *Leukemic Stem Cell* [LSC]) se sitúa en la parte superior de una disposición jerárquica y es capaz de proliferar dando lugar a células hijas (blastos) responsables de la invasión tisular, así como células que mantengan la población de LSC (Figura 1)². Esta teoría se sustenta en la idea de que las LSC son una minoría de células en la enfermedad, pero son las únicas capaces de desarrollar LMA cuando son trasplantadas en ratones inmunodeprimidos, expresando un fenotipo característico (CD34⁺ CD38⁻)³. El efecto global de estos eventos se traduce en la invasión de la médula ósea, produciendo una alteración de su normal funcionamiento, conllevando la aparición de citopenias. Además, la invasión, menos frecuente, de tejidos fuera de la sangre y la médula ósea, es responsable de la aparición de alteraciones clínicas tales como la hiperplasia gingival o la infiltración cutánea. Particularmente, existe una rara entidad (sarcoma mieloide), caracterizada por la formación de tumores sólidos formados por células de LMA, con o sin evidencia de invasión medular concomitante⁴.

La mayoría de casos de LMA son considerados esporádicos, dado que no hay un factor reconocible que explique la leucemogénesis ocurrida. Aun así, existen factores de riesgo poco frecuentes pero claramente asociados con LMA⁵. Por ejemplo, la exposición a ciertos agentes químicos (benceno, pesticidas, fluidos de embalsamamiento), el tabaco y las radiaciones ionizantes son factores que han sido relacionados con un aumento de incidencia de LMA⁶⁻⁸. Junto con el tabaco, la obesidad también ha demostrado un mayor riesgo de leucemia⁹. Además, ciertas terapias utilizadas en el tratamiento de enfermedades oncológicas han demostrado también un aumento de algunos subtipos

LMA, como por ejemplo pacientes que han recibido tratamiento para cáncer de mama o linfoma de Hodgkin, frecuentemente en los 3-5 años previos al diagnóstico de LMA^{10,11}. De manera destacada, los agentes alquilantes (melfalan, busulfan, ciclofosfamida y derivados del platino) y los inhibidores de la topoisomerasa-II (etopósido y doxorubicina) son los mas relacionados con un aumento de incidencia de LMA, en especial con ciertos subtipos citogenéticos específicos (como las translocaciones del cromosoma 11q23 y 21q22 con los inhibidores de topoisomerasa-II)^{12,13}.

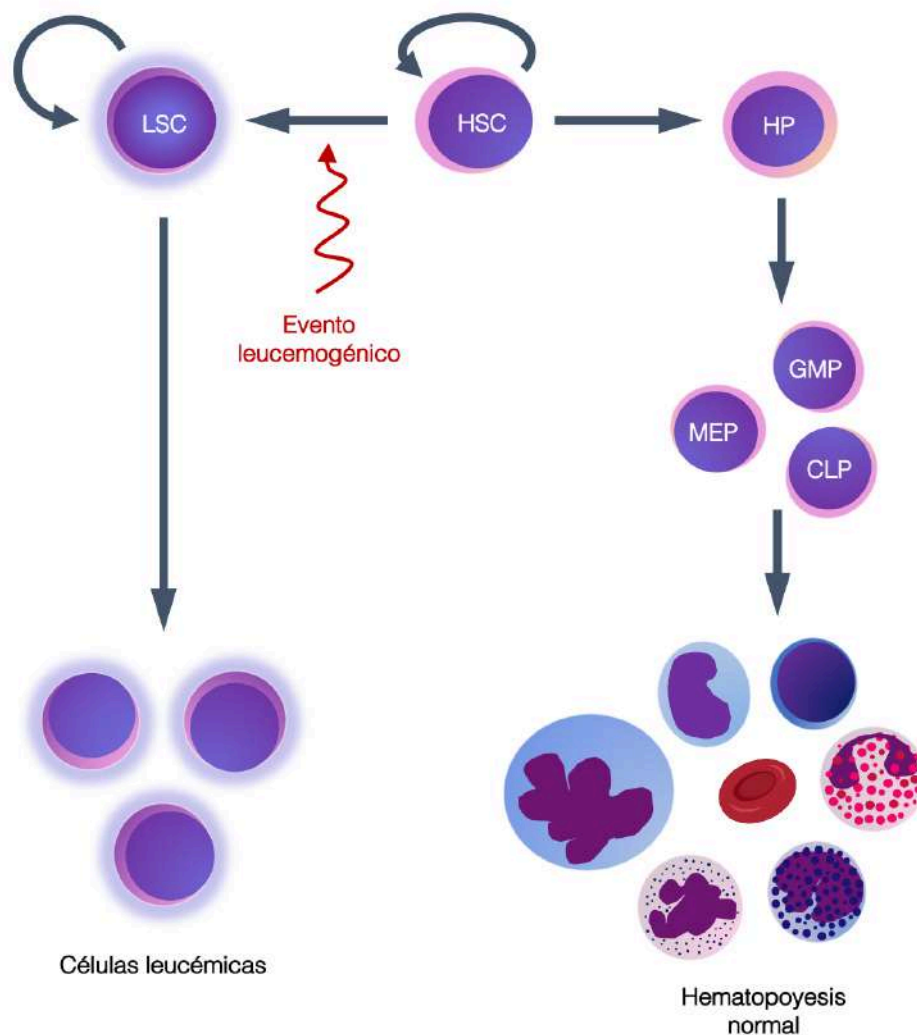


Figura 1. Esquema de la teoría del origen de las células neoplásicas de LMA. Adaptado de Bonnet D. y colaboradores. HSC: Célula madre hematopoyética (*Hematopoietic Stem Cell*), HP: Progenitor Hematopoyético (*Hematopoietic progenitor*), GMP: Progenitor Granulocítico Monocítico (*Granulocytic Monocytic Progenitor*), MEP: Progenitor Megacariocítico Eritroide (*Megakaryocytic Erythroid Progenitor*), CLP: Progenitor linfoide común (*Common Lymphoid Progenitor*).

Ciertos síndromes genéticos, como la anemia de Fanconi o la disqueratosis congénita, entre muchos otros, están asociados a un aumento de la incidencia de LMA^{14,15}. En este sentido, se han descrito mutaciones germinales transmitidas entre generaciones con mayor incidencia de neoplasias mieloides (por ejemplo, portadores de la mutación de *RUNX1* o de *DDX41*). Estas mutaciones pueden ir asociadas a alteraciones hematológicas (como por ejemplo citopenias) o características sindrómicas, aunque también las hay que son prácticamente silentes (como las mutaciones germinales de *CEBPA*)¹⁶.

Las enfermedades hematológicas neoplásicas como los síndromes mielodisplásicos (SMD), o en menos frecuencia, los síndromes mieloproliferativos, tienen un potencial riesgo a transformarse en una LMA, que en el momento de la transformación típicamente muestran características de alto riesgo por su alta refractariedad al tratamiento. Por último, recientemente se ha descrito el concepto de hematopoyesis clonal (*Clonal Hematopoiesis of indeterminate potential*; CHIP), refiriéndose a la adquisición, en los progenitores hematopoyéticos, de mutaciones en genes específicos en pacientes sin hemopatía conocida y frecuentemente relacionado con el envejecimiento (*Aging-Related Clonal Hematopoiesis*; ARCH)^{17,18}. Estas mutaciones son compartidas con las mutaciones que aparecen recurrentemente en LMA, y estos pacientes tienen un riesgo superior a desarrollar LMA, en comparación con la población sin CHIP^{19,20}.

1.2. Epidemiología

Globalmente, la leucemia representó en 2020 el 2,5% de los diagnósticos de cáncer en el mundo, siendo la LMA la leucemia mas frecuente, seguida muy de cerca por la leucemia linfática crónica^{21,22}. En Estados Unidos de América, la incidencia ajustada por edad en 2020 fue de 4,3 casos por 100.000 habitantes, mostrando unos datos similares en datos de pacientes de Europa^{22,23}. Según los datos de *Global Burden of Disease Study*, en 2019 en España se diagnosticaron unos 1.700 casos de LMA²⁴. La incidencia es mayor en el sexo masculino (ratio hombre:mujer 1.2-1.3:1), y la edad media de presentación es de 68 años, siendo aproximadamente un 75% de los pacientes mayores de 65 años. La mortalidad anual ajustada por año es de 2,8 casos por 100.000 habitantes (Figura 2). De manera global, la incidencia de LMA se ha ido incrementando los últimos 30 años según los registros disponibles, siendo este auge mas marcado en los países con rentas altas. Este hecho esté probablemente relacionado con un aumento de la esperanza de vida en estos países, lo que conlleva a un incremento de pacientes con edades donde la incidencia de LMA es mas alta, pacientes con fenómenos de CHIP y supervivientes de otras neoplasias a riesgo de LMA secundarias. Es destacable señalar que este fenómeno no se observa en los países con rendas bajas, donde solo el 35% de los pacientes con LMA tienen mas de 50 años²⁵.

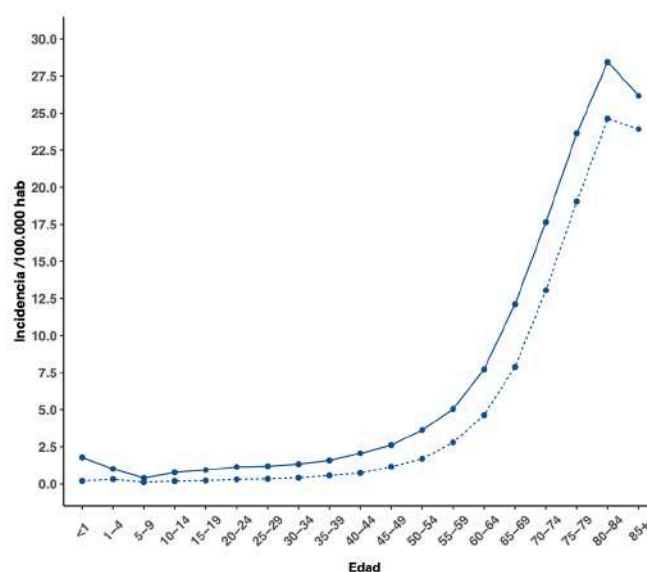


Figura 2. Incidencia (línea continua) y mortalidad (línea discontinua) por cada franja de edad. Datos: *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program Database* (2020).

1.3. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la LMA se requiere la identificación de las células neoplásicas, ya sea en el tejido hematopoyético (sangre periférica o médula ósea) o de manera menos frecuente invadiendo algún tejido no hematológico. Estas células leucémicas (blastos o mieloblastos), están definidas morfológicamente como elementos celulares con un elevado ratio núcleo/citoplasma, nucléolo fácilmente visible y frecuentemente presencia de cromatina nuclear fina. La forma del núcleo es variable, y a nivel de citoplasma pueden presentar basofilia variable, granulación y bastones de Auer, sin detectarse aparato de Golgi, que es un hallazgo propio del promielocito (estadio celular más maduro)²⁶. Para el diagnóstico, se requiere realizar una extensión de sangre periférica para contar un total de 200 células nucleadas o una extensión de aspirado de médula ósea para contar un total de 500 células nucleadas. Es necesario $\geq 20\%$ de blastos en médula o sangre periférica para diagnosticar una LMA, si bien no es necesario alcanzar esta cifra en caso de detectar las alteraciones cromosómicas $t(15;17)/PML::RARA$, $t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1$, $inv(16)$ o $t(16;16)/CBFB::MYH11$ ^{27,28}. También, en los infrecuentes casos de LMA tipo leucemia eritroide aguda, el diagnóstico con menos de un 20% de blastos se permite si en sangre periférica se detecta $>80\%$ de precursores eritroides inmaduros con $\geq 30\%$ de proeritroblastos²⁷. En el caso del sarcoma mieloide, para el diagnóstico solo es necesario la detección de una invasión por blastos en un tejido extra-hematopoyético.

Además del diagnóstico morfológico de los blastos, en muchas ocasiones se emplea la citometría de flujo para complementar el diagnóstico. Con esta técnica se pretende demostrar los antígenos expresados por los blastos de LMA, que frecuentemente expresan marcadores de inmadurez (como CD34 o CD117) así como marcadores de diferenciación granulocítica o monocítica (CD13, CD15, CD33, CD64 o mieloperoxidasa)²⁹. Además, los blastos de LMA también pueden expresar de manera aberrante antígenos de otro linaje (CD7, CD56, CD2 y CD19). Determinar el inmunofenotipo puede ser útil para el diagnóstico integrado de LMA; por ejemplo las LMA con $t(8;21)$ típicamente expresan CD19 de manera aberrante, o las LMA con

Introducción: Leucemia mieloide aguda

mutación de *NPM1* suelen caracterizarse por la ausencia de CD34, positividad para CD117 y una expresión variable de HLA-DR y marcadores de diferenciación monocítica^{30,31}.

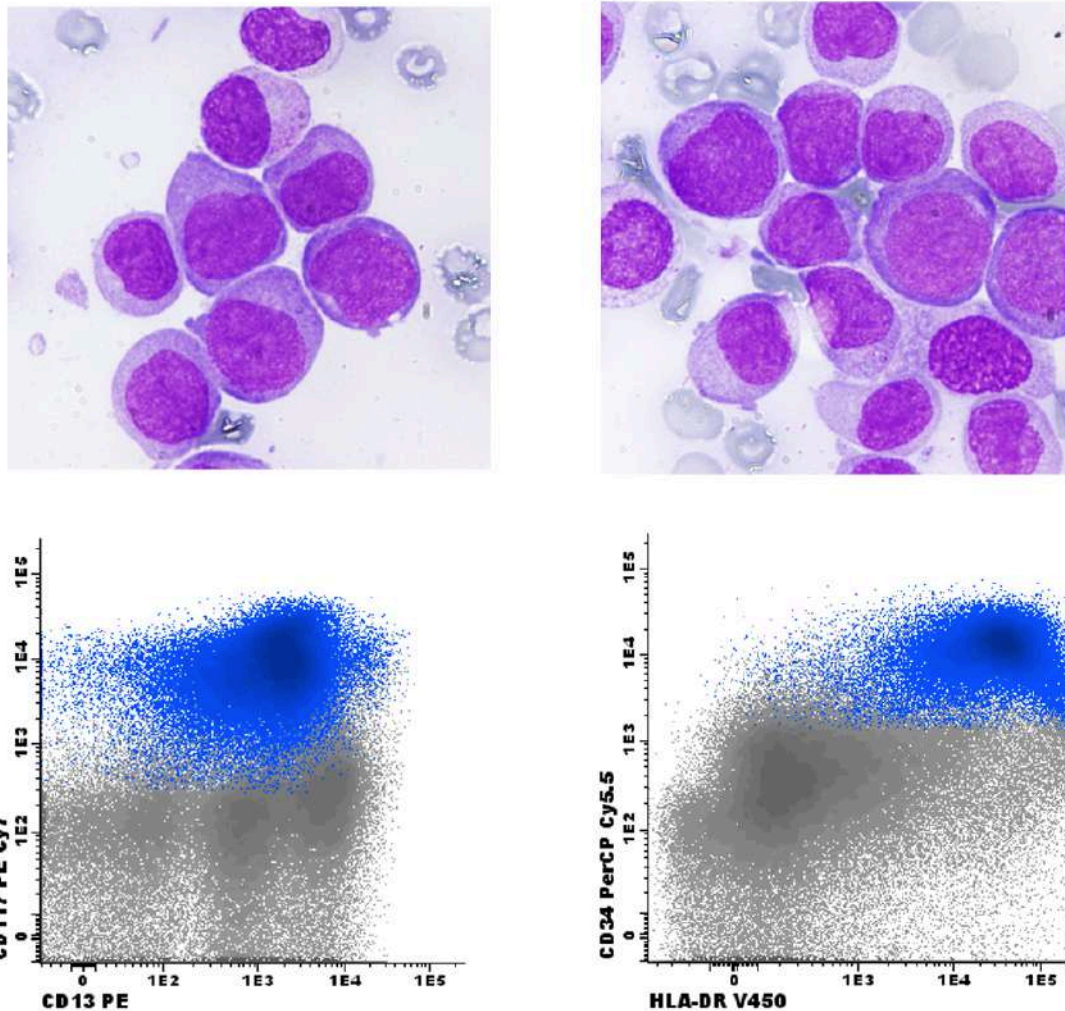


Figura 3. Tinción May Grünwald-Giemsa mostrando blastos de LMA (arriba). Gráficos de citometría de flujo resaltando la población de blastos de LMA en azul, evidenciando su expresión de CD117 y CD13 (abajo, izquierda) y de CD34 y HLA-DR (abajo, derecha). Imágenes cortesía de la Dra. Francesca Guijarro.

1.4. Biología y aspectos genéticos

Los mecanismos leucemogénicos por los cuales se origina la LMA siguen siendo un reto para la investigación, sobre todo debido a la heterogeneidad de esta enfermedad. La teoría más aceptada en la actualidad es que la LMA se origina en un progenitor hematopoyético tras la adquisición de un patrón de mutaciones y cambios epigenéticos que le otorgan una ventaja proliferativa así como el bloqueo de la diferenciación celular³²⁻³⁵. Si bien se cree que la célula de origen de la LMA sea probablemente un progenitor hematopoyético muy inmaduro, también se ha postulado que pudiera tratarse de un progenitor más maduro y comprometido que ha adquirido mutaciones capaces de invertir el proceso diferenciador, e incluso se ha teorizado sobre la capacidad de algunos progenitores linfoides T de transdiferenciarse para originar células con potencial leucémico^{36,37}.

1.4.1. Genética de la LMA

A día de hoy, no se ha determinado una mutación única capaz de iniciar una LMA por sí sola, siendo necesaria la coexistencia y colaboración de varias mutaciones y/o cambios epigenéticos. En 2002, Gilliland y colaboradores describieron el modelo *two-hit* para explicar la generación de LMA a partir de una célula hematopoyética sana³⁸. Este modelo se basa en la coexistencia de al menos dos mutaciones, la primera típicamente afectando genes involucrados en la diferenciación hematopoyética (mutaciones de tipo II; típicamente genes de fusión) y una segunda aportando una ventaja proliferativa (mutaciones de tipo I; por ejemplo *FLT3-ITD*, *KIT* o *NRAS*). Si bien algunas LMA podrían explicarse por este mecanismo, muchas de las mutaciones encontradas en LMA no cumplen las características para ser clasificadas en tipo I o tipo II. En este contexto, los estudios del genoma y exoma de la LMA han ayudado a determinar la existencia de mutaciones directoras (*driver*) en prácticamente todas las LMA, que interactúan con las distintas alteraciones genéticas coexistentes en la misma³⁹⁻⁴¹.

La LMA es uno de los tumores con menos frecuencia de mutaciones (mediana de 0.37 mutaciones por megabase), en comparación con otros tumores como el cáncer de

pulmon o el melanoma (que en ocasiones exceden de 100 mutaciones por megabase)⁴². El análisis publicado por el consenso de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) demostró una media de 13 mutaciones en regiones exónicas por muestra de LMA, siendo 5 recurrentes en las distintas muestras³⁹. Estas mutaciones afectan distintas vías de señalización y funciones celulares, responsables de contribuir a la leucemogénesis. Estas funciones celulares y las mutaciones mas frecuentes en LMA están representadas en la Tabla 1 y Figura 4.

Categoría funcional	Gen afectado o fusión	Características	Ref.
Alteraciones en factores de transcripción mieloides	<p><i>RUNX1::RUNX1T1</i> (21q22.12 y 8q21.3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ RUNX1 es la subunidad de fijación al DNA del factor de transcripción heterodimérico llamado core binding factor (CBF), implicado en programas de diferenciación hematopoyética. <i>RUNX1T1</i> codifica para la proteína antiguamente llamada ETO, que es un correpresor transcripcional. ▪ Esta fusión es resultante de la translocación t(8;21)(q22;q22.1). ▪ Aproximadamente 4% de las LMA. ▪ La proteína de fusión bloquea la acción de factores de transcripción hematopoyéticos, además de interactuar con otras vías implicadas en proliferación. ▪ Alteración genética asociada a buen pronóstico. 	43,44
	<p><i>RUNX1</i> (21q22.12)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ RUNX1 es la subunidad de fijación al DNA del CBF (ver <i>RUNX1::RUNX1T1</i>). ▪ Mutaciones mono o bi-alélicas, de múltiples tipos, entre el exón 3 al 8. ▪ Aproximadamente 10% de las LMA. ▪ Las mutaciones truncan el normal funcionamiento del factor de transcripción hematopoyético, alterando su función en la diferenciación celular. ▪ Asociado a edad avanzada y mal pronóstico. 	45,46
	<p><i>CBFB::MYH11</i> (16q22.1 y 16p13.11)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CBFB es la subunidad beta del CBF, implicado en programas de diferenciación hematopoyética. <i>MYH11</i> codifica para una cadena pesada de la miosina de músculo liso (SMMHC). ▪ Esta fusión resulta de las alteraciones citogenéticas inv(16)(p13.1q22) o de la t(16;16)(p13.1;q22). ▪ Aproximadamente 5% de las LMA. ▪ La proteína de fusión bloquea la acción del factor de transcripción RUNX1. Este bloqueo, además de impedir la diferenciación, evita la interacción de RUNX1 con DNMT3A, alterando el estado de metilación del DNA. ▪ Asociado a buen pronóstico. 	47-49

	<p>PML::RARA (15q24.1 y 17q21.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PML es una proteína de distribución nuclear con un rol central en los llamados cuerpos nucleares (<i>nuclear bodies</i>), implicados en respuesta nuclear al estrés y estabilidad genómica. RARA es un factor de transcripción dependiente de ligando (ácido retinoico) que se une a proteínas RXR para formar heterodímeros activos, ejerciendo un efecto represor de la transcripción de ciertos genes ante la ausencia de ligando. ▪ Este gen de fusión surge de la translocación t(15;17)(q22;q21.2). ▪ Aproximadamente un 4% de las LMA. Estas LMA es comúnmente conocida como leucemia promielocítica aguda (LPA). ▪ La proteína de fusión actúa como un represor de genes objetivo de RARA, bloqueando la diferenciación celular a un estadio de promielocito y promoviendo la proliferación. Además, se altera la función de los <i>nuclear bodies</i> formados por PML. ▪ La LPA es una leucemia de buen pronóstico gracias al tratamiento combinado de ácido all-trans retinoico (ATRA) asociado a trióxido de arsénico (ATO). 	<p>50,51</p>
	<p>CEBPA (19q13.11)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Factor de transcripción que actúa como homo o heterodímero controlando la expresión de varios programas génicos, entre ellos de diferenciación mieloide. ▪ Mutaciones a lo largo de todo el gen, mono (57%) o bialélicas (43%). Las bialélicas típicamente muestran una combinación de una mutación <i>frameshift</i> en la región N-terminal en un alelo con una mutación <i>in-frame</i> en el dominio C-terminal del otro alelo. ▪ Aproximadamente 10% de las LMA. ▪ Las mutaciones impiden el normal funcionamiento del factor de transcripción CEBPA, afectando la mielopoyesis. ▪ Las mutaciones bialélicas están asociadas a pacientes jóvenes con cariotipo normal, presentando buen pronóstico. 	<p>52,53</p>

	<p>GATA2 (3q21)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Factor de transcripción implicado en la diferenciación en los distintos linajes mieloides en la hematopoyesis. ▪ Mutaciones en un <i>hotspot</i> del exón 4 que codifica para dos secuencias tipo <i>zinc finger</i>. Además, en los pacientes con LMA inv(3)(q21q26.2)/t(3:3)(q21;q26.6) se produce una relocalización de un <i>enhancer</i> distal de GATA2, provocando una haploinsuficiencia de este gen (ver gen <i>MECOM</i> mas adelante). ▪ Las mutaciones ocurren en aproximadamente un 6% LMA, pero un 20% de las LMA con mutación de <i>CEBPA</i>. ▪ La mutación impide el normal funcionamiento del factor de transcripción GATA2, alterando la diferenciación hematopoyética. ▪ Pronóstico asociado a las alteraciones citogenéticas y moleculares concomitantes. 	<p>54-56</p>
<p>Alteraciones en genes supresores de tumores u oncogenes</p>	<p>MECOM (EVI1) (3q26.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El gen <i>MECOM</i> codifica para varias isoformas de factores de transcripción, algunos con actividad oncogénica capaces de activar e inhibir la transcripción de ciertos genes. ▪ En los pacientes con LMA inv(3)(q21q26.2)/t(3:3)(q21;q26.6) se produce la relocalización del <i>enhancer</i> G2DHE de GATA2 en la proximidad de <i>MECOM</i>, resultando en la sobreexpresión de este último. ▪ Esta alteración citogenética se encuentra en un 1-2% de las LMA. Un 8% de LMA sin esta translocación también pueden sobreexpresar <i>MECOM</i>. ▪ La sobreexpresión de <i>MECOM</i>, que actúa como un proto-oncogén, está asociado a inestabilidad genómica, resistencia a la apoptosis e inhibición de la actividad de factores de transcripción mieloides. ▪ Muy mal pronóstico. 	<p>57,58</p>

	<p>DEK::NUP214 (6p22.3 y 9q34.13)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>DEK</i> es un oncogén que codifica para una proteína capaz de unirse al DNA y activar ciertos programas transcripcionales. <i>NUP214</i> forma parte del complejo del poro nuclear, involucrado en el transporte nucleocitoplasmático. ▪ Este gen de fusión es resultado de la translocación t(6;9)(p23;q34.1). ▪ La proteína de fusión se localiza a nivel nuclear de manera distinta a <i>DEK</i>, alterando la transcripción. Además, interactúa con la exportina-1 (<i>XPO1</i>) y podría explicar una alteración en el transporte nuclear. ▪ Aproximadamente un 1% de las LMA. ▪ Mal pronóstico, aunque esta mejora si se consolidan las respuestas al tratamiento con un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (aloTPH). 	59-61
	<p>TP53 (17p13.1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gen supresor de tumores implicado en múltiples procesos celulares (apoptosis, reparación del DNA, metabolismo, etc). ▪ Mutaciones típicamente <i>missense</i>, algunas localizadas en <i>hotspots</i> que codifican regiones de unión al DNA. Es frecuente la pérdida del alelo sano por mutaciones heterocigotas o pérdida de heterocigosidad (LOH). ▪ Un 8% de las LMA (frecuencia mucho menor a los tumores sólidos). Un 30% de las LMA y SMD relacionadas con la terapia. ▪ Pérdida de la función de gen supresor tumoral favoreciendo inestabilidad genómica. Además, se ha descrito, ganancia de funciones anómalas por parte de la proteína mutada. ▪ Muy mal pronóstico y resistencia a la terapia. 	62-64

	<p>WT1 (11p13)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gen que transcribe para distintas isoformas que actúan como factores de transcripción, algunos con actividad de gen supresor de tumores, actuando sobre varios procesos celulares. ▪ Sobreexpresión anómala en varios tipos de leucemia. También mutaciones (inserciones, deleciones, sustituciones) focalizadas en el exón 1, 7 y 9. ▪ Expresión variable en un 80% de las LMA y mutaciones en un 6-15% de LMA primarias. Mutuamente excluyente con mutaciones de <i>TET2</i>, <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>. ▪ <i>WT1</i> es considerado un gen supresor de tumores. El mecanismo leucemogénico de su sobreexpresión es poco conocido. Las mutaciones desencadenan una pérdida de función de <i>WT1</i>, lo que se traduce en una disregulación epigenética del DNA. ▪ Algunas publicaciones atribuyen peor pronóstico a la sobreexpresión y mutaciones de <i>WT1</i> en LMA, aunque es controvertido. 	65-67
	<p>PHF6 (Xq26.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gen supresor de tumores que codifica para una proteína con capacidad de fijación al DNA, permitiendo su actividad de regulación de la transcripción. ▪ La mayoría son mutaciones <i>frameshift</i> o <i>nonsense</i>, sin un <i>hotspot</i> identificado. Además, también se ha descrito un aumento de la expresión del gen <i>PHF6</i> en algunas LMA. ▪ Un 3% de las LMA presentan mutaciones, mas frecuente en hombres. ▪ Las mutaciones inactivan el gen supresor de tumores <i>PHF6</i>, promoviendo la leucemogénesis. ▪ En un estudio, la mutación de <i>PHF6</i> empeoraba el pronóstico de los pacientes con LMA de riesgo intermedio sin mutación de <i>FLT3-ITD</i>. 	68-71

	<p>SETBP1 (18q12.3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SETBP1 es una proteína nuclear que se une al oncogén SET para inhibir PP2A, que actúa como gen supresor de tumores. Se presuponen otras funciones poco conocidas. ▪ Las mutaciones afectan predominantemente los aminoácidos del 868 al 871. También se ha descrito sobreexpresión de gen <i>SETBP1</i> en algunas LMA. ▪ Mutaciones en un 3% de las LMA, sobretodo las secundarias a otras neoplasias hematológicas. ▪ Las mutaciones afectan el dominio de homología SKI, aumentando su estabilidad y disminuyendo su degradación. El aumento de SETBP1 mutante favorece, entre otros efectos, la transcripción de genes <i>HOXA9</i>, <i>HOXA10</i> y del oncogen <i>MYB</i>, implicados en proliferación. ▪ Pronóstico incierto, si bien algunos estudios lo relacionan con peor supervivencia en los pacientes con mutación o sobreexpresión de <i>SETBP1</i>. 	<p>72-74</p>
<p>Alteraciones en <i>NPM1</i></p>	<p>NPM1 (5q35.1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NPM1 es una chaperona de predominio nucleolar con múltiples funciones, entre ellas, regular la formación de ribosomas o actuar en la reparación del DNA. ▪ Mutaciones en heterocigosis tipo <i>frameshift</i> en el exón 12 por inserciones de 4 pares de bases (TCTG) en los nucleótidos 860 a 863 (mutación tipo A), provocando una pérdida del triptófano W288 y W290 y generando un nuevo dominio de exportación nuclear. ▪ Presente en un 30% de las LMA. ▪ La proteína NPM1 mutada adquiere nuevas funciones, deslocalizándose del núcleo al citoplasma y favoreciendo la expresión de genes HOX. ▪ Generalmente asociada a buen pronóstico. 	<p>75,76</p>

Alteraciones en genes involucrados en la metilación del DNA	DNMT3A (2p23.3)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA metiltransferasa, promoviendo la metilación del DNA, asociado a reducción de la expresión génica. ▪ La mutación mas frecuente es <i>missense</i> en la posición R882, la mayoría localizadas en el dominio metiltransferasa. Son consideradas mutaciones fundadoras de procesos de hematopoyesis clonal. ▪ Presente en un 20% de las LMA (frecuente en LMA con cariotipo normal y mutaciones de <i>NPM1</i> y <i>FLT3</i>). ▪ Las mutaciones inactivan el dominio metiltransferasa, afectando su capacidad de regulación epigenética. ▪ Pronóstico asociado a las mutaciones concomitantes presentes en la LMA 	77,78
	IDH1 (2q34)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enzima citoplasmática implicada en el ciclo del ácido cítrico, catalizando el paso de isocitrato a α-ketoglutarato. Este paso es crucial para la regulación epigenética. ▪ Mutaciones <i>missense</i> en el residuo R132. ▪ Presentes en un 7-14% de las LMA. ▪ La proteína IDH1 mutada adquiere una neofunción capaz de convertir isocitrato en 2-hidroxisulcatato (2-HG). Este metabolito anómalo impide el normal funcionamiento de la DNA hidroxilasa TET2, alterando la demetilación del DNA. ▪ Pronóstico asociado a las mutaciones concomitantes. Nuevos inhibidores pueden modificar el pronóstico actual. 	79,80
	IDH2 (15q26.1)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Al igual que IDH1, también implicada en el ciclo del ácido cítrico, pero de localización mitocondrial. ▪ Mutaciones <i>missense</i> en la arginina R140 (80%) y menos frecuentemente en R170. ▪ Presentes en un 8-19% de las LMA. ▪ La producción del metabolito 2-HG impide el normal funcionamiento de enzimas como TET2, entre otros. ▪ Pronóstico asociado a las mutaciones concomitantes. Nuevos inhibidores pueden modificar el pronóstico actual. 	80,81

	<p>TET2 (4q24)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Esta enzima actúa añadiendo un grupo hidroxilo a la metilcitosina del DNA para la hipometilación del DNA. Requiere hierro y α-ketoglutarato para su función. ▪ Varios tipos de mutaciones a lo largo del gen. Son consideradas mutaciones fundadoras de procesos de hematopoyesis clonal. ▪ Presente en un 12-34% de las LMA. ▪ Alteración del normal funcionamiento de TET2, propiciando una deregulación epigenética. ▪ Pronóstico asociado a las mutaciones concomitantes. 	<p>82-84</p>
<p>Alteraciones en genes implicados en modificación de la cromatina</p>	<p>KMT2A (MLL) (11q23)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ KMT2A es una metiltransferasa implicada en la metilación de histonas (H3K4), lo que promueve el silenciamiento de genes HOX. ▪ Reordenamientos de <i>KMT2A</i> con múltiples genes (mas de 80 identificados). Existen también duplicaciones parciales en tándem del gen (<i>KMT2A-PTD</i>), que duplican ciertos exones elongando la proteína. ▪ Un 3-4% de las LMA presentan reordenamientos, un 3-6% presentan PTD. ▪ El gen de fusión es capaz de reclutar reguladores de la transcripción y activar programas transcripcionales responsables de la leucemogénesis. En el caso de las PTD, el mecanismo no es bien conocido, si bien se sospecha una desregulación epigenética debido a la alteración de KMT2A. ▪ Los reordenamientos estan asociados a mal pronóstico, el impacto pronóstico de las PTD no está bien esclarecido. 	<p>85-87</p>

	<p>ASXL1 (20q11.21)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulador epigenético. Participa en el complejo <i>Polycomb repressive deubiquinase</i> (PR-DUB; elimina la monoubiquitinación de H2AK119Ub asociada a genes silenciados) y en el <i>Polycomb Repressive Complex 2</i> (PRC2; encargado de la trimetilación de H3K27 lo que produce silenciamiento génico). ▪ Las mutaciones más frecuentes son de tipo frameshift por adiciones de un nucleótido en la posición Gly646 u otras del exón 12. ▪ Presentes en un 5-6% de las LMA. ▪ Las mutaciones inactivan la acción de la proteína ASXL1, lo que supone una disregulación epigenética. ▪ Asociado a edad avanzada y mal pronóstico. 	<p>88-90</p>
	<p>EZH2 (7q36.1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forma parte del PRC2, favoreciendo la trimetilación de H3K27. Además, funciones no-canónicas independientes de PRC2, poco conocidas. ▪ Mutaciones <i>missense</i> o <i>nonsense</i> a lo largo de todo el gen. En algunas LMA y neoplasias linfoides se ha detectado una sobreexpresión del gen. ▪ Aproximadamente un 4% de las LMA. ▪ Las mutaciones provocan una pérdida de función, traducido en una disregulación epigenética. ▪ No claro impacto pronóstico. Recientemente implicado en quimioresistencia. 	<p>91-93</p>
	<p>BCOR (Xp11.4)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína que forma parte de una variante del complejo represor PRC1.1, responsable de la ubiquitinación H2AK119Ub. Además actúa como corepresor del factor BCL6. ▪ Mutaciones a lo largo de todo el gen. ▪ Aproximadamente un 4% de las LMA, más frecuente en cariotipo normal sin mutación de <i>NPM1</i>. ▪ Las mutaciones resultan en una proteína truncada sin función. En ratones con pérdida de función de BCOR, la autorenovación de la mielopoyesis está aumentada y colabora con KRAS^{G12D} para la leucemogénesis. ▪ No claro impacto pronóstico, algunas series lo atribuyen a peor supervivencia. 	<p>94-96</p>

Alteraciones de genes implicados en el <i>splicing</i>	SF3B1 (2q33.1)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína que forma parte del complejo U2 snRNP, implicada en la unión de este complejo al <i>branch-point sequence</i>, para proseguir con el proceso de <i>splicing</i>. ▪ Mutaciones puntuales localizadas en el hotspot que codifica para el dominio HEAT. ▪ Aproximadamente un 3%, mas frecuente en LMA secundarias y pacientes de edad avanzada. ▪ Las mutaciones de <i>SF3B1</i> promueven el <i>splicing</i> en sitios 3' crípticos, produciendo proteínas anómalas. ▪ Asociadas a peor supervivencia. 	97-99
	SRSF2 (17q25.2)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Regulador del <i>splicing</i>, se une a regiones tipo ESE exónicas y permite la interacción con otros factores reguladores de <i>splicing</i>. ▪ Mutaciones puntuales en el aminoácido P95. ▪ Aproximadamente un 10-14% de las LMA, frecuente en LMA secundarias y pacientes de edad avanzada. ▪ La mutación afecta el dominio de reconocimiento del mRNA, provocando la unión anómala a dominios alternativos (ricos en citosina), induciendo un <i>splicing</i> anómalo en muchas proteínas (entre ellas, EZH2 y BCOR). ▪ Mutaciones asociadas a peor supervivencia. 	97,98,100
	U2AF1 (21q22.3)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El factor U2AF1, junto a U2AF2, reconoce el lugar de <i>splicing</i> 3' (normalmente el dinucleótido AG) en las etapas precoces del <i>splicing</i>. ▪ Mutaciones localizadas en los aminoácidos S34 y Q157. ▪ Aproximadamente un 3% de las LMA, que aumenta a un 10% de las LMA secundarias. ▪ Las mutaciones afectan los dos <i>zinc fingers</i>, alterando la capacidad para reconocer los lugares de <i>splicing</i>, provocando una aberrante inclusión o omisión de exones <i>cassette</i> en aproximadamente un 5% de todos los transcritos. ▪ En algunas series asociado a mal pronóstico. 	97,98,100

	<p>ZRSR2 (Xp22.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Factor implicado en el <i>spliceosoma</i> menor, que regula el <i>splicing</i> de los intrones tipo U12 (<0.5% de los genes contienen estos intrones). ZRSR2 se une al extremo 3' del intron U12 para potenciar el <i>splicing</i> de este. ▪ Mutaciones <i>nonsense</i> o <i>frameshift</i> a lo largo de todo el gen. ▪ Aproximadamente un 1% de las LMA, mas frecuente en varones. ▪ Mecanismo poco conocido, se cree que la disfunción de ZRSR2 provoca la alteración de <i>splicing</i> de ciertos genes por retención de los intrones U12. ▪ Papel pronóstico poco conocido. 	<p>98,100</p>
<p>Alteraciones en receptores y vías de señalización</p>	<p>KIT (4q12)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Receptor transmembrana (CD117) tipo tirosina kinasa III, que al activarse con la unión de su ligando (<i>stem cell factor</i>), forma un dímero y activa vías de señalización implicadas en proliferación. ▪ Mutaciones puntuales, focalizadas en el exón 17, siendo V617F y N822K las mas frecuentes. ▪ Aproximadamente un 10% de las LMA, muy frecuentes en LMA con mutación de CBF (30-40% de estas presentan mutación de KIT) ▪ Mutación que afecta el dominio tirosina kinasa distal, provocando la autofosforilación y consiguiente activación del receptor de manera ligando-independiente. Esta activación desencadena una cascada intracelular implicada en proliferación. ▪ Controversia en si aportan un efecto pronóstico deletéreo en las LMA con mutación de CBF. 	<p>101-103</p>

	<p style="text-align: center;">FLT3 (13q.12.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Receptor transmembrana presente en las células hematopoyéticas, activado tras dimerización en presencia de ligando (<i>FLT3-Ligand</i>). ▪ Existen dos tipos de mutaciones: duplicaciones internas en tándem del dominio JM o TK1 (<i>FLT3-ITD</i>) y mutaciones puntuales missense del dominio tirosin kinasa TK2 (<i>FLT3-TKD</i>, las mas frecuetentes en D835 y D836). ▪ Es la mutación mas frecuente en LMA (30% de todas las LMA), siendo la <i>FLT3-ITD</i> un 25% y <i>FLT3-TDK</i> un 7-10%. ▪ Las mutaciones <i>FLT3-ITD</i> alteran el dominio JM, que de manera natural actúa como inhibidor de la activación del receptor, provocando su activación sin ligando. Las <i>FLT3-TKD</i> afectan el <i>loop</i> de activación intracelular del receptor, interfiriendo en el efecto inhibidor de este dominio y por lo tanto perpetuando una activación constitutiva del receptor. ▪ Las <i>FLT3-ITD</i> están asociadas a mal pronóstico, sobretodo ante la presencia de un ratio alélico alto (<i>FLT3-ITD^{high}</i>), con un aumento de la proliferación celular. El papel de las <i>FLT3-TKD</i> es dudoso, probablemente en relación con las mutaciones coexistentes en un mismo paciente. Con los nuevos fármacos inhibidores de tirosina kinasa, es probable que el pronóstico de estas LMA pueda mejorar. 	<p style="text-align: center;">104,105</p>
--	---	---	--

	<p>NRAS (1p13.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oncogén que codifica para una proteína GTPasa de la familia RAS, localizada en la capa interna de la membrana plasmática. Ciertos receptores de membrana son capaces de activar NRAS, que a su vez activa varias cascadas implicadas en proliferación y supervivencia celular (por ejemplo PI3K y RAF). ▪ La mutaciones mas frecuentes son de tipo <i>missense</i> en la posición G12 y G13 (79%) y Q61 (17%). Típicamente son mutaciones de aparición tardía, implicadas en progresión de mielodisplasias y en clonas de escape en pacientes tratados con terapias dirigidas. ▪ Es el gen de la familia de <i>RAS</i> mas frecuentemente mutado en LMA, aproximadamente un 7%. ▪ La mutación suprime la actividad GTPasa, lo que mantienen NRAS en su conformación activa, perpetuando sus efectos de proliferación y supervivencia. ▪ Sin claro impacto en el pronóstico en LMA. 	<p>106,107</p>
	<p>KRAS (12p12.1)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Función GTPasa análoga a NRAS. ▪ La mutación mas frecuente es tipo <i>missense</i> en la posición G12. ▪ Mutación presente en un 3% de las LMA. ▪ Al igual que NRAS, se altera la actividad GTPasa de KRAS. ▪ Sin claro impacto en el pronóstico en LMA. 	<p>99</p>

	<p>PTPN11 (12q24.13)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fosfatasa intracelular con dominio SH2, implicada en la señalización de receptores tirosina kinasa, receptores de citoquinas o efectores de la vida Ras/Erk. ▪ Mutaciones tipo <i>missense</i> repartidas sobre todo en los exones 3 y 13. ▪ Mutaciones en un 7-8% de las LMA, frecuentes en las LMA con mutación de NPM1. ▪ Las mutaciones afectan en residuos de los dominios N-SH2 y PTP, implicados en la autoinhibición de PTPN11, provocando la activación constitutiva de esta fosfatasa. Esta activación involucra proteínas implicadas en supervivencia y proliferación celular. ▪ Recientemente relacionado con una peor supervivencia, incluidos los pacientes con mutación de <i>NPM1</i>, que a priori son considerados de riesgo favorable. 	108-110
	<p>CBL (11q23.3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ubiquitina ligasa (E3) implicada en regulación negativa de varias cascadas de activación intracelular. ▪ Mutaciones tipo <i>missense</i> o pequeñas inserciones o deleciones en el exón 8 y 9. ▪ Mutaciones en un 1-2% de las LMA. ▪ Las mutaciones afectan el dominio junto al <i>RING finger</i>, perdiendo la actividad E3 ligasa. Esto genera una deregulación de la señalización intracelular de múltiples vías debido a la pérdida del efecto inhibitor de CBL. ▪ El impacto pronóstico aun es indeterminado. 	111,112

	<p>NF1 (17q11.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se trata de un gen supresor de tumores que codifica para una GTPasa tipo GAP, implicada en la inactivación de las proteínas de la familia RAS. ▪ Mutaciones de varios tipos a lo largo de todo el gen, con un <i>hotspot</i> de mutaciones tipo <i>frameshift</i> en T676. ▪ Mutaciones en un 5% de las LMA. ▪ Las mutaciones producen inactivación de NF1, secundariamente permitiendo desregulación de proteínas de la familia RAS. ▪ Impacto pronóstico no definido, aunque podría tener un efecto negativo en la supervivencia. 	<p>113,114</p>
<p>Alteraciones del complejo de la cohesina</p>	<p>STAG2 (Xq25)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína nuclear del complejo de la cohesina con múltiples repeticiones de dominios helicoides, implicada en la cohesión de las cromátidas hermanas a nivel centromérico, en la reparación del DNA y organización tridimensional del DNA. Esta última función es importante en la formación de dominios topológicamente asociados, que facilitan las interacciones entre genes y <i>enhancers</i>. ▪ Mutaciones de múltiples tipos, sobretodo tipo <i>frameshift</i> o <i>missense</i> a lo largo de todo el gen, sobretodo del exón 1 al 27. ▪ Mutación mas frecuente del complejo de la cohesina, siendo un 4% de las LMA <i>de novo</i>, pero hasta un 14% de las LMA secundarias. ▪ Las mutaciones provocan una disfunción de STAG2 por lo que se pierde su efecto en la regulación tridimensional del DNA y su rol en la mitosis. ▪ Impacto pronóstico por determinar. 	<p>115-117</p>

	<p>RAD21 (8q24.11)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína nuclear del complejo de la cohesina, permitiendo la unión y estabilización de SMC1 y SMC3 que rodean las cadenas de DNA. ▪ Mutaciones de múltiples tipos, la mayoría tipo <i>frameshift</i> o truncantes, a lo largo de todo el gen. ▪ Un 3% de las LMA, aparece con frecuencia en LMA con mutación de <i>NPM1</i> y t(8;21). ▪ Las mutaciones comportan una pérdida de función de RAD21, lo que desestabiliza el complejo de la cohesina. ▪ Impacto pronóstico por determinar 	115-117
	<p>SMC1A (Xp11.22)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína nuclear del complejo de la cohesina que forma un heterodímero con SMC3 para rodear el DNA, permitiendo la organización tridimensional de este. ▪ Mutaciones, sobretodo tipo <i>missense</i>, a lo largo de todo el gen. ▪ Un 3% de las LMA. ▪ Las mutaciones alteran la función de la proteína SMC1A, afectando la conformación del complejo de la cohesina. ▪ Impacto pronóstico por determinar. 	115-117
	<p>SMC3 (10q25.2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteína nuclear del complejo de la cohesina que forma un heterodímero con SMC1A. ▪ Mutaciones, sobretodo tipo <i>missense</i>, a lo largo de todo el gen. ▪ Un 3% de las LMA. ▪ Las mutaciones alteran la función de la proteína SMC3, y como SMC1A, se afecta la conformación del complejo de la cohesina. ▪ Impacto pronóstico por determinar. 	115-117

Tabla 1. Mutaciones recurrentes en LMA, agrupadas según los mecanismos afectados.

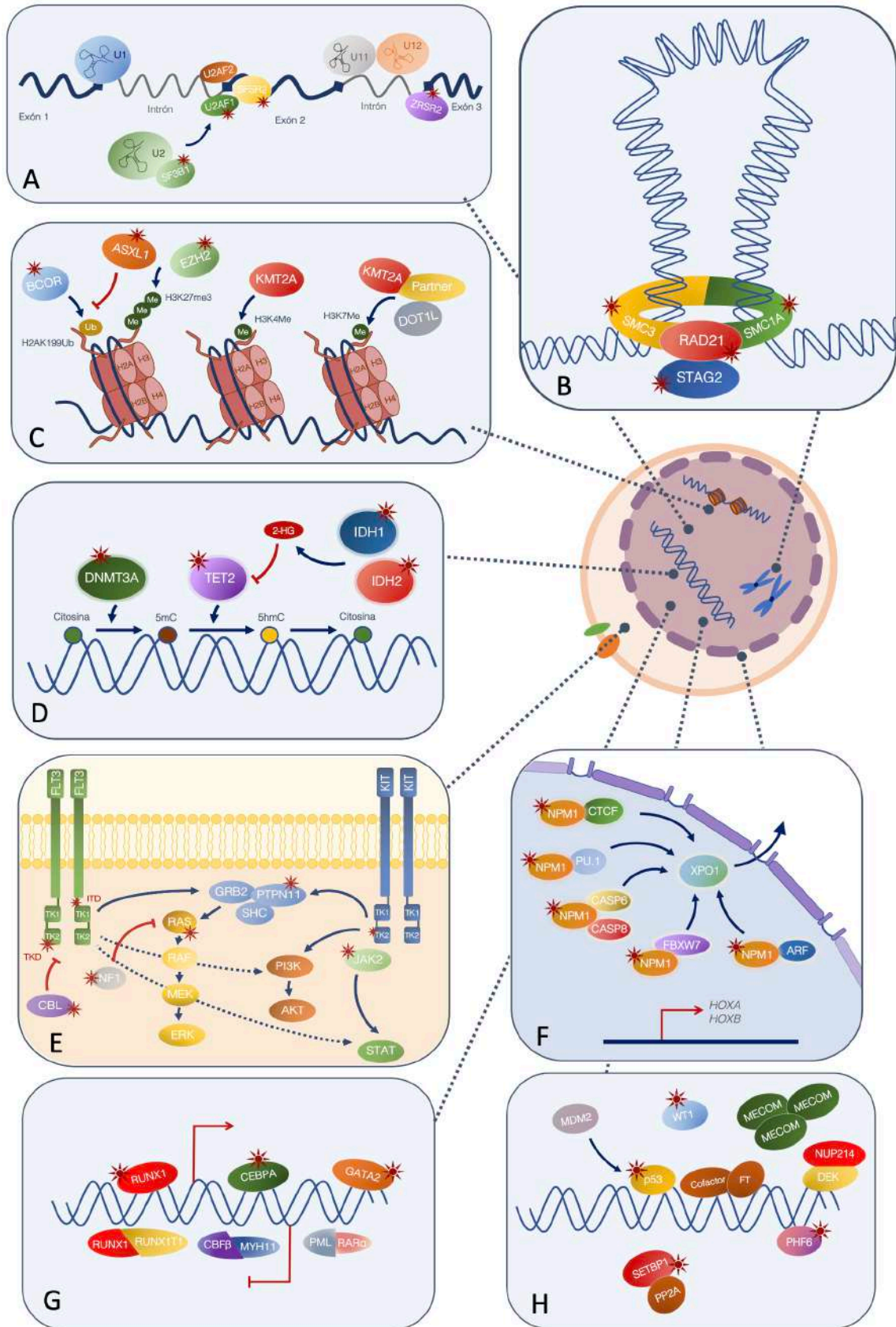


Figura 4. Representación de las principales mutaciones en LMA: Alteraciones en splicing (A), alteraciones en el complejo de la cohesina (B), alteraciones en la modificación de la cromatina (C), mutaciones implicadas en modificación del DNA (D), alteraciones en vías de señalización (E), mutación de *NPM1* (F), alteración en factores de transcripción (G) y alteración de oncogenes y genes supresores de tumores (H).

1.4.2. Jerarquía y organización clonal

Las células neoplásicas contienen una o varias lesiones de las descritas previamente, responsables de su comportamiento biológico, pero aun así la LMA continúa siendo una enfermedad muy heterogénea. Al igual que la hematopoyesis normal establece unas células HSC que son las responsables de proliferar y diferenciarse en células maduras, las células de la LMA también establecen una jerarquía similar^{118,119}. Así pues, se establecen unas LSC que son las responsables de la generación y perpetuación de la leucemia, y unas células (*bulk cells*) más diferenciadas y mayoritarias. Estas LSC, además, son las responsables de las recaídas tras recibir tratamientos para LMA¹²⁰.

Esta jerarquía se complica con una compleja arquitectura clonal detectable en un mismo paciente. Así pues, en un paciente en un mismo momento del tiempo se pueden detectar varios clones distintos de células de LMA, y establecer una filogenia según el patrón de mutaciones. Todos estos clones se originan y se mantienen según un modelo de evolución darwiniana, influenciados además por el microambiente medular existente¹²¹⁻¹²³. Algunos modelos de la ontogenia de la LMA explican la existencia de mutaciones pre-leucémicas (algunos de los genes típicos son *ASXL1*, *TET2*, *DNMT3A*), estableciendo el fenómeno de CHIP. Se pueden acumular varias alteraciones genéticas en varios clones y tras la adquisición de una mutación leucemogénica en uno de ellos (por ejemplo, *NPM1*), se desarrolla y establece una LMA. Además, entre las células de LMA surgen subclones con eventos mutacionales tardíos, tales como mutaciones de *FLT3*, *PTPN11* o *RAS*, entre otros¹¹⁸.

Por último, es posible establecer la evolución clonal en distintos momentos del tiempo de un mismo paciente, lo cual explica los mecanismos de resistencia y recaída de las LSC¹²⁴ (Figura 5). Por ejemplo, en pacientes con LMA con mutaciones de *FLT3*, la presión que ejercen los inhibidores dirigidos a *FLT3* típicamente originan clones a la recaída sin esta mutación, con nuevas mutaciones de *FLT3* resistentes al fármaco o adquisición de nuevas mutaciones¹²⁵. También, en los pacientes con mutaciones de *IDH1* o *IDH2*, ante la terapia con inhibidores de IDH puede surgir como mecanismos de resistencia la aparición de clones con mutaciones de *RAS*, que condicionan una ventaja proliferativa en las células leucémicas¹²⁶.

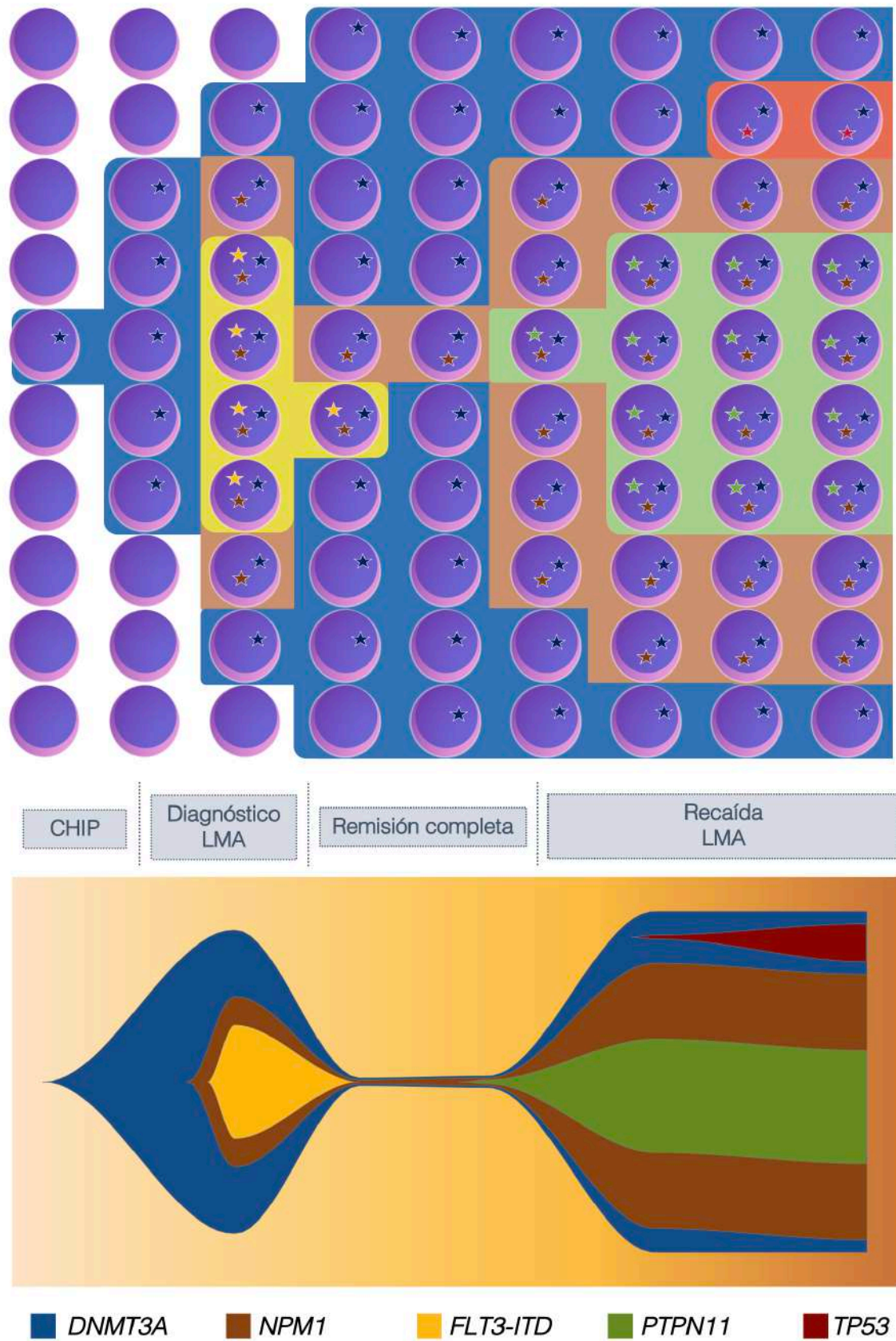


Figura 5. Ejemplo ilustrado de la dinámica de una LMA desde su generación a partir de un CHIP, hasta la recaída. En la parte superior se representa la disposición de las células con mutaciones en la médula del paciente, en la parte inferior la dinámica de las mutaciones a lo largo del tiempo.

1.4.3. Microambiente tumoral e inmunología

Además de las características propias de la célula de LMA, cada vez mas se está descubriendo la importancia del nicho ambiental para favorecer la generación de la LMA así como perpetuar la resistencia a tratamientos y las recaídas. Las células de LMA son capaces de generar un ambiente medular de inmunosupresión, colaborando con distintos tipos celulares con el objetivo de evitar su reconocimiento por parte de las distintas células inmunes. Además, el nicho creado supone un ambiente favorable para la supervivencia de las LSC y para su resistencia a los tratamientos^{127,128}. Se han resumido los principales efectos sobre el microambiente en la Tabla 2.

Mecanismo afectado	Descripción de los procesos	Ref.
Alteraciones en la presentación antigénica	<ul style="list-style-type: none"> Los blastos de LMA pueden disminuir la presentación de moléculas HLA-II por delección genética o mecanismos epigenéticos, evitando su reconocimiento por parte de los linfocitos T. Mecanismo importante para evitar el efecto injerto contra leucemia y demostrado en recaídas post aloTPH. 	129-131
Expresión de <i>checkpoints</i> inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> Los blastos expresan marcadores de <i>checkpoint</i> inmunológico para activar la autotolerancia por parte de los linfocitos T. PD-L1, TIM3, TIGIT, LAG3 y CTLA4 son los mas relevantes en LMA. CD47 es un marcador expresado por los blastos de LMA para evitar la fagocitosis por parte de los macrófagos. 	132-134
Alteración de la sinapsis inmunológica	<ul style="list-style-type: none"> Los pacientes con LMA tienden a tener mas linfocitos T que controles sanos (fenotipo T citotóxico), pero con una expresión génica distinta, por ejemplo, en genes involucrados en el citoesqueleto de actina. Datos funcionales han demostrado esta expresión génica distinta con una menor capacidad de formar la sinapsis inmune con los blastos. Los linfocitos T de paciente con LMA tienen un potencial citotóxico reducido por menor expresión de gránulos tóxicos. 	135,136

<p>Secreción de factores solubles inhibidores del sistema inmune</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se ha asociado una mayor cantidad de linfocitos T reguladores en el microambiente de LMA, probablemente mediado por liberación de IL10, IL35, TGFb e IDO1 por parte de los blastos y otras células del microambiente. ▪ IDO1 cataliza la degradación de triptófano en metabolitos tóxicos, lo que promueven la inhibición de la proliferación de linfocitos T y favorecen su apoptosis. ▪ La arginasa-II se ha descrito en el plasma de pacientes con LMA, alterando la proliferación de los linfocitos T y favoreciendo el cambio de fenotipo de los macrófagos a macrófagos M2-like inmunosupresores. 	<p>137,138</p>
<p>Escape del reconocimiento por las células NK</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Las células de LMA son capaces de hipermetilar los genes que codifican para ligandos activadores de células NK, evitando su reconocimiento por estas. ▪ Además, pueden secretar formas solubles del ligando NKG2DL, provocando una regulación negativa del receptor NKG2D por parte de las NK. ▪ Los blastos pueden expresar ligandos inhibidores de la actividad de las células NK. 	<p>139,140</p>
<p>Incremento de MSCs i macrófagos</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los blastos de LMA pueden promover la expansión de las células mieloides supresoras (MSCs) con la liberación de vesículas extracelulares con contenido génico y de microRNAs. ▪ Estas células fomentan el mantenimiento de un microambiente inmunosupresor mediante la liberación de citoquinas y contacto con células inmunes. ▪ Los pacientes con LMA tienen mayor cantidad de macrófagos con fenotipo M2 con características inmunosupresoras. 	<p>141,142</p>
<p>Cambios del estroma y vasculares</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se ha demostrado un remodelamiento anormal de la vascularización medular en modelos de LMA, sobretodo en áreas endosteales, favoreciendo un aumento de permeabilidad y alteraciones de la perfusión y creando un ambiente de hipoxia. ▪ Esta remodelación favorece el mantenimiento de las células tumorales sobre las células hematopoyéticas normales, además que favorece la supervivencia de las células ante agentes quimioterápicos. 	<p>143,144</p>

<p>Células mesenquimales inmunosupresoras</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Las células mesenquimales estromales de los pacientes con LMA son capaces de reprogramar y modificar las células de la inmunidad, favoreciendo un estado inmunosupresor. ▪ Estas células son capaces de inducir linfocitos T reguladores y favorecer la síntesis de IDO1. ▪ Se ha demostrado que el comportamiento de las células mesenquimales es variable según el tipo de LMA (secundaria, <i>de novo</i>), con un perfil de liberación de citoquinas distinto. ▪ Ensayos <i>in vitro</i> han demostrado la mayor resistencia a quimioterapia de los blastos en contacto con las células mesenquimales. 	<p>145-147</p>
<p>Alteración del homing medular</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ En algunas LMA se ha observado un aumento de la expresión del receptor CXCR4, siendo su ligando CXCL12 expresado en el nicho medular. ▪ La sobreexpresión de CXCR4 puede favorecer el tráfico de los blastos para su establecimiento y mantenimiento en la médula, además de activar vías de señalización para favorecer su supervivencia. ▪ Otras moléculas de adhesión (VLA4, CD44) podrían ser responsables de anclar las LSC en la médula permitiendo crear ambientes favorables para su resistencia a tratamientos. 	<p>128,148</p>
<p>Alteraciones del metabolismo</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los blastos, como muchas células tumorales, aceleran el metabolismo de la glicólisis y favorecen vías anabólicas para la biosíntesis de membranas y DNA (efecto Warburg). ▪ Las células de LMA pueden inducir la lipólisis de los adipocitos medulares para utilizar los ácidos grasos como productos metabólicos. ▪ Se ha demostrado la transferencia de mitocondrias a los blastos de LMA por parte de las MSCs. ▪ La depleción de glucosa y aminoácidos (arginina y triptófano) así como los productos derivados de su metabolismo (radicales libres de oxígeno, lactato) son inhibidores de las células T y favorecen su cambio a fenotipo de células T reguladoras. 	<p>149-151</p>

Tabla 2. Principales alteraciones del microambiente medular en LMA. Adaptado de Tettamati S. y colaboradores¹²⁷.

1.5. Clasificación

La LMA es una enfermedad heterogénea, tanto entre pacientes como entre las células de un mismo paciente. Eso es así porque en su patogénesis están involucrados distintos mecanismos biológicos, lo que se traducen en LMAs con distintas presentaciones clínicas y pronóstico¹⁵². Debido a esta heterogeneidad, desde hace años han surgido clasificaciones con objetivo de poder catalogar distintas LMA con alteraciones genéticas recurrentes y pronósticos distintos.

En primer lugar, en el año 1976 se postuló la primera clasificación para LMA, a partir de un consenso de expertos del grupo Franco-Americano-Británico (FAB)¹⁵³. Dicha clasificación estratificaba los distintos tipos de LMA inicialmente en función de los hallazgos morfológicos y citoquímicos de los blastos, y más adelante se publicaron actualizaciones añadiendo también la positividad para ciertos marcadores inmunofenotípicos¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ (Tabla 3). Esta clasificación, si bien se utilizó ampliamente a finales del siglo XX, ha sido progresivamente reemplazada por nuevas clasificaciones que incluyen aspectos citogenéticos y moleculares, a medida que se han ido descubriendo mediante nuevas herramientas diagnósticas y nuevos mecanismos moleculares.

Subtipo FAB	Denominación	% de LMA ¹⁵⁷	MPO ¹⁵⁸	Esterasas inespecíficas ¹⁵⁸
M0	LMA con mínima diferenciación	5	-	+/-
M1	LMA sin maduración	15	+	-
M2	LMA con maduración	25	++	-
M3	Leucemia Aguda Promielocítica	5-10	+++	-/+
M4	LMA mielomonocítica (M4Eo; variante con eosinofilia)	20-25	++	+
M5	LMA monoblástica (M5a)/ Monocítica (M5b)	5-10	+/-	++
M6	LMA tipo eritroleucemia	<5	+	-
M7	LMA tipo megacarioblástica	<5	-	-

Tabla 3. Clasificación FAB de las leucemias agudas mieloides. MPO: Mieloperoxidasa.

Introducción: Leucemia mieloide aguda

Actualmente hay varias clasificaciones de LMA que agrupan las leucemias en función de hallazgos morfológicos, citogenéticos, moleculares y características clínicas. La clasificación más estándar es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que en su última revisión en 2016 presentó las distintas entidades en que puede clasificarse una LMA (Tabla 4). Aun así, en la práctica clínica son de utilidad las clasificaciones con impacto pronóstico que ayudan a estratificar los pacientes en los protocolos diagnósticos (ver apartado Aspectos Pronósticos en LMA).

Categoría	Frecuencia (%)
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	
LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	7 (<60 años)
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;122); <i>CBFB::MYH11</i>	~5 (<60 años)
Leucemia promielocítica aguda con <i>PML::RARA</i>	5-10
LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3::KMT2A</i>	~3
LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK::NUP214</i>	~1,5
LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>	1-2
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.1); <i>RBM15::MKL1</i>	Pediátrico
LMA con mutación de <i>NPM1</i>	25-35
LMA con mutación bialélica de <i>CEBPA</i>	6-10
Entidad provisional: LMA con <i>BCR::ABL1</i>	
Entidad provisional: LMA con mutación de <i>RUNX1</i>	
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	25-35
Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia	10-20
LMA, no especificada	
LMA con mínima diferenciación	<5
LMA sin maduración	5-10
LMA con maduración	~10
Leucemia aguda mielomonocítica	5-10
Leucemia aguda monoblástica/monocítica	<5
Leucemia eritroide pura	<5
Leucemia aguda megacarioblástica	<5
Leucemia aguda basofílica	<1
Panmielosis aguda con mielofibrosis	<1
Sarcoma mieloide	
Proliferaciones mieloides asociadas con el síndrome de Down	
Mielopoiesis anormal transitoria asociada con el síndrome de Down	
Leuceima mieloide asociada con el síndrome de Down	

Tabla 4. Clasificación de la OMS (WHO) 2016 de la LMA y neoplasias relacionadas.

1.6. Tratamiento

La LMA es una enfermedad potencialmente letal sin tratamiento por lo que es necesario un diagnóstico rápido y certero para poder iniciar el tratamiento. Actualmente el tratamiento de LMA está sufriendo un cambio notable respecto a los años previos, con la incorporación de nuevos fármacos y combinaciones al arsenal terapéutico¹⁵⁹. En función de las características clínicas del paciente y de los hallazgos biológicos, se debe consensuar la mejor estrategia terapéutica del momento.

Como regla general, en pacientes jóvenes con buen estado general se tiende a emplear tratamientos intensivos, con la eventual realización de un aloTPH tras conseguir la remisión. Por otro lado, en pacientes mayores no candidatos a tratamientos intensivos, las opciones son más limitadas, y se prioriza su inclusión en ensayos clínicos si su estado y la biología de la enfermedad lo permiten¹⁶⁰.

1.6.1. Tratamiento de la LMA no promielocítica en primera línea en pacientes elegibles para aloTPH

Ante un paciente con una LMA al diagnóstico, los esquemas de tratamiento más usuales se basan en una terapia de inducción con el objetivo de lograr una remisión completa (es decir, alcanzar una cifra de <5% de blastos en médula ósea). Tras la respuesta, se suele consolidar con uno o varios ciclos de quimioterapia, y según el riesgo de recaída, se recomienda además realizar un aloTPH tras la consolidación.

1.6.1.1. Quimioterapia intensiva

La combinación de 7 días seguidos de arabinosilcitosina (citarabina, Ara-C) con 3 días alternos de antraciclínicos (daunorrubicina o idarrubicina) ha sido y sigue siendo la columna vertebral del tratamiento intensivo de inducción en la LMA desde su aprobación en 1973¹⁶¹. Su acción sobre el DNA interfiere con la replicación de las células leucémicas, induciendo su muerte. Se trata de una combinación de tratamiento intensivo, con citopenias profundas que requieren del ingreso y manejo del paciente en un régimen de ingreso hospitalario. En el caso de la citarabina, además se emplea para el

tratamiento de consolidación con altas dosis (High-dose Ara-C; HiDAC) con el objetivo de mantener la respuesta conseguida tras la inducción.

1.6.1.2. AloTPH

El aloTPH supone una de las piedras angulares del tratamiento de la LMA, puesto que la mayoría de pacientes con LMA no lograrán alcanzar la curación solo con quimioterapia. El primer aloTPH en leucemia se realizó en 1957 y desde entonces ha ido evolucionando, optimizando los regímenes de acondicionamiento, la selección de donantes y los procedimientos y cuidados durante todo el proceso^{162,163}. Uno de sus efectos terapéuticos se basa en la capacidad de dar altas dosis de quimioterapia sin que la toxicidad medular sea un factor limitante debido a la disponibilidad de un injerto medular viable. Aun así, el principal efecto buscado es la inmunoterapia generada por el efecto injerto contra leucemia. Este efecto se basa en la capacidad de las células T alogénicas del injerto de reconocer y eliminar células de LMA residuales en el paciente¹⁶⁴.

El aloTPH supone una técnica compleja con múltiples variables que deben ser definidas, como por ejemplo el tratamiento de acondicionamiento, la fuente del injerto o el tratamiento inmunosupresor. El tratamiento de acondicionamiento suelen ser combinaciones de fármacos como el busulfán, ciclofosfamida y fludarabina. Este debe ser adecuado a la condición del paciente, siendo preferible el acondicionamiento mieloablativo sobre el de intensidad reducida siempre que sea posible. En cuanto a la fuente del injerto, suele ser obtenido de sangre periférica de un donante sano, pudiendo ser de un relativo del paciente (por identidad de HLA o haploidenticidad) o de un donante no emparentado¹⁶⁵.

Aun con todos los beneficios antileucémicos del aloTPH, este es un procedimiento asociado a una alta morbilidad y mortalidad. Globalmente, en LMA la principal causa de muerte tras el aloTPH es la recaída de la enfermedad, seguido por infecciones y el efecto injerto contra huésped (EICH), que además es causa importante de morbilidad^{166,167}. Por este motivo, es vital seleccionar los pacientes que mejor van a beneficiarse mediante escalas de riesgo validadas con el objetivo de reducir la morbilidad y mortalidad¹⁶⁸.

Además, cada vez es más necesario investigar en nuevas técnicas o tratamientos post-aloTPH que puedan reducir la incidencia de recaídas, siendo un campo actualmente explorado.

En la Tabla 5 se muestra un ejemplo propuesto por el grupo de trabajo en LMA de la European LeukemiaNet (ELN) sobre cómo se integran las escalas de valoración del paciente con el riesgo de recaída y de NRM para decidir la idoneidad del aloTPH¹⁶⁹.

Grupos de riesgo LMA	Características	Riesgo de recaída		Scores pronósticos para NRM que recomendarían aloTPH		
		QT o autoTPH (%)	aloTPH (%)	EBMT score	HCT-CI score	NRM (%)
Bueno	t(8;21) con leucocitos ≤ 20 Inv(16)/t(16;16) Mutación <i>CEBPA</i> bialélica Mutación <i>NPM1</i> sin <i>FLT3-IT</i> CR1 y no MRD	35-40	15-20	NA (≤ 1)	NA (≤ 1)	10-15
Intermedio	t(8;21) con leucocitos > 20 Citogenética normal (o con pérdida de X o Y), leucocitos ≤ 100 y RC1	50-55	20-25	≤ 2	≤ 2	< 20 -25
Malo	Bueno o intermedio sin RC1 Citogenética normal y leucocitos > 100 Citogenética anormal	70-80	30-40	$\leq 3-4$	$\leq 3-4$	< 30
Muy Malo	Cariotipo monosómico Abn3q26 Alta expresión <i>EVI1</i>	> 90	40-50	≤ 5	≤ 5	< 40

Tabla 5. Recomendaciones de la ELN para realizar un aloTPH basado en los scores que predicen mortalidad del paciente. NRM: Non-Relapse Mortality, QT: Quimioterapia, AutoTPH: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. EBMT: European Society for Blood and Marrow Transplantation. HCT-CI score: Hematopoietic stem Cell Transplantation - Comorbidity Index (Sorró ML. y colaboradores¹⁷⁰). EBMT score (Muffy LS. y colaboradores¹⁷¹).

1.6.1.3. Midostaurina y otros inhibidores de *FLT3*

Con el mayor conocimiento de la biología de la LMA se han desarrollado terapias dirigidas a ciertas dianas presentes en la enfermedad. Tal como se ha descrito anteriormente, la mutación del gen *FLT3* es la más frecuente en LMA y supone la activación en ausencia de ligando del receptor *FLT3*, activando vías de señalización

implicadas en supervivencia y proliferación^{41,105}. Dada esta situación, se han desarrollado fármacos capaces de bloquear la región de unión al ATP del dominio intracelular tirosina kinasa. Los de primera generación (sunitinib, sorafenib y midostaurina) son inhibidores no específicos de FLT3, pudiendo además inhibir otras dianas como KIT, PDGFR, VEGFR, RAS/RAF y JAK2¹⁷². Entre estos, cabe destacar midostaurina, que en el estudio RATIFY en combinación con quimioterapia demostró un aumento de la supervivencia en pacientes con LMA y mutación de *FLT3*, lo cual resultó en su posterior aprobación por las principales agencias reguladoras¹⁷³. Los inhibidores de nueva generación (quizartinib, gilteritinib, crenolanib) son más potentes y específicos del receptor FLT3, y actualmente están siendo empleados en fases de ensayo clínico, aunque se prevé que puedan incorporarse al arsenal terapéutico de la LMA a corto plazo¹⁷².

Hay que destacar que los inhibidores de FLT3 se dividen en dos tipos según su mecanismo de acción. Los de tipo I (sunitinib, midostaurina, crenolanib o gilteritinib) se unen a FLT3 en su conformación activa, mientras que los de tipo II (quizartinib o sorafenib) actúan en una área adyacente al dominio de unión del ATP, solo accesible cuando está inactivo. Debido a esto, los inhibidores tipo I actúan tanto en LMA con *FLT3*-TKD como en *FLT3*-ITD, mientras que los de tipo II solo actúan frente a *FLT3*-ITD^{104,172}.

1.6.1.4. Gemtuzumab ozogamicina

El antígeno CD33 (Siglec 3) es un receptor transmembrana expresado en las células de origen mieloide, siendo detectable con una expresión variable en la mayoría de blastos de LMA¹⁷⁴. Mediante ensayos con anticuerpos monoclonales marcados con radiación contra CD33, se observó que tras unirse al antígeno, el blasto interiorizaba el complejo receptor-anticuerpo, por lo que se desarrolló gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®; GO); un anticuerpo anti CD33 unido a una molécula capaz de dañar el DNA (calicheamicina) para inducir la apoptosis celular^{175,176}.

Basado en los estudios fase I de escalada de dosis, se fijó 9 mg/m² en los días 1 y 14 como dosis máxima, no por toxicidad sino por saturación de los lugares de unión del

anticuerpo. Los análisis intermedios de estudios fase III en LMA en recaída demostraron un 30% de respuestas completas, por lo que en mayo del 2000 obtuvo la aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) para pacientes no candidatos a terapia intensiva. Posteriormente, en un ensayo con pacientes mayores de 60 años con LMA *de novo*, se diseñó un esquema con daunorrubicina (45 mg/m² en el grupo experimental) y citarabina, randomizando GO (6 mg/m²) una dosis. Para la sorpresa de los investigadores, no hubo un incremento de las respuestas ni la supervivencia, además que el brazo experimental mostró un aumento de la mortalidad relacionada con el tratamiento, por lo que se retiró del mercado en Octubre de 2010^{177,178}.

Años mas tarde, tras estudiar mas profundamente las causas de toxicidad de GO, se describe una probable relación de ciertas toxicidades como la enfermedad veno-oclusiva hepática (EVOH) con la combinación con otros fármacos tóxicos y, sobretodo, la concentración plasmática máxima. Es por ello que se posteriormente diseña un ensayo clínico (ALFA-0701) randomizando GO a una dosis mas baja y mas días (3mg/m² día 1, 4 y 7) con daunorrubicina y citarabina¹⁷⁹. Si bien no hay diferencias en las tasas de respuesta, la supervivencia libre de recaída (RFS) y la supervivencia global (SG) fueron superiores en la rama experimental. Posteriormente se realizaron varios ensayos con pacientes de distintas características y diferentes dosis. Un meta-análisis analizando 5 de estos estudios concluyó que la adición de GO reducía el riesgo de recaída y aumentaba la supervivencia de manera significativa, sobre todo, en los pacientes de riesgo favorable¹⁸⁰. Es por ello que volvió a conseguir la aprobación por la FDA en 2017. Actualmente es un fármaco con una potencial utilidad en combinación con quimioterapia para los pacientes con LMA y riesgo favorable por presencia de mutaciones de CBF¹⁶⁰.

1.6.1.5. CPX-351

El CPX-351 (Vyxeos®) es una novedosa formulación de administración de quimioterapia convencional (daunorrubicina y citarabina en un ratio 5:1) en forma encapsulada mediante partículas liposomales. Parece ser que esta modalidad permite optimizar los ratios de dosis y llegar al compartimento medular donde están las células de LMA con mayor facilidad que la quimioterapia de administración convencional¹⁸¹. En un ensayo

fase II randomizado con pacientes mayores (60 a 75 años) con LMA no tratada previamente, se obtuvieron mejores respuestas en el grupo con CPX-351 comparado con quimioterapia convencional, con mejoría de la supervivencia libre de evento (SLE) y la SG en el grupo de pacientes con LMA secundaria¹⁸². Posteriormente, un ensayo fase III confirmó un aumento de la supervivencia en los pacientes con LMA relacionada con la terapia (tLMA) y consiguió su aprobación por la FDA para pacientes con tLMA y con LMA con cambios relacionados con mielodisplasia¹⁸³.

1.6.2. Tratamiento de la LPA en primera línea

Este trabajo no trata sobre el estudio de esta subcategoría de LMA por tener una biología y un tratamiento totalmente distintos a la LMA no LPA. Aun así, cabe mencionar brevemente el enfoque terapéutico de esta entidad. Inicialmente, en 1973 se publicó la efectividad de daunorrubicina para el tratamiento de la LPA, si bien el pronóstico era malo debido a las muertes por coagulopatía y por las recaídas¹⁸⁴. Con el descubrimiento de la efectividad del ácido all-trans retinoico (ATRA) para esta enfermedad, se diseñaron protocolos combinado ATRA con quimioterapia, revolucionando la tasa de respuestas y supervivencia de los pacientes con LPA^{185,186}. Esta molécula actúa degradando la proteína de fusión (PML-RAR α) y reactivando la transcripción génica interrumpida por la mutación. Posteriormente, en 1996 se introdujo el uso de trióxido de arsénico (As₂O₃; ATO), que es capaz de inducir la diferenciación y degradación de PML-RAR α , y en combinación con ATRA ha demostrado una mayor tasa de respuestas y supervivencia^{187,188}. A día de hoy la combinación ATO-ATRA supone el tratamiento estándar de los pacientes de riesgo bajo o intermedio, con una supervivencia a los 2 años del 99%. En los pacientes de alto riesgo esta combinación aun esta siendo evaluada y se recomienda la adición de algún fármaco citorreductor¹⁸⁹.

1.6.3. Tratamiento de la LMA primera línea en pacientes no elegibles para aloTPH

Los pacientes no elegibles para TPH (por edad o comorbilidades) tienen un panorama terapéutico mucho mas limitado, muchas veces con tratamientos que no consiguen la curación, con el objetivo de mantener una respuesta clínica mantenida en el tiempo. Es por ello que muchas veces estos pacientes son excelentes candidatos para inclusión en

ensayos clínicos que puedan suponer un beneficio respecto a los tratamientos estándar actuales¹⁹⁰.

1.6.3.1. Agentes hipometilantes (HMA)

Los HMA inicialmente fueron fármacos utilizados para SMD, pero dado el *overlap* de la LMA con la entidad ya desaparecida del SMD con exceso de blastos en transformación, virtualmente se pudo explorar su utilidad en LMA^{191,192}. Se trata de los fármacos azacitidina (5-Azacitidina) y decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina), y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de DNA metiltransferasas con el objetivo de bloquear la metilación de genes y reactivar genes aberrantemente silenciados en las células de LMA responsables de varias vías de señalización¹⁹³.

Ambos fármacos han demostrado seguridad y una eficacia discreta en ensayos fase III con pacientes mayores con LMA en sub-análisis de supervivencia (SG mediana 7.7 vs 5 meses para decitabina y 12.1 vs 6.9 meses para azacitidina, ambos estadísticamente significativos)^{194,195}. Aun así, no existen estudios randomizados que comparen de manera homogénea estos dos fármacos. Su administración en ciclos es mensual y se mantienen si hay respuesta hasta la progresión de la LMA, aunque se necesitan 6 meses para observar la máxima respuesta y normalmente esta aparece en los 3 primeros meses. Actualmente son el tratamiento estándar para el tratamiento de pacientes con LMA no elegibles para aloTPH, si bien se van explorando nuevos esquemas que intentan mejorar su efectividad combinándolos con nuevos fármacos^{190,196}.

1.6.3.2. Venetoclax

Recientemente ha surgido evidencia de la eficacia de azacitidina con el inhibidor de Bcl-2 venetoclax (ABT-199) para el tratamiento de la LMA. Se ha propuesto que azacitidina podría aumentar la expresión de las proteínas proapoptóticas NOXA (*PMAIP1*) y PUMA (*BBC3*), que actuarían en sinergia con la inhibición de la proteína antiapoptótica Bcl-2 por parte de venetoclax para inducir la muerte de las células de LMA¹⁹⁷. Tras comprobar su viabilidad en pacientes con LMA en recaída o refractaria (LMA R/R), se iniciaron

ensayos clínicos comparando esta combinación frente a azacitidina u otros tratamientos estándar, mostrando una eficacia superior a la vez que seguridad^{198,199}. El estudio más destacable es el ensayo clínico randomizado fase III comparando azacitidina frente a venetoclax con azacitidina para pacientes no candidatos a terapia intensiva con LMA no tratado previamente. Este estudio demostró la superioridad de la combinación, con una tasa de respuestas superior (66% vs 28%) así como una mediana de supervivencia también superior (14.7 vs 9.6 meses)²⁰⁰. Tras este estudio, la combinación de venetoclax y azacitidina consiguió la aprobación por la FDA y actualmente supone el tratamiento óptimo de los pacientes con LMA no candidatos a terapia intensiva.

1.6.4. Tratamiento de la LMA R/R

La LMA R/R supone una situación de difícil manejo y con un pronóstico sombrío, con una supervivencia a los 5 años del 10%. En esta situación, no existe un abordaje estándar y requiere un balance de las posibilidades de beneficio con una nueva línea de tratamiento y las complicaciones potenciales de la misma²⁰¹. Como norma general, se recomienda valorar la inclusión del paciente en ensayo clínico, siempre que sea posible y que el ensayo pueda ofrecer la posibilidad de una respuesta aceptable²⁸.

En los pacientes jóvenes con LMA R/R previo al aloTPH, una nueva remisión completa (RC) puede conseguirse con quimioterapia intensiva en más de la mitad de los casos, si bien en pacientes mayores con LMA con genéticas desfavorables esta cifra es menor^{202,203}. En cuanto a las LMA R/R que ocurren tras un aloTPH, el pronóstico es aún peor. Sobre todo, las recaídas tempranas tras el aloTPH ofrecen una supervivencia muy reducida frente a recaídas más tardías (SG a los 3 años del 3% vs 38%, para los pacientes con recaída en los primeros 6 meses y a más de 3 años, respectivamente)²⁰⁴. En estos pacientes es imprescindible individualizar la estrategia terapéutica, pudiendo incluir técnicas inmunoterápicas como la infusión de linfocitos del donante o fármacos quimioterápicos o hipometilantes.

1.6.5. Nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas

Además de los tratamientos previamente descritos, surgen nuevos enfoques terapéuticos y dianas con potencial de ser efectivas para la LMA. Por ejemplo, los fármacos inhibidores directos de dianas distintas a FLT3 son una interesante estrategia con resultados prometedores en ensayos clínicos. Entre ellos, destacar los inhibidores de la proteína mutada IDH1 (ivosidenib) e IDH2 (enasidenib), que en monoterapia han demostrado eficacia en LMA con estas mutaciones^{205,206}. Otras dianas terapéuticas (inhibidores de MDM2, inhibidores de histonas desacetilasa, inhibidores de menina, etc.) no han demostrado una mejoría significativa en el pronóstico o aun están en fases muy tempranas de exploración¹⁵⁹.

En otras neoplasias, la inmunoterapia ha resultado un campo de tratamiento revolucionario, utilizando nuevas dianas y mecanismos inmunológicos para el tratamiento de los tumores. En el caso de la LMA, si bien no ha sido un campo en crecimiento exponencial, han surgido terapias que en un futuro próximo puedan aportar mejorías en los protocolos actuales. Por ejemplo, anticuerpos duales como flotetuzumab (anti CD123 y anti CD3), o anticuerpos inhibidores de *checkpoint* inmune como sabatolimab (anti TIM3) o magrolimab (anti CD47), son candidatos a poder complementar el arsenal terapéutico en un futuro próximo²⁰⁷. En este contexto, los tratamientos sofisticados con inmunoterapia celular con células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cells*) están en desarrollo pero abren la puerta a innovaciones terapéuticas para el tratamiento de situaciones difíciles como la LMA R/R²⁰⁸.

2. Aspectos pronósticos de la LMA

La LMA es una enfermedad heterogénea, por lo que es entendible que el pronóstico sea distinto en función de diferentes variables, que se pueden dividir en variables relacionadas con el paciente y con la enfermedad. La edad supone el factor de riesgo del paciente mas importante, mientras que las alteraciones genéticas suponen el factor de riesgo de la enfermedad mas importante. Hasta mitades del siglo XX se trataba de una enfermedad incurable, pero actualmente se logra la curación de forma global en un 35-40% de las LMA en menores de 60 años y en un 5-15% en mayores de 60 años¹. En este apartado discutiremos los principales factores pronósticos en LMA, profundizando en las principales clasificaciones de riesgo que combinan factores genéticos para estratificar a los pacientes²⁰⁹.

2.1. Edad y comorbilidad

La edad supone el factor pronóstico independiente mas importante dentro de los factores dependientes del paciente, sobretodo por encima de 50-55 años, donde la supervivencia cae progresivamente²⁰⁹. También, la presencia de comorbilidades (medido con escalas como HCT-CI) y el estado general del paciente (medido con las escalas ECOG y Karnofsky) son factores independientes para predecir la supervivencia de los pacientes con LMA^{210,211}. Todas estas variables son clave para definir la estrategia terapéutica en el tratamiento de la LMA, pues las potenciales toxicidades secundarias a los tratamientos empleados pueden ser insostenibles con las características clínicas del paciente.

2.2. Alteraciones citogenéticas

Aproximadamente un 55% de las LMA tienen alguna alteración citogenética, muchas de ellas recurrentes en varios pacientes²¹². En 1982 ya se describió que algunas alteraciones citogenéticas pueden tener un impacto pronóstico importante e independiente de otros factores, por lo que las técnicas citogenéticas son empleadas

para asesorar el diagnóstico y el tratamiento de las LMA²¹³. A partir de estos hallazgos, se establecieron varias clasificaciones de riesgo en función de la citogenética, si bien las series de pacientes eran reducidas o los tratamientos no eran homogéneos entre grupos²¹⁴⁻²¹⁶. En 1998, el grupo *Medical Research Council (MRC) Adult and Children's Leukaemia Working Parties* publicó los resultados del pronóstico de más de 1500 pacientes junto con una clasificación de riesgo, siendo una guía de referencia para asesorar el riesgo de pacientes con LMA²¹⁷. Posteriormente, en 2010 Grimwade y colaboradores publicaron una nueva actualización donde se perfiló el impacto pronóstico de las alteraciones citogenéticas recurrentes²¹⁸.

2.2.1. Clasificación citogenética MRC revisada

Este estudio analizó el impacto de distintas alteraciones citogenéticas en el pronóstico de los pacientes. Se estudió una cohorte de 5876 pacientes con una edad media de 44 años (rango, 16-59), abarcando 3 protocolos terapéuticos en los que todos los pacientes habían recibido terapia intensiva de inducción seguido de distintos modelos de terapia de consolidación según el protocolo. A partir de los datos de supervivencia y los análisis multivariados, se planteó esta clasificación que estratifica los pacientes en tres grupos de riesgo en función de los hallazgos citogenéticos al diagnóstico (Tabla 6).

Los pacientes clasificados con un pronóstico favorable son los que presentan la translocación t(15;17) (LPA), o los pacientes con una translocación de los componentes del CBF. En este mismo estudio demuestran una OS a los 10 años del 81%, 61% y 55% para los pacientes con LPA, t(8:21) e inv(16)/t(16;16), respectivamente. Por otro lado, los pacientes con alteraciones de pronóstico adverso presentan una OS a los 10% por debajo del 30%, llegando a un 3% en algunas entidades (ver figura 6).

Esta clasificación supone un importante hito científico dado que permite estratificar los pacientes según las características genéticas de la enfermedad, pudiendo diseñar protocolos de tratamiento que basen su intensidad en función del pronóstico esperado. Aun así, hasta un 41% de pacientes presentaron un cariotipo normal y un gran número de pacientes tenían anomalías en el cariotipo muy variadas, no clasificables en favorable

o adverso, lo cual convierte el grupo intermedio en un grupo de LMAs biológicamente muy heterogéneas. En este punto, las nuevas clasificaciones que aportan datos citogenéticos y genéticos fueron decisivas para perfilar mejor la mayoría de pacientes sin una alteración citogenética recurrente.

Pronóstico favorable	t(15;17)(q22;q21)
	t(8;21)(q22;q22)
	inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
Pronóstico intermedio	Entidades no clasificadas en favorable o adverso
Pronóstico adverso	abn(3q) [excluyendo t(3;5)(q21~25;q31~35)]
	inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)
	add(5q), del(5q), -5
	-7, add(7q)/del(7q)
	t(6;11)(q27;q23)
	t(10;11)(p11~13;q23)
	t(11q23) [excluyendo t(9;11)(p21~22;q23) y t(11;19)(q23;p13)]
	t(9;22)(q35;q11)
	-17/abn(17p)
Cariotipo complejo (≥ 4 anomalías no relacionadas)	

Tabla 6. Clasificación de riesgo citogenético de LMA MRC revisada.

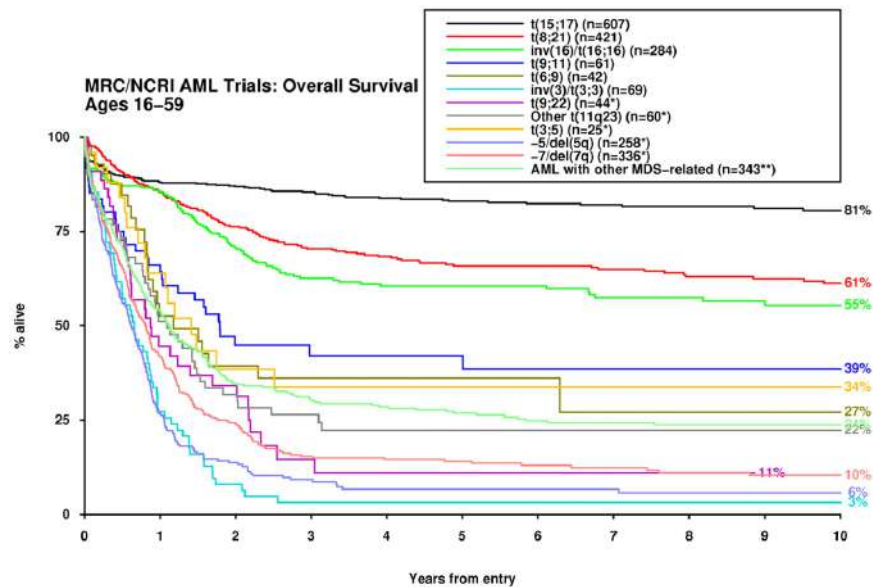


Figura 6. Supervivencia global en función de las características citogenéticas del estudio publicado por Grimwade y colaboradores²¹⁸.

2.3. Alteraciones moleculares

Diversos estudios han caracterizado la LMA a nivel molecular, pudiendo describir mutaciones que aparecen recurrentemente, afectando distintas vías celulares. A partir de estos hallazgos, se ha podido correlacionar la presencia o ausencia de ciertas mutaciones con el comportamiento clínico de la leucemia, pudiendo asesorar mejor el pronóstico^{39,41,219}. Además, la presencia de ciertas mutaciones puede indicar sensibilidad a ciertos fármacos inhibidores, por lo que cada vez mas la caracterización molecular cobra especial interés para planear el abordaje terapéutico. La mayoría de estas mutaciones recurrentes han sido descritas en apartados anteriores. En este sentido, a partir de estos datos se generaron escalas de riesgo que combinaron aspectos citogenéticos y moleculares para definir distintos grupos pronósticos de LMA. De estas escalas, destacamos las clasificaciones de la ELN 2010 y 2017 así como la clasificación CETLAM.

2.3.1. Clasificación ELN 2010

En 2010, el panel de expertos de la ELN publicó un documento de recomendaciones para el diagnóstico y manejo de la LMA, abarcando desde las técnicas diagnósticas recomendadas hasta los tratamientos indicados para cada situación²²⁰. En este contexto, a partir de los datos pronósticos de estudios previos, se estableció una clasificación de riesgo estandarizada basada en los hallazgos genéticos y citogenéticos mas frecuentes, incluyendo el estado mutacional de NPM1, FLT3 y CEBPA (Tabla 7).

Favorable	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-ITD</i> (cariotipo normal)
	Mutación <i>CEBPA</i> (cariotipo normal)
Intermedio-I	Mutación <i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal)
	<i>NPM1</i> no mutada y <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal)
	<i>NPM1</i> no mutada y ausencia <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal)
Intermedio-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
	Anormalidades citogenéticas no clasificadas como favorable o adverso
Adverso	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RNP1-EVI1</i>
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;q23); reordenamiento <i>MLL</i>
	-5 o del(5q)
	-7
	abn(17p)
	Cariotipo complejo

Tabla 7. Clasificación de riesgo de la LMA según las guías ELN 2010.

Esta clasificación optimiza la anterior propuesta por el grupo MRC incluyendo datos de mutaciones, pudiendo clasificar gran parte de los pacientes con cariotipo normal. Las entidades de riesgo favorable de la clasificación MRC son prácticamente superponibles a la de la ELN 2010, si bien se incluyen las mutaciones de *NPM1* (sin *FLT3-ITD*) y *CEBPA* como entidades de buen pronóstico. De la misma manera, las entidades de riesgo adverso también comparten similitud entre la clasificación MRC y la ELN 2010, con mínimas diferencias en alguna alteración citogenética (por ejemplo, en la ELN 2010 solo se considera de riesgo adverso la monosomía del 7, mientras que en el MRC se considera de riesgo adverso tanto la monosomía como alteraciones de 7q). En esta clasificación no se contempla la infrecuente alteración t(9;22) como riesgo adverso, y la definición de cariotipo complejo se reduce a 3 alteraciones citogenéticas no relacionadas.

Tras la publicación de estas recomendaciones, varios grupos se esforzaron en validarla en sus respectivos protocolos terapéuticos, incluyendo dos grandes estudios de dos grupos cooperativos distintos. De manera interesante, estos estudios validaron esta clasificación, pero en los pacientes mayores las diferencias en el pronóstico entre el grupo intermedio-I e intermedio-II no eran distinguibles^{221,222}.

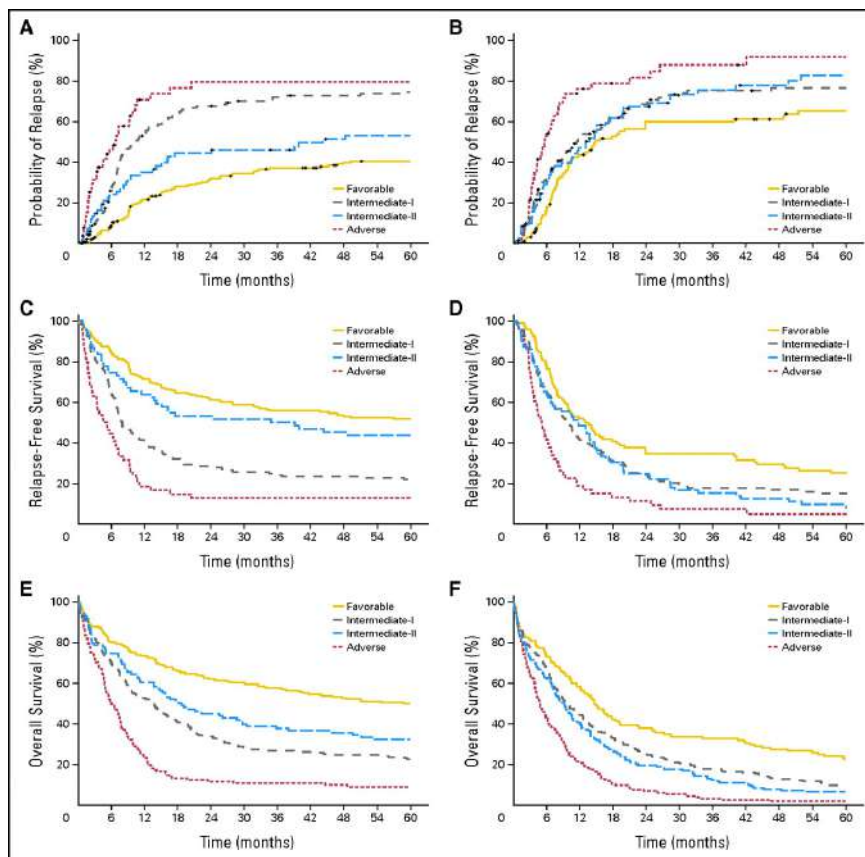


Figura 7. Probabilidad de recaída, supervivencia libre de recaída y supervivencia global según los grupos de la ELN 2010 en pacientes de hasta 60 años (A, C, y E) y en pacientes mayores de 60 años (B, D y F).

2.3.2. Clasificación ELN 2017

En 2017, el mismo grupo de expertos publicó una versión revisada de la clasificación previa (ELN 2017). Esta nueva versión reduce los grupos de riesgo a tres categorías (grupo favorable, intermedio y adverso), además de refinar el valor pronóstico de ciertas mutaciones. En este sentido, las mutaciones de *CEBPA* solo se consideran de carácter favorable cuando son bialélicas y la presencia de *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53* son consideradas mutaciones de riesgo adverso. Además, el valor pronóstico de *FLT3*-ITD se ve condicionado por la presencia de la mutación de *NPM1* así como la cuantificación de su ratio alélico por métodos recientemente descritos²²³ (Tabla 8).

Favorable	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-ITD</i> o <i>FLT3-ITD</i> ^{low}
	Mutación bialélica <i>CEBPA</i>
Intermedio	Mutación <i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITD</i> ^{high}
	<i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (sin anomalías genéticas de riesgo adverso)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>
Adverso	Anormalidades citogenéticas no clasificadas como favorable o adverso
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11)(v;11q23.3); reordenamiento <i>KMT2A</i>
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL11</i>
	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i>
	-5 o del(5q)
	-7
	-17/abn(17p)
	Cariotipo complejo* o cariotipo monosómico
	<i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> ^{high}
	Mutación <i>RUNX1</i> **
Mutación <i>ASXL1</i> **	
Mutación <i>TP53</i>	

Tabla 8. Estratificación del riesgo según la ELN 2017. *FLT3-ITD*^{low}: Ratio calculado por métodos semicuantitativos de *FLT3-ITD/FLT3* wild type (*FLT3wt*) <0,5. *FLT3-ITD*^{high}: Ratio *FLT3-ITD/FLT3wt* igual o superior a 0,5. *Tres o mas alteraciones cromosómicas no relacionadas en ausencia de translocaciones o inversiones contempladas en la clasificación de la OMS. ** Estos marcadores no deben usarse como factores de mal pronóstico si ocurren en LMA de riesgo favorable.

Esta clasificación aporta nuevos cambios respecto a la ELN 2010, añadiendo valor a ciertas mutaciones o matizando el impacto de otras mutaciones en función de ciertas combinaciones. Si bien las distintas alteraciones genéticas de la clasificación están basadas en la literatura publicada hasta el momento, pocos estudios han validado esta clasificación de riesgo. Además, hasta el momento, estas validaciones han sido con series pequeñas, excluyendo algún grupo genético, y con protocolos de tratamiento poco homogéneos y bajas tasas de realización de aloTPH²²⁴⁻²²⁶.

2.3.2.1. ELN 2017 riesgo favorable

Dentro de esta categoría están las translocaciones afectando el CBF, las mutaciones de *NPM1* sin *FLT3-ITD* o con ratio bajo y las mutaciones bialélicas de *CEBPA*. Las mutaciones afectando el CBF ya estaban descritas previamente como patologías de buen pronóstico, con una alta tasa de respuestas y curación con altas dosis de quimioterapia^{217,218}. Las mutaciones con *NPM1* afectan un 40% de las LMA, y son

característicamente de buen pronóstico, incluso independientemente de si hay anomalías citogenéticas acompañantes^{227,228}. En este sentido, al contrario que en la clasificación ELN 2010, las mutaciones de *FLT3*-ITD son deletéreas concomitante a la presencia de *NPM1* solo si se encuentran en un ratio alélico alto, tal como se había descrito en publicaciones recientes a la ELN 2017²²³. Por último, tras la publicación de las guías ELN 2010 se observó que las mutaciones de *CEBPA* solo ofrecían un pronóstico favorable si estas eran bialélicas, por lo que se adecuó este criterio en la ELN 2017^{52,53}. Según las recomendaciones de la ELN 2017, estos pacientes se benefician de un tratamiento de inducción con quimioterapia convencional seguido de un tratamiento consolidación con quimioterapia con altas dosis de Ara-C, sin estar indicado un aloTPH si se adquiere una respuesta completa.

2.3.2.2. ELN 2017 riesgo intermedio

En este subgrupo se encuentran los pacientes con la mutación de *NPM1* y con *FLT3*-ITD^{high}, así como los pacientes sin mutación de *NPM1* con *FLT3*-ITD^{low}. La mutación de *NPM1* confiere buen pronóstico, pero un alto ratio de *FLT3*-ITD traduce un alto número de células tumorales con esta alteración, lo cual les confiere una ventaja proliferativa, siendo una leucemia con altas tasas de recaída, si se compara con una ratio de *FLT3*-ITD^{low}²²⁹. Por otro lado, la translocación t(9;11)(p21.3;q23.3) involucrando el gen *KMT2A* (*MLL*) y el gen *MLLT3* (*AF9*) es también considerada de pronóstico intermedio por su mejor pronóstico que las demás translocaciones que implican a *KMT2A*, algo que ya se contempla en la clasificación MRC y ELN 2010²³⁰. Por último, se incluye una categoría para agrupar todos los casos no clasificables, incluyendo los cariotipos normales sin mutaciones que sean definitorias de categorías de riesgo, así como las anomalías cariotípicas que no cumplen los criterios de ninguna categoría de riesgo. En estos pacientes, tras el tratamiento de inducción no hay un tratamiento establecido de consolidación, recomendando tras la inducción un aloTPH, quimioterapia de consolidación e incluso quimioterapia seguido de un autoTPH.

2.3.2.3. ELN 2017 riesgo adverso

El grupo adverso es quizás el grupo más biológicamente heterogéneo de los tres grupos de riesgo de la clasificación ELN 2017. Esto es así porque incluye distintas anomalías genéticas que implican la disregulación de vías celulares totalmente distintas, como por ejemplo los reordenamientos de *KMT2A* a la vez que las mutaciones de *TP53* o la translocación del gen *MECOM* (*EVI1*). A continuación, describimos brevemente la distintas entidades.

En primer lugar, las translocaciones de *KMT2A* son lesiones genéticas recurrentes en leucemia aguda, provocando un gen de fusión implicando esta metiltransferasa, lo que provoca una deregulación epigenética²³¹. Estas leucemias tienen mal pronóstico, con un alto índice de recaídas, algo que ya se tenía en cuenta en clasificaciones de riesgo anteriores. Asimismo, las mutaciones de *FLT3-ITD*^{high} sin la mutación de buen pronóstico *NPM1* se caracterizan por una elevada proliferación y agresividad, por lo que son consideradas de alto riesgo²³².

Las mutaciones de *RUNX1* y *ASXL1* aparecen como novedad dentro de las alteraciones de riesgo adverso. Esto es así debido a distintas publicaciones que implican la presencia de estas mutaciones, normalmente en pacientes con cariotipo normal, con un peor pronóstico^{46,88,89,233}. También, las mutaciones de *TP53* suponen un factor de riesgo, si bien muchas veces aparecen en el contexto de otras anomalías citogenéticas de mal pronóstico (alteraciones del cromosoma 5 o cariotipos complejos)^{234,235}. Estas alteraciones citogenéticas se han asociado a pobre respuesta a los tratamientos quimioterápicos debido a la alta inestabilidad genética y también se contemplaban como alteraciones de mal pronóstico en las clasificaciones anteriores MRC y ELN 2010.

También, las LMA con alteraciones implicando el reordenamiento y sobreexpresión del oncogén *MECOM* (localizado en el 3q26) son asociadas a un mal pronóstico con mala respuesta al tratamiento intensivo, hecho demostrado en varias series de pacientes^{236,237}.

Por último, las categorías de LMA con la t(6;9) implicando el gen de fusión *DEK::NUP214* y la t(9;22) con el gen de fusión *BCR::ABL1* son infrecuentes pero en estudios

retrospectivos se ha podido determinar un peor pronóstico de estas si no se realiza un aloTPH, por lo que se decidió admitirlas en la categoría de riesgo adverso²³⁷⁻²³⁹.

En todas estas entidades, aunque los mecanismos leucemogénicos son diversos, todas convergen en ser LMA de alto riesgo con un pronóstico malo a corto plazo, incluso con tratamientos quimioterápicos intensivos. Es por ello que las recomendaciones de la ELN 2017 recomiendan la realización de un aloTPH tras adquirir una respuesta completa en inducción, pues la inmunoterapia del trasplante puede suponer la única herramienta capaz de conseguir la curación en estos pacientes.

2.3.3. Clasificación y protocolo adaptado al riesgo CETLAM-12

El grupo cooperativo de estudio y tratamiento de las leucemias agudas y mielodisplasias (CETLAM) agrupa distintos hospitales españoles y tiene como misión el diseño de protocolos terapéuticos y de investigación para el tratamiento de estas hemopatías. En 2012 se inició el protocolo terapéutico CETLAM-12 para el tratamiento intensivo de pacientes adultos con LMA. Este protocolo estratifica los pacientes en tres categorías de riesgo, que se elaboraron modificando los criterios propuestos del grupo MRC y ELN 2010. De manera interesante, dados los resultados publicados por parte del grupo, del valor pronóstico de la ratio molecular de *FLT3*-ITD, este se utilizó como criterio pronóstico, de tal manera que los pacientes de riesgo favorable CETLAM-12 cumplen los mismos criterios que los pacientes de riesgo favorable de la ELN 2017, aun siendo un protocolo anterior a esta clasificación. Los pacientes que no cumplen criterios de buen pronóstico y tienen alteraciones citogenéticas adversas reconocidas por la clasificación MRC o ELN 2010 son considerados de alto riesgo, incluyendo los pacientes con *NPM1* y mutación *FLT3*-ITD^{high}.

A modo de resumen, el protocolo CETLAM-12 incluye un tratamiento de inducción basado en idarrubicina (12mg/m²/día los días 1 a 3) y citarabina (200mg/m²/día los días 1 a 7), con un priming con G-CSF (150mcg/m²/día del día 1 a 7). Tras lograr la RC, los pacientes de riesgo favorable son candidatos a 3 ciclos de HiDAC (3g/m² dos veces al día los días 1, 3 y 5; 1,5g/m² en pacientes mayores de 60 años) con un seguimiento

estrecho mediante métodos moleculares si la biología de la LMA lo permite. En el caso que se detecte una recaída o un aumento de la carga tumoral mediante técnicas moleculares, se recomienda la realización de un aloTPH. Para los pacientes de riesgo intermedio y bajo, tras la RC se recomienda la realización de un aloTPH, precedido de uno o dos ciclos de HiDAC (Figura 8). Desde 2017, tras la aprobación de Midostaurina para LMA con mutación de *FLT3*, se recomendó su adición en inducción y consolidaciones desde el día +8 al +21 en los pacientes con dicha mutación.

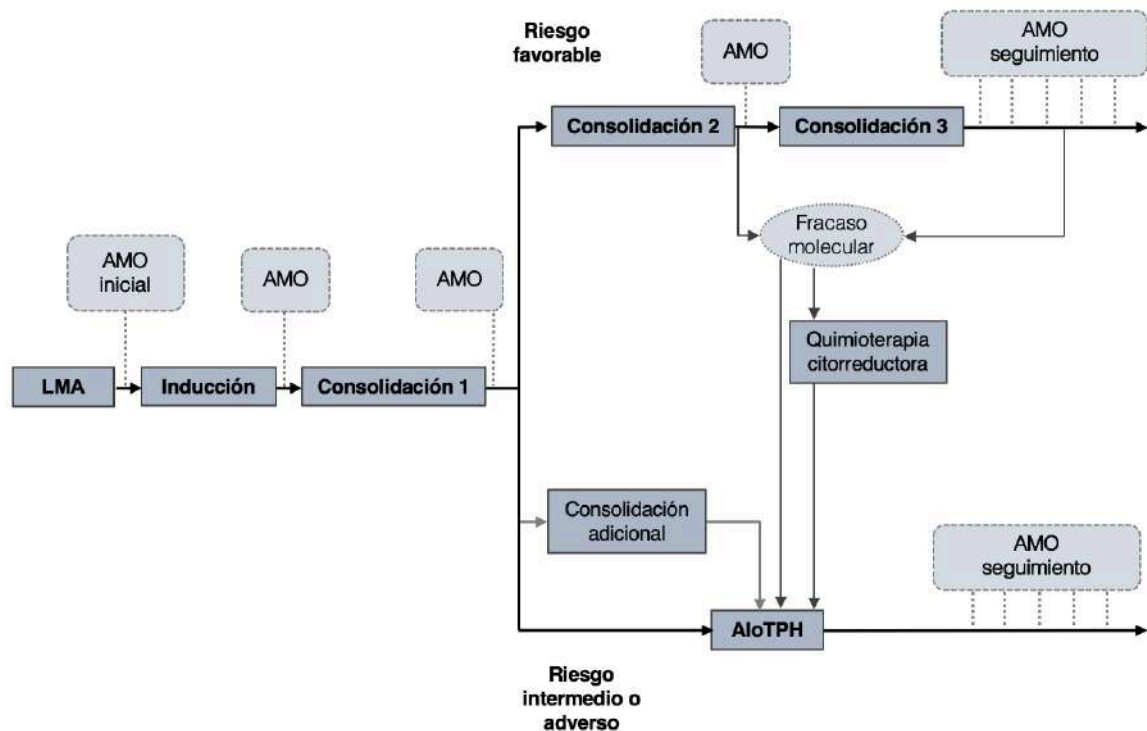


Figura 8. Esquema de tratamiento según el protocolo CETLAM-12. AMO: Aspirado de médula ósea. en ausencia de translocaciones o inversiones contempladas en la clasificación de la OMS.

2.4. Papel pronóstico de la enfermedad mínima/medible residual (EMR)

Además de asesorar el pronóstico de la LMA al diagnóstico, existe un parámetro cada vez más explorado que se constituye como un importante indicador pronóstico posterior al diagnóstico, este es la enfermedad medible residual (antes llamada enfermedad mínima residual; EMR). Se basa en la detección de la enfermedad mediante técnicas citométricas o moleculares en pacientes que cumplen criterios de remisión completa. Si

bien la remisión completa (RC) en LMA se establece como la presencia de <5% de blastos por conteo microscópico tras el tratamiento, hay pacientes en RC a los que se puede detectar enfermedad con métodos más sensibles, y esto tiene un poder pronóstico importante e independiente.

2.4.1. EMR por citometría de flujo multiparamétrica

Por métodos de citometría de flujo multiparamétrica (CF) se pueden detectar células con marcadores antigénicos seleccionados, con una sensibilidad de detección de 1 célula de LAM por 10^3 a 10^4 células estudiadas, pudiendo llegar hasta 10^5 . Se pueden emplear dos metodologías: seguimiento por inmunofenotipo asociado a leucemia (*leukemia-associated immunophenotype*; LAIP) o por marcadores aberrantemente expresados por la leucemia (*different from normal*; DfN), aunque según las recomendaciones, la técnica óptima es una combinación de estas dos, siempre que sea posible. La técnica de LAIP emplea marcadores como CD34, CD117, CD45, CD33, CD13 o HLA-DR, entre otros, para poder caracterizar correctamente las células de LMA. Gracias a esta técnica, se puede hacer el seguimiento de los pacientes con LMA para detectar recaídas precozmente. Aun así, presenta algunas limitaciones, la principal de la cual es la estandarización de la técnica, dado que la calidad y el procesamiento de la muestra es muy variable entre centros, además que la técnica requiere de una interpretación hecha por un facultativo experimentado. Por otro lado, también pueden ocurrir cambios fenotípicos en la recaída, por lo que estas células escaparían de la vigilancia de las técnicas de EMR. Actualmente varias iniciativas están intentando estandarizar esta técnica para detección de EMR en LMA, siendo una EMR de un 0.1% un punto de corte aceptable para determinar la positividad de la EMR. Así pues, la CF para la detección de EMR es una herramienta útil y asequible, aunque la interpretación de sus resultados debe hacerse con cautela, siendo preferibles las técnicas moleculares si son posibles.

2.4.2. EMR por técnicas moleculares

En el caso de las técnicas moleculares, a día de hoy existen dos métodos para la detección de MRD: por PCR y por *Next Generation Sequencing* (NGS). El primer método (PCR) es el más utilizado, y se basa en técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-

qPCR) para detectar y cuantificar las copias de un gen mutado de la LMA, que será un indicador de la presencia de EMR a nivel molecular. Esta técnica ha demostrado un gran potencial pronóstico de recaídas, con una sensibilidad de detección de 10^{-4} a 10^{-5} , por lo que las guías recomiendan su utilización para el seguimiento de los pacientes con LMA²⁴⁰. Además, el resultado cuantitativo permite analizar la cinética de la EMR pudiendo hacer predicciones de la probabilidad de recaída o de si se trata de un resultado residual. Desafortunadamente, solo un 40-60% de las LMA tienen marcadores validados para poder hacer esta qPCR (*NPM1*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1* y *PML::RARA*), por lo que las leucemias negativas para estas mutaciones no pueden beneficiarse de este seguimiento tan profundo de la enfermedad. Otras técnicas como la PCR digital están surgiendo como alternativas para los pacientes sin marcadores moleculares compatibles con qPCR.

Recientemente, con la introducción de las técnicas de paneles de NGS, se ha abierto la posibilidad de utilizar estas técnicas no solo en el diagnóstico si no también durante el seguimiento del paciente. La identificación de múltiples mutaciones por NGS durante el seguimiento de los pacientes con LMA ha resultado tener un impacto pronóstico importante, lo cual hace de esta una técnica atractiva. Aun así, hay varias consideraciones a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Primeramente, existen mutaciones que son frecuentes en situaciones de CHIP (las más frecuentes *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*), que tras el tratamiento pueden persistir, indicando la persistencia de la CHIP pero no necesariamente de la LMA. Por otro lado, los pacientes con mutaciones en línea germinal (en genes como *DDX41*, *ANKRD26* o *RUNX1*) no pueden ser seguidos dado que el resultado no es informativo al tener las mutaciones también en células sanas. También, hay genes detectables al diagnóstico que pueden desaparecer (y reaparecer) a lo largo del seguimiento de los pacientes (por ejemplo *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *PTPN11*, etc.), siendo un dato de evidencia de las dinámicas de aparición y desaparición de los distintos clones en una misma LMA. Así pues, estos genes por si solos no son un buen marcador de EMR y en caso de ser positivos, deben combinarse con la presencia de otras mutaciones para interpretar los resultados y tomar decisiones. Por último, esta técnica resulta costosa económicamente y su

implementación en los centros está siendo lenta debido a este hecho, por lo que su estandarización para la detección e interpretación de la EMR aun está por definir.

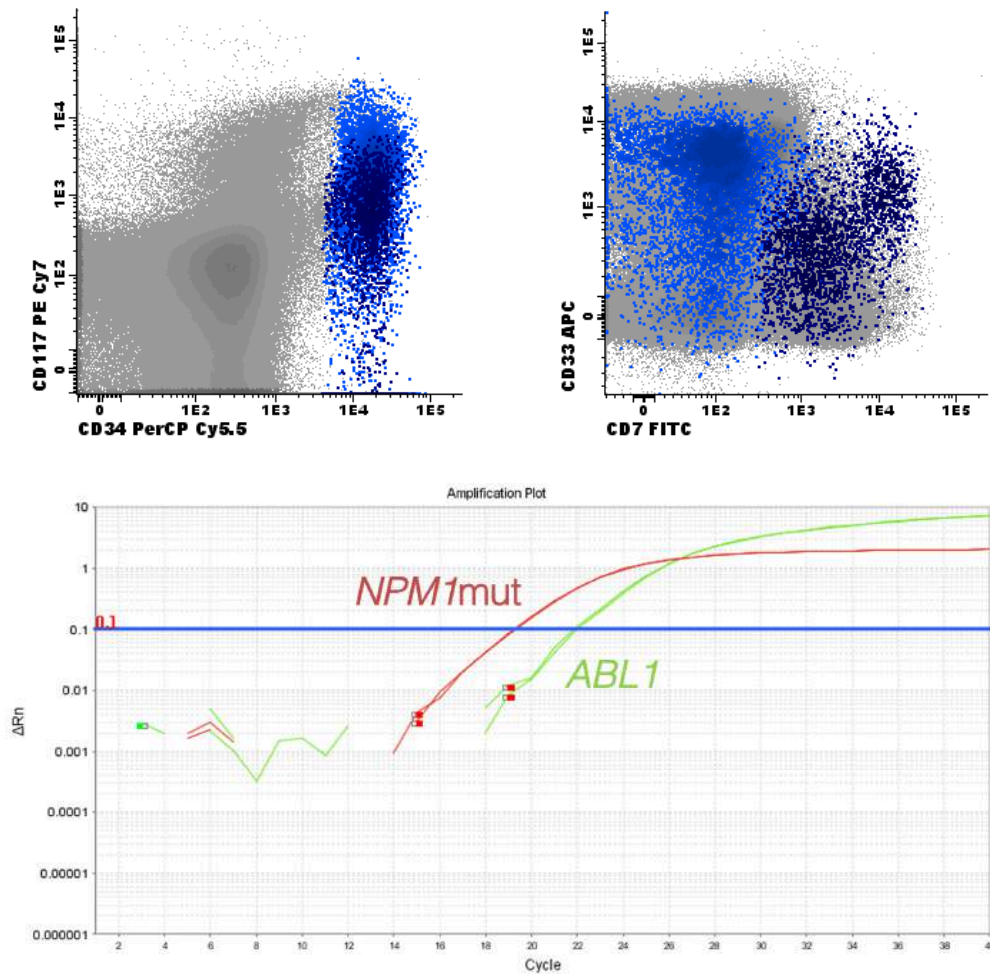


Figura 9. Ejemplos de seguimiento de EMR. Arriba, las células inmaduras (azul claro) y los blastos residuales (azul oscuro) comparten expresión de CD34 y CD117, pero con el CD7 se puede ver una expresión de los blastos pero no de las células inmaduras sanas. Abajo, ejemplo de gráfica de RT-qPCR para *NPM1* en donde la curva roja muestra la expansión de *NPM1* alrededor del ciclo de PCR 20, mientras que el gen control (*ABL1*) se expande hacia el ciclo 22. Con estos datos se puede calcular la ratio de copias de *NPM1* por *ABL1*. Figuras cortesía de la Dra. Francesca Guijarro y Mónica López-Guerra.

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

La clasificación de la ELN 2017 establece tres grupos de riesgo claramente definidos por características genéticas, si bien ha sido validada con series pequeñas de pacientes tratados con distintos protocolos terapéuticos. La validación de esta clasificación con un gran número de pacientes, dentro de un protocolo adaptado al riesgo (CETLAM 2012) que estratifica los pacientes de manera superponible a la ELN 2017, aportará una mayor evidencia sobre el pronóstico de estos pacientes en función de las características genéticas. Además, se podrán identificar subgrupos genéticos de especial alto riesgo que podrían suponer una propuesta de reclasificación para futuras clasificaciones de riesgo.

Por otro lado, en los pacientes de riesgo favorable de la ELN 2017 con mutación de *NPM1*, se ha demostrado el papel pronóstico de la cuantificación de copias de gen mutado *NPM1*, pero no el papel de una estrategia de tratamiento precoz en aquellos que presentan fracaso molecular (FM). Dado que el protocolo CETLAM-12 establece un tratamiento preventivo de la recaída en los pacientes con FM, probablemente esta estrategia aporte un beneficio en la supervivencia de estos pacientes.

2. Objetivos

Los objetivos del presente proyecto de tesis doctoral son:

- Identificar y seleccionar los pacientes tratados dentro del protocolo CETLAM-12 en los centros vinculados al grupo cooperativo CETLAM.
- Aplicar la clasificación ELN 2017 en función de los hallazgos genéticos al diagnóstico. Identificar, además, los pacientes con mutación de *NPM1* del grupo favorable de la ELN 2017.
- Establecer el pronóstico de los pacientes en función de la clasificación ELN 2017, con especial énfasis en identificar subgrupos moleculares que pudieran tener un especial peor pronóstico.
- Obtener los datos de la cuantificación por RT-qPCR de los transcritos de *NPM1* en médula ósea al diagnóstico y en las distintas reevaluaciones de los pacientes del grupo favorable de la ELN 2017.
- Analizar el pronóstico de estos pacientes con FM que han recibido una estrategia de tratamiento precoz para evitar la recaída.

Metodología

1. Pacientes a estudio

Se trata de un estudio observacional, retrospectivo y longitudinal de 820 pacientes diagnosticados de leucemia mieloide aguda (LMA) en alguno de los centros vinculados al grupo CETLAM, entre 18 y 75 años tratados de manera intensiva con el protocolo CETLAM-2012, desde 2012 hasta 2020. Todos los pacientes han sido informados y han firmado el correspondiente consentimiento informado para la inclusión en el protocolo terapéutico. El protocolo CETLAM-12 así como el estudio en cuestión tienen aprobación por parte del Comité de Ética de Investigación del Hospital Clínic de Barcelona, y están alineados con la Declaración de Helsinki.

2. Variables a estudio

Se han recogido las variables clínicas y datos de filiación de los pacientes:

- **Datos iniciales:** Fecha de nacimiento, sexo, fecha de diagnóstico, hospital de procedencia, comorbilidades previas, cifra de blastos al diagnóstico en sangre periférica, cifra de blastos al diagnóstico en médula ósea, hemoglobina, leucocitos totales, plaquetas.
- **Datos evolutivos:** Fecha inicio de inducción, fecha reevaluación inducción, fecha inicio consolidación 1, 2 y 3, fechas reevaluación consolidación 1, 2 y 3, fecha de trasplante alogénico/autólogo, tipo y fuente de donante de progenitores hematopoyéticos, tipo de acondicionamiento recibido, fecha de recaída, características de la recaída, tipo de tratamiento de rescate, supervivencia y fecha de última visita, causa de fallecimiento.
- **Datos de respuesta al tratamiento:** Para la respuesta al tratamiento en los distintos momentos del tiempo (tras inducción, consolidaciones, trasplante) se utilizarán los criterios propuestos por Cheson BD y colaboradores²⁴¹.

Para la estratificación del riesgo de los pacientes en función de la clasificación ELN 2017, se han recogido los siguientes datos biológicos a partir de las pruebas realizadas al diagnóstico:

- **Datos citológicos:** Clasificación morfológica según clasificación AML FAB.
- **Datos inmunofenotípicos:** Expresión de los marcadores MPO, CD13, CD33, CD117, CD15, CD16, CD11b, CD66, CD36, CD64, CD14, CD300e, CD35, CD203c, CD34, HLA-DR, CD41, CD42b, CD9, CD123, CD303, CD304.
- **Datos citogenéticos:** Cariotipo con bandas G, resultados de FISH.
- **Datos moleculares:**
 - **Mutaciones obtenidas por RT-qPCR:** *RUNX1::RUNX1*, *CBFb::MYH11*, *PML::RARA*, *NPM1*.
 - **Mutaciones obtenidas por Sanger:** *FLT3-TKD*, *IDH1*, *IDH2*.
 - **Mutaciones obtenidas por Next Generation Sequencing:** datos mutacionales de regiones *hotspot* y codificantes de genes incluidos en los paneles utilizados por los laboratorios del grupo CETLAM:
 - Ion Ampliseq™ AML Research Panel (ThermoFischer Scientific)
 - OncoPrint™ Myeloid Research Panel (ThermoFischer Scientific)
 - HaloPlex^{HS} Custom Panel (Agilent Technologies)
 - SOPHiA Myeloid Solution™ (SOPHiA)

Para el análisis del subgrupo de pacientes de riesgo favorable de la ELN 2017, además de los datos previamente recogidos, también se han obtenido específicamente los siguientes datos:

- Copias del gen *NPM1* mutado al diagnóstico en médula ósea, obtenidas a partir de cDNA mediante técnicas de RT-qPCR.
- Copias del gen *ABL1* al diagnóstico en médula ósea, obtenidas a partir de cDNA mediante técnicas de RT-qPCR.
- Copias de *NPM1* y *ABL1* en médula ósea en las distintas reevaluaciones de la enfermedad (durante el tratamiento, después del tratamiento, en la recaída, antes del aloTPH, después del aloTPH).

- En caso de recaída de la enfermedad, se recogerán nuevamente los datos biológicos disponibles de la enfermedad (citología, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular).

3. Análisis estadístico

Todos los datos especificados anteriormente han sido recogidos en la base de datos del grupo CETLAM 2012. La información ha sido exportada para su procesamiento mediante el programa R statistics (R core Team, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Las características clínico-biológicas comparativas entre los grupos de la ELN 2017 se han comparado mediante el test de la χ^2 para variables categóricas y la t-Student y U de Mann-Whitney para variables continuas con distribución normal y no normal, respectivamente. Los análisis de supervivencia se han estimado mediante el método de Kaplan-Meier y las comparaciones se han realizado mediante el log-rank test. Los cálculos de incidencia acumulada se han realizado mediante el uso de eventos competitivos (muerte o recaída) y la comparación se ha realizado con el test de Gray. Para determinar puntos de corte de variables cuantitativas como predictores de respuestas tiempo-dependientes (supervivencia), se han realizado curvas ROC tiempo-dependientes y el test estadístico de selección de rango máximo. Se han llevado a cabo análisis uni y multivariados (regresión logística y regresión de Cox para riesgos proporcionales) para determinar el impacto pronóstico de distintas variables estudiadas.

Resultados

1. Primer artículo

*Acute myeloid leukemia with NPM1
mutation and favorable European
LeukemiaNet category: outcome after
preemptive intervention based on
measurable residual disease*

Alex Bataller, Guadalupe Oñate, Marina Díaz-Beyá, Francesca Guijarro, Ana Garrido, Susana Vives, Mar Tormo, Montserrat Arnan, Olga Salameo, Antònia Sampol, Rosa Coll, Ferran Vall-Llovera, Aina Oliver-Caldés, Mònica López-Guerra, Marta Pratcorona, Lurdes Zamora, Eva Villamon, Gaël Roué, Adoración Blanco, Josep F. Nomdedeu, Dolors Colomer, Salut Brunet, Jorge Sierra and Jordi Esteve, on behalf of the Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM)

British Journal of Haematology. 2020, 191(1): 52-61

2020 Impact Factor: 6.998
Quartile 1 (Hematology)




1.1. Resumen del primer artículo

En los pacientes con LMA clasificados en la categoría de riesgo favorable de la ELN 2017, el aloTPH no está indicado en los pacientes en primera respuesta completa. Sin embargo, una proporción importante de estos pacientes con mutación de *NPM1* presentarán una recaída, lo que supone un evento deletéreo para la supervivencia. Dada la reciente importancia en el pronóstico de las técnicas moleculares de EMR, el protocolo CETLAM-12 estableció un seguimiento de la EMR así como una innovadora estrategia de tratamiento preventivo en los pacientes que presentaran un fracaso molecular (fracaso en obtener una respuesta molecular o reaparición confirmada de EMR tras una respuesta molecular). Se analizaron 110 pacientes que habían alcanzado RC tras la inducción, incluidos en el protocolo CETLAM-12 con mutación de *NPM1* y clasificados según la ELN 2017 como favorables. Se analizó la supervivencia de estos pacientes, con una SG, SLE y IAR a los dos años de 81,5%, 82% y 17%, respectivamente. Tras un seguimiento medio de 24 meses, 46 pacientes requirieron un tratamiento adicional tras la consolidación por detección de FM (n=33) o recaída hematológica (HemR; n=13), suponiendo a los dos años una supervivencia libre de recaída (molecular o hematológica) de 61% y una IAR (molecular o hematológica) de 38%. En estos pacientes que presentaron FM o HemR, la SG a los dos años fué de 66%, con una diferencia en el pronóstico en los pacientes tratados en FM (SG de 86%) en comparación con aquellos tratados en HemR (SG de 42%; p = 0.002). Además, la detección y cuantificación por RT-qPCR de los transcritos de la mutación *NPM1* en las diferentes evaluaciones en médula ósea resultó predictivo para la SLE molecular. Concretamente, un punto de corte de 0,05 en el ratio de enfermedad molecular (*NPM1* mut/*ABL1* × 100) tras la primera consolidación discrimina a dos grupos con una molSLE a los 2 años claramente distinta (77% vs 40% para pacientes por debajo y por encima de 0,05, respectivamente, p < 0.0001). En conclusión, la estrategia de tratamiento preventivo resultó ser una estrategia con un buen pronóstico asociado, y el seguimiento de la EMR permite predecir los pacientes a riesgo de presentar FM o HemR.

1.2. Artículo

bjh research paper

Acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation and favorable European LeukemiaNet category: outcome after preemptive intervention based on measurable residual disease

Alex Bataller,¹  Guadalupe Oñate,² Marina Diaz-Beyá,¹  Francesca Guijarro,¹ Ana Garrido,² Susana Vives,³ Mar Tormo,⁴ Montserrat Arnan,⁵ Olga Salameo,⁶  Antònia Sampol,⁷ Rosa Coll,⁸ Ferran Vall-Llovera,⁹ Aina Oliver-Caldés,¹  Mònica López-Guerra,¹⁰ Marta Pratorcorona,² Lurdes Zamora,³ Eva Villamon,⁴ Gaël Roué,⁶ Adoración Blanco,⁶ Josep F. Nomdedeu,² Dolores Colomer,¹⁰ Salut Brunet,² Jorge Sierra,² Jordi Esteve¹ and Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM)

¹Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, University of Barcelona, ²Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB, ³Hematology Department, ICO – Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, ⁴Hematology Department, Hospital Clínic Universitario de Valencia, Valencia, ⁵Hematology Department, ICO – Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, ⁶Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, ⁷Hematology Department, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, ⁸Hematology Department, ICO – Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Girona, ⁹Hematology Department, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, and ¹⁰Hematopathology Section, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERONC, UB, Barcelona, Spain

Received 10 March 2020; accepted for publication 18 May 2020

Correspondence: Jordi Esteve, Hematology Department, Hospital Clínic of Barcelona, Barcelona, Spain.
E-mail: jesteve@clinic.cat

Summary

In the European LeukemiaNet favourable risk category, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) is not indicated in first complete remission for patients with acute myeloid leukaemia (AML) with *NPM1* mutations (ELNfav *NPM1* AML), although a proportion of these patients will relapse. Given the prognostic importance of measurable residual disease (MRD), CETLAM-12 considered a pre-emptive intervention in patients with molecular failure (MF). We analyzed 110 ELNfav *NPM1* AML patients achieving complete remission (CR) after induction chemotherapy. Two-year cumulative incidence of relapse (CIR), overall survival (OS) and leukaemia-free survival (LFS) were 17%, 81.5% and 82%, respectively. Forty-six patients required additional therapy for MF ($n = 33$) or haematological relapse (HemR; $n = 13$), resulting in a molecular LFS (molLFS) and a cumulative incidence of MF at two years of 61% and 38% respectively. Two-year OS for these 46 patients was 66%, with a different outcome between patients with MF (86%) and HemR (42%) ($P = 0.002$). Quantitative *NPM1* detection at different timepoints was predictive of molLFS; an MRD ratio ($NPM1mut/ABL1 \times 100$) cut-off of 0.05 after first consolidation identified two cohorts with a two-year molLFS of 77% and 40% for patients below and above 0.05, respectively. In conclusion, MRD-based pre-emptive intervention resulted in a favourable outcome for ELNfav *NPM1* AML patients.

Keywords: acute myeloid leukaemia, molecular analysis, stem cell transplantation, leukaemia.

The prognosis of patients diagnosed with acute myeloid leukaemia (AML) is related to their recurrent cytogenetic abnormalities and gene mutations.^{1–3} These genetic features help guide treatment choice, including allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) after the first complete remission (CR1) among eligible patients.^{4,5}

A mutation in nucleophosmin 1 (*NPM1*) is present in approximately 25–30% of all primary AML patients and in 50–60% of those with normal karyotype.^{1,2,6} The prognosis of AML patients harbouring an *NPM1* mutation (*NPM1mut* AML) is favourable when a FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication (*FLT3-ITD*) is absent or is present with a low allelic ratio (*FLT3-ITD/FLT3wt* < 0.5, *FLT3-ITD_{LOW}*).³ These patients are included in the European LeukemiaNet (ELN) favourable genetic risk category (ELNfav).^{3,7,8} For these ELNfav *NPM1mut* AML patients, no benefit for alloSCT in CR1 has been demonstrated,^{8,9} although a proportion of these patients will relapse and require salvage therapy. Their outcome after relapse is unfavourable and only 50% of patients achieve a long-standing response.¹⁰

Monitoring of *NPM1* mutation-based minimal/measurable residual disease (MRD) can be used to predict relapse and shorter survival.^{11–17} In acute promyelocytic leukaemia, a pre-emptive intervention in molecular relapse led to improved outcomes,^{18,19} suggesting that periodic assessment of MRD with a quantitative polymerase chain reaction (PCR) could also identify *NPM1mut* AML patients with a high risk of relapse. However, to date there is no proven benefit for pre-emptive intervention in *NPM1mut* AML patients with molecular failure (MF) before they present morphologic haematological recurrence (HemR).

In its CETLAM 2012 protocol, the Spanish AML cooperative group CETLAM (Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias) included a postremission strategy without alloSCT consolidation in CR1 for ELNfav *NPM1mut* AML patients with an adequate MRD clearance. This strategy required periodic monitoring of *NPM1*-based MRD and proposed early therapeutic intervention in patients not achieving a sustained MRD clearance, with the aim of preventing HemR. Here we present the results of this prospective management of ELNfav *NPM1mut* AML patients, with a specific analysis of salvage strategies, subsequent outcome, and risk factors for MF.

Patients and methods

Patients and treatment

Patients diagnosed with *de novo* AML assigned to the ELNfav risk category and harbouring an *NPM1* mutation without unfavourable cytogenetics according to the revised UK Medical Research Council (MRC) classification²⁰ were included in the study. All patients were treated according to the CETLAM-12 protocol from March 2012 to December 2018. From 2017 on, six patients with a *FLT3* mutation (*FLT3-*

TKD [tyrosine kinase domain], $n = 5$, *FLT3-ITD*, $n = 1$) received midostaurin during induction and consolidation chemotherapy within an early access programme (CPKC412A24071). Detailed information on the treatment received is available in Data S1–S7. Postremission therapy consisted of three courses of high-dose cytarabine (HDAC), with a decisive MRD determination at the end of therapy. For patients with confirmed MF or overt HemR, alloSCT was indicated, without a predefined guideline for specific pretransplant salvage chemotherapy.

The CETLAM-12 protocol was approved by the Spanish Medication Agency (Agencia Española del Medicamento) as a postapproval study (EPA-OD, JSG-SMD-2014-01). All patients provided their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and all experiments were approved by the Ethics Committee.

NPM1-based assessment of MRD

MRD was determined in samples obtained from bone marrow. Quantitative assessment of mutated *NPM1* was performed from RNA extracted using reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR),²¹ in six different reference laboratories of the CETLAM group. MRD was evaluated after each chemotherapy course and thereafter at three-month intervals for at least three years after CR. MF was defined as failure to achieve a molecular response after consolidation therapy (*NPM1mut/ABL1* × 100 ratio >0.05) or confirmed MRD reappearance after molecular response. All MFs were confirmed in a second sample, obtained 2–4 weeks after the first positive MRD assessment. To confirm a MF, an increase in MRD load was required, although a pre-established MRD increase threshold was not defined. After MF confirmation, alloSCT was indicated. The decision whether or not to administer bridge chemotherapy prior to alloSCT was individualized in each patient, without an established protocol for this particular point. HemR was defined as the presence of an overt morphologic relapse in bone marrow, peripheral blood, and/or an extramedullary site.

Statistical methods

Characteristics between groups were compared using the chi-square test for categorical variables and with the Student's *t*-test and Mann–Whitney *U*-test for continuous variables with normal and non-normal distribution, respectively. Overall survival (OS) was calculated from diagnosis to death. Leukaemia-free survival (LFS) was calculated from CR to death or relapse. Molecular LFS (molLFS) was calculated from CR to MF, HemR or death. Risk of relapse from CR to HemR was estimated by the cumulative incidence estimator, with non-relapse-related death as a competitive risk. OS, LFS, and molLFS were estimated with the Kaplan–Meier method. MRD ratio cut-offs were selected using maximally selected rank statistics. Univariate and multivariate analyses

A. Bataller *et al.*

were performed using the Cox model. Clinically relevant variables as well as variables with a $P < 0.1$ in the univariate analysis were included in the multivariate analysis. Statistical analyses were performed with SPSS software version 25 (IBM, Armonk, NY, USA) and R statistics version 3.6.3 (R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Patient characteristics

In all, 157 ELNfav *NPM1*mut AML patients were included in the CETLAM-12 protocol. Among patients achieving CR, 110 were selected for inclusion in the study, based on the availability of molecular data. The main characteristics of these patients are summarized in Table I, being similar to those of the entire ELNfav *NPM1*mut AML cohort.

Outcome of the ELNfav *NPM1*mut AML cohort

Among all 157 patients with ELNfav *NPM1*mut AML, 143 (91%) achieved CR after one ($n = 136$) or two ($n = 7$) courses of chemotherapy. After a median follow-up of 24 months, two-year OS and LFS of the entire cohort were 81.5% (± 3.3) and 81.8% (± 3.4), respectively. The two-year cumulative incidence of relapse (CIR) was 17.3% (± 3.2). Among the 110 patients included in the study, 46 developed MF ($n = 33$) or HemR without prior MF ($n = 13$), resulting in a molLFS at two years of 60.9% (± 4.8). Among these 46 patients, six progressed during the consolidation period (1 MF; 5 HemR), ten did not achieve an adequate MRD clearance after consolidation, and 30 relapsed after having achieved a molecular response (22 MF; 8 HemR). MF occurred at a median of 6.9 months (range: 2.3–29), after CR, whereas HemR with no prior MF occurred at a median of 7.5 months (range: 1.4–25) after CR. Among patients not presenting MF or HemR ($n = 64$), the two-year OS was 91.3% (± 2.6).

Salvage therapy after MF or HemR

After confirmation of MF or HemR, treatment was at the discretion of the attending physician, although alloSCT was recommended after a second CR (CR2) (Fig 1).

Among the 33 patients with MF, ten received high-dose cytarabine-based chemotherapy [fludarabine, cytarabine, idarubicin and G-CSF (FLAG-IDA), $n = 9$; HDAC, $n = 1$] and two received azacytidine, with a median time from MF to start of chemotherapy of 45 days (range: 23–558). Eight of the ten patients treated with chemotherapy achieved an MRD-negative response, whereas the two patients receiving azacytidine progressed to HemR; one later achieved a CR2 with HDAC. Thirteen patients, who harboured a median pretransplant *NPM1/ABL1* $\times 100$ ratio of 9.3 (range: 0.06–54), proceeded directly to alloSCT without salvage

Table I. Characteristics of *NPM1*mut acute myeloid leukaemia patients at diagnosis and induction.

Characteristics	No. of patients (%)
No. of patients	110 (100%)
Age, years	
Median	54
Range	18–71
Sex	
Male	52 (47%)
Female	58 (53%)
Cytogenetics	
Normal karyotype	92 (84%)
Abnormal karyotype	13 (12%)
Not available	5 (4%)
Bone marrow blasts at diagnosis, %	
Median	68
Range	17–99
Leukocyte count at diagnosis, %	
Median	15.94
Range	0.5–288.9
<i>FLT3</i> -ITD status	
<i>FLT3</i> -ITDHIGH	0 (0%)
<i>FLT3</i> -ITDLOW	20 (18%)
<i>FLT3</i> -ITD negative	90 (82%)
<i>FLT3</i> -TKD status*	
<i>FLT3</i> -TKD mutated	6 (5%)
<i>FLT3</i> -TKD wild-type	19 (17%)
<i>DNMT3A</i> status†	
<i>DNMT3A</i> mutated	37 (34%)
<i>DNMT3A</i> wild-type	44 (40%)
<i>NPM1</i> ratio (<i>NPM1/ABL1</i> $\times 100$) at diagnosis	
Median	1111.84
Range	7.57–12312.72
No. of cycles to achieve CR	
1 course	105 (96%)
2 courses	5 (4%)

ITD, internal tandem duplication; TKD, tyrosine kinase domain CR, complete remission.

*Available in 25 patients.

†Available in 81 patients.

chemotherapy, with a median time from MF to alloSCT of 71 days (range: 26–213). Eight patients progressed to HemR before starting salvage therapy [median time of progression from MF: 90 days (range: 25–176)]. In addition, five patients with persistent ($n = 4$) or intermittent ($n = 1$) MRD after consolidation therapy, with a median *NPM1/ABL1* $\times 100$ ratio of 0.17 (range: 0.06–0.6) were closely monitored and showed a decrease of MRD until complete clearance within six months. These five patients did not receive further therapy and were not classified as MF. Overall, 23 of the 33 patients (69.7%) with MF received pre-emptive alloSCT (MRD-negative, $n = 8$; MRD-positive, $n = 15$).

Twenty-one patients developed HemR, 13 with no prior MF and eight who progressed from MF before starting salvage therapy. Among patients presenting HemR without

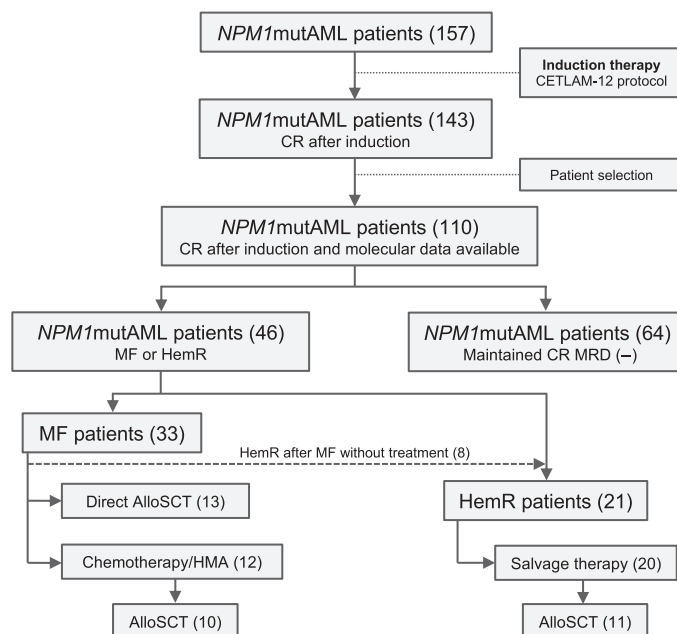


Fig 1. CONSORT diagram describing patient disposition through the study. AML, acute myeloid leukaemia; CR, complete remission; MRD, measurable residual disease; alloSCT, allogeneic haematopoietic stem cell transplantation; HMA, hypomethylating agents.

prior MF, the median number of MRD assessments with an *NPM1* ratio below 0.05 was 1 (range 0–7) (Data S6). Regarding the patients that presented HemR without previous MF after having achieved CR, the median time elapsed from this most recent MRD assessment was 3.3 months (range: 2–4.2). Twelve patients received FLAG-IDA, three HDAC with methotrexate, two hypomethylating agents, and one FLUGA (fludarabine, standard-dose cytarabine), while two were enrolled in clinical trials. The remaining patient died before salvage therapy. Thirteen patients achieved CR2 (65%) after one ($n = 10$) or two ($n = 3$) courses of chemotherapy, but only six (30%) acquired an MRD-negative status. Eleven patients (52%) underwent alloSCT.

Long-term follow-up after MF or HemR

For patients with MF and/or an overt HemR, two-year OS was 66.4% (± 7.5). Nonetheless, two-year OS was different between the 25 patients with MF [85.7% (± 7.8)] and the 21 with HemR [42.0% (± 11.7)] at the time of salvage therapy ($P = 0.001$) (Fig 2). Thirty-four patients received an alloSCT, with a two-year cumulative incidence of relapse and non-relapse mortality of 13.3% (± 6.4) and 14.4 (± 6.8), respectively. At three months after alloSCT, the number of patients available at that time ($n = 27$) with *NPM1* ratio <0.05 was 22 (81%) (Data S6c).

Among the 23 patients with MF who received an alloSCT, three relapsed and one had a significant MRD increase. These three patients were treated (one with FLAG-IDA, one with donor lymphocyte infusion plus FLAG-IDA and one with immunosuppression withdrawal) but eventually died, two of treatment-related causes and one of progressive disease. The remaining patient presenting MRD increase could be successfully treated with immunosuppression withdrawal. There was no difference in two-year OS between the ten patients treated with chemotherapy followed by alloSCT and the 13 treated directly with alloSCT [81.5% (± 11.9) and 90% (± 9.5), respectively] ($P = 0.126$).

Among the 21 patients with HemR, ten died, six during initial salvage chemotherapy (four due to progressive disease and two due to treatment-related mortality) and four after alloSCT (one relapse-related case that could not be treated and three non-relapse-related deaths). One additional patient presented an extramedullary relapse after alloSCT and was successfully treated with immunochemotherapy (cytarabine with mitoxantrone and gemtuzumab ozogamicin) and donor lymphocyte infusion.

Predictive factors for MF and HemR

In the univariate analysis no significant difference was found between patients with a sustained molecular CR and patients

A. Bataller et al.

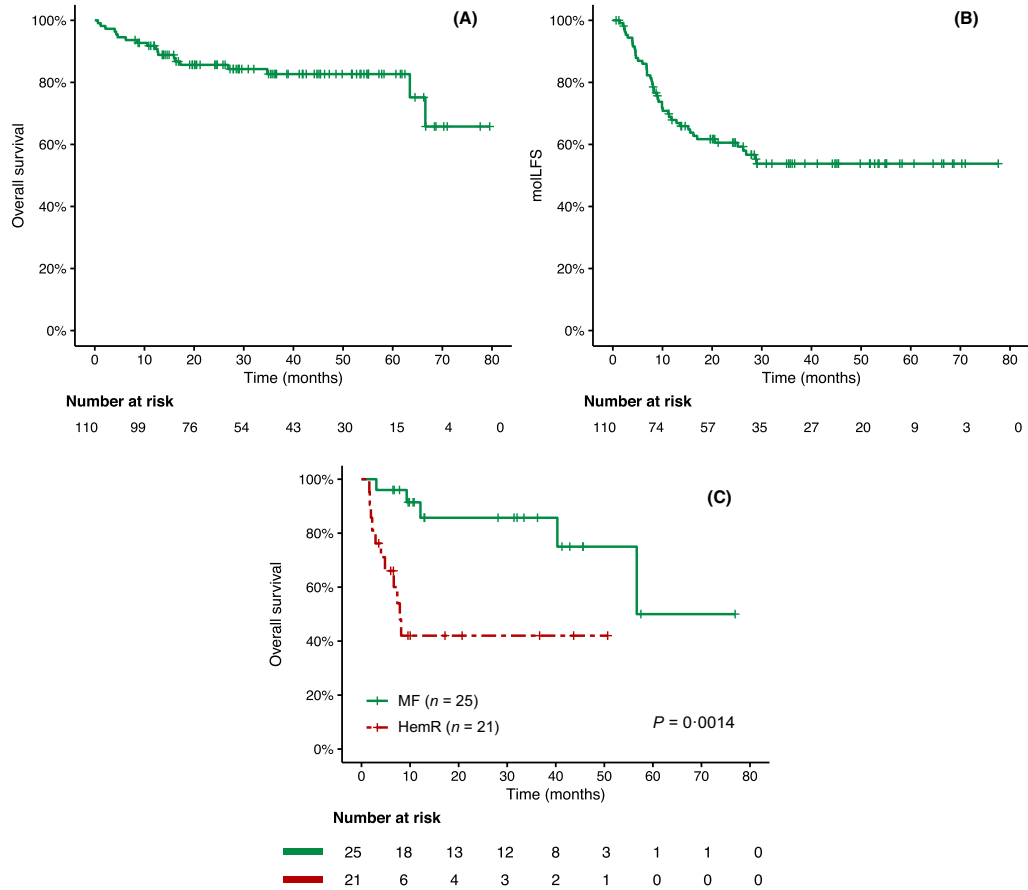


Fig 2. Overall survival (A), and molecular leukaemia-free survival (molLFS) (B) of 110 patients included in the study. Overall survival (C) of patients who presented either molecular failure (MF) or haematological relapse (HemR), calculated from the time of last event (MF or HemR) before therapy initiation. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

with MF or HemR in terms of sex, age, cytogenetic aberrations, *NPM1* initial burden or *FLT3-ITD*_{LOW} status. However, a higher leukocyte count was associated with a lower molLFS. MRD kinetics at different timepoints during treatment were highly predictive of molLFS. Thus, a higher *NPM1*mut/*ABL1* ratio after induction, first, and second consolidation was associated with worse molLFS using different disease burden cut-offs. The *NPM1*mut/*ABL1* ratios of 1.0, 0.05 and 0.01 after induction, first, and second consolidation, respectively, were able to segregate two groups of patients with different molLFS. For patients with a ratio <0.05 after first consolidation, two-year molLFS was 77% (± 6.8), two-year CIR was 10% (± 4.8), and two-year OS was 95.2% (± 3.3), compared to 40% (± 7.3) ($P < 0.001$), 25% (± 4.8) ($P = 0.01$), and 82.7% (± 6) ($P = 0.02$) for those with a ratio ≥ 0.05 (Figs 3 and 4).

The multivariate analysis confirmed the independent prognostic value of these cut-offs at different timepoints (Table II).

Discussion

In this study, we have evaluated the management of ELNfav *NPM1* AML patients according to the CETLAM-2012 protocol, which established a pre-emptive intervention for patients presenting MF. The outcome of this strategy was remarkably favourable, with a two-year OS of approximately 80% and a risk of overt relapse of <20% at two years. Nonetheless, approximately 40% of our patients failed to achieve a sustained molecular remission. However, early intervention before HemR resulted in an OS of >80% at two years, compared to approximately 40% in patients treated at the time

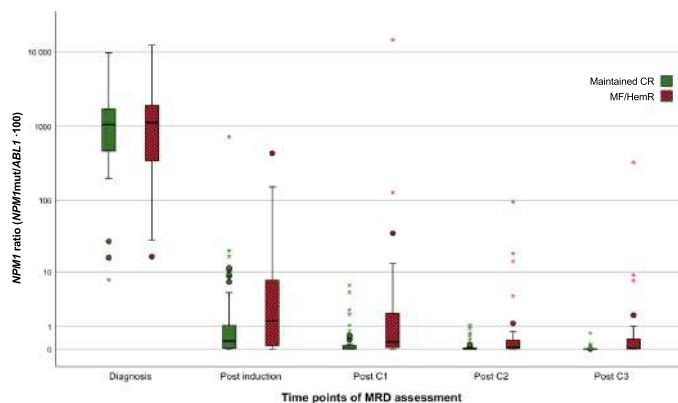


Fig 3. Box plot diagram representing the distribution of *NPM1mut/ABL1* ratios at different timepoints for patients who maintained complete remission (CR) and those who presented molecular failure (MF) or overt haematological relapse (HemR). Points and asterisks represent outliers and extreme outliers, respectively. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

of morphologic relapse. Our results suggest a potential benefit of a pre-emptive intervention in patients with MRD indicating that early anticipation of impending MF might result in an improved overall outcome. However, a subgroup of patients who present with a rapid HemR, not anticipated by previous MF and probably harbouring a highly proliferative disease, constitutes a caveat of our current protocol based on MRD surveillance to prevent overt relapse. We have found that the MRD kinetics during frontline chemotherapy identified different threshold values able to distinguish subgroups of patients with a diverse risk of MF. This leads us to recommend the implementation of prompt experimental or intensified therapy during frontline treatment in high-risk patients identified by this analysis of MRD kinetics.

Prior studies have shown the value of the *NPM1* mutation as a good marker for MRD monitoring, based on its high stability at relapse.^{22–24} Moreover, several studies have demonstrated a correlation of persistence or reappearance of the *NPM1* mutation with unfavourable outcome.^{11–16,25} The largest study showed a correlation between persistence of *NPM1* mutations after the second course of chemotherapy and the risk of relapse, leading to a higher CIR and shorter LFS and OS. The prognostic value of *NPM1*-based MRD was independent of other prognostic features, and could be confirmed at different timepoints.¹¹ Nonetheless, this study did not establish a pre-emptive intervention in patients with an inadequate MRD clearance. In contrast, in our protocol, we hypothesized that an early therapeutic intervention in patients developing MF could prevent HemR and improve outcome. Accordingly, we recommended alloSCT in CR1 in patients who developed a confirmed MF despite having been initially allocated to the favourable arm. Overall, the CIR after CR1 was 17.3% in our entire cohort, which compares favourably with analogous cohorts from other groups, where the CIR was greater than 30%.^{11,14,25} The benefit of this

policy is also evident when we compare two-year OS between patients treated for MF (85%) and those with HemR (39%).

More than two-thirds of patients (34 of 46) with a confirmed MF or HemR received alloSCT as part of their salvage therapy. However, 13 patients had HemR without a prior confirmed MF. The failure of *NPM1* MRD monitoring to anticipate a HemR may be more likely due to the emergence of a highly proliferative leukaemic population, not detectable at prefixed MRD intervals, or to a relapse with *NPM1mut* loss, which occurs in approximately 10% of patients.^{22,23} This subset of patients, with a steep MRD kinetics, might harbour an intrinsically chemoresistant leukaemic population with a rapid cell turnover, and contribute, in part, to the poor prognosis observed in patients treated for a HemR. Eight patients with MF did not receive the planned early intervention, revealing a significant fraction of patients who, for different reasons, cannot follow predefined intervention protocols. Overall, relapses not predicted by MRD monitoring and lack of protocol compliance led to patients being treated at HemR rather than at MF. These patients had a higher disease burden and worse outcome, indicating a weakness in our protocol and representing a challenge for future improvement.

To date, there is no consensus on the specific cut-off that can determine MF. In our study, we established the cut-off for MF at 0.05, based on the sensitivity of our detection method as well as on previous reports.^{15,21} We recommend that all cases of MF should be confirmed in a second sample after at least 2–4 weeks. This is in line with recommendations established in a consensus European LeukemiaNet document on MRD.¹⁶ The need to confirm increasing MRD kinetics is illustrated by our experience with five patients who, despite having a positive MRD determination, presented a delayed clearance during close surveillance.

Our protocol was designed to rescue alloSCT patients who developed MF after frontline chemotherapy. Of 23 patients

A. Bataller *et al.*

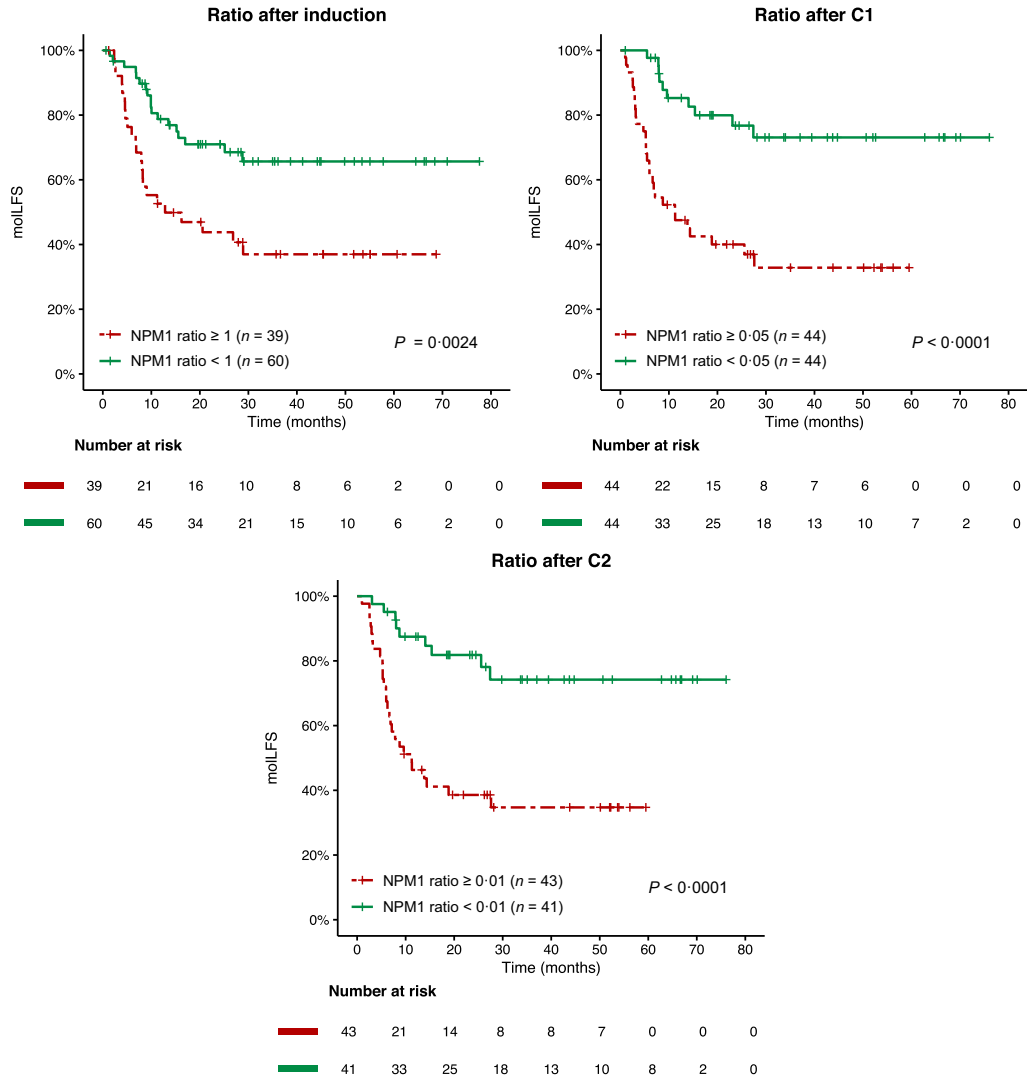


Fig 4. Molecular leukaemia-free survival (molLFS) according to *NPM1* ratio (*NPM1/ABL1*-100) at different timepoints. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

receiving alloSCT for MF, only three relapsed after alloSCT, indicating the capability of donor alloreactive cells to provide a sustained response in *NPM1*mut AML patients with a low disease burden. These favourable results among patients with detectable MRD at the time of alloSCT contrast with the poor outcome observed in the cohort of patients with multi-parameter flow cytometry-detectable MRD transplanted at Fred Hutchinson Cancer Research Center (FHCR), who had a three-year relapse risk of 67%.²⁶ This difference in outcome

might depend on differences in the proliferative kinetics of disease and disease burden captured by the different methods used. Most MRD-detectable patients from the FHCR series harboured an MRD level surpassing 0.1%. In this regard, a recent study confirmed the determinant effect of MRD level pretransplant on subsequent outcome in *NPM1*mut AML, together with the coexistence of *FLT3*-ITD mutation and *ex vivo* T-cell depletion among patients with persistent MRD before alloSCT.²⁷ Regarding the interesting risk classification

Table II. Univariate and multivariate analysis of the risk of molecular failure and/or haematological relapse.

Variable	n	Univariate			Multivariate		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age*	110	1.01	0.98–1.03	0.526	1.01	0.98–1.04	0.578
Sex (male)	110	0.63	0.35–1.13	0.120	0.60	0.30–1.21	0.152
Low leukocyte count†	109	0.5	0.27–0.92	0.024	0.67	0.34–1.43	0.325
Normal karyotype	105	0.61	0.27–1.37	0.227	–	–	–
FLT3-ITD _{LOW}	110	0.85	0.38–1.89	0.667	0.59	0.24–1.48	0.250
NPM1 ratio* <0.05 post C1	86	0.23	0.11–0.48	<0.001	0.22	0.10–0.48	<0.001

HR, hazard ratio; CI confidence interval.

*Continuous variable.

†Below the median leukocyte count \times NPM1/ABL1 \times 100.

proposed by Dillon et al., we applied this risk stratification to our cohort of patients who received an alloSCT, without finding outcome difference between high- and low-risk patients. This apparent discrepancy between both studies could be explained, in part, by differences between the patient populations included in both studies. Thus, patients in Dillon's study represent a higher risk population, with high-allelic ratio FLT3-ITD and high-risk UK National Cancer Research Institute (NCRI) risk score. Furthermore, differences in T-cell depletion methods used in both studies, with a high proportion of patients receiving T-cell deletion with alemtuzumab in the NCRI study, might impact on transplant outcome. Finally, lower sample size and shorter follow-up in our study may preclude finding of outcome differences based on this pre-transplant risk score. All these causes might account for the lack of predictive value of Dillon's score in our patient cohort.

The CETLAM-12 protocol did not establish chemotherapy prior to alloSCT and the decision to administer pretransplantation chemotherapy was at the discretion of the physician. Comparison of the outcome between patients receiving pre-transplant chemotherapy ($n = 10$) and those proceeding directly to alloSCT ($n = 13$) did not disclose significant differences. Additionally, administering pretransplant chemotherapy might lead to a bias, such as a rapid increase in MRD kinetics or lack of immediately available donor. Our protocol was not designed to compare these strategies and therefore, we cannot recommend either of these approaches based on our results. However, the role of alternative options like targeted agents, such as FLT3 and isocitrate dehydrogenase (IDH) inhibitors for appropriate patients also merits exploration in this setting for the treatment of MF. These novel agents might provide an active yet less toxic tool to bridge these patients to transplant and even to implement post-alloSCT maintenance strategies to prevent relapse.^{28–31}

Several groups have investigated risk factors for relapse of NPM1mut AML patients^{11–15} and have demonstrated a prognostic impact for NPM1 MRD levels measured at different timepoints, suggesting that MRD can be used to identify patients with a higher risk of relapse. However, the predictive

value of these NPM1 measurements might differ according to sample source (peripheral blood or bone marrow), timepoint of MRD assessment, or the MRD level used for defining MRD persistence/relapse.^{11–16} Different NPM1 cut-offs have been used to predict clinical outcome, ranging from 0.1 to 0.01.^{15,25} In the present study, an NPM1/ABL1 \times 100 ratio of 0.05 after the first consolidation showed a remarkable predictive value of molecular relapse-free status. Interestingly, this cut-off was associated with a higher risk of subsequent relapse (25% vs. 10% at two years, $P = 0.011$) and with shorter OS (79% vs. 95% at two years, $P = 0.018$). This predictive timepoint, after two cycles of chemotherapy, was consistent with findings of other studies.^{11,12,15} Establishing early MRD assessment after two chemotherapy courses as a critical decision-making milestone may be of special clinical interest when implementing pre-emptive strategies of treatment intensification for high-risk patients.

To conclude, our findings confirm the favourable prognosis of ELNfav NPM1mut AML patients, although 40% of our patients required an additional early intervention due to MF or HemR. Moreover, an early intervention with salvage therapy at the time of MF led to a favourable outcome and highlighted the clinical value of monitoring MRD to improve clinical outcome. Our identification of patients with a higher risk of developing MF after a second course of chemotherapy leads us to recommend the implementation of treatment intensification based on assessment of MRD at this timepoint.

Acknowledgements

The authors are grateful to Renee O'Brate for her assistance with the manuscript.

Funding information

This study was supported (in part) by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias/Instituto de Salud Carlos III (ISCIII): PI 16/01027, PERIS from Generalitat de Catalunya SLT002/16/00433, SGR 1655 and resident award "Emili Letang" (Hospital Clínic de Barcelona).

A. Bataller *et al.*

Author contributions

AB, GO, MD-B, FG, AG, SV, MT, MA, OS, AS, RC, F-VL, SB, JS and AOC collected the clinical data. ML-G, MP, LZ, EV, GR, AB, JFN and, DC performed the molecular tests. AB, GO, MD-B, FG and JE analyzed the data and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Conflicts of interest

JS and JE report advisory and trial investigation for Novartis, Daiichi-Sankyo and Astellas.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

- Data S1.** Clinical situations in *NPM1*-mutated AML patients.
- Data S2.** CETLAM-12 treatment protocol scheme.
- Data S3.** CETLAM reference laboratories.
- Data S4.** AlloSCT characteristics.
- Data S5.** Cytogenetic abnormalities.
- Data S6.** *NPM1* ratio kinetics.

References

1. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366:1079–89.
2. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374:2209–21.
3. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129:424–47.
4. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2015;373:1136–52.
5. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a *FLT3* mutation. *N Engl J Med.* 2017;377:454–64.
6. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005;352:254–66.
7. Pratorcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, 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;121:2734–8.
8. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in *FLT3*-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood.* 2014;124:3441–9.
9. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358:1909–18.
10. Schlenk RF, Frech P, Weber D, Brossart P, Horst HA, Kraemer D, et al. Impact of pretreatment characteristics and salvage strategy on outcome in patients with relapsed acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2017;31:1217–20.
11. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. *N Engl J Med.* 2016;374:422–33.
12. Krönke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol.* 2011;29:2709–16.
13. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Haferlach C, et al. Minimal residual disease levels assessed by *NPM1* mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML minimal residual disease levels assessed by *NPM1* mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood.* 2009;114:2220–31.
14. Balsat M, Renneville A, Thomas X, De Botton S, Caillot D, Marceau A, et al. Postinduction minimal residual disease predicts outcome and benefit from allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation: a study by the acute leukemia French association group. *J Clin Oncol.* 2017;35:185–93.
15. Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant *NPM1* is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood.* 2013;122:83–92.
16. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2018;131:1275–91.
17. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016;127:29–41.
18. Esteve J, Escoda L, Martín G, Rubio V, Díaz-Mediavilla J, González M, et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. *Leukemia.* 2007;21:446–52.
19. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol.* 2009;27:3650–8.
20. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in AML younger adult patients treated in United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010;116:354–66.
21. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell’Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (*NPM1*) gene mutations. *Leukemia.* 2006;20:1103–8.
22. Cocciardi S, Dolnik A, Kapp-Schwoerer S, Rücker FG, Lux S, Blätte TJ, et al. Clonal evolution patterns in acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation. *Nat Commun.* 2019;10:1–11.
23. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschürtz F, Gaidzik VI, Kühn MWM, et al. Clonal evolution in relapsed *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122:100–8.
24. Jain P, Kantarjian H, Patel K, Faderl S, Garcia-Manero G, Benjamini O, et al. Mutated *NPM1* in patients with acute myeloid leukemia in remission and relapse. *Leuk Lymphoma.* 2014;55:1337–44.
25. Hubmann M, Köhnke T, Hoster E, Schneider S, Dufour A, Zellmeier E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in *NPM1*-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica.* 2014;99:1317–25.
26. Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, 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.* 2016;34:329–36.
27. Dillon R, Hills RK, Freeman SD, Potter N, Jovanovic J, Ivey A, et al. Molecular MRD status and outcome after transplantation in *NPM1* mutated AML: results from the UK NCRI AML17 study. *Blood.* 2020;135:680–8.
28. Battipaglia G, Ruggeri A, Massoud R, El Cheikh J, Jestin M, Antar A, et al. Efficacy and feasibility of sorafenib as a maintenance agent after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for *Fms*-like tyrosine kinase 3-mutated acute myeloid leukemia. *Cancer.* 2017;123:2867–74.

29. Brunner AM, Li S, Fathi AT, Wadleigh M, Ho VT, Collier K, et al. Haematopoietic cell transplantation with and without sorafenib maintenance for patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Br J Haematol.* 2016;**175**:496–504.
30. Burchert A, Bug G, Finke J, Stelljes M, Rollig C, Wäsch R, et al. Sorafenib as maintenance therapy post allogeneic stem cell transplantation for FLT3-

MRD-Based Intervention in NPM1-Mutated AML

- ITD positive AML: results from the randomized, double-blind, placebo-controlled multicentre sormain trial. *Blood.* 2018;**132**:661.
31. Chen Y-B, Li S, Lane AA, Connolly C, Del Rio C, Valles B, et al. Phase I trial of maintenance sorafenib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for fms-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;**20**:2042–8.

1.3. Material suplementario del primer artículo

Supplementary Appendix

Acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation and favorable European LeukemiaNet category: outcome after preemptive intervention based on measurable residual disease

Alex Bataller¹, Guadalupe Oñate², Marina Diaz-Beyá¹, Francesca Guijarro¹, Ana Garrido², Susana Vives³, Mar Tormo⁴, Montserrat Arnan⁵, Olga Salamero⁶, Antònia Sampol⁷, Rosa Coll⁸, Ferran Vall-Llovera⁹, Aina Oliver-Caldés¹, Mònica López-Guerra¹⁰, Marta Pratcorona², Lurdes Zamora³, Eva Villamon⁴, Gaël Roué⁶, Adoración Blanco⁶, Josep F. Nomdedeu², Dolors Colomer¹⁰, Salut Brunet², Jorge Sierra² and Jordi Esteve¹, on behalf of the Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM)

¹ Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain.

² Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB, Barcelona, Spain.

³ Hematology Department, ICO – Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.

⁴ Hematology Department, Hospital Clínic Universitario de Valencia, Valencia, Spain.

⁵ Hematology Department, ICO – Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.

⁶ Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

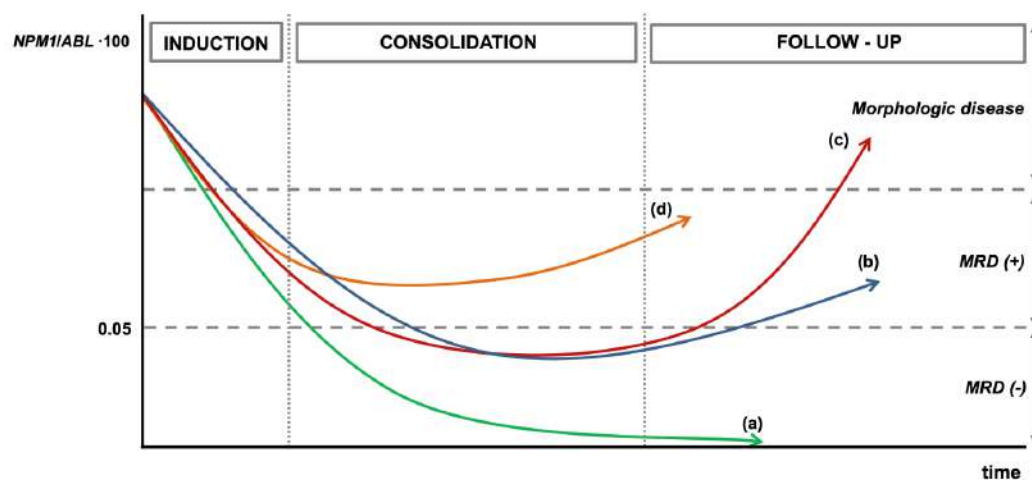
⁷ Hematology Department, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain.

⁸ Hematology Department, ICO – Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Girona, Spain.

⁹ Hematology Department, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain.

¹⁰ Hematopathology Section, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERONC, UB, Barcelona, Spain

S1. Clinical situations in *NPM1* mutated AML patients



Representation of different clinical settings according to the evolution of measurable residual disease (MRD). Patient (a) represents a patient who achieved a molecular CR after consolidation chemotherapy which was maintained during subsequent follow-up. Patients (b), (c) and (d) illustrate different forms of molecular failure (MF). Patient (b) represents a case with molecular response (MRD-negative CR) at the end of the treatment who developed a subsequent molecular relapse. Patient (c) is a case showing a similar course to that of patient (b) but who had an overt hematological relapse (HemR) preceded by a molecular relapse. Patient (d) represents a case with a molecular persistence after the third consolidation course.

S2. CETLAM-12 treatment protocol scheme

CETLAM-12 protocol is a risk-adapted protocol eligible for fit patients up to 70 years diagnosed with *de novo*, excluding patients with relapsed/refractory AML as well as acute promyelocytic leukemia.

All patients received a timed-sequential induction chemotherapy with idarubicin (12 mg/m²/day on days 1 to 3) and cytarabine (200 mg/m²/day as continuous infusions on days 1 to 7) as well as granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) priming (150 µm²/day subcutaneous from day 0 to 7). Response was assessed with a bone marrow (BM) aspirate according to proposed criteria¹ at day 28 after treatment initiation or before if there was evidence of hematopoietic recovery. Patients failing to achieve CR received salvage chemotherapy and were taken off the study, although patients achieving PR received a second induction chemotherapy with the same scheme as the first one.

After achieving CR, all patients received one consolidation course with high dose cytarabine (HDAC; 3 g/m² bid on days 1, 3 and 5, reduced to 1.5 g/m² bid for patients over 60). After the first consolidation patients were assessed stratified according to genetic initial prognosis, based on cytogenetic MRC and genetic ELN classification^{2,3}.

Favorable risk: AML with t(8;21)(q22;q22);RUNX1/RUNXT1, inv(16)(p13;q12) or t(16;16)(p13;q12);CBFβ/MYH11, NPM1 mutated with FLT3-ITD negative or low allelic burden (FLT3-ITD/FLT3wt <0.5), and CEBPα biallelic mutation.

Patients with those characteristics received 2 additional consolidation courses with HDAC, and thereafter, relapse surveillance was assessed with bone marrow aspirates at a regular 3-month interval during at least 3 years after CR. Patients presenting *NPM1* mutation as well as RUNX1/RUNXT1 or CBFβ/MYH11 rearrangements were MRD monitored with RT-qPCR from RNA from bone marrow samples. Molecular failure or persistence was established as: detection of a copy number above $>10^{-4}$ ($>0.01\%$) regarding the copy number at diagnosis (RUNX1/RUNXT1), detection of a copy number >10 out of 10^4 copies of control gene (*ABL*), or detection of a copy number >0.05 *NPM1*mut/ 10^2 copies of control gene (*ABL*). Furthermore, all molecular failures/persistence were confirmed in a second sample, obtained 2-4 weeks after initial positive MRD, where an ascending kinetic needed to be demonstrated. Patients with borderline results or not clearly ascending were close monitored with BM MRD assessment. Patients with a confirmed molecular failure/persistence were eligible for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT), preceded or not by cytoreductive chemotherapy (treating physician's choice). Patients not eligible for alloSCT were treated with hypomethylating agents (azacytidine) or enrolled in available clinical trials.

Intermediate risk: intermediate karyotype according to MRC classification and ELN intermediate-1, excluding mutations classified above as favorable.

Unfavorable risk: unfavorable karyotype according to MRC classification and ELN intermediate-2 and adverse, as well as patients not classified in favorable or intermediate risk and patients of favorable and intermediate risk with persistence of MRD after consolidation.

Patients of intermediate or unfavorable risk achieving and maintaining CR after first consolidation course were eligible for alloSCT. HLA-matched related donor was preferred for alloSCT (within 3 months after finishing HDAC), although this condition was not always possible. If no related donor was available, HLA-matched unrelated or haploidentical donor were chosen, according to the availability and experience of each treating center. Patients

could receive an additional HDAC consolidation course, if needed in terms of timing, before alloSCT. Patients failing to maintain CR received salvage chemotherapy and were taken off the study.

Since 2017, patients harboring *FLT3* mutation (either ITD or TKD) could receive adjuvant midostaurin (Rydapt®) during induction and consolidation phases (day +8 to day +21), depending on availability of this inhibitor in each treating center through a compassionate access program. Midostaurin was administered 50 mg bid on days 8 to 21 in each treatment course⁴.

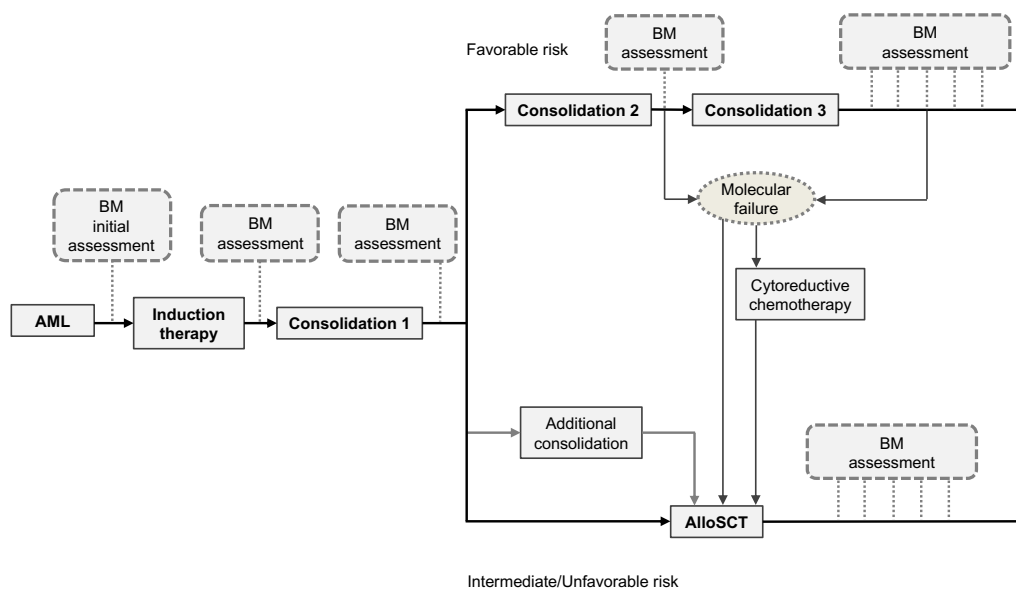


Figure S1.- Schematic view of CETLAM-12 protocol

References

1. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(24):4642–4649.
2. Grimwade D, Hills RK, Moorman A V, et al. Refinement of cytogenetic classification in AML_ Younger adult patients treated in UKMRC. *Blood* 2010;116(3):354–366.
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(3):453–474.
4. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *N Engl J Med* 2017;377(5):454–464.

S3. CETLAM reference laboratories

1.- Laboratori d'Hematologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Marta Pratorona, Josep F. Nomdedéu)
Carrer Sant Quintí 77-79 08041 Barcelona (Spain)

2.- Laboratori d'Hemopatologia (CDB), Hospital Clínic de Barcelona (Mònica López-Guerra, Dolors Colomer)
Carrer Villarroel 170 08036 Barcelona (Spain)

3.- Laboratori d'Hematologia, ICO – Germans Trias i Pujol (Lurdes Zamora)
Carretera Canyet s/n 08916 Badalona (Spain)

4.- Secció de diagnòstic Hematològic, Hospital Universitari Vall d'Hebron (Gaël Roué, Adoración Blanco)
Passeig Vall d'Hebron 119-129 08035 Barcelona (Spain)

5.- Laboratorio de Hematologia, Hospital Clínico Universitario de Valencia (Eva Villamon)
Avenida de Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia (Spain)

S4. AlloSCT characteristics

AlloSCT characteristics (n=34)	
Conditioning intensity	
Myeloablative (MAC)	23 (67.6%)
Reduced intensity (RIC)	11 (32.4%)
Donor type	
HLA matched sibling	10 (29.4%)
HLA matched unrelated donor	14 (41.2%)
Haplo-identical related donor	8 (23.5)
Umbilical cord blood	2 (5.9)

AlloSCT characteristics of the 34 patients that presented either a molecular failure (MF) or a hematological relapse (HemR).

S5. Cytogenetic abnormalities

ID	Karyotype
329	46,XX,del(20q)
450	46,XY,del(13)(q14)[7]/46,XY[3]
715	46,XY,del(20)(q12q13.3)[2]/46,XY[17]
714	45,XY,-20[6],46,XY[19]
713	46,XY,del(9)(q22q34)[7]/46,XY[7]
322	47,XX,+8 [20]
712	46,XY, t(11;22)(q23;q11) [20]*
309	46,XX,del(13)(q12q14)[4]/46,XX[17]
280	46,XX,del(9)(q22q32)[7]/46,XX[11]
704	46,XX,del(9)(q21)[20]
565	46,XY,+2[2]/48,sl,+3,del(3)(p12)[2]/46,XY[16]
21	46,XY,add(9)(p22)[2]/46,XY[18]
496	47,XY,+mar[2]/46,XY[18]

* Constitutional non-Robertsonian translocation confirmed in non-leukemic cells.

S6. *NPM1* ratio kinetics

S6a. *NPM1* ratio kinetics of patients presenting MF/HemR

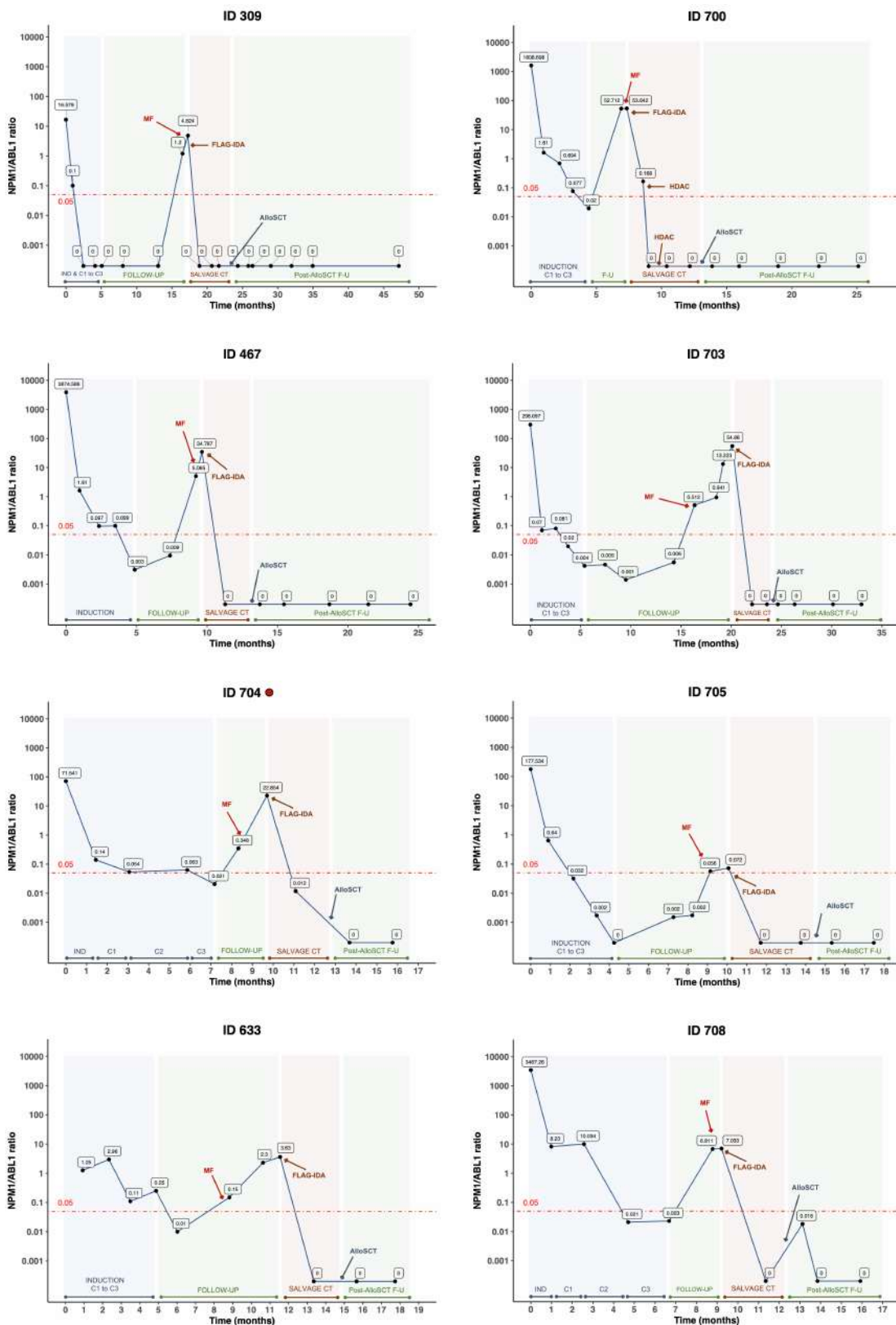
Herein is provided the *NPM1/ABL* ratio at different timepoints of the patients included in the study, from the diagnosis to the last available follow-up. *NPM1* ratio is expressed as *NPM1mut/ABL1*·100. *NPM1* ratio data of three patients was not available.

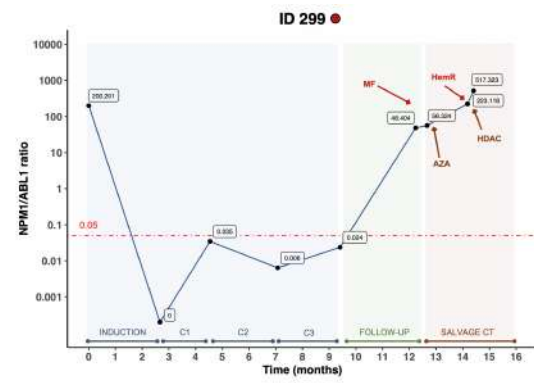
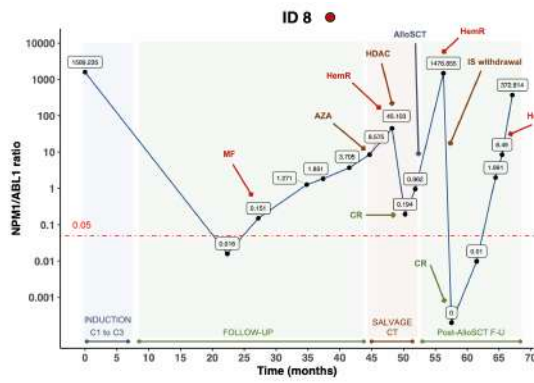
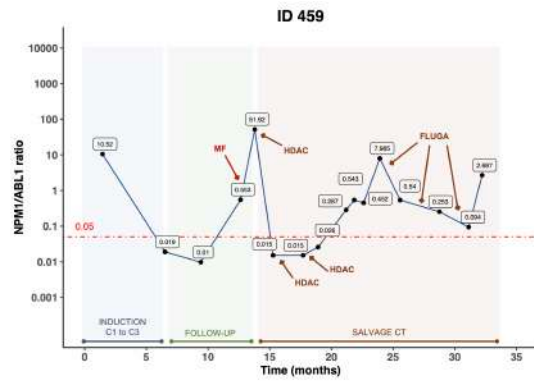
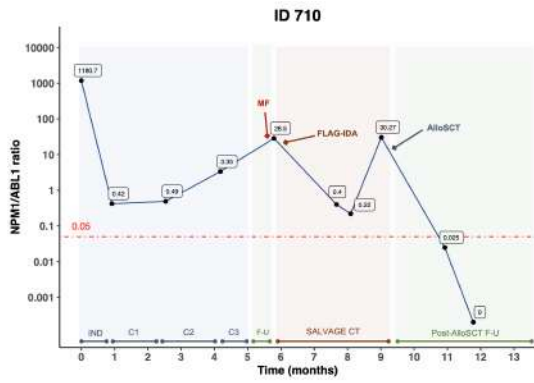
Abbreviations

IND: Induction; **C1:** First consolidation course; **C2:** Second consolidation course; **C3:** Third consolidation course; **F-U:** Follow-up; **Salvage CT:** Salvage chemotherapy; **AZA:** Azacytidine; **DEC:** Decitabine; **HDAC:** High-dose cytarabine chemotherapy; **CR:** Complete response; **IS:** immunosuppression; **DLI:** Donor lymphocyte infusion; **MTX:** Methotrexate.

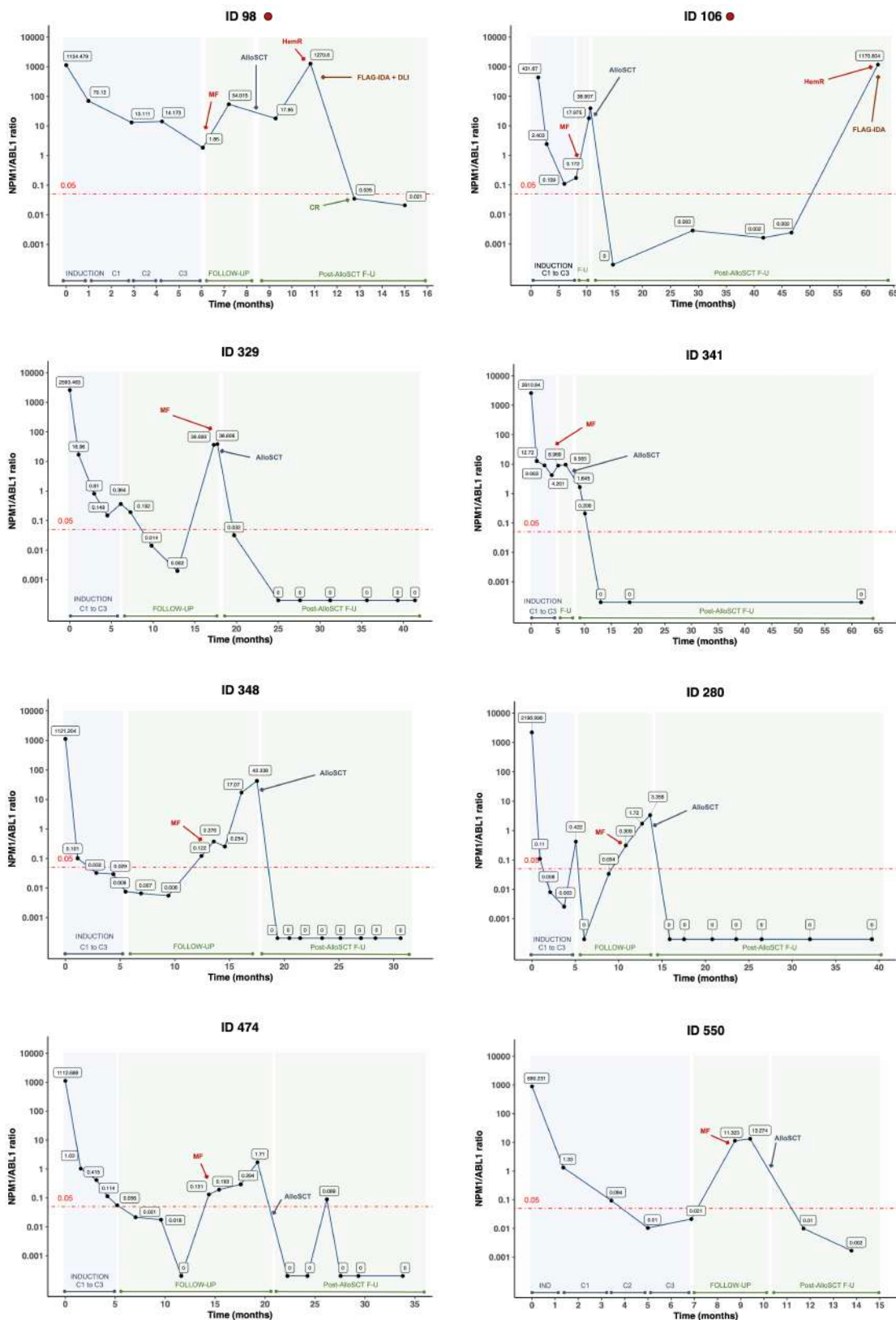
- Patient is deceased

Patients treated in MF status (n = 12)

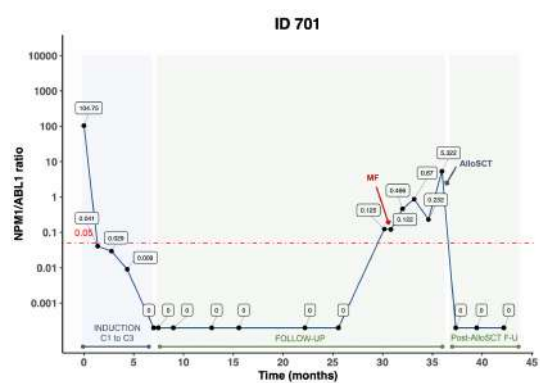
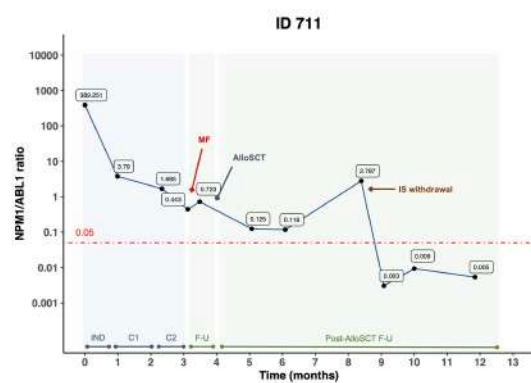
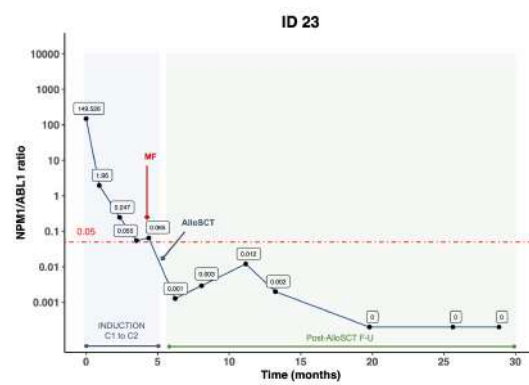
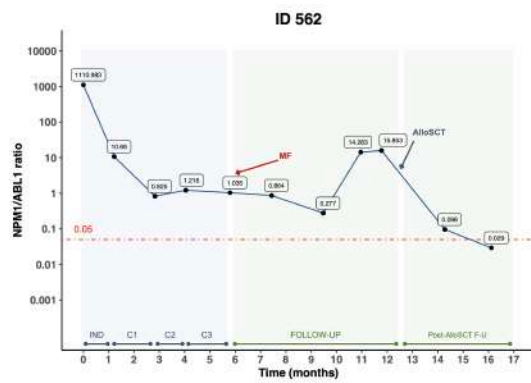




Patients proceeding directly to alloSCT (n = 13)¹

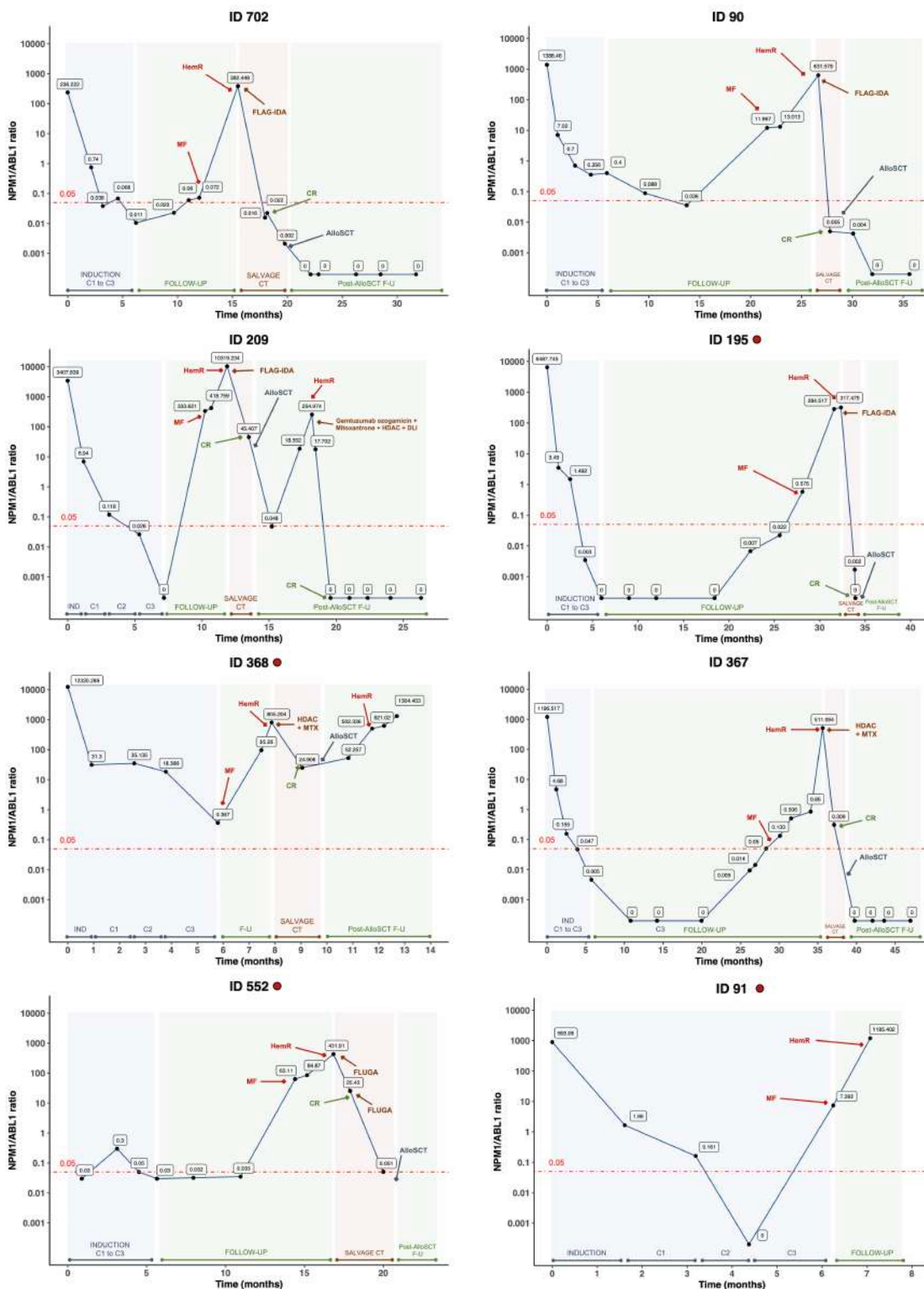


Resultados: primer artículo



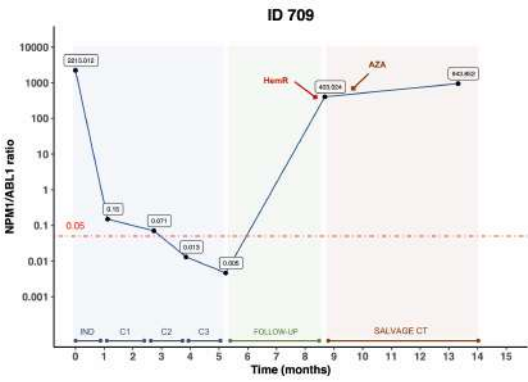
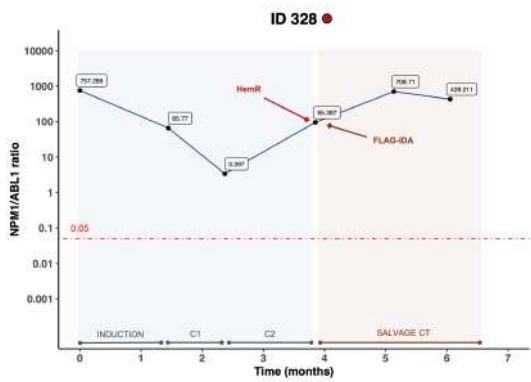
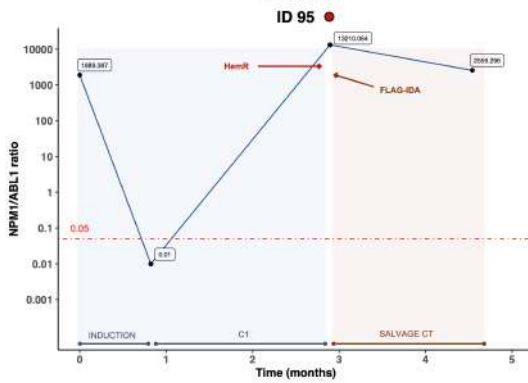
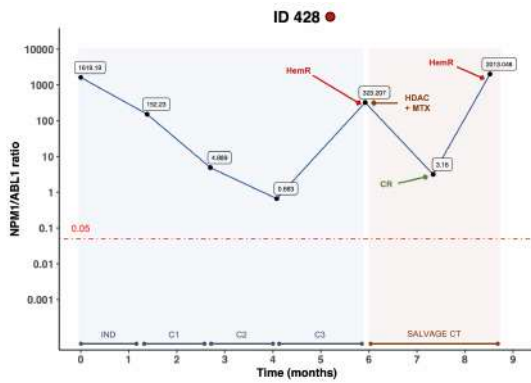
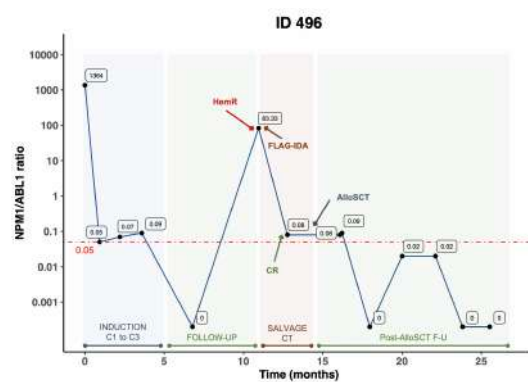
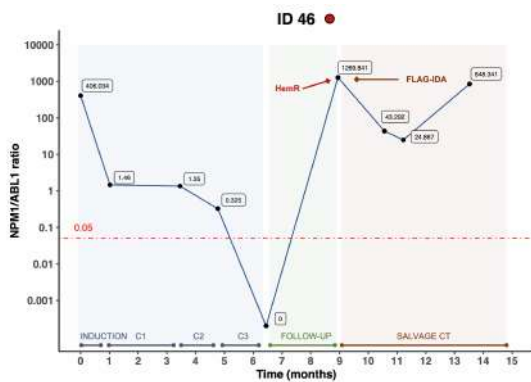
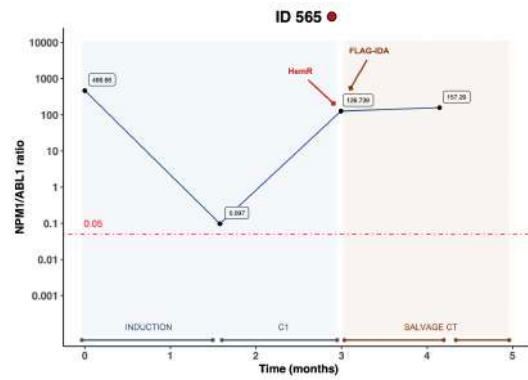
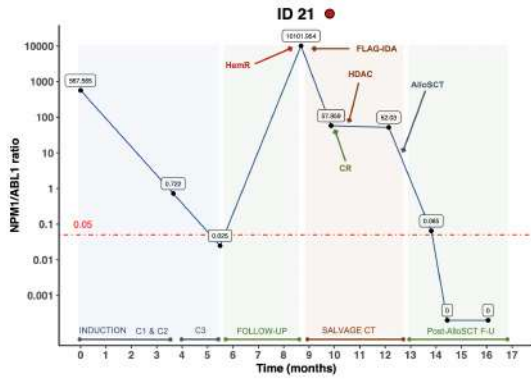
¹ Molecular data of patient ID 243 is not available.

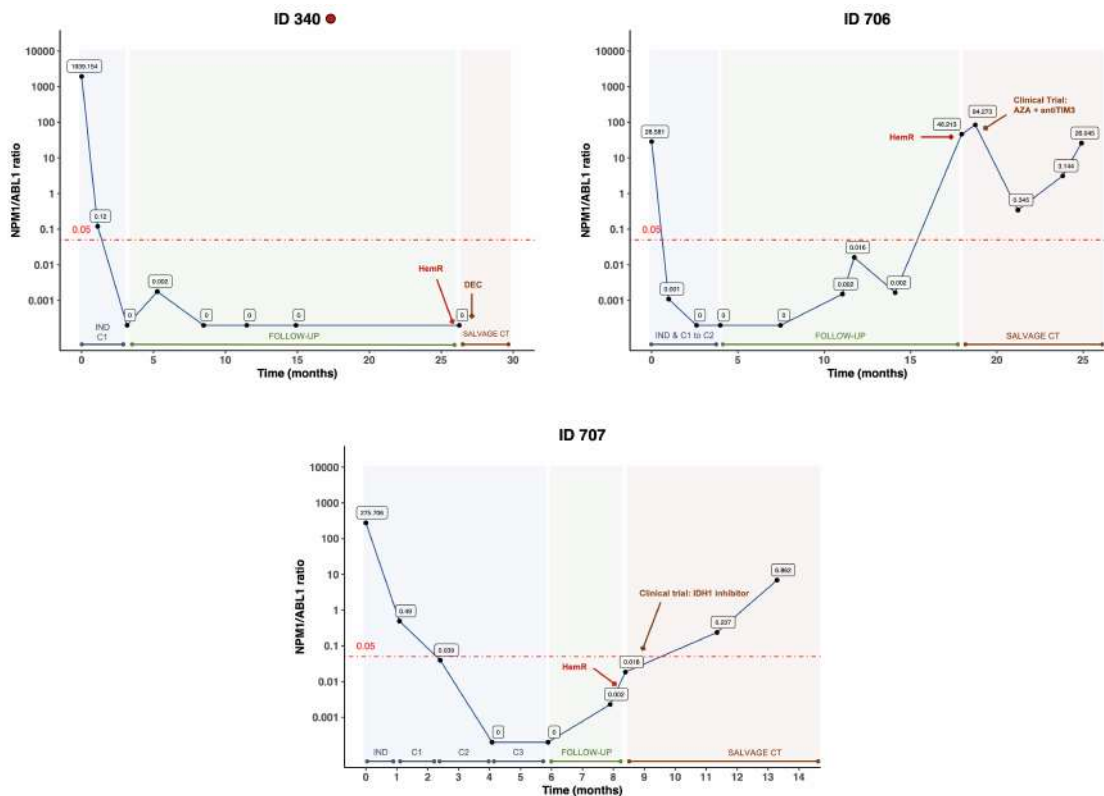
Patients presenting HemR after MF (n = 8)¹



¹ Patient ID 91 died before salvage therapy initiation.

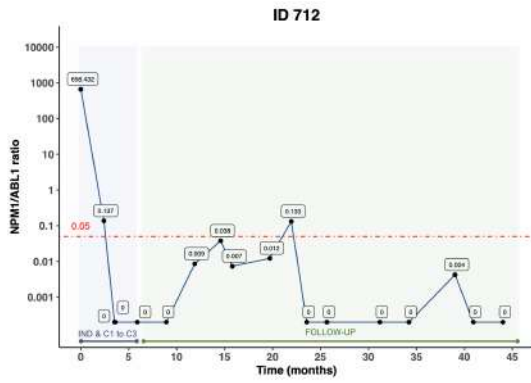
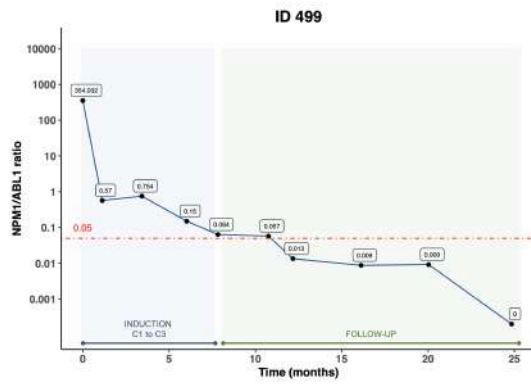
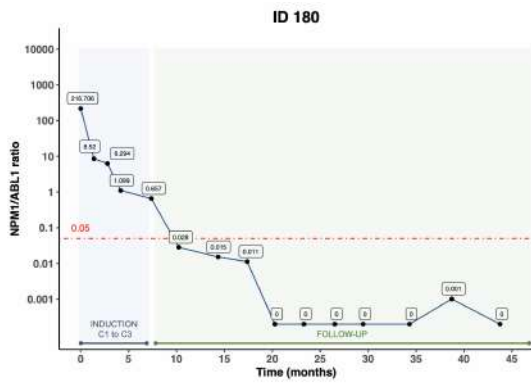
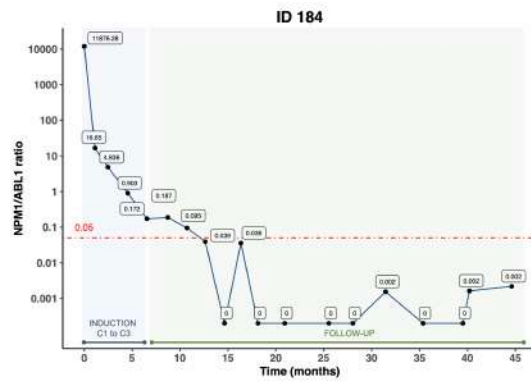
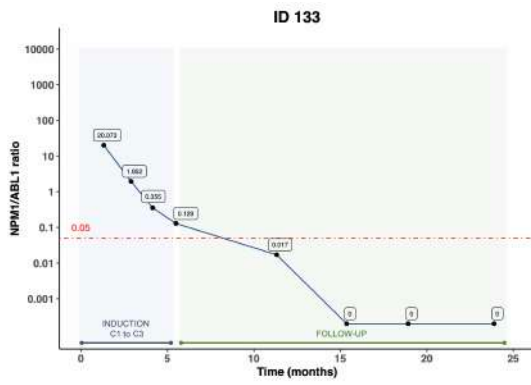
Patients treated in HemR status (n = 13)¹





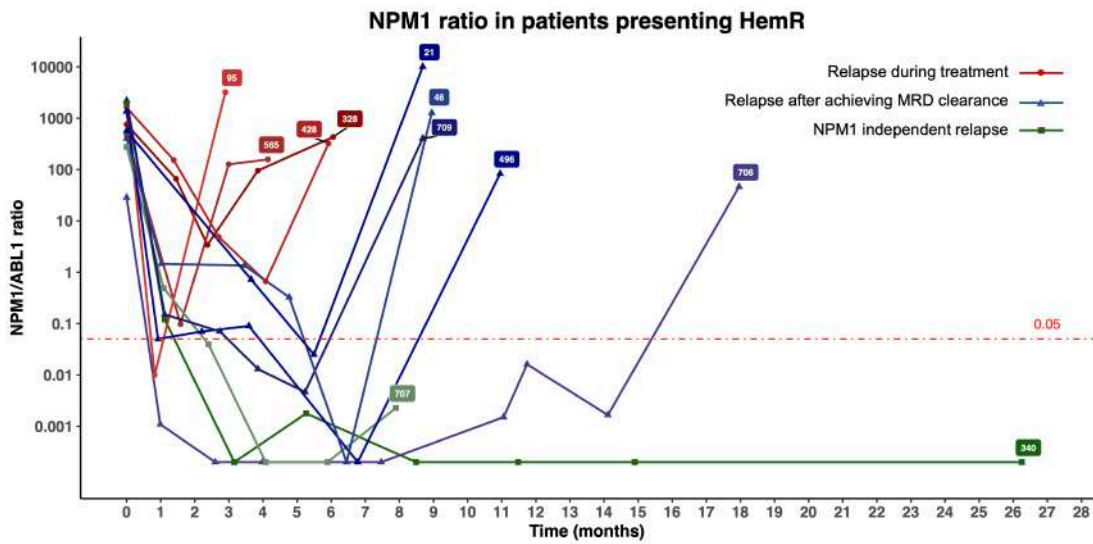
¹ Molecular data of patient ID 159 and 327 is not available.

Patients with spontaneous MRD clearance (n = 5)



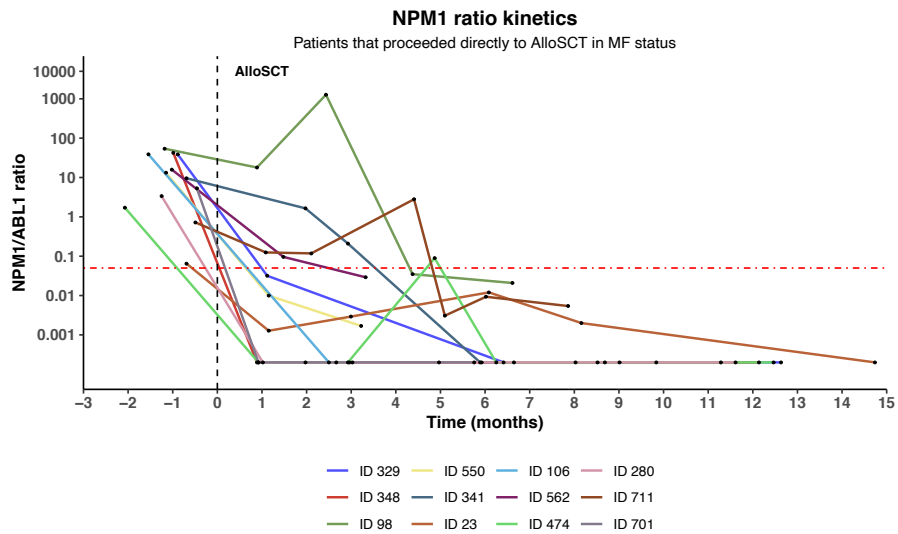
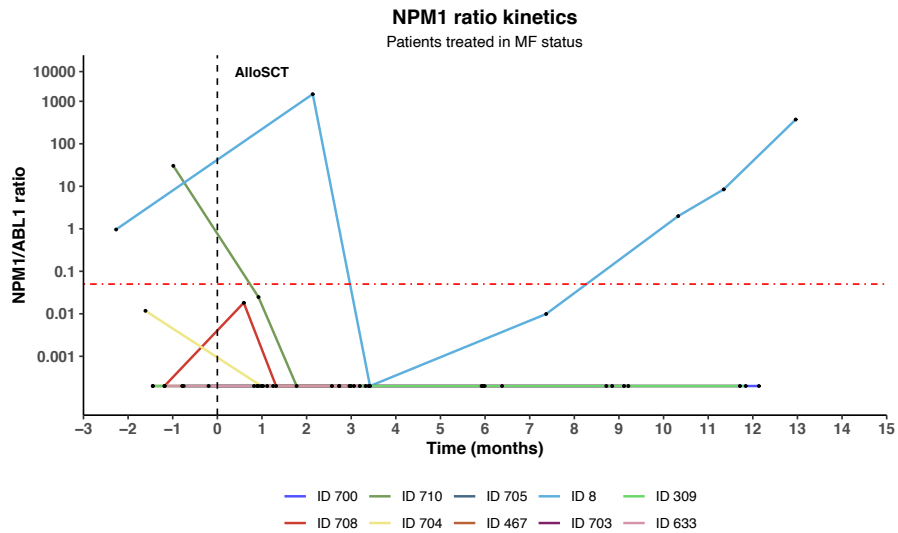
S6b. NPM1 ratio of HemR patients

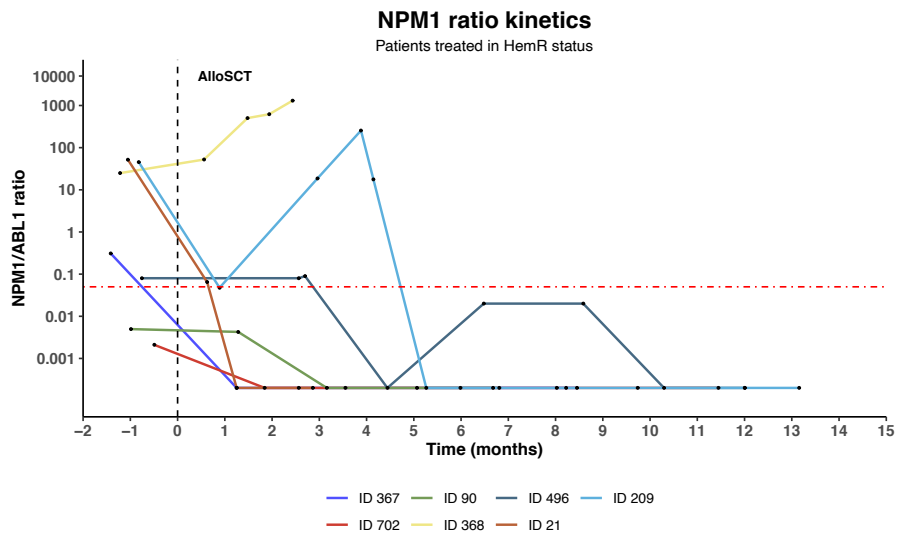
Herein is provided the *NPM1* ratio of patients presenting HemR without previous MF versus time. Each line represent one patient, from diagnosis to relapse time, labeled with de patient ID number. Patients are stratified depending on the type of HemR relapse (during consolidation treatment, after having achieved MRD clearance with the treatment and NPM1 negative/independent relapse).



S6c. NPM1 ratio in patients receiving alloSCT

Herein is provided the *NPM1* ratio of patients with available data receiving an alloSCT. It is showed the last MRD assessment before alloSCT and posterior MRD values of each patient. Time 0 corresponds to date of alloSCT. Specific MRD values are represented in S6a section.





2. Segundo artículo

European LeukemiaNet 2017 risk stratification for acute myeloid leukemia: validation in a risk-adapted protocol

Alex Bataller, Ana Garrido, Francesca Guijarro, Guadalupe Oñate, Marina Díaz-Beyá, Montserrat Arnan, Mar Tormo, Susana Vives, María Paz Queipo de Ilano, Rosa Coll, David Gallardo, Ferran Vall-Llovera, Lourdes Escoda, Antonio García-Guiñón, Olga Salamero, Antònia Sampol, Brayan M. Merchan, Joan Bargay, Sandra Castaño-Díez, Daniel Esteban, Aina Oliver-Caldés, Andrea Rivero, Pablo Mozas, Mònica López-Guerra, Marta Pratcorona, Lurdes Zamora, Dolors Costa, Maria Rozman, Josep F. Nomdedeu, Dolors Colomer, Salut Brunet, Jorge Sierra and Jordi Esteve, on behalf of the Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM)

Blood Advances. 2022 Feb 22;6(4):1193-1206

2020 Impact Factor: 6.686
Quartile 1 (Hematology)

2.1. Resumen del segundo artículo

Las guías de la ELN 2017 para el diagnóstico y manejo de la LMA son actualmente utilizadas de manera global para poder categorizar el riesgo de los pacientes con LMA, así como establecer el tratamiento en función de este riesgo. La clasificación de riesgo de la ELN ha surgido del consenso de expertos en base a la evidencia publicada sobre el riesgo de distintas alteraciones citogenéticas, si bien ha sido validada en estudios con pocos pacientes y con protocolos distintos de tratamiento. Desde 2012, el protocolo CETLAM-12 ha estratificado a los pacientes en función del riesgo genético al diagnóstico, recomendando tratamientos de consolidación basados en quimioterapia en los pacientes de riesgo favorable mientras que reserva el aloTPH para los pacientes de riesgo intermedio o alto. Debido al diseño del protocolo, el grupo favorable según el protocolo CETLAM-12 y según la ELN 2017 cumplen los mismos criterios, por lo que es posible una validación de la ELN 2017 en un protocolo que estratifica los pacientes en función de los criterios de riesgo de esta última clasificación. Retrospectivamente se clasificaron los pacientes en ELN favorable (ELN fav, n=327 [48%]), ELN intermedio (ELN int, n=109 [16%]) y ELN adverso (ELN adv, n=245 [36%]). La SG a los 2 y 5 años resultó de 77% y 70% para los ELN fav, 56% y 46% para los ELN int, y 33% y 23% para los ELN adv. En un subanálisis de los pacientes ELN adv, identificamos un subgrupo genético con un especial mal pronóstico: pacientes con inv(3) o t(3;3), cariotipo complejo y/o mutación de TP53/alteraciones de 17p. Este subgrupo presentaba una SG a los 2 años del 15%. Este estudio permite validar la ELN 2017 en una cohorte grande de pacientes tratados acorde a esta clasificación, y además se identifica un subgrupo de pacientes con un pronóstico muy adverso, el cual podría ser considerado como un grupo de riesgo aparte en subsiguientes clasificaciones, en los que nuevas estrategias de tratamiento son urgentemente requeridas.

2.2. Artículo

REGULAR ARTICLE



European LeukemiaNet 2017 risk stratification for acute myeloid leukemia: validation in a risk-adapted protocol

Alex Bataller,^{1,2} Ana Garrido,^{2,3} Francesca Guijarro,¹ Guadalupe Onate,^{2,3} Marina Diaz-Beyá,¹ Montserrat Arnan,⁴ Mar Tormo,⁵ Susana Vives,⁶ María Paz Queipo de Llano,⁷ Rosa Coll,⁸ David Gallardo,⁸ Ferran Vall-Llovera,⁹ Lourdes Escoda,¹⁰ Antonio Garcia-Guiñon,¹¹ Olga Salameo,¹² Antònia Sampol,¹³ Brayan M. Merchan,¹⁴ Joan Bargay,¹⁵ Sandra Castaño-Díez,¹ Daniel Esteban,¹ Aina Oliver-Caldés,¹ Andrea Rivero,¹ Pablo Mozas,¹ Mònica López-Guerra,^{15,16} Marta Pratcorona,^{2,3} Lurdes Zamora,^{2,6} Dolores Costa,¹⁵, Maria Rozman,¹⁵ Josep F. Nomdedéu,^{2,3} Dolores Colomer,^{15,16} Salut Brunet,^{2,3} Jorge Sierra,^{2,3,*} and Jordi Esteve,^{1,2,*} on behalf of the Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM)

¹Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, UB, Barcelona, Spain; ²Josep Carreras Leukemia Research Institute; ³Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB, Barcelona, Spain; ⁴Hematology Department, ICO-Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; ⁵Hematology Department, Hospital Clínic Universitario de Valencia, Valencia, Spain; ⁶Hematology Department, ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁷Hematology Department, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; ⁸Hematology Department, ICO-Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Girona, Spain; ⁹Hematology Department, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain; ¹⁰Hematology Department, ICO-Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain; ¹¹Hematology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; ¹²Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ¹³Hematology Department, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain; ¹⁴Hematology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ¹⁵Hematology Department, Hospital Universitari Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Spain; ¹⁶Hematopathology Section, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, UB, Barcelona, Spain; and ¹⁸Centro de Investigación Biomédica en Red en Oncología, Madrid, Spain

Key Points

- The ELN 2017 classification has been validated in a risk-adapted intensive protocol, supporting its utility to predict outcome.
- Within the ELN 2017 adverse group, there is a subset of patients (inv(3) and *TP53* abnormalities) with a particularly poor prognosis.

The 2017 European LeukemiaNet (ELN 2017) guidelines for the diagnosis and management of acute myeloid leukemia (AML) have become fundamental guidelines to assess the prognosis and postremission therapy of patients. However, they have been retrospectively validated in few studies with patients included in different treatment protocols. We analyzed 861 patients included in the Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias-12 risk-adapted protocol, which indicates cytarabine-based consolidation for patients allocated to the ELN 2017 favorable-risk group, whereas it recommends allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) as a postremission strategy for the ELN 2017 intermediate- and adverse-risk groups. We retrospectively classified patients according to the ELN 2017, with 327 (48%), 109 (16%), and 245 (36%) patients allocated to the favorable-, intermediate-, and adverse-risk group, respectively. The 2- and 5-year overall survival (OS) rates were 77% and 70% for favorable-risk patients, 52% and 46% for intermediate-risk patients, and 33% and 23% for adverse-risk patients, respectively. Furthermore, we identified a subgroup of patients within the adverse group (inv(3)/t(3;3), complex karyotype, and/or *TP53* mutation/17p abnormality) with a particularly poor outcome, with a 2-year OS of 15%. Our study validates the ELN 2017 risk stratification in a large cohort of patients treated with an ELN-2017 risk-adapted protocol based on alloSCT after remission for nonfavorable ELN subgroups and identifies a genetic subset with a very poor outcome that warrants investigation of novel strategies.

Submitted 21 June 2021; accepted 8 November 2021; published online ■■■■ 2021.
DOI 10.1182/bloodadvances.2021005585.

*J.S. and J.E. contributed equally to this work.

For data sharing, contact the corresponding author.

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2021 by The American Society of Hematology. Licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0), permitting only noncommercial, nonderivative use with attribution. All other rights reserved.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous clonal disease of transformed hematopoietic precursors presenting with recurrent genetic abnormalities. In recent years, the unraveling of the AML genetic landscape has allowed a better correlation of the biological features of the disease with the prediction of response to treatment and clinical outcome.¹ Based on that, expert working groups have published recommendations for the diagnosis, response criteria, and prognostic stratification of AML.²⁻⁴ In 2010, a panel of experts proposed the first European LeukemiaNet (ELN) recommendations for the diagnosis and management of AML. The ELN 2010 risk classification stratified patients into 4 risk categories (favorable, intermediate I, intermediate II, and adverse) according to cytogenetics and *NPM1*, *FLT3*, and *CEBPA* mutational status. Several groups have undertaken the effort to validate the prognostic impact of this classification, although differential prognosis of intermediate I and intermediate II categories could not be confirmed.^{5,6}

In 2017, a revised version of the ELN classification was published (ELN 2017).⁴ This updated risk stratification grouped patients into 3 risk categories (favorable, intermediate, and adverse risk) and refined the prognostic value of specific genetic mutations. Thus, *CEBPA* mutation defined a favorable AML subset only in a biallelic status, the presence of *RUNX1*, *ASXL1*, and *TP53* mutations conferred an adverse risk, and risk of *FLT3*-ITD was further modulated by its allelic ratio and the interaction with *NPM1* mutation.

Although the ELN 2017 risk classification was mainly designed using data from the published evidence of individual genetic entities contained in the classification, to date, few studies to date have validated its whole prognostic value in a large series of patients. A recent publication by Herold et al⁷ validated the ELN 2017 among 771 available patients from 2 treatment protocols, with a broad age range, comparing the prognostic impact according to the ELN classifications. This work highlighted the predictive prognostic potential of this latest classification, although it proposed a refined ELN 2017 stratification with 2 additional groups (namely, very favorable and very adverse subgroups). Of note, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) in first complete remission (CR1) had only been performed in a minority of patients (16% of patients achieving CR). Other studies have also validated the prognostic impact of the ELN 2017 classification, although with a smaller number of patients of younger age.^{8,9}

The Spanish AML cooperative group Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM) proposed an AML risk-adapted treatment protocol (CETLAM-12), defining risk categories that virtually overlapped with the ELN 2017 classification, and recommending alloSCT in CR1 for intermediate- and high-risk patients. Herein we present the validation of the ELN 2017 risk stratification in patients with AML included in the CETLAM-12, with a genetic risk-based preestablished transplant policy, unraveling a genetically defined very-high-risk subset within the adverse risk ELN 2017 category.

Patients and methods

Patients and treatment

Newly diagnosed patients with de novo AML eligible for intensive chemotherapy and treated according to the CETLAM-12 protocol

from January 2012 to December 2019 were included in the study (n = 861). The CETLAM-12 protocol is detailed in the supplemental Materials. Essentially, all patients received a common induction regimen based on a 3 + 7 scheme with idarubicin and cytarabine. Afterward, patients received a risk-based postremission therapy according to 3 categories based on initial genetics (including cytogenetics, *NPM1*, *FLT3*-ITD, and *CEBPA* mutational status), and postconsolidation minimal/measurable residual disease (MRD). The favorable group was defined as in the ELN 2017 classification, including the subset of patients with *NPM1*-mutated and wild-type or low-ratio *FLT3*-ITD, given the favorable outcome observed in our previous protocol.¹⁰ In these patients, consolidation therapy consisted of 3 courses of high-dose cytarabine (HDAC). In these patients, bone marrow MRD assessment with quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed after each chemotherapy course and thereafter at 3-month intervals for at least 3 years after CR. If a confirmed molecular failure was evidenced (ie, persistence or MRD reappearance after consolidation), alloSCT was the recommended strategy without a predefined guideline for specific pretransplant salvage chemotherapy. For patients allocated to the intermediate- and high-risk categories, alloSCT was the recommended strategy after at least 1 HDAC course. In addition, all patients with persistent MRD after consolidation therapy were allocated to the high-risk category, and alloSCT was also recommended. Since 2017, patients with *FLT3* mutations (either *ITD* or *TKD*) could receive midostaurin through an early access program.

The CETLAM-12 protocol was approved by the Spanish Medicines Agency as a postapproval study (EPA-OD, JSG-SMD-2014-01). Patients provided their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and all procedures were approved by the ethics committee.

Cytogenetic and mutational analysis

Cytogenetic analysis including fluorescence in situ hybridization was performed in the laboratory of each treating center. Mutational analysis of *NPM1* and *FLT3* (ITD and TKD) was performed on DNA, using PCR-based methods.¹⁰⁻¹² Testing for recurrent AML mutations, including *RUNX1*, *ASXL1*, *CEBPA*, *NPM1*, *FLT3*, and *TP53*, was done with next-generation sequencing (NGS) techniques, with a limit of detection of 5% variant allele frequency. Recurrent gene rearrangements, including *RUNX1-RUNX1T1* and *CBFB-MYH11*, were analyzed by qRT-PCR, fluorescence in situ hybridization, or NGS. Participating centers and NGS panels used are detailed in the supplemental Material.

Risk group and ELN category allocation

According to cytogenetic and mutational findings, each patient with available data were retrospectively allocated to the corresponding ELN 2017 risk category (favorable, intermediate, and adverse) to analyze the outcome according to this classification. Of note, patients with wild-type *NPM1* and *FLT3*-ITD ≥ 0.5 lacking NGS testing were assigned to the adverse-risk category, irrespective of the presence or absence of adverse risk-defining gene mutations such as *RUNX1*, *ASXL1*, or *TP53*. Ambiguous cases and the detailed risk allocation procedure are detailed in the supplemental Material.

Statistical methods

Characteristics among ELN 2017 groups were compared using the χ^2 test and Fisher's exact test for categorical variables and using the Student *t* test and Mann-Whitney *U* test for continuous variables with normal and non-normal distribution, respectively. Median follow-up time was calculated with the Kaplan-Meier estimate of potential follow-up.¹³ Overall survival (OS) was calculated from diagnosis to death. Event-free survival (EFS) was calculated from diagnosis to treatment failure (not achieving complete remission/partial remission after induction), relapse, or death. OS and EFS were estimated with the Kaplan-Meier method, and groups were compared with the log-rank test.^{14,15} For outcomes where a possible competing event exists, cumulative incidence was calculated using relapse as the primary event and death without relapse as a competing event. Cumulative incidence function comparison was performed using Gray's test. In the univariate and multivariate analyses, logistic regression was used to estimate odds ratio, whereas Cox proportional hazards regression was used to estimate hazard ratios. Post hoc *P* value analyses were adjusted with the Bonferroni method. All statistical analyses were performed with R statistics version 4.0.2 (R core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Patient characteristics

This study included a total of 861 patients enrolled in the multicentric CETLAM-12 treatment protocol, classified according to the ELN 2017 classification as favorable (*n* = 327), intermediate (*n* = 109) and adverse risk (*n* = 245), corresponding to 48%, 16%, and 36% of classifiable patients, respectively. One hundred eighty additional patients (20.9% of all patients) could not be classified according to the ELN 2017 because of the lack of risk-defining cytogenetic abnormalities and unavailable NGS testing. This nonclassifiable group is mostly composed by ELN 2017 intermediate- and adverse-risk patients with AML, without either favorable-risk mutations or ELN group-defining cytogenetic findings, in whom NGS testing was not performed and *RUNX1*, *ASXL1*, and *TP53* mutational status could not be assessed. As a consequence, these patients could not be properly allocated into either the ELN 2017 intermediate- or adverse-risk group. The main characteristics of each group and the whole cohort are summarized in Table 1, including the comparison with the MRC and ELN 2010 risk classifications.^{3,16} Furthermore, the distribution of the genetic groups within the ELN 2017 risk classification is detailed in Figure 1.

The median age of patients in the ELN 2017 adverse risk category was higher than that of patients from the remaining risk groups, without achieving statistical significance. These patients also had a lower white blood cell count (WBC), as well as lower peripheral blood and bone marrow blast count, compared with the other risk categories (*P* < .01), and a trend to a lower hemoglobin level. Intermediate-risk patients presented with a higher WBC and blast count than the other risk categories (*P* < .01), largely attributable to the higher prevalence of *FLT3*-ITD in this cohort (66.9% in the intermediate-risk group vs 15.6% and 18% among favorable- and adverse- risk patients, respectively). Of note, 46 patients received frontline midostaurin during chemotherapy because of the presence of a *FLT3* mutation.

Treatment outcome according to ELN 2017 category

All patient included in this study received at least induction therapy according to the CETLAM-12 protocol. A detailed flowchart with patient disposition following induction and postremission therapy is shown in Figure 2.

Among patients allocated to the ELN 2017 favorable risk group (*n* = 327), 295 achieved CR1 (90%) after 1 (*n* = 277) or 2 (*n* = 18) induction courses. Although not intended in CR1, 82 patients (25%) received an alloSCT: after experiencing an overt hematologic relapse in 29 patients (second complete response [CR2] *n* = 25; partial response/refractory disease, *n* = 4), after presenting molecular relapse (*n* = 40; 33 patients with *NPM1* mutation), and because of a protocol deviation (*n* = 13). Overt hematologic relapses were mostly detected after completion of HDAC consolidation courses (44; 70% of all relapses). After alloSCT, 13 patients relapsed, and 14 additional patients died because of a non-relapse-related cause (NRM). The median follow-up time of the ELN 2017 favorable group was 38 months, with 234 patients in a CR status (72% of all ELN 2017 favorable patients) at the cutoff time and 57 of them after an alloSCT (24% of all patients with CR). Among patients who did not receive an alloSCT, 10 patients died because of treatment complications. Overall, 170 patients remained in sustained CR after HDAC-based consolidation chemotherapy (Figure 2).

Regarding patients allocated to the ELN 2017 intermediate-risk group (*n* = 109), 87 achieved CR1 (80%), 18 of them requiring more than 1 chemotherapy course. Thirteen early relapses before alloSCT were observed, with 7 patients achieving CR2 after salvage therapy and therefore proceeding to alloSCT. Overall, 80 patients (73.4%) received an alloSCT (CR1, *n* = 69, 63%; CR2, *n* = 7; refractory disease, *n* = 4), and 3 patients received an autologous stem cell transplant. After alloSCT, 19 patients relapsed, and 10 patients died because of NRM. The median follow-up time of the ELN 2017 intermediate group was 24 months, with 57 patients in a CR status (52% of all ELN intermediate-risk patients) at the cutoff time and 53 after an alloSCT (93% of all patients with CR).

Concerning patients of the ELN 2017 adverse-risk group (*n* = 245), 173 achieved CR1 (71%), 38 requiring more than 1 chemotherapy course. After achieving CR1, 41 patients relapsed, and only 5 of them achieved CR2 after salvage therapy (12%). Altogether, 150 (61.6%) proceeded to alloSCT (CR1, *n* = 125, 51%; CR2, *n* = 3; refractory disease, *n* = 22), and 2 patients received an autologous stem cell transplant. After alloSCT, 53 patients relapsed and 34 died because of NRM. The median follow-up time of the ELN 2017 adverse group was 38 months, with 68 patients in a CR status (28% of all ELN adverse-risk patients) at the cutoff time and 66 after an alloSCT (97% of all patients with CR).

Patients of the ELN 2017 favorable-risk group exhibited a higher CR rate (90%) compared with the intermediate and adverse groups (80% and 71%, respectively; *P* < .05). Furthermore, the ELN 2017 adverse group showed a higher proportion of induction refractoriness than the other groups (19% in the adverse group vs 1% and 8% in the favorable and intermediate groups, respectively; *P* < .001). The multivariate analysis confirmed the independent prognostic value of this classification for the achievement of CR after induction chemotherapy (Figure 4), together with age and leukocyte count at diagnosis. There was no significant difference in terms of induction mortality among the 3 groups.

Table 1. Patient characteristics of the entire cohort and according to the ELN 2017 risk stratification

	All patients (861)	ELN 2017 favorable (327)	ELN 2017 intermediate (109)	ELN 2017 adverse (245)	ELN 2017 not classifiable (180)	P*
Age, years median (range)	56 (17-76)	54 (17-76)	53 (20-75)	58 (18-71)	59 (17-71)	.33
Sex, male n (%)	449 (51)	164 (50)	48 (44)	123 (50)	107 (59)	.43
WBC, median (range) (/10 ⁹ /L)	9.88 (0.1-530)	17.9 (0.6-361)	45.6 (0.8-384.2)	5.2 (0.4-313.6)	3.4 (0.1-530)	<.001
Hemoglobin, median (range) (g/L)	89 (26-159)	92 (34-150)	91 (40-153)	87 (38-159)	87 (26-147)	.08
Platelet count, median (range) (/10 ⁹ /L)	62 (2-742)	60 (5-453)	62 (10-488)	62 (6-465)	74 (2-742)	.96
PB blasts, median (range) (%)	30 (0-100)	37 (0-100)	61 (0-100)	20 (0-99)	11 (0-98)	<.001
BM blasts, median (range) (%)	62 (1-100)	66 (2-100)	79 (17-100)	57 (7-99)	50 (9-99)	<.001
NPM1 status						
NPM1 mutated	295 (34.3)	217 (66.4)	72 (66.1)	6	0	–
NPM1 unknown	27 (3)	5 (1.6)	0	10 (9.2)	12 (6.7)	–
FLT3-ITD status						
FLT3-ITD ^{low}	60 (7.3)	45 (13.8)	2 (1.8)	7 (2.9)	6 (3.3)	–
FLT3-ITD ^{high}	115 (13.4)	6 (1.8)	71 (65.1)	38 (15.5)	0	–
FLT3-ITD unknown	22 (2.6)	3 (1)	0	8 (3.7)	11 (6.1)	–
MRC cytogenetic risk category¹⁶						
MRC favorable	93 (10.8)	93 (28.4)	0	0	0	–
MRC intermediate	551 (64)	215 (65.7)	98 (91)	80 (32.5)	158 (87.8)	–
MRC adverse	174 (20.2)	2 (0.6)	1 (1)	161 (65.4)	10 (5.5)	–
MRC not classifiable	43 (5)	17 (5.2)	9 (8)	5 (2.1)	12 (6.7)	–
ELN-2010 risk stratification³						
Favorable	255 (29.6)	251 (76.8)	1 (1)	0	3 (1.7)	–
Intermediate I	260 (30.2)	38 (11.6)	78 (71.5)	44 (18)	100 (55.5)	–
Intermediate II	132 (15.3)	28 (8.6)	26 (23.8)	19 (7.8)	59 (32.8)	–
Adverse	178 (20.7)	1 (0.3)	0	177 (72.2)	0	–
Not classifiable	36 (4.21)	9 (2.7)	4 (3.7)	5 (2)	18 (10)	–

BM, bone marrow; PB, peripheral blood.

*P value of the comparison among ELN 2017 classifiable patients.

Relapse risk, NRM, EFS, and OS according to ELN 2017 risk classification

The median follow-up of the entire cohort (n = 861) was 38 months. Detailed information regarding OS, EFS, and cumulative incidence of relapse (CIR) and NRM is summarized in Table 2 and Figure 3. CIR and NRM at 5 years increased from 28% and 7% to 40% and 14% and to 53% and 21% in favorable, intermediate, and adverse ELN categories, respectively (P < .001). This marked prognostic impact of the ELN 2017 category is translated into OS and EFS, with a gradual decline at 5 years from 70% and 60% to 46% and 31% and to 23% and 15%, for favorable-, intermediate-, and adverse-risk patients, respectively (P < .001). The prognostic impact of ELN 2017 stratification was maintained in patients above and below 60 years (supplemental Material).

The multivariate analysis confirmed the independent prognostic value of the ELN risk classification (Figure 4). Thus, the hazard ratio for death and event defined by EFS increased by ELN risk category,

being 2.2- and 2.4-fold in intermediate-risk patients and 4.5- and 4.2-fold in adverse-risk patients. Interestingly, age, sex, and WBC at diagnosis also showed an independent prognostic impact on OS and EFS, with a protective effect of female sex.

Outcome after alloSCT according to ELN 2017 category

In the CETLAM-12 protocol, alloSCT policy varied according to the genetic risk category. AlloSCT was recommended in CR1 for all eligible nonfavorable risk patients, after receiving at least 1 consolidation course. In contrast, alloSCT was deferred in favorable-risk patients after frontline treatment failure, either molecular or morphologic. Main characteristics of alloSCT are summarized in the supplemental Material. Of note, transplant characteristics were similar among the different ELN 2017 groups, with the exception of disease status at the time of alloSCT. A higher proportion of patients from the adverse-risk category received alloSCT without being in

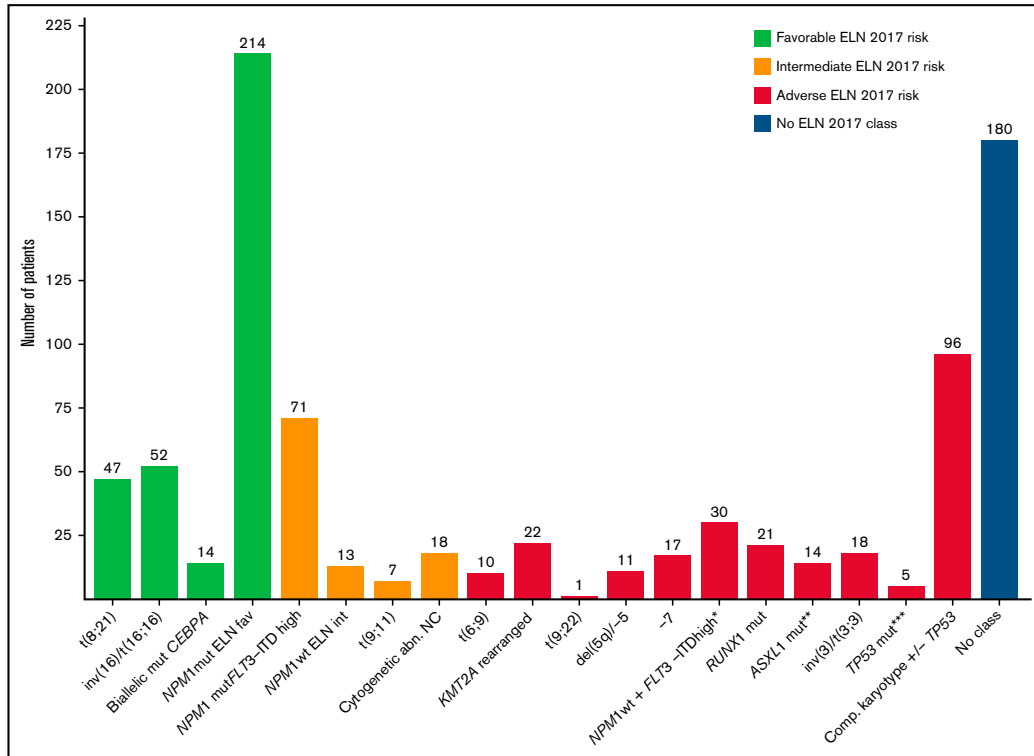


Figure 1. Distribution of patients with AML included in the study within the ELN 2017 risk categories. *Patients allocated to this category have been identified by NPM1 and FLT3-ITD mutational status. **Patients with ASXL1 mutation without RUNX1 mutation. ***Patients with TP53 mutation or abn(17p) without complex karyotype.

CR at the time of transplant (14% vs 6%; $P = .04$). Concerning conditioning intensity and donor type, 48% of patients received a myeloablative regimen, and an unrelated donor was used in 45% of transplant procedures. As a consequence of this risk-adapted transplant policy, median time from CR to alloSCT was similar for intermediate- and high-risk categories (2.9 and 3.1 months, respectively), and longer for favorable-risk patients (11.7 months).

OS after alloSCT was similar in favorable- and intermediate-risk patients and worse in adverse-risk patients (OS at 2 years of 71% and 67% in favorable- and intermediate-risk vs 47% in adverse-risk patients; $P < .001$). Relapse risk increased with ELN 2017 risk category, whereas NRM after transplant was comparable among groups (Figure 5; Table 3).

Identification of a very-adverse-risk subgroup within the adverse ELN 2017 category

Considering the wide biological heterogeneity within the ELN 2017 adverse-risk category, we analyzed the outcome of the genetic entities included (supplemental Material). Indeed, some AML subtypes of the ELN 2017 adverse-risk category showed an exceptionally poor prognosis (very adverse risk, ELN Adv+), differentially worse

than that of the remaining patients of the adverse-risk category (ELN Adv-). These very-adverse-risk subtypes were as follows: AML with *inv(3)(q21.3q26.2)* or *t(3;3)(q21.3q26.2)*, leading to deregulation of *GATA2* and *MECOM (EVI1)* genes ($n = 18$), and AML with mutated *TP53* and/or 17p abnormalities and AML with complex karyotype ($n = 119$, 49%; supplemental Figure 9.1). The complex karyotype subgroup included a high number of patients with *del(17p)/-17*, *del(5q)/-5*, and/or monosomal cytogenetic abnormalities (supplemental Table 8; supplemental Figure 8.1). ELN Adv+ patients had a higher proportion of male patients and presented with a lower leukocyte count and bone marrow blast infiltration at diagnosis.

Patients included in the ELN Adv+ subgroup showed a lower proportion of responders to frontline therapy (60% vs 81% for ELN Adv+ and ELN Adv-, respectively; $P < .001$), a lower proportion of patients amenable to alloSCT in CR1 (46% vs 75% for ELN Adv+ and ELN Adv-, respectively; $P < .001$), and a higher CIR (75% vs 35% at 2 years for ELN Adv+ and ELN Adv-, respectively; $P < .001$). As a consequence, OS and EFS were significantly worse in the ELN Adv+ group, compared with Adv-, with 2- and 5-year estimates of 15% and 10% vs 49% and 36% for OS

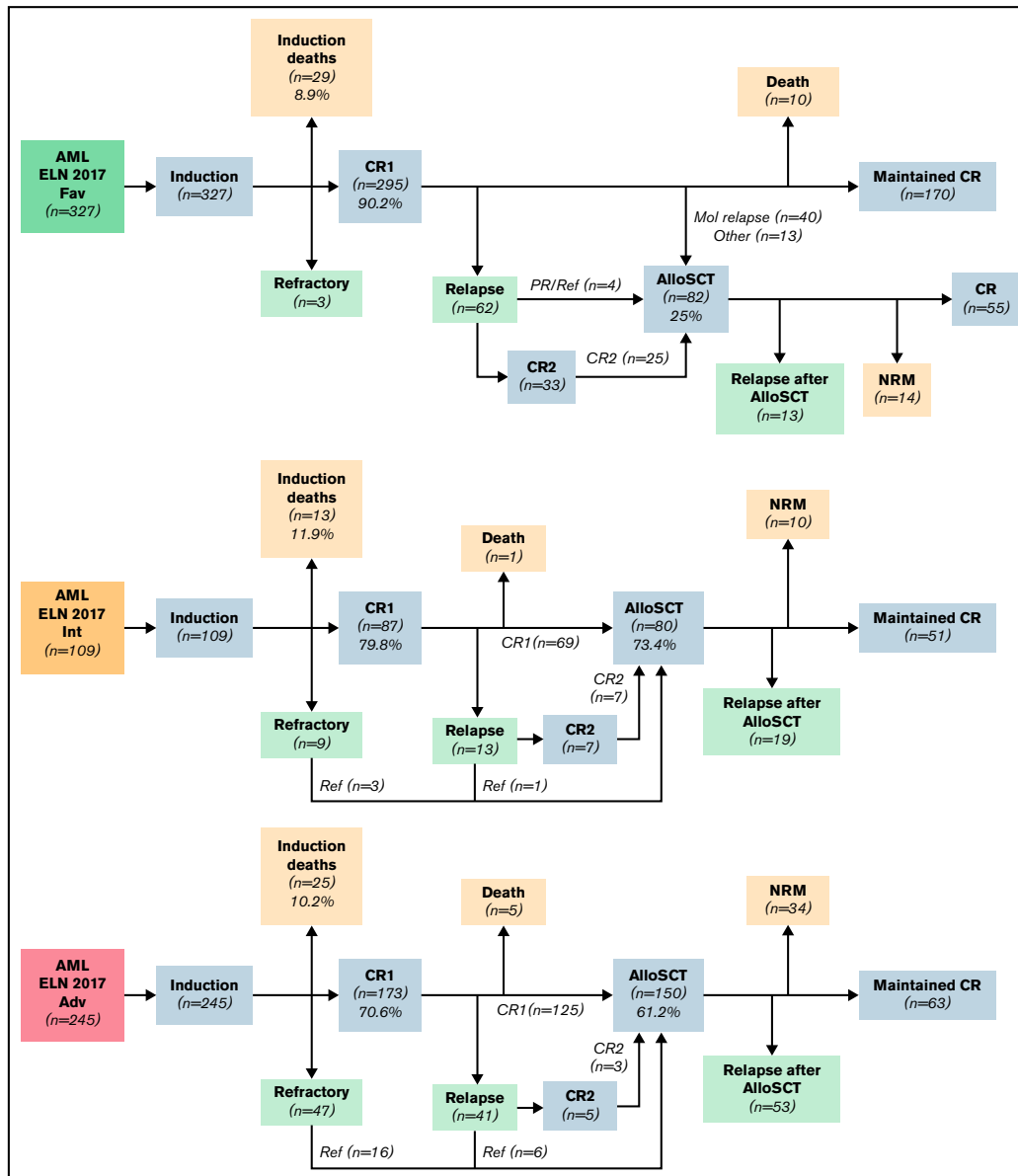


Figure 2. Treatment disposition of patients according to responses and outcomes of patients of each ELN 2017 risk category.

($P < .001$) and 3% (2- and 5-year) vs 33% and 28% for EFS ($P < .001$), respectively. This different outcome between subgroups was confirmed regardless of the age range analyzed (<60 vs ≥ 60

years) and was more evident in the younger patient population (2- and 5-year OS: 61% and 50% vs 24% and 15%; $P < .0001$; supplemental Figure 9.5).

Table 2. Outcomes at 2 and 5 years of the overall study population and detailed for each ELN 2017 risk category

	OS, % (SE)	EFS, % (SE)	Cumulative incidence of relapse, % (SE)	Cumulative incidence of NRM, % (SE)
All patients	2 y, 54.2 (1.8)	2y, 41.7 (1.8)	2y, 35.1 (1.9)	2y, 10.8 (1.2)
	5 y, 44.4 (2)	5y, 35.9 (1.9)	5y, 39.1 (2.1)	5y, 13.6 (1.5)
ELN 2017 favorable	2 y, 77.3 (2.4)*	2 y, 66.5 (2.7)*	2 y, 22.7 (2.6)*	2 y, 3.5 (1.1)*
	5 y, 70.3 (3)	5 y, 59.6 (3.1)	5 y, 27.7 (3)	5 y, 6.8 (1.8)
ELN 2017 intermediate	2 y, 51.8 (5.2)	2 y, 36.7 (5)	2 y, 36.9 (5.7)	2 y, 10.4 (3.5)
	5 y, 45.7 (6.1)	5 y, 30.6 (5.9)	5 y, 39.5 (6.1)	5 y, 14.2 (5.1)
ELN 2017 adverse	2 y, 32.5 (3.2)	2 y, 18 (2.7)	2 y, 51.5 (4.1)	2 y, 18.5 (3.1)
	5 y, 23.1 (3.2)	5 y, 15.4 (2.7)	5 y, 52.6 (4.1)	5 y, 20.7 (3.4)

SE, standard error.

**P* < .001.

Moreover, this different outcome was maintained in patients who could receive an alloSCT in CR1, with a 2-year OS after alloSCT of 28% vs 58% and CIR at 2 years of 61% vs 21% for patients of the ELN Adv+ and ELN Adv-, respectively, without significant difference in terms of NRM (Figure 6C-D). Additional comprehensive information comparing ELN Adv+ and ELN Adv- is provided in the supplemental Material. Interestingly, when ELN Adv- and ELN Adv+ categories were analyzed together with the remaining ELN 2017 risk groups, the outcome of the ELN Adv- group overlapped with that of ELN 2017 intermediate-risk group, whereas the outcome of ELN Adv+ was markedly poorer than the remaining category. Thus, 4 prognostic groups could be clearly distinguished, although the ELN 2017 intermediate-risk group and the ELN Adv- group did not show statistically significant differences regarding OS or EFS (Figure 6).

Discussion

In this study, we validated the prognostic ability of the current AML ELN risk classification in a cohort of patients treated under the same risk-adapted protocol (CETLAM-12). This protocol prospectively assigned a postremission strategy based on the genetic risk evaluation at diagnosis, largely resembling that proposed by ELN 2017. Despite this risk-adapted post-CR strategy, ELN categories segregated groups of patients with a markedly diverse outcome, with a 5-year OS of 70%, 46%, and 23%, respectively, mainly as a result of the different initial response rate and relapse risk. Remarkably, we were able to identify a high-risk subset within ELN adverse category, the ELN very adverse risk (ELN Adv+), with a significantly poorer outcome, with a 5-year OS of less than 10%. On the contrary, the outcome of the remaining ELN unfavorable patients not included in this very-high-risk subset showed a comparable outcome to that of ELN intermediate-risk patients. These results support a refinement of the ELN classification with the recognition of this very-poor-risk subset and warrant the design of specific novel therapeutic approaches aimed to improve the outcome of these patients.

Patients allocated to the ELN 2017 favorable category were confirmed to have a relatively good outcome, with a 5-year OS and CIR of 71% and 28%, respectively. Although alloSCT was not preplanned in this subgroup, following previous recommendations,^{17,18} approximately one quarter of patients received an alloSCT, mostly because of molecular failure. This preemptive intervention based on MRD kinetics, might result in an overall clinical benefit. This had

been suggested by a previous study performed by our group in ELN-favorable patients with an *NPM1* mutation, showing an improved outcome for patients treated at the time of molecular failure status compared with hematologic relapse.¹⁷ A similar observation has been described in patients with core-binding factor-rearranged AML, in whom a preemptive intervention could lead to a survival improvement.¹⁸ Because most patients in this group harbor a molecular marker amenable to quantitative MRD monitoring (ie, quantitative detection of mutated *NPM1* or *RUNX1/RUNX1T1* and *CBFB/MYH11* fusion genes), a preemptive MRD-driven policy could be offered to most patients in this category.¹⁹ This preemptive strategy translated into a favorable EFS of 67% and relatively low relapse incidence of 23% at 2 years, presumably because this preemptive intervention, which included an allo-SCT for molecular failure in 40 patients, prevented the emergence of an overt hematologic relapse in a significant proportion of these patients. Interestingly, we also confirmed our previous observation regarding the comparable outcome of patients with *NPM1* mutation without *FLT3*-ITD or those with a *FLT3*-ITD mutation with a low allelic ratio, supporting their inclusion in this favorable category and reinforcing our MRD surveillance policy to prevent overt relapses¹⁰ (supplemental Material). A recent study performed in the CALGB has proposed a refined ELN classification according to specific comutation patterns. Thus, the presence of *WT1* mutations in *NPM1*-mutated AML or *SETBP1* and *BCOR* in non-CBF ELN-favorable patients was associated with a worse outcome, and the authors proposed the reallocation of these patients to the adverse- and intermediate-risk group, respectively.²⁰ Whether an MRD-driven preemptive treatment might overcome the negative prognostic impact of these markers is unknown.

As expected, ELN-defined adverse-risk features identified AML entities incurable for most patients, with a lower response rate to initial chemotherapy, a 5-year OS of only 23%, and a relapse risk as high as 53%. These patients represent a current clinical challenge with the need to explore new drugs.²¹ The category is, however, highly heterogeneous, with diverse genetic lesions with distinct leukemogenic mechanisms, such as *KMT2A* rearrangements, a *DEK-NUP98* fusion gene, or point mutations of *TP53*, *ASXL1*, or *RUNX1* genes. Accordingly, we identified a very-poor-risk subset, defined by the presence of *inv(3)(t(3;3))* with *GATA2-MECOM1* rearrangement or a complex karyotype, highly enriched in cases with loss of chromosomal material at 5q, 7q, and/or 17p, presumably involving *TP53* mutation in many cases. This subgroup (ELN

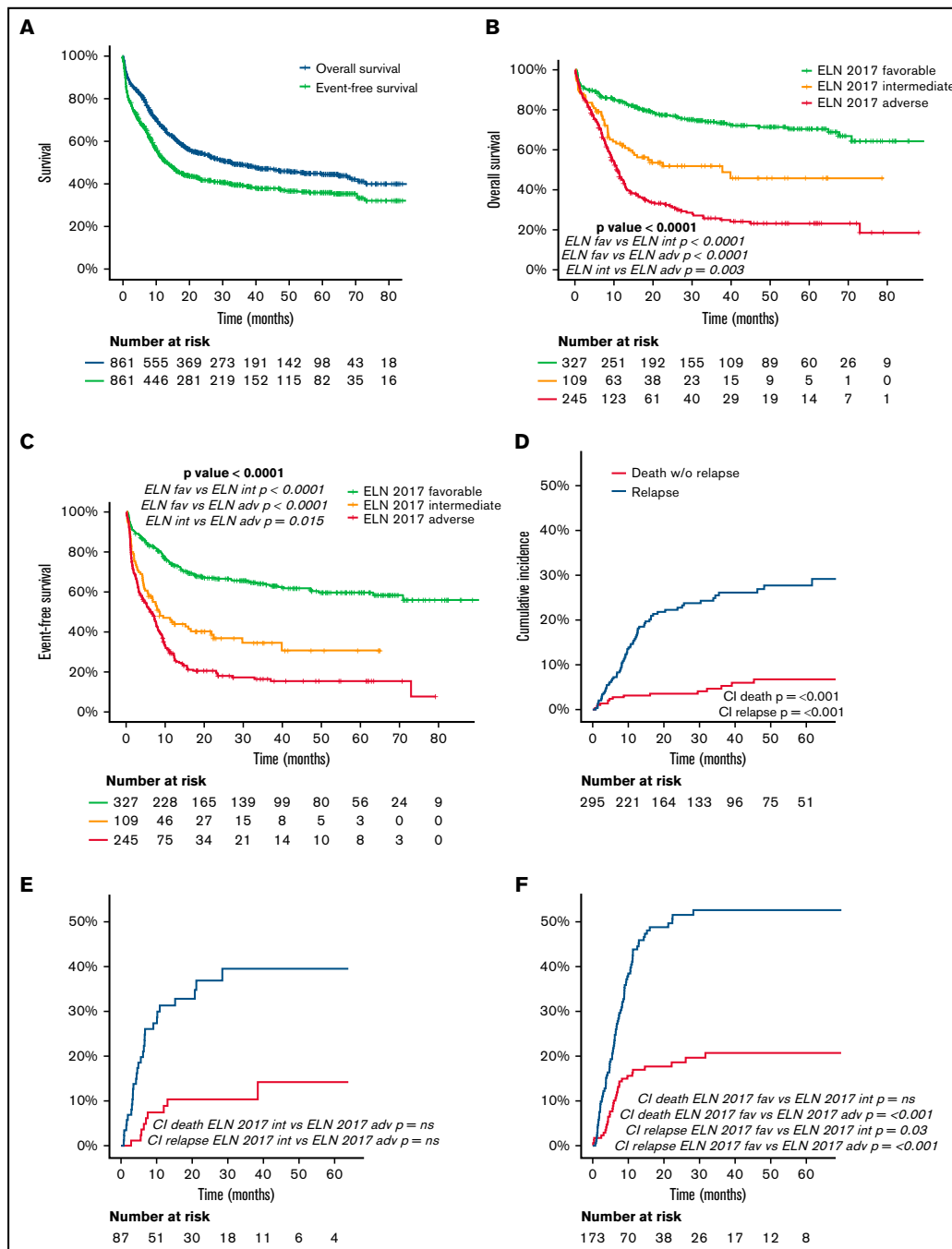


Figure 3. (A) OS and EFS of the entire cohort. (B) OS according to ELN 2017 risk category. (C) EFS according to ELN 2017 risk category. (D-F) CIR and death without relapse of patients allocated in the ELN 2017 favorable (D), intermediate (E), and adverse (F) risk category. Pairwise comparison of OS, EFS, and CI has been adjusted with the Bonferroni method.

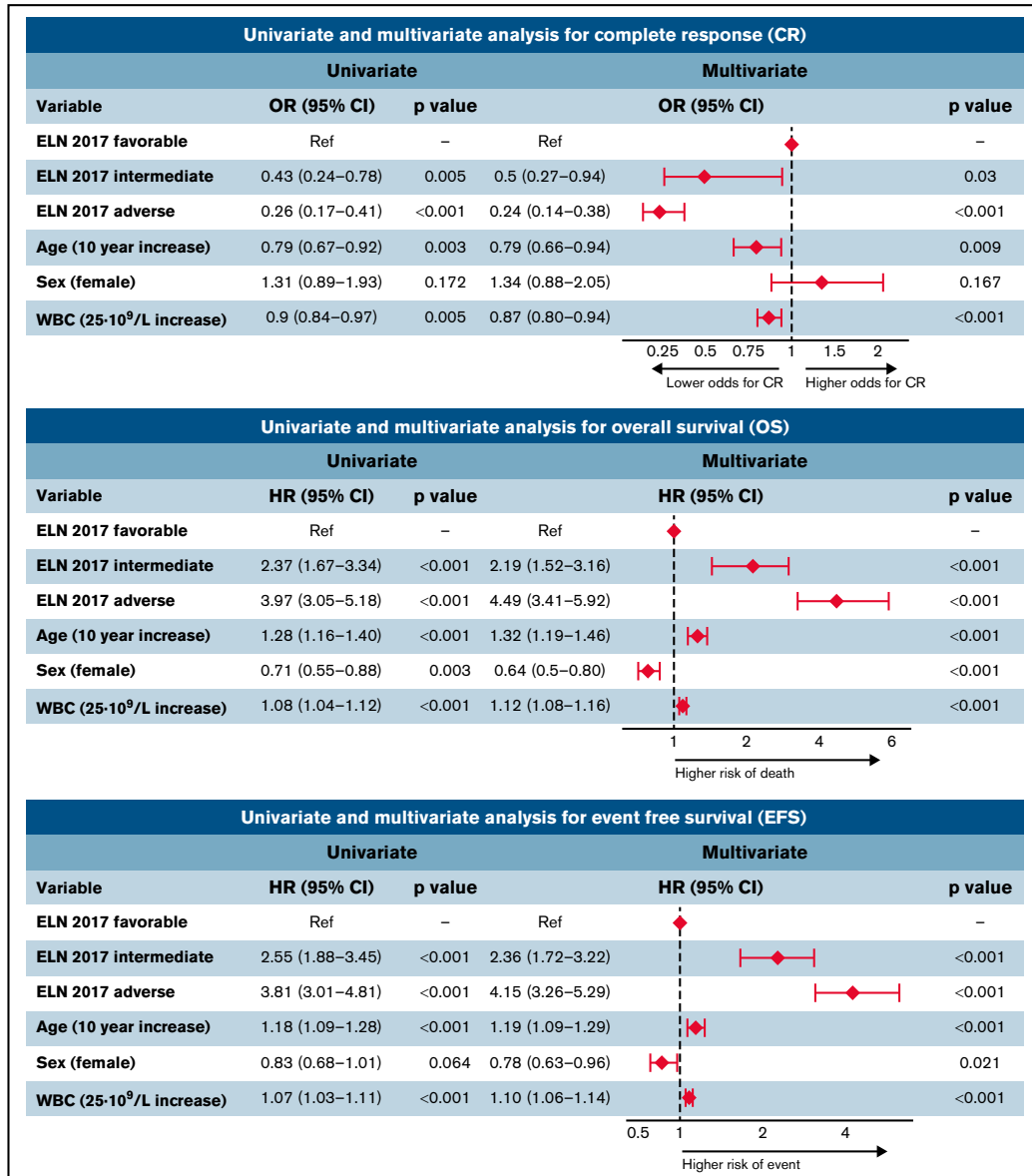


Figure 4. Univariate and multivariate analysis for CR, OS, and EFS. OR, odds ratio; HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

Adv+) showed a 5-year OS of less than 10%. A high proportion of these patients, more than 50%, do not achieve a planned alloSCT because of lack of response, and those who proceed to alloSCT have a high relapse risk after transplant. When we reanalyzed this

adverse-risk category, split between this very-adverse-risk subgroup (ELN Adv+) and the remaining cases of the adverse-risk cohort, the outcome of both adverse-risk groups was markedly different, and in fact, the ELN Adv- group overlapped with the patients with

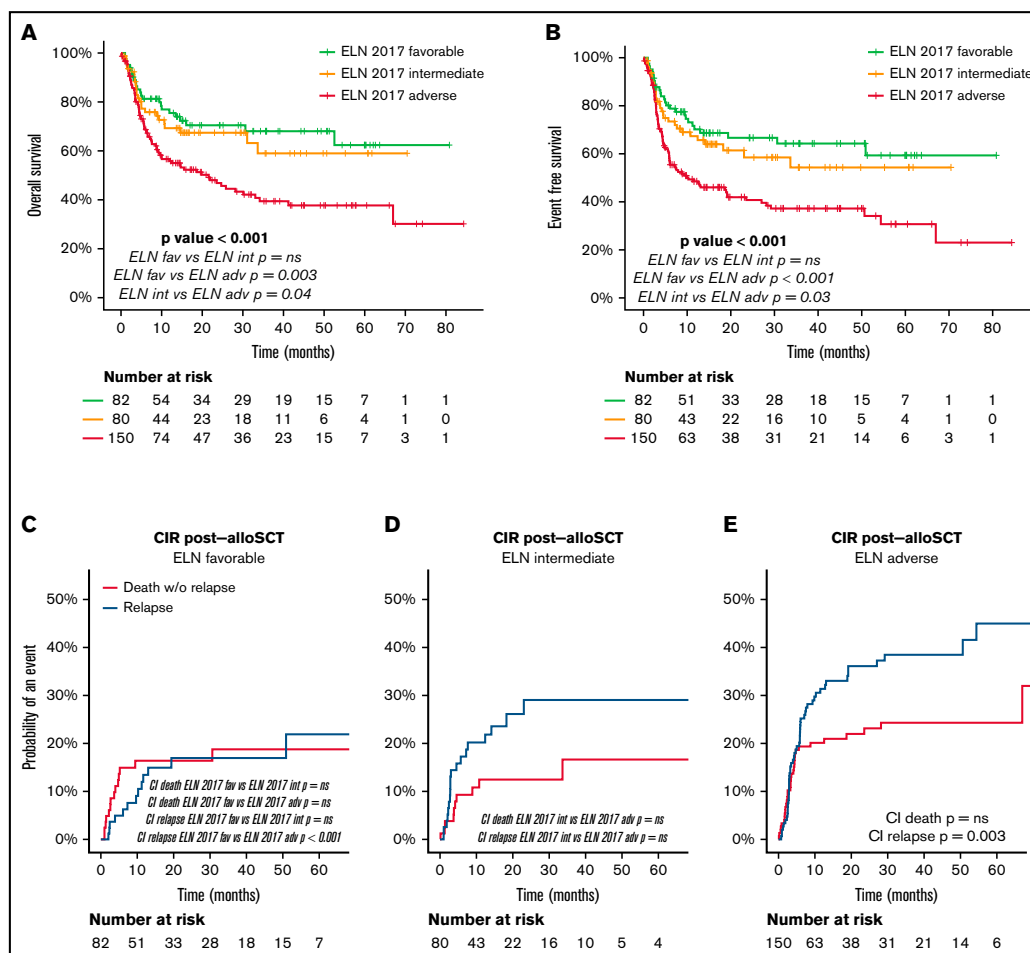


Figure 5. (a) OS after alloSCT according to the ELN 2017 risk categories. (B) EFS after alloSCT according to the ELN 2017 risk categories. (C-E) CI of relapse and death without relapse of patients allocated in the ELN 2017 favorable (C), intermediate (D), and adverse (E) risk category. Pairwise comparison of OS, EFS, and CIR has been adjusted with the Bonferroni method. Starting time for the analysis is the date of alloSCT.

intermediate-risk AML (Figure 6). This observation suggests that the treatment planning according to our protocol, with an alloSCT early after CR, could benefit patients from the ELN Adv⁻ subgroup but only a small fraction of patients from the ELN Adv⁺ category. In fact, both AML subgroups contained in this ELN Adv⁺ represent distinct biological entities, and their particularly poor outcome has been previously recognized. A large part of the leukemogenic process driven by the *GATA2-MECOM (EVI1)* rearrangement, leading to *GATA2* haploinsufficiency and *MECOM (EVI1)* deregulated expression, has been well characterized.²²⁻²⁵ This entity has been associated with a very poor outcome, and the limited role of alloSCT in this context has been specifically analyzed.^{22,26,27} On

the other hand, the poor prognosis of complex karyotype in AML seems, in part, explained by the frequent coexistence of *TP53* multi-hit mutations inducing a loss of the functional wild-type *TP53* protein, leading to chemoresistance, as recently recognized in myelodysplastic syndromes.²⁸ Unfortunately, as a limitation of our study, we were not able to determine the proportion of patients from the complex karyotype/*TP53* subset that corresponded to a biallelic *TP53* mutation. Similarly, the adverse outcome even after alloSCT of frequent cytogenetics such as $-5/\text{del}(5q)$, $-7/\text{del}(7q)$, $17p$, and/or *TP53*, in the context of a complex karyotype, has been directly addressed and confirmed in recent studies.²⁹⁻³¹ Given the poor outcome obtained with the standard approach based on

Table 3. Outcomes after alloSCT according to the ELN 2017 risk stratification

	OS after alloSCT, % (SE)	EFS after alloSCT, % (SE)	CIR after alloSCT, % (SE)	Cumulative incidence of death without relapse after alloSCT, % (SE)
All patients	2 y, 58.2 (2.6)	2y, 52.5 (2.7)	2y, 26.7 (2.3)	2y, 20.8 (2.1)
ELN 2017 favorable	2 y, 70.5 (5.4)*	2 y, 66.6 (5.6)*	2 y, 17 (4.6) [†]	2 y, 16.4 (4.2)NS
ELN 2017 intermediate	2 y, 67.4 (5.7)	2 y, 58.5 (6.4)	2 y, 29 (6.1)	2 y, 12.5 (4)
ELN 2017 adverse	2 y, 46.9 (4.5)	2 y, 40.8 (4.4)	2 y, 36.1 (4.2)	2 y, 23.1 (3.6)

NS, not significant; SE, standard error.

**P* < .001.[†]*P* < .01.

intensive AML-type chemotherapy and alloSCT, the recognition of this subset with very poor prognosis could be essential for the design of novel therapeutic approaches. Potential innovative strategies to improve outcomes of this AML subgroup should focus on pretransplant treatment to increase the response rate and prevent early relapse, as well as maintenance after alloSCT to enhance the graft-versus-leukemia effect and avoid posttransplant relapse.³² Novel current available agents, approved for AML, could contribute to improve outcome of high-risk patients obtained with intensive chemotherapy. Specifically, 1:5 daunorubicin/cytarabine liposomal formulation CPX-351 has demonstrated its role in elderly patients diagnosed with AML with myelodysplasia-related changes, with a clear impact on those patients bridged to alloSCT after treatment with this agent.³³ Similarly, the combination of venetoclax with azacitidine has been established as the standard of care in patients not candidate to intensive chemotherapy; its role in younger patients, combined with intensive chemotherapy and other agents, is now being explored.^{34,35} More recently, investigational agents such as epenatopopt (APR-246) magrolimab (monoclonal antibody directed against macrophage immune checkpoint CD47), or flotetuzumab (bispecific DART antibody molecule to CD3 and CD123) have shown promising activity in patients with very high-risk genetic features, including *TP53* mutation, and should be explored in therapeutic algorithms for higher-risk patients.³⁶⁻³⁸

The current intermediate-risk group represents the smallest category, involving less than 20% of all patients, being highly enriched in *FLT3*-ITD. This low proportion of intermediate-risk patients can be attributed, in part, to the nonclassifiable group composed of patients not harboring a cytogenetic or PCR-based genetic ELN defining category and without available NGS testing. Presumably, and based on other large series providing accurate information on the frequency of *RUNX1*, *ASXL*, and *TP53* sole mutations, the largest part of this nonclassifiable subgroup must correspond to intermediate-risk patients. With the assumption of 70% of nonclassifiable patients as intermediate-risk patients, approximately 29% of our study population would correspond to the ELN intermediate-risk category, a proportion similar to that found in other large cooperative groups.^{7,20} Because the use of *FLT3* inhibitors was minimal in this patient cohort, the impact of the generalized use of midostaurin (or alternative *FLT3* inhibitors) should be reanalyzed in future studies. These targeted *FLT3* inhibitors have been shown to improve outcomes in patients with *FLT3*-mutated AML and could lead to the need of risk group reallocation in the future.³⁹ In addition, this category includes patients with cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse, as well as patients without *NPM1* mutation

and adverse-risk genetic lesions, which are biologically heterogeneous.^{29,40} In this context, further knowledge on the prognostic impact of additional markers and gene mutation interactions, such as the deleterious effect associated with *BCOR*, *SETBP1*, *ZRSR2*, or *DNMT3A* mutations might contribute to redefine the current classification in future updates, as suggested by Eisefeld et al²⁰ from the CALGB network.⁴¹

The ELN 2017 classification was proposed by a panel of experts refining the previous ELN 2010 prognostic stratification, collapsing the 2 intermediate subgroups into a unique category and including the contemporary evidence on individual markers with independent prognostic value in different studies.^{3,4} Its validation has been retrospectively performed in a few studies that confirmed, with some limitations, the ELN 2017 clinical value.^{7-9,20} These studies differ in the patient population included (up to 60 years in 3 of these 4 studies) and the treatment protocol used, and, most importantly, they did not include a ELN category-based transplant policy. Nonetheless, all these studies were able to confirm its prognostic impact and proposed some refined definitions. Herold et al⁷ also identified a very poor outcome among patients with *TP53* mutation and complex karyotype and highlighted the negative impact of *DNMT3A* mutations within every ELN 2017 risk group. The aforementioned study by Eisefeld et al²⁰ reallocated specific subgroups of patients according to specific mutations (eg, *BCOR* and *SETBP1* in non-CBF favorable AML and *IDH*-mutated adverse risk patients should be redefined as intermediate-risk AML; *WT1* and *ZRSR* mutation in *NPM1*-mutated AML confer an adverse prognosis). With our analysis, we contribute to validate the ELN prognostic stratification, based on a prespecified treatment protocol for patients eligible to intensive chemotherapy up to 70 years and with a predefined alloSCT policy, which provides useful information about this risk classification in the setting of planned alloSCT.

In conclusion, the current ELN 2017 risk classification is able to segregate groups of patients with a different prognosis and is useful to guide postremission alloSCT indications. Moreover, the current analysis confirms that these outcome differences among ELN categories persist even after predefined, risk adapted postremission strategies, establishing alloSCT in first complete remission for all suitable patients with a nonfavorable risk. The poor outcome observed in adverse-risk patients, and especially among ELN Adv+, despite alloSCT, warrants the investigation of experimental strategies aimed to improve pretransplant response depth and prevent relapse after transplantation. Additionally, an accurate clinical use of MRD monitoring can complement the information provided by genetic characterization at diagnosis and identify patients from the

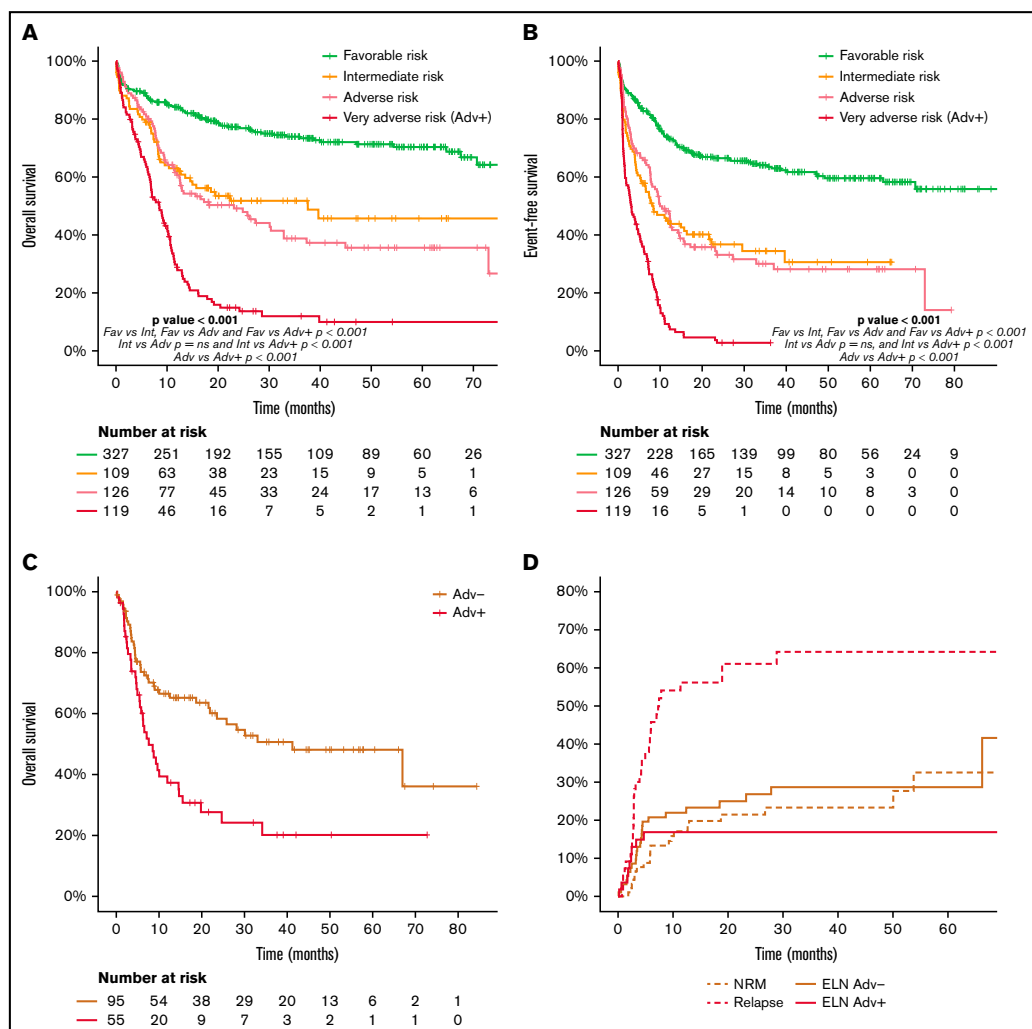


Figure 6. (A) OS and (B) EFS of the ELN 2017 risk groups stratifying the ELN 2017 adverse risk patients in the 2 proposed groups (ELN Adv- and very adverse risk/ELN Adv+). Pairwise comparison of OS and EFS has been adjusted with the Bonferroni method. Outcome after alloSCT in both ELN Adv subgroups in terms of OS (C) and CIR and NRM (D).

favorable-risk category who can benefit from an alloSCT in CR1. Finally, our study confirmed the existence of a very-poor-risk subset among adverse-risk patients who deserve specific investigation of novel therapeutic approaches that might overcome the limitations of the current standard plan.

Acknowledgments

This study was supported (in part) by Fondo de Investigaciones Sanitarias/Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) grants PI16/01027, PI19/1476, and PI20/01621; PERIS

from Generalitat de Catalunya grants SLT002/16/00433, SGR 1655, and SGR 1395; resident award “Emili Letang” 2019 (Hospital Clínic de Barcelona); and “Beca de Investigación FEHH 2019” (Fundación Española de Hematología y Hemoterapia).

Authorship

Contribution: A.B., A.G., F.G., G.O., M.D.-B., M.A., M.T., S.V., M.P.Q.d.L., R.C., D.G., F.-V.L., L.E., A.G.-G., O.S., A.S., B.M.M., J.B., S.C., and A.O.-C. collected the clinical data. M.L.-G., M.P., L.Z.,

J.F.N., D.C., M.R., and D.C. performed the cytogenetic and molecular tests. A.B., G.O., M.D.-B., F.G., A.R., P.M., S.B., J.S., and J.E. analyzed the data and wrote the manuscript. All authors reviewed and accepted the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: J.S. reports advisory and speaker fees for Abbvie, Astellas, Jazz Pharmaceuticals, Novartis, and CSL Behring and grant support from Astellas, Novartis, Amgen, Jansen, Pfizer, and Jazz Pharmaceuticals. J.E. reports consultancy for Abbvie, Novartis, Astellas, Pfizer, and Jazz Pharmaceuticals and grand support from Novartis and Jazz Pharmaceuticals. All other authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: A.B., 0000-0002-6085-2745; F.G., 0000-0001-6376-0929; G.O., 0000-0003-2180-2371; R.C., 0000-0003-0560-1254; F.-V.L., 0000-0002-0718-5955; A.S., 0000-0001-7465-6203; B.M.M., 0000-0002-6733-6006; S.C.-D., 0000-0001-9044-4665; D.E., 0000-0001-8897-3170; A.O.-C., 0000-0002-7921-5420; A.R., 0000-0002-4233-5031; P.M., 0000-0001-9528-4971; M.P., 0000-0001-6375-596X; J.E., 0000-0002-8056-648X.

Correspondence: Alex Bataller, Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; e-mail: abataller@clinic.cat; or Jordi Esteve, Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; e-mail: jesteve@clinic.cat.

References

- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152.
- Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al; International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21(24):4642-4649.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, et al; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-474.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447.
- Röllig C, Bornhäuser M, Thiede 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*. 2011;29(20):2758-2765.
- 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(36):4515-4523.
- Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald VV, et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(12):3161-3172.
- Boddu PC, Kadia TM, Garcia-Manero G, et al. Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-internal tandem duplication genotypes. *Cancer*. 2019;125(7):1091-1100.
- Harada Y, Nagata Y, Kihara R, et al; Japan Adult Leukemia Study Group JALSG. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leuk Res*. 2018; 66(66):20-27.
- Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, et al; Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas. 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(14):2734-2738.
- Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103-1108.
- Benthaus T, Schneider F, Mellert G, et al. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2008; 143(2):230-239.
- Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials*. 1996;17(4):343-346.
- Delgado J, Pereira A, Villamor N, López-Guillermo A, Rozman C. Survival analysis in hematologic malignancies: recommendations for clinicians. *Haematologica*. 2014;99(9):1410-1420.
- Medeiros BC. Interpretation of clinical endpoints in trials of acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2018;68(January):32-39.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in AML Younger adult patients treated in UKMRC. *Blood*. 2010; 116(3):354-366.
- Bataller A, Oñate G, Diaz-Beyá M, et al; Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM). Acute myeloid leukemia with NPM1 mutation and favorable European LeukemiaNet category: outcome after preemptive intervention based on measurable residual disease. *Br J Haematol*. 2020;191(1):52-61.
- Yalniz FF, Patel KP, Bashir Q, et al. Significance of minimal residual disease monitoring by real-time quantitative polymerase chain reaction in core binding factor acute myeloid leukemia for transplantation outcomes. *Cancer*. 2020;126(10):2183-2192.
- Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-1291.

20. Eisfeld A-K, Kohlschmidt J, Mims A, et al. Additional gene mutations may refine the 2017 European LeukemiaNet classification in adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged <60 years. *Leukemia*. 2020;34(12):3215-3227.
21. DiNardo CD, Wei AH. How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs. *Blood*. 2020;135(2):85-96.
22. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, et al. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3890-3898.
23. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, et al. A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. *Cell*. 2014;157(2):369-381.
24. Katayama S, Suzuki M, Yamaoka A, et al. GATA2 haploinsufficiency accelerates EVI1-driven leukemogenesis. *Blood*. 2017;130(7):908-919.
25. Yamaoka A, Suzuki M, Katayama S, Orihara D, Engel JD, Yamamoto M. EVI1 and GATA2 misexpression induced by inv(3)(q21q26) contribute to megakaryocyte-lineage skewing and leukemogenesis. *Blood Adv*. 2020;4(8):1722-1736.
26. Halaburda K, Labopin M, Houhou M, et al. AlloHSCT for inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26) AML: a report from the acute leukemia working party of the European society for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(6):683-691.
27. Sitges M, Boluda B, Garrido A, et al; PETHEMA, CETLAM Cooperative Groups. Acute myeloid leukemia with inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2): Study of 61 patients treated with intensive protocols. *Eur J Haematol*. 2020;105(2):138-147.
28. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, et al. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes [corrections published in *Nat Med*. 2021;27:562 and 927]. *Nat Med*. 2020;26(10):1549-1556.
29. Papaemmanuil E, Döhner H, Campbell PJ. Genomic classification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2016;375(9):900-901.
30. Mrózek K, Eisfeld AK, Kohlschmidt J, et al. Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically. *Leukemia*. 2019;33(7):1620-1634.
31. Britt A, Mohyuddin GR, McClune B, et al. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome with chromosome 17 abnormalities and long-term outcomes with or without hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res*. 2020;95:106402.
32. Thekkudan SF, Lima M, Metheny L. Prevention of relapse after allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: Updates and challenges. *Adv Cell Gene Ther*. 2020;3(2):1-18.
33. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(26):2684-2692.
34. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al. Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(7):617-629.
35. DiNardo CD, Lachowicz CA, Takahashi K, et al. Venetoclax combined with FLAG-IDA induction and consolidation in newly diagnosed and relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2021;39(25):2768-2778.
36. Cluzeau T, Sebert M, Rahmé R, et al. Eprenetapopt plus azacitidine in TP53-mutated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: a phase II study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). *J Clin Oncol*. 2021;39(14):1575-1583.
37. Uy GL, Aldoss I, Foster MC, et al. Flotetuzumab as salvage immunotherapy for refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2021;137(6):751-762.
38. Sallman DA, Asch AS, Al Malki MM, et al. The first-in-class anti-CD47 antibody magrolimab (5F9) in combination with azacitidine is effective in MDS and AML patients: ongoing phase 1b results. *Blood*. 2019;134(suppl 1):569.
39. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-464.
40. Eisfeld AK, Mrózek K, Kohlschmidt J, et al. The mutational oncoprint of recurrent cytogenetic abnormalities in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(10):2211-2218.
41. Oñate G, Batailler A, Garrido A, et al. Prognostic impact of DNMT3A mutation in acute myeloid leukemia with mutated NPM1 [published online ahead of print 13 September 2021]. *Blood Adv*. doi: 10.1182/bloodadvances.2020004136.

2.3. Material suplementario del segundo artículo

SUPPLEMENTARY MATERIAL

European LeukemiaNet 2017 risk stratification for acute myeloid leukemia: validation in a risk-adapted protocol

Alex Bataller^{1,16}, Ana Garrido^{2,16}, Francesca Guijarro¹, Guadalupe Oñate^{2,16}, Marina Diaz-Beyá¹, Montserrat Arnan³, Mar Tormo⁴, Susana Vives⁵, María Paz Queipo de Llano⁶, Rosa Coll⁷, David Gallardo⁷, Ferran Vall-Llovera⁸, Lourdes Escoda⁹, Antonio Garcia-Guiñon¹⁰, Olga Salamero¹¹, Antònia Sampol¹², Brayan M. Merchan¹³, Joan Bargay¹⁴, Sandra Castaño-Díez¹, Daniel Esteban¹, Aina Oliver-Caldés¹, Andrea Rivero¹, Pablo Mozas¹, Mònica López-Guerra^{14,15}, Marta Pratcorona^{2,16}, Lurdes Zamora^{5,16}, Dolors Costa¹⁴, Maria Rozman¹⁴, Josep F. Nomdedéu^{2,16}, Dolors Colomer^{14,15}, Salut Brunet^{2,16}, Jorge Sierra^{2,16*} and Jordi Esteve^{1,16*}, on behalf of the Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM)

S1. CETLAM-12 protocol	4
S2. Participating centers	8
S3. NGS PANELS	9
S4. RISK CLASSIFICATION	10
S4.1.- Risk allocation method	10
S4.1.1.- Favorable ELN 2017 risk category:.....	11
S4.1.2.- Intermediate ELN 2017 risk category:.....	11
S4.1.3.- Adverse ELN 2017 risk category:.....	12
S4.2.- Ambiguous cases	13
S5. PATIENT CHARACTERISTICS	15
Figure S5.1.- Age distribution	15
Figure S5.2.- White blood cell (WBC) count distribution.....	15
Figure S5.3.- Hemoglobin (Hb) distribution	16
Figure S5.4.- Platelet count distribution.....	16
Figure S5.5.- ELN 2010 risk stratification	17
Figure S5.6.- ELN 2010 risk stratification	17
Figure S5.7.- Patients above or below 60 years old	18
Figure S5.8.- Sex distribution.....	18
S6. Patient responses and outcomes	19
Figure S6.1.- Response to induction	19
Figure S6.2.- Overall survival of ELN 2017 favorable group	19
Figure S6.3.- Overall survival of <i>NPM1</i> mut vs <i>NPM1</i> mut <i>FLT3</i> -ITD ^{low}	20
Figure S6.4.- Overall survival of ELN 2017 intermediate group	20
Figure S6.5.- Overall survival of ELN 2017 adverse group	21
Figure S6.6.- Overall survival of age <60 years vs ≥ 60 years	21
S7. AlloSCT characteristics	22

S8. Complex karyotypes	23
Figure S8.1.- Complex karyotype chromosomal abnormalities	27
S9. Very adverse-risk subgroup (ELN Adv+)	28
S10. Non-classifiable patients	32

S1. CETLAM-12 protocol

CETLAM-12 protocol is a risk-adapted protocol eligible for untreated, fit patients up to 70 years diagnosed with *de novo* AML, excluding patients with relapsed/refractory AML as well as acute promyelocytic leukemia.

All patients receive a timed-sequential induction chemotherapy with idarubicin (12 mg/m²/day on days 1 to 3) and cytarabine (200 mg/m²/day as continuous infusions on days 1 to 7) as well as granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) priming (150 µ/m²/day subcutaneous from day 0 to 7). Response is assessed with a bone marrow (BM) aspirate according to proposed criteria¹ at day 28 after treatment initiation or earlier if there is evidence of full hematopoietic recovery. Patients failing to achieve CR should receive salvage chemotherapy (not predefined scheme), although patients achieving PR received a second induction chemotherapy with the same scheme as the first one.

After achieving CR, all patients receive one consolidation course with high dose cytarabine (HDAC; 3 g/m² bid on days 1, 3 and 5, reduced to 1.5 g/m² bid for patients over 60). After the first consolidation patients were assessed and stratified according to genetic initial prognosis, based on MRC cytogenetic stratification and mutational status of *NPM1*, *FLT3*-ITD (including ITD/wt allelic ratio), and *CEBPA* genes, with the following risk categories^{2,3}:

Favorable risk: AML with t(8;21)(q22;q22);*RUNX1/RUNXT1*, inv(16)(p13;q12) or t(16;16)(p13;q12);*CBFβ/MYH11*, *NPM1* mutated with *FLT3*-ITD negative or low allelic burden (*FLT3*-ITD/*FLT3*wt <0.5), and *CEBPA* biallelic mutation (*CEBPA*adm).

Patients with these characteristics receive 2 additional consolidation courses with HDAC, and thereafter, relapse surveillance is assessed with bone marrow aspirates at a regular 3-month interval during at least 3 years after CR. Patients presenting *NPM1* mutation as well as *RUNX1/RUNXT1* or *CBFβ/MYH11* rearrangements were MRD monitored with RT-qPCR from RNA from bone marrow samples. Molecular failure or persistence was established as: detection of a copy number above $>10^{-4}$ ($>0.01\%$) regarding the copy number at diagnosis (*RUNX1/RUNXT1*), detection of a copy number >10 out of 10^4 copies of control gene (*ABL*), or detection of a copy number >0.05 *NPM1*mut/ 10^2 copies of control gene (*ABL*). Furthermore, all molecular failures/persistence were confirmed in a second sample, obtained 2-4 weeks after initial positive MRD, where an ascending kinetic needed to be demonstrated. Patients with borderline results or not clearly ascending were close monitored with BM MRD assessment. Patients with a confirmed molecular failure/persistence were eligible for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT), preceded or not by cytoreductive chemotherapy (treating physician's choice). Patients not eligible for alloSCT were treated with hypomethylating agents (azacytidine) or enrolled in available clinical trials.

Intermediate risk: patients harboring an intermediate karyotype according to MRC classification and lacking mutations in *NPM1*, *FLT3*-ITD, and *CEBPA*adm (Triple negative genotype).

Adverse risk: defined by the presence at diagnosis of unfavorable karyotype according to MRC classification, all *KMT2A*-rearranged AML subtypes, including t(9;11) and t(11;19), and t(6;9)(p23;q34);*DEK-NUP214*, and any other subtype harboring a *FLT3*-ITD, with the

exception of *NPM1*-mutated, low ratio *FLT3*-ITD as previously defined. Moreover, patients of favorable and intermediate risk with persistence of MRD after consolidation were re-allocated into the adverse risk category.

Patients of intermediate or unfavorable risk achieving and maintaining CR after first consolidation course are eligible for alloSCT. HLA-matched related donor is preferred for alloSCT (within 3 months after finishing HDAC), although this condition is not always possible. If no related donor is available, HLA-matched unrelated or haploidentical donor are chosen, according to the availability and experience of each treating center. Patients can receive an additional HDAC consolidation course, if there is a need in terms of timing, before alloSCT.

Since 2017, patients harboring *FLT3* mutation (either ITD or TKD) could receive adjuvant midostaurin (Rydapt®) during induction and consolidation phases (day +8 to day +21), depending on availability of this inhibitor in each treating center through a early-access program. Midostaurin was administered 50 mg bid on days 8 to 21 in each treatment course⁴.

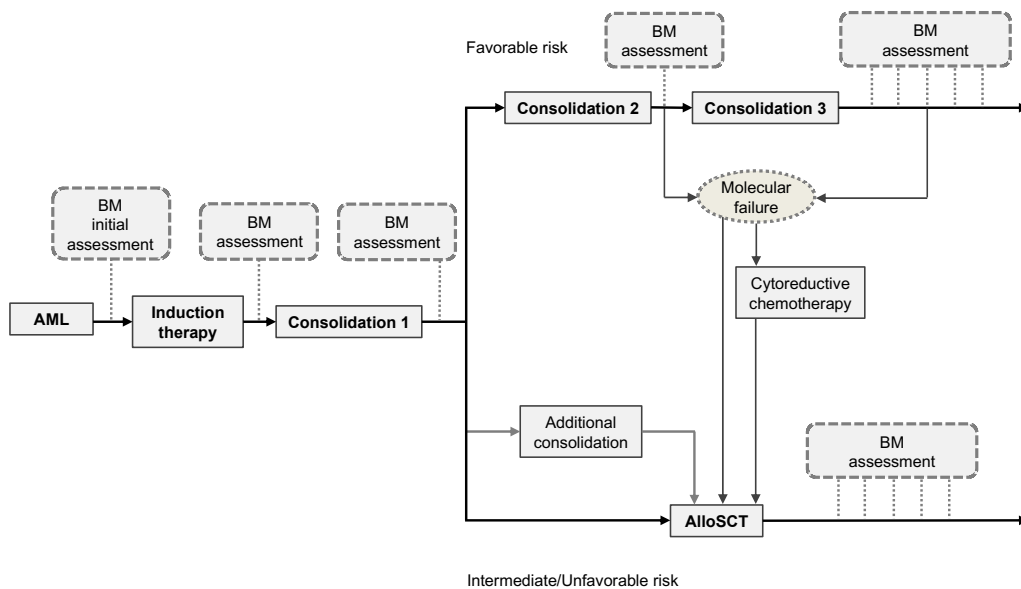


Figure S1.1.- Schematic view of CETLAM-12 protocol

	ELN 2010	ELN 2017	CETLAM-12	
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>			
	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>			
	Mutated <i>CEBPA</i> (normal karyotype)	Biallelic mutated <i>CEBPA</i>		
	Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype)	Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low}		
Intermediate	I	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype)	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high}	-
		Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype)	Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (without adverse-risk genetic lesions)	-
		Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> (normal karyotype)		-
	II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i>	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>	-
		Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
	Adverse	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM (EVI1)</i>	abn(3q) excluding t(3;5)(q21-25;q31-35); inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)
t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>		t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	
t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranged		t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged	
-5 or del(5q); -7; abn(17p); complex karyotype		-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p); Complex karyotype, monosomal karyotype	add(5q),del(5q),-5, -7, add(7q)/del(7q), 17/abn(17p); Complex karyotype, monosomal karyotype	
-		t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL1</i>	
-		Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high}	<i>FLT3-ITD</i> ^{high} with or without <i>NPM1</i> mutation	
-		Mutated <i>RUNX1</i> , <i>ASXL1</i> or <i>TP53</i>	-	

Table S1.1.- Schematic comparison of AML risk classifications: ELN 2010, ELN 2017 and CETLAM-12.

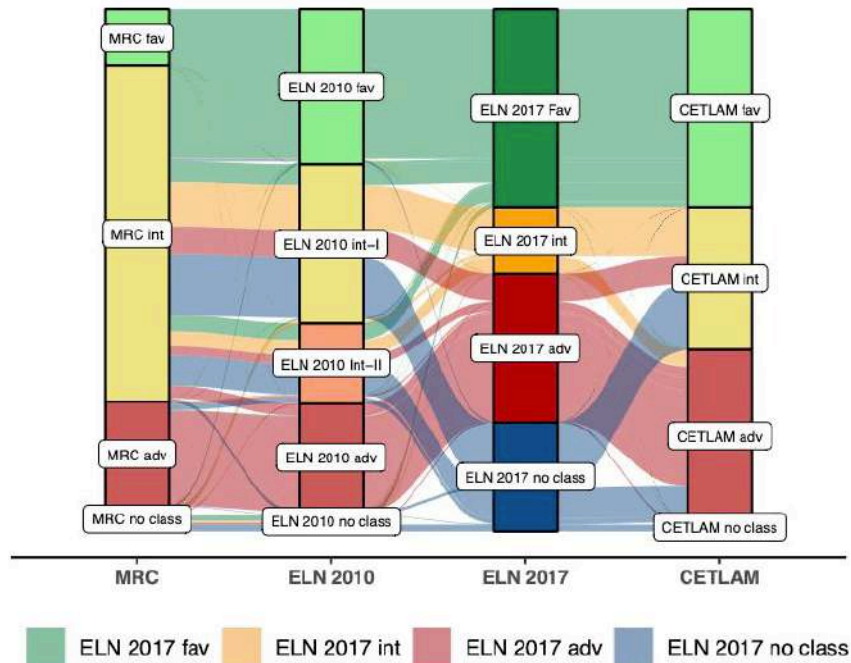


Figure S1.1.- Alluvial plot of the patients included in the study according to the different AML classifications.

References

1. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(24):4642–4649.
2. Grimwade D, Hills RK, Moorman A V, et al. Refinement of cytogenetic classification in AML_Younger adult patients treated in UKMRC. *Blood* 2010;116(3):354–366.
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(3):453–474.
4. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *N Engl J Med* 2017;377(5):454–464.

S2. Participating centers



- 1.- **Hospital Clínic de Barcelona.** Carrer de Villarroel, 170, 08036 Barcelona (Spain)
- 2.- **Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.** Carrer de Sant Quintí, 89, 08041 Barcelona (Spain)
- 3.- **Hospital Universitari Vall d'Hebron.** Passeig de la Vall d'Hebron, 119, 08035 Barcelona (Spain)
- 4.- **Hospital del Mar.** Passeig Marítim de la Barceloneta, 25-29, 08003 Barcelona (Spain)
- 5.- **Hospital Clínico Universitario de Valencia.** Avinguda Blasco Ibáñez, 17, 46010 Valencia (Spain)
- 6.- **Hospital Duran i Reynals - ICO L'hospitalet.** Avinguda de la Granvia de l'Hospitalet, 199, 08908 L'hospitalet de Llobregat, Barcelona (Spain)
- 7.- **Hospital Germans Trias i Pujol - ICO Badalona.** Carretera de Canyet, s/n, 08916 Badalona, Barcelona (Spain)
- 8.- **Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII.** Carrer Dr. Mallafrè Guasch, 4, 43005 Tarragona (Spain)
- 9.- **Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta.** Avinguda de França, s/n, 17007, Girona (Spain)
- 10.- **Hospital Universitari Mútua de Terrassa.** Carrer de Sant Antoni, 2, 08221 Terrassa, Barcelona (Spain)
- 11.- **Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida.** Avinguda Rovira Roure, 80, 25198, Lleida (Spain)
- 12.- **Hospital Universitari Son Espases.** Carretera de Valldemossa, 79, 07120 Palma - Illes Balears (Spain)
- 13.- **Hospital Universitari Son Llàtzer.** Carretera de Manacor, Km 4, 07198 Palma - Illes Balears (Spain)
- 14.- **Hospital Universitario Virgen de la Victoria.** Campus de Teatinos s/n. 29010 Málaga (Spain)
- 15.- **Hospital Verge de la Cinta.** Carrer de les Esplanetes, 44, 43500 Tortosa, Tarragona (Spain)

S3. NGS PANELS

Ion Ampliseq™ AML Research Panel (ThermoFisher Scientific)

- **Coding regions:** *CEBPA, DNMT3A, GATA2, TET2, TP53*
- **Hotspot regions:** *ASXL1, BRAF, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, NPM1, NRAS, PTPN11, RUNX1, WT1*

OncoPrint™ Myeloid Research Panel (ThermoFisher Scientific)

- **Coding regions:** *ASXL1, BCOR, CALR, CEBPA, ETV6, EZH2, IKZF1, NF1, PHF6, PRPF8, RB1, RUNX1, SH2B3, STAG2, TET2, TP53, ZRSR2*
- **Hotspot regions:** *ABL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, FLT3, GATA2, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NPM1, NRAS, PTPN11, SETBP1, SF3B1, SRSF2, U2AF1, WT1*
- **Genes involved in gene fusions:** *ABL1, ALK, BCL2, BRAF, CCND1, CREBBP, EGFR, ETV6, FGFR1, FGFR2, FUS, HMGA2, JAK2, KMT2A, MECOM, MET, MLLT10, MLLT3, MYBL1, MYH11, NTRK3, NUP214, PDGFRA, PDGFRB, RARA, RBM15, RUNX1, TCF3, TFE3*

HaloPlex^{HS} Custom Panel (Agilent Technologies)

- **Coding regions:** *ANKRD26, ASXL1, ASXL2, BCOR, BRAF, CALR, CBL, CEBPA, CSF3R, DDX41, DNMT3A, EZH2, ETV6, FLT3, GATA2, IDH1, IDH2, JAK2, KDM6A, KIT, KMT2A, KRAS, MYC, MPL, NF1, NPM1, NRAS, PHF6, PPM1D, PTPN11, RAD21, RUNX1, SF3B1, SMC1A, SRSF2, STG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZBTB7A, ZRSR2*

SOPHiA Myeloid Solution™ (SOPHiA)

- **Coding regions:** *CEBPA, CSF3R, DNMT3A, ETV6, EZH2, JAK2, MPL, RUNX1, TET2, TP53, ZRSR*
- **Hotspot regions:** *ABL1, ASXL1, BRAF, CALR, CBL, CSNK1A1, FLT3, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, KMT2A, NPM1, NRAS, PTPN11, SETBP1, SF3B1, SRSF2, U2AF1, WT1*

S4. RISK CLASSIFICATION

S.4.1.- Risk allocation method

According to the ELN 2017 classification (from Döhner et al Blood 2017):

Risk category*	Genetic abnormality	Frequencies, response rates, and outcome measures should be reported by risk category, and, if sufficient numbers are available, by specific genetic lesions indicated.
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low} † Biallelic mutated <i>CEBPA</i>	*Prognostic impact of a marker is treatment-dependent and may change with new therapies. †Low, low allelic ratio (<0.5); high, high allelic ratio (≥0.5); semiquantitative assessment of <i>FLT3-ITD</i> allelic ratio (using DNA fragment analysis) is determined as ratio of the area under the curve " <i>FLT3-ITD</i> " divided by area under the curve " <i>FLT3-wild type</i> "; recent studies indicate that AML with <i>NPM1</i> mutation and <i>FLT3-ITD</i> low allelic ratio may also have a more favorable prognosis and patients should not routinely be assigned to allogeneic HCT. ^{57-59,77}
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high} † Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low} † (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> ‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse	‡The presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) takes precedence over rare, concurrent adverse-risk gene mutations. §Three or more unrelated chromosome abnormalities in the absence of 1 of the WHO-designated recurring translocations or inversions, that is, t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) or t(3;3); AML with <i>BCR-ABL1</i> . Defined by the presence of 1 single monosomy (excluding loss of X or Y) in association with at least 1 additional monosomy or structural chromosome abnormality (excluding core-binding factor AML). ¹¹⁶
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high} † Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> #	¶These markers should not be used as an adverse prognostic marker if they co-occur with favorable-risk AML subtypes. # <i>TP53</i> mutations are significantly associated with AML with complex and monosomal karyotype. ^{37,66-69}

Following the ELN 2017 risk categories, we systematically allocated patients into these following genetic groups:

ELN 2017 genetic abnormality	Genetic group
t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	t(8;21)
inv(15)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1q22)M CBFB-MYH11	inv(16)/t(16;16)
Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low}	<i>NPM1</i> mut ELN fav
Biallelic mutated <i>CEBPA</i>	<i>CEBPA</i> biallelic
Mutated <i>NPM1</i> with <i>FLT3-ITD</i> ^{high}	<i>NPM1</i> mut <i>FLT3-ITD</i> High
Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (without adverse-risk genetic lesions)	<i>NPM1</i> wt ELN int
t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>	t(9;11)
Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse	Cytogenetic abn. NC
t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	t(6;9)
t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged	<i>KMT2A</i> rearranged
t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)
inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM (EVI1)</i>	inv(3)/t(3;3)
-5 or del(5q)	-5/del(5q)
-7	-7
-17/abn(17p)	17p
Complex karyotype, monosomal karyotype	Complex karyotype
Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high}	<i>NPM1</i> wt <i>FLT3-ITD</i> high
Mutated <i>RUNX1</i>	<i>RUNX1</i> mut
Mutated <i>ASXL1</i>	<i>ASXL1</i> mut
Mutated <i>TP53</i>	<i>TP53</i> mut

S4.1.1.- Favorable ELN 2017 risk category:

- Patients with karyotype t(8;21)(q22;q22.1) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) or *RUNX1-RUNX1T1* (RT-qPCR or NGS) were allocated in the "t(8;21)" genetic group of the ELN 2017 favorable category. As described in the ELN 2017 risk stratification, patients with t(8;21)(q22;q22.1) and additional unrelated chromosome abnormalities were also allocated in this group.
- Patients with karyotype inv(16)(p13;1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) or *CBFB-MYH11* (RT-qPCR or NGS) were allocated in the "inv(16)" genetic group of the ELN 2017 favorable category. As described in the ELN 2017 risk stratification, patients with additional unrelated chromosome abnormalities in the presence of inv(16)(p13;1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) were allocated in this group.
- Patients with *NPM1* mutation (PCR and/or NGS) without *FLT3*-ITD or with *FLT3*-ITD^{low} (allelic ratio using DNA fragment analysis <0.5) were allocated in the "mutated *NPM1* ELN fav" of the ELN 2017 favorable group. Karyotype abnormalities were accepted in this group unless the presence of ELN category-defining abnormalities.
- Patients with biallelic mutated *CEBPA* (Sanger and/or NGS) were allocated in the "*CEBPA* biallelic" genetic group of the ELN 2017 favorable category. Karyotype abnormalities were accepted in this group unless the presence of ELN category-defining abnormalities.

S4.1.2.- Intermediate ELN 2017 risk category:

- Patients with *NPM1* mutation (PCR and/or NGS) and *FLT3*-ITD^{high} (allelic ratio using DNA fragment analysis ≥0.5) were allocated in the "*NPM1*mut *FLT3*-ITD High" of the ELN 2017 intermediate risk category. Karyotype abnormalities were accepted in this group unless the presence of ELN category-defining abnormalities.
- Patients with wild-type (wt) *NPM1* without *FLT3*-ITD or with *FLT3*-ITD^{low} were allocated in the "*NPM1*wt ELN int" group of the ELN 2017 intermediate risk category. Karyotype abnormalities were accepted in this group unless the presence of ELN category-defining abnormalities and Next Generation Sequencing (NGS) was necessary to exclude adverse risk genetic lesions (*RUNX1*, *ASXL1* or *TP53*).
- Patients with t(9;11)(p21.3;q23.3) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) or *MLLT3-KMT2A* (RT-qPCR or NGS) were included in the "t(9;11)" genetic group of the ELN 2017 intermediate risk category. As described in the ELN 2017 risk stratification, patients with ≥3 unrelated chromosome abnormalities and the presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) were allocated in this group.
- Patients with cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse (detected using G-banding karyotype analysis and/or FISH) were allocated in the cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse genetic group of the ELN 2017 intermediate risk category. Next Generation Sequencing (NGS) was necessary to exclude adverse risk genetic lesions (*RUNX1*, *ASXL1* or *TP53*).

S4.1.3.- Adverse ELN 2017 risk category:

- Patients with t(6;9)(p23;q34.1) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) or *DEK-NUP214* (RT-qPCR or NGS) were allocated in the "t(6;9)" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. As described in the ELN 2017 risk stratification, patients with ≥ 3 unrelated chromosome abnormalities and the presence of t(6;9)(p23;q34.1) were allocated in this group.
- Patients with t(v;11q23.3)/*KMT2A* rearranged (G-banding karyotype analysis and/or FISH and/or NGS) other than t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3-KMT2A* were allocated in the "*KMT2A* rearranged" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. As described in the ELN 2017 risk categories, patients with ≥ 3 unrelated chromosome abnormalities and the presence of t(v;11q23.3)/*KMT2A* rearrangement were allocated in this group.
- Patients with t(9;22)(q32.1;q11.2) (G-banding karyotype analysis and/or FISH and/or NGS) or *BCR-ABL1* (RT-qPCR or NGS) were allocated in the "t(9;22)" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. As described in the ELN 2017 risk categories, patients with ≥ 3 unrelated chromosome abnormalities and the presence of t(9;22)(q32.1;q11.2) rearrangement were allocated in this group.
- Patients with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) were allocated in the "inv(3)/t(3;3)" genetic group of the ELN 2017 risk category. As described in the ELN 2017 risk categories, patients with ≥ 3 unrelated chromosome abnormalities and the presence of inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2) rearrangement were allocated in this group.
- Patients with loss of chromosome 5 (-5) or del(5q) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) were allocated in the "-5/del(5q)" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. If this abnormality was found along with a complex karyotype, it was classified as a complex karyotype.
- Patients with loss of chromosome 7 (-7) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) were allocated in the "-7" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. If this abnormality was found along with a complex karyotype, it was classified as complex karyotype. Importantly, patients with 7q abnormalities (described as adverse cytogenetics by the revised MRC classification; Grimwade D, Blood 2010) were not classified in this group.
- Patients with loss of entire chromosome 17 (-17) or abn(17p) (G-banding karyotype analysis and/or FISH) were allocated in the "-17/abn(17p)" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. If this abnormality was found along with a complex karyotype, it was classified as complex karyotype.
- Patients with complex karyotype (≥ 3 unrelated chromosome abnormalities in the absence of WHO-designated recurring translocations or inversions) and monosomal karyotype (1 single monosomy excluding loss of X or Y in association with at least 1 additional monosomy or structural chromosome abnormality excluding CBF AML) were allocated in the "complex karyotype" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category.

- Patients with wild-type *NPM1* and *FLT3*-ITD^{high} (allelic ratio using DNA fragment analysis ≥ 0.5) were allocated in the "*NPM1*wt/*FLT3*-ITD^{high}" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. NGS was not mandatory as the detection of co-occurring *RUNX1/ASXL1/TP53* mutations would not change the ELN 2017 risk category (adverse). According to this, some of the patients allocated in this group would be re-allocated mostly to *RUNX1* or *ASXL1* mutated genetic group if NGS was performed.
- Patients with *RUNX1* mutation (NGS) without favorable-risk AML features were allocated in the "*RUNX1* mutated" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category.
- Patients with *ASXL1* mutation (NGS) without favorable-risk AML features were allocated in the "*ASXL1* mutated" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. As the concomitant mutation of *ASXL1* and *RUNX1* is not uncommon, patients with both mutations were allocated in the "*RUNX1* mutated" genetic group.
- Patients with *TP53* mutation (NGS) without favorable-risk AML features were allocated in the "*TP53* mutated" genetic group of the ELN 2017 adverse risk category. If this abnormality was found along with a complex karyotype, it was classified as a complex karyotype.

S4.2.- Ambiguous cases

- **UPN 001-059:** 46,XX,del(5)(q21q34),del(20)(q11)[20] and *NPM1* mutation without *FLT3*-ITD. Allocated in the "-5/5q" genetic group.
- **UPN 001-131:** 45,XX,-7[19]/46,XX[20] and *RUNX1* mutation. Allocated in the "-7" genetic group.
- **UPN 003-006:** 46,XY[8]/52,sl,+3,+6,+10,+13,+18[9] and *FLT3*-ITD^{high}. Allocated in the "Complex karyotype" genetic group.
- **UPN 003-037:** 45,XY,-7,del(20q)(q11.2)[12]/46XY,-7,+20[6]/46,XY[20] and *NPM1* mutation without *FLT3*-ITD. Allocated in the "-7" genetic group.
- **UPN 003-137:** 54,XY,+1,del(1)(p11),+6,del(6)(q21q27),+8,+8,+8,-10,t(11;?) (q23;?),+13,der(13)x2,del(17)(p13),-22,+r,+mar1,mar2,2-4dmin[cp14] / 46,XY[1] and *NPM1* mutation and *TP53* mutation. Allocated in the "Complex karyotype" genetic group.
- **UPN 004-102:** 46,XY,t(3;15)(p21;q15),t(11;17)(q23;p11)[18]/46,XY[2] and *RUNX1* mutation. Allocated in the "*KMT2A* rearranged" genetic group.
- **UPN 008-022:** 46,XX,t(6;9)(p13;q24)[14]/46,XX[6] and *NPM1* mutation. Allocated in the "t(6;9) genetic group.
- **UPN 013-009:** 45,XY,del(2)(p15),-4,del(5)(q15q33),del(7)(q33),dup(8)(q21q24),add(10)(q25)[10] and *NPM1* mutation. Allocated in the "Complex karyotype" genetic group.
- **UPN 013-015:** 45,XY,inv(3)(q21q26),-7[17]/46,XY[3]. Allocated in the "inv3/t(3;3)" genetic group.

- **UPN 013-136:** 45,XY,add(2)(p23),del(2)(q33),del(5)(q14q33),-7,dic(8;11)(q24;q13q25),der(17)del(17)(p11)del(17)(q22),der(21)t(7;21)(p11;p11),+r[20] and *ASXL1* mutation. Allocated in the "Complex karyotype" genetic group.
- **UPN 014-011:** 45,XX,inv(3)(q21q26),-7[19]/46,XY[1]. Allocated in the "inv3/t(3;3)" genetic group.
- **UPN 018-007:** 46,XY,-7,+8,add(19)(p13.3)[10]/46,XY[10] and *NPM1* mutation. Allocated in the "-7" genetic group.

S5. PATIENT CHARACTERISTICS

Figure S5.1.- Age distribution

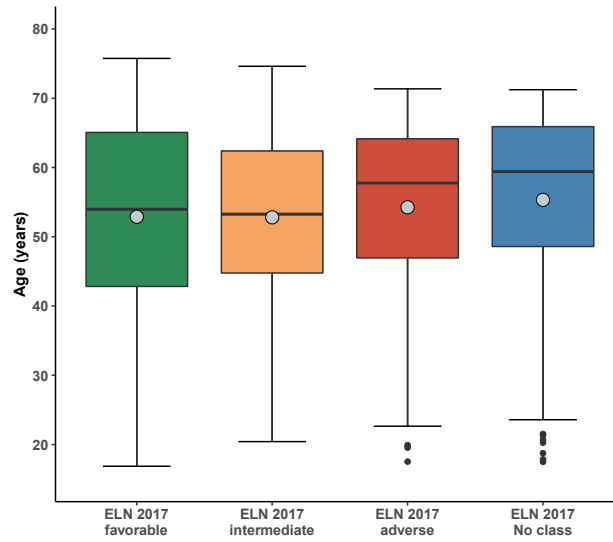


Figure S5.1.- Age distribution in the different ELN 2017 groups as well as the ELN 2017 non-classifiable group (ELN 2017 No class). Grey dots represent mean.

Figure S5.2.- White blood cell (WBC) count distribution

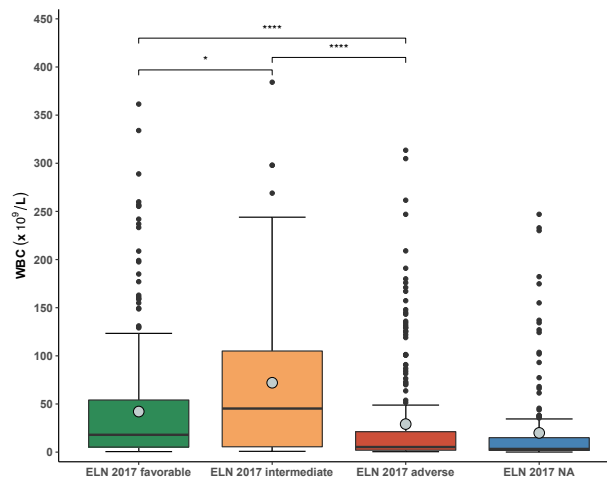


Figure S5.2.- WBC distribution in the different ELN 2017 groups as well as the ELN 2017 non-classifiable group (ELN 2017 No class). Grey dots represent mean. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure S5.3.- Hemoglobin (Hb) distribution

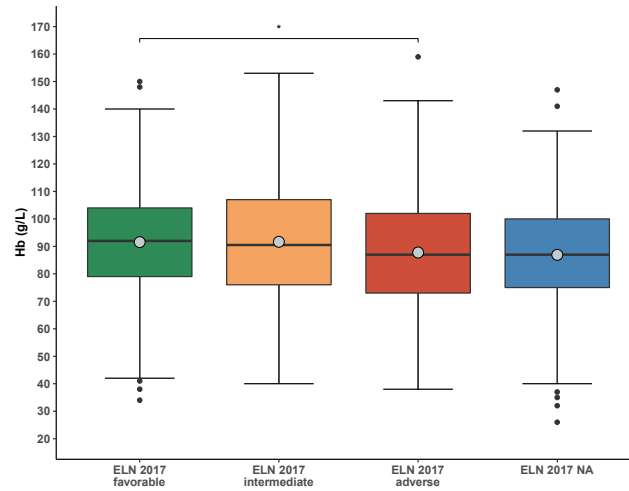


Figure S5.3.- Hb distribution in the different ELN 2017 groups as well as the ELN 2017 non-classifiable group (ELN 2017 No class). Grey dots represent mean. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure S5.4.- Platelet count distribution

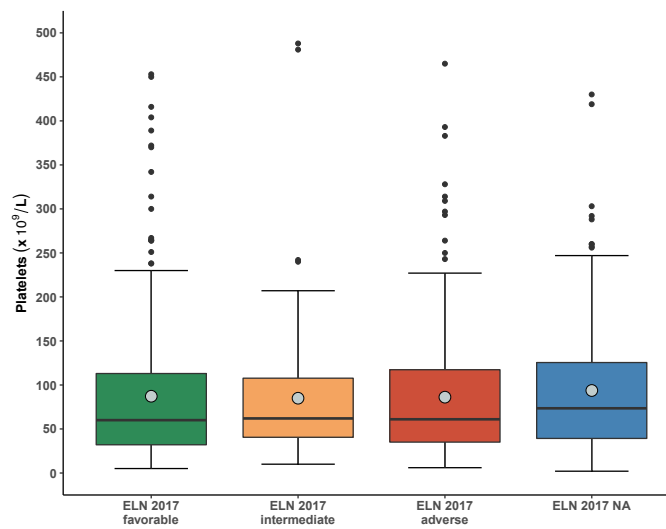


Figure S5.4.- Platelet count distribution in the different ELN 2017 groups as well as the ELN 2017 non-classifiable group (ELN 2017 No class). Grey dots represent mean.

Figure S5.5.- ELN 2010 risk stratification

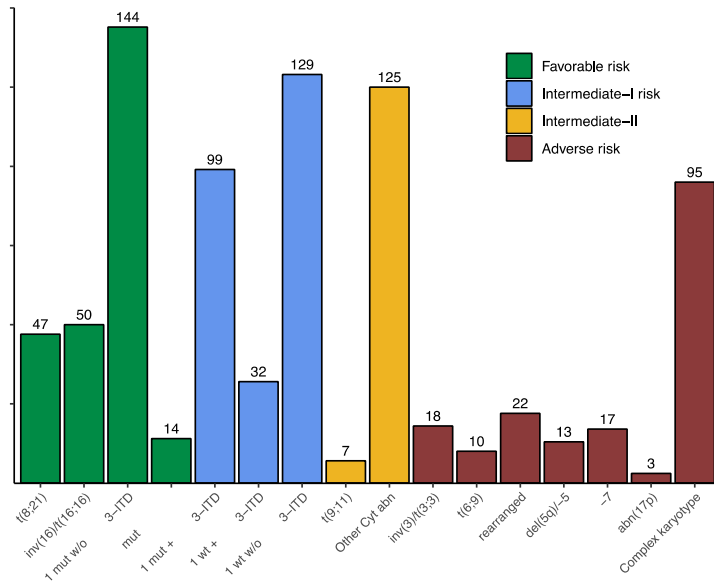


Figure S5.5.- Number of patients of each ELN 2010 genetic group.

Figure S5.6.- ELN 2010 risk stratification

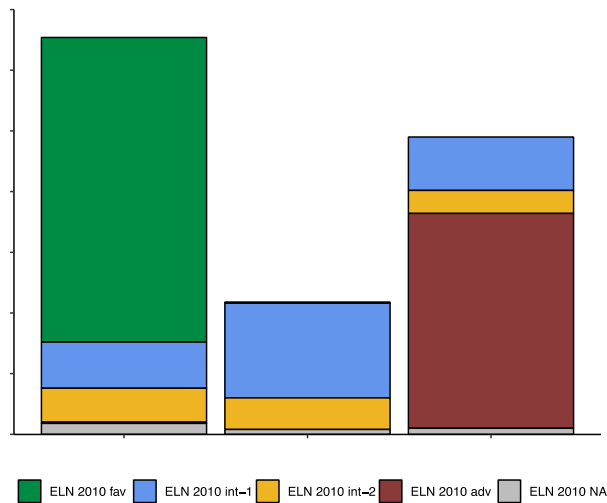


Figure S5.6.- ELN 2010 risk groups distribution within the ELN 2017 risk stratification.

Figure S5.7.- Patients above or below 60 years old

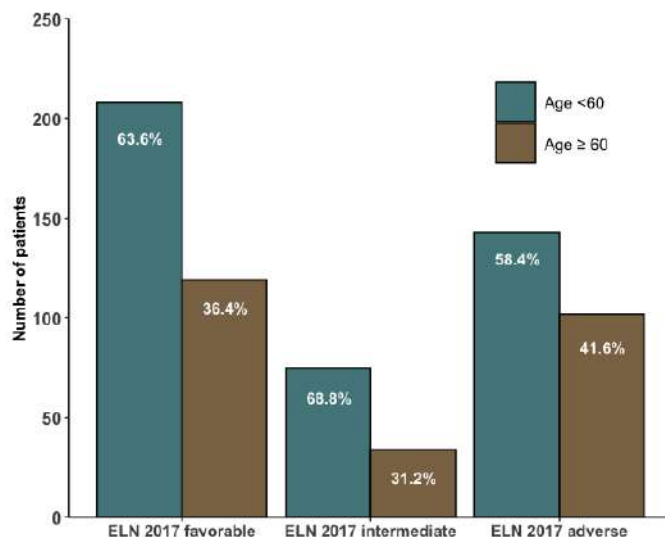


Figure S5.7.- Frequency and absolute number of patients above or below 60 years old in each ELN 2017 risk category.

Figure S5.8.- Sex distribution

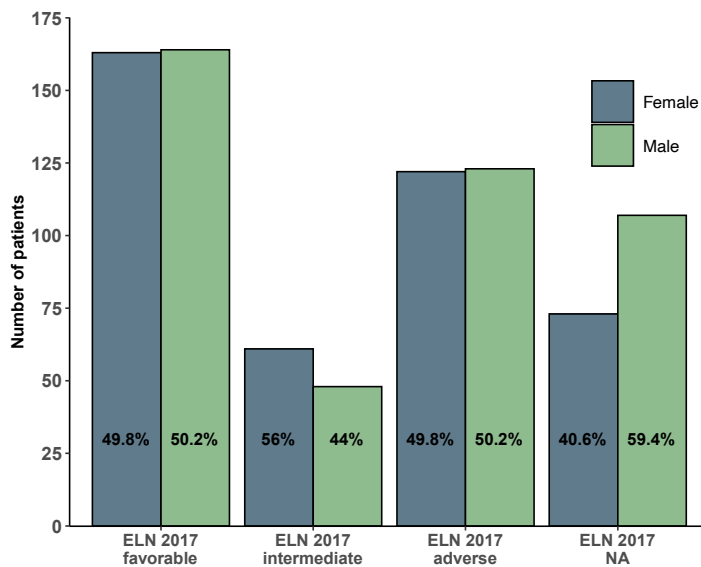


Figure S5.8.- Frequency and absolute number of females and males in each ELN 2017 risk category.

S6. Patient responses and outcomes

Figure S6.1.- Response to induction

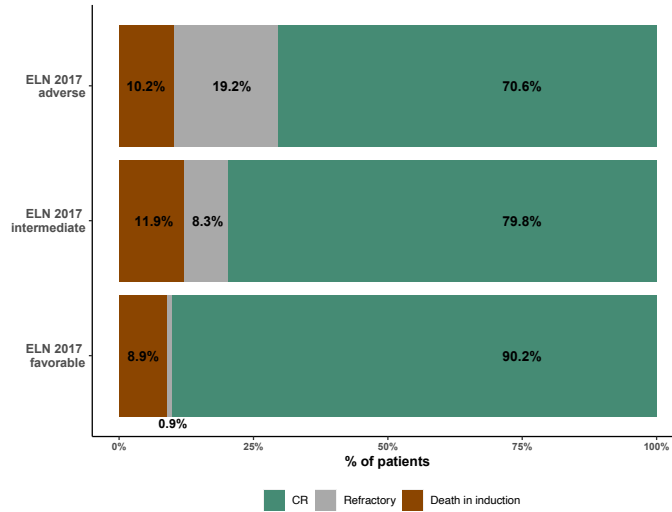


Figure S6.1.- Responses to induction course according to the ELN 2017 risk stratification.

Figure S6.2.- Overall survival of ELN 2017 favorable group

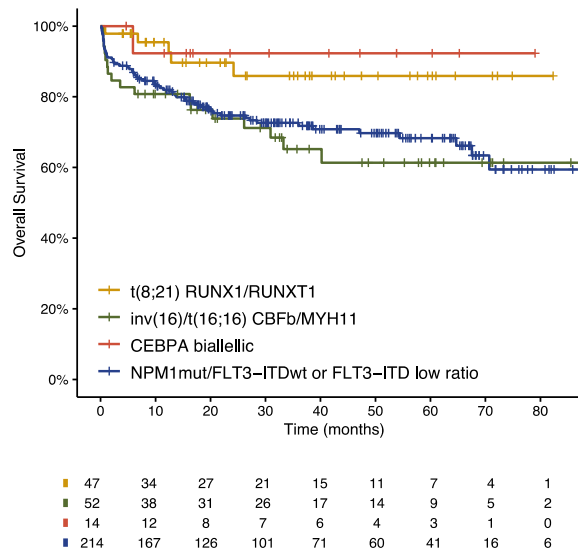


Figure S6.2.- Overall survival of the different genetic groups within the ELN 2017 favorable risk category.

Figure S6.3.- Overall survival of *NPM1* mut vs *NPM1* mut *FLT3*-ITD^{low}

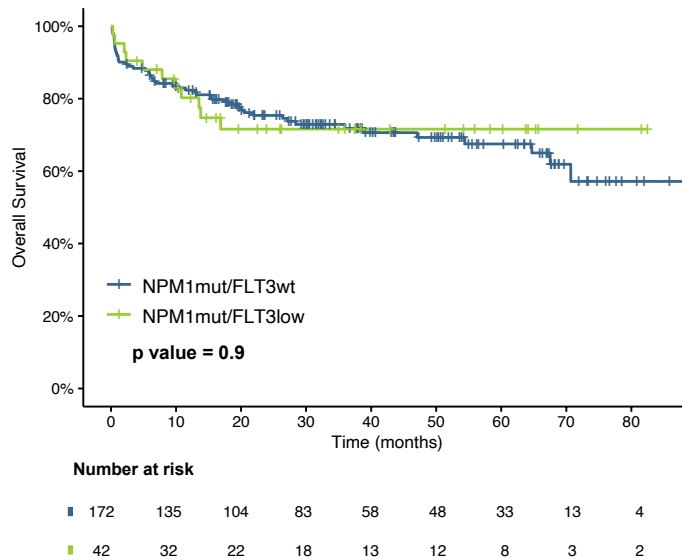


Figure S6.3.- Overall survival of patients allocated in the *NPM1* mutated genetic group of the ELN 2017 favorable risk category. Comparison between presence or absence of *FLT3*-ITD^{low} mutation.

Figure S6.4.- Overall survival of ELN 2017 intermediate group

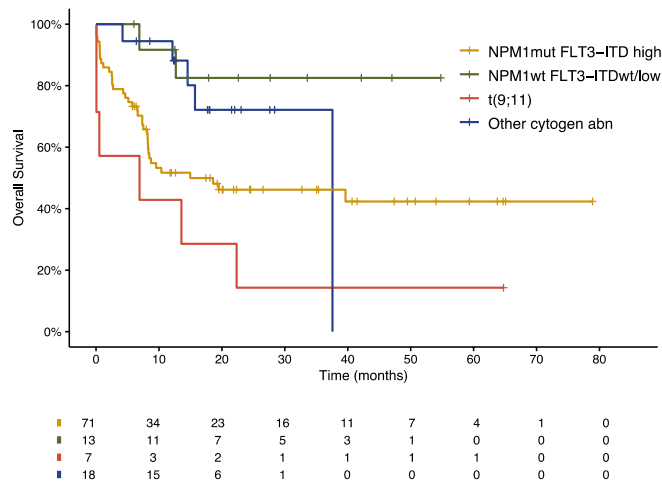


Figure S6.4.- Overall survival of the different genetic groups within the ELN 2017 intermediate risk category.

Figure S6.5.- Overall survival of ELN 2017 adverse group

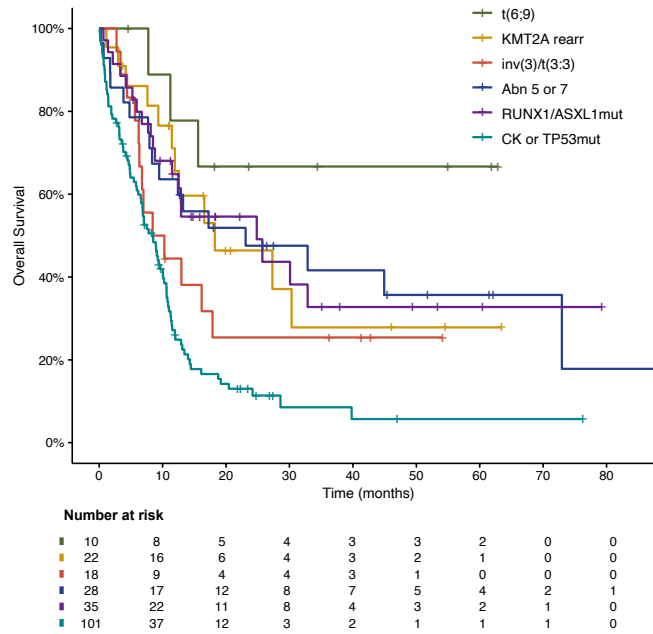


Figure S6.5.- Overall survival of the different genetic groups within the ELN 2017 adverse risk category.

Figure S6.6.- Overall survival of age <60 years vs ≥ 60 years

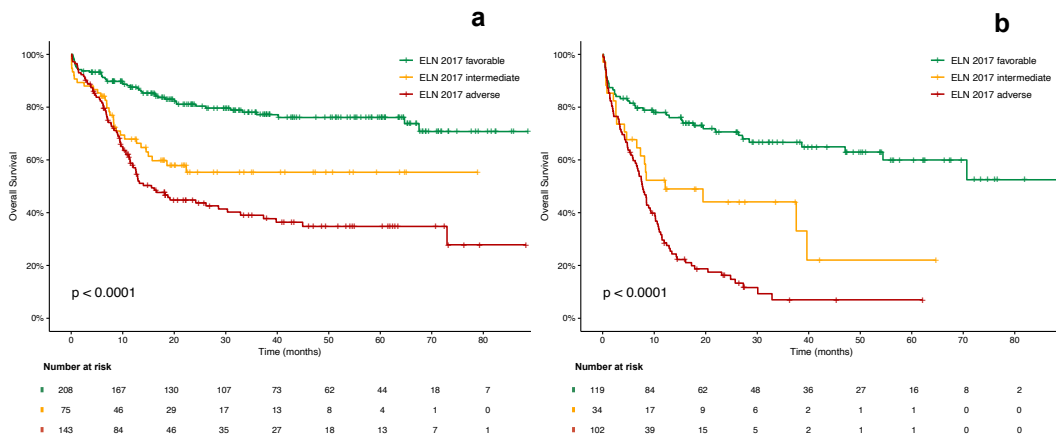


Figure S6.6.- Overall survival of the different ELN 2017 categories according to age. Patients <60 years old (a) or ≥60 years old (b).

S7. AlloSCT characteristics

	All patients (418)	ELN 2017 favorable (82)	ELN 2017 intermediate (80)	ELN 2017 adverse (150)	p
Age at alloSCT, years median (range)	54 (18-72)	52 (18-71)	52 (21-70)	55 (18-71)	0.42
Sex, male n (%)	203 (49)	40 (49)	32 (40)	70 (47)	0.49
Conditioning regimen					
Myeloablative conditioning (MAC)	200 (48)	47 (57)	42 (53)	64 (42)	0.08
Reduced intensity conditioning (RIC)	211 (50)	35 (43)	37 (46)	85 (57)	
Not specified	7 (2)	-	1 (1)	1 (1)	-
Type of donor					
HLA-matched related donor	140 (33)	27 (33)	30 (38)	53 (35)	-
Unrelated donor	187 (45)	37 (45)	37 (46)	66 (44)	-
Umbilical cord blood	26 (6)	5 (6)	1 (1)	8 (5)	-
Haploidentical related donor	63 (15)	12 (15)	12 (15)	22 (15)	-
Not specified	2 (1)	1 (1)	-	1 (1)	-
Graft source					
Peripheral blood	376 (91)	74 (90)	76 (96)	137 (91)	-
Bone marrow	14 (3)	2 (3)	2 (3)	4 (3)	-
Umbilical cord	26 (6)	6 (7)	1 (1)	8 (6)	-
Status at alloSCT					
Complete response	381 (91)	78 (95)	75 (94)	129 (86)	0.04
Non-CR	37 (9)	4 (5)	5 (6)	21 (14)	

Figure S7.- Characteristics of patients and procedure of patients undergoing alloSCT.

S8. Complex karyotypes

UPN	Karyotype
001-022	45,XX,-11,-13,-14,-16,-17,-20,-22,+4-5mar [cp 4] /46,XX[16]
001-051	44,XY,t(2;13)(p11;p11),add(9)(p22),add(14)(p11),-15,add(15)(p11),-18,add(19)(p11),add(21)(q22),-22[cp9]/44,XY,del(6)(q21),add(7)(q31),-9,add(12)(p11),add(15)(p11),-16,-18,add(19)(p11),add(21)(q22)[cp6]/42~43,XY,-4,add(4)(p16),add(9)(p22),-13,add(13)(p11),-14,add(14)(p11),-15,add(15)(p11),der(15),-17,add(17)(p13),-18,add(19)(p13),add(21)(p22),+22[cp4]/46,XY[1]
001-057	54,X,-Y,+1,+2,t(2;3)(p15;q26-27),del(5)(q12q34),+8,del(8)(q21),+9,+11,+13,+20,+21,+22[11]/54,X,-Y,+1,+2,t(2;3)(p15;q26-27),del(5)(q12q34),+8,del(8)(q21),+9,+11,+13,+20,+21,+idic(22)(p11)[7]/46,XY[2]
001-064	49,XX,add(1)(q21),der(3)t(3;?)(q26;?),add(4)(q32),+5,del(5)(q23q33)x2,-6,-7,+11,del(11)(p13),-17,+der(3)t(3;?)(q26;?),+mar1,+mar2[3]/47,idem,?inv(14)(q12q24)[5]/50,idem,+2[2]/50,idem,+2,?inv(14)(q12q24)[8]/46,XX[2]
001-074	46,XX,del(5)(q12q34)[3]/44,idem,-4,-17,-18,+mar1[5]/45,idem,-4,-17,-18,+21,+mar1[4]/46,XX[8]
001-076	42~45,XY,-7,-8,del(11)(q23),-17,-19[cp10]/46,XY[5]
001-091	44,XY,-2,add(4)(q34),del(5)(q12q34),-13,add(18)(q22),-20,+mar1[8]/43,idem,2,add(4)(q34),del(5)(q12q34),-13,add(18)(q22),-19,+mar2[10]/44,idem,+mar3[2]
001-099	43~46,XY,add(3)(p24)[6],-5[10],der(14)t(14;17)(p11;p11)[10],-15[3],-17[10],-18[10],-20[2],+mar1[5],+mar2[2],+mar3[6],+1~4mar[5][cp10]/46,XY[10]
001-154	46,X,-Y,+6,-10,der(17)t(10;17)(q11;p11),add(22)(p11),+mar1[9]/46,X,-Y,+6,-10,der(17)t(10;17)(q11;p11),add(22)(p11),+mar2[2]/45,X,-Y,+6,-10,add(15)(p11),der(17),add(22)(p11) [9]
002-004	46,XY,t(3;14)(q35;q32)[9]/46,idem,del(18)(q22)[2]/46,idem,del(5q)(q22q31),del(18)(q22)[2]/46,XY[12]
002-007	43-46,XX,add(3)(p?),?t(5;9)(q?15;q?34),?t(12;15)(q?24;q?23),-15,-17,-18,-21,+mar[cp12]
002-020	40-43,X,-Y,del(3)(p13),-5,-7,-9,-12,-14,-16,-17,-18,-19,?add(19)(q?),-20,-21,-22,+3-7mar[cp21]
002-047	46,XX,del(5)(q13q33)[3]/44,XX,del(5)(q13q33),?del(8)(p21p23),der(12)t(8;12)(q11;p11),+16,-17,-18,-22[17]/44,XX,del(5)(q13q33),?del(8)(p21p23),del(12)(p11),+16,-17,-18,-22[2]
002-057	46-47,XY,del(5)(q22q34),del(6)(q22q25),del(7)(q22q23),-8,-9,add(11)(q23),+i(11)(q11),-16,+mar1,+mar2,+mar3[cp20].
002-067	45-46,XY,del(5)(q13q31),del(7)(p14),del(12)(p13),add(12)(p13),del(20)(q11q13),-20[cp20]
002-099	46,XX,del(5)(q13q33),del(20)(q11q13)[3]/46,idem,t(3;14;17)(q21;q24;p12),t(4;17)(q22-24;q12)[12]
002-100	Karyotype not available; FISH suggests complex karyotype including del(5q)
003-006	47,XY,+8[11]/52,idem,+3,+6,+10,+13,+18[9]
003-009	Complex karyotype (formula not available); hypodyploid; 3p rearrangement
003-028	43-44,XY,add(3)(?pq),del(5)(q13q33),-7,-11,-20,-21,+r,+mar1[cp16]/46,XY[4]
003-055	48,XX,t(2;11)(p21;p15),+8,+19[12]/46,XX[1]
003-058	45,XX,del(5)(q12q33),-16,-18,-21,add(22)(p13),+mar1,+mar2[17]/46,XX[3]

Resultados: segundo artículo

003-063	47,XX,add(1)(p13),-3,-4,-5,-7,add(17)(p13),-18,+21,+5mar,+2r[cp20]
003-137	54,XY,+1,del(1)(p11),+6,del(6)(q21q27),+8,+8,+8,-10,t(11;?)(q23;?),+13,der(13)x2,del(17)(p13),-22,+r,+mar1,mar2,2-4dmin[cp14] / 46,XY[1]
003-192	46,XY,-5[9],del(5)(q13q33)[8],del(7)(q22q32)[16],-14[12] der(17)t(5;17)(q13;p13)[10],-18[16],-21[14],i(22)(p10)[16],+mar1,+mar2[15],+mar3[13],+mar4[10][cp17]/46,XY[3]
003-193	47-49,XY,-2,-2,add(3)(q26),del(3)(p21),-5,del(6)(q13),-7,add(8)(p11),add(12)(p11),-14,-14,-17,+7mar[cp8]
004-024	45,XX,add(2)(p13),del(7)(q22q32),-11,-18,del(20)(q11),+mar[12]/46,XX[2]
004-029	Complex karyotype with 13 abnormalities. Del chr 5 and 7. Formula not available.
004-031	Complex karyotype with 50 chromosomes, abnormalities in chr. 5, 6, 12, 17, 18 and 21. Formula not available.
004-035	Complex karyotype with 46 to 50 chromosomes. Formula not available.
004-080	45,XX,-5,-7,i(9)(p10),der(14;21)(q10;q10),-16,+3mar[17] / 46,XX[3]
004-083	41-45,X,-Y,add(1)(p34),add(2)(p25),-3,-3,-5,add(6)(p25),-7,-12,add(16)(q24),-17,-18,-21,+4mar[cp20]
004-084	46,XY,del(5)(q13q32),-12,-21,+2mar[8] / 46,XY[17] b
005-007	Hyperploidy of more than 100 chromosomes, complex karyotype and multiple marker chromosomes. Formula not available.
005-014	46,XX,del(3)(p21),del(4)(q12),-5,add(6)(?pq),add(7)(q32),t(8;?)(q22;?),add(14)(q22),add(17)(p11),add(21)(q22),add(22)(p11),+mar[10]
005-024	43-44,XY,add(2)(p25),-3,del(3)(p13),-5,del(7)(q22q36),add(8)(q24),+11,del(11)(p11.2),-15,-17x2,-18,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6[18]/46,XY[2]
005-026	46,XX,der(1)r(1;1)(q10q43;q10q43),del(4)(q23),del(5)(q12q35),add(7)(p11),add(7)(q36),del(7)(q22q36),-11,add(16)(q24)[18]/46,XX[2]
005-032	44,XY,-5,add(16)(q23),-17,add(17)(p11.2),der(19)t(17;19)(q21;p13.1)[18]/46,XX[2]
005-043	43-45,XX,-2,add(8)(q24),add(11)(p13),idic(11)(p11),-16,-17,-22,+r(?) [cp13]/46,XX[6]
005-044	47-48,XX,add(1)(p36.3),del(3)(p12p21),-4,add(5)(q31),?add(13)(p13),?add(14)(p13),-15,+4mar[10]
005-057	46,XX,add(2)(p25),add(3)(q26),del(6)(q21q25),del(10)(q24q26),add(12)(p13),del(13)(q14)[20]
006-001	Hyperloid karyotype (83-86 chromosomes) with complex karyotype. Formula not available.
006-025	44,Y,-X,add(5)(q11),del(6)(q23),-7,-8,t(12;17)(p13;q11),add(14)(q32)[20]
006-044	43,XX,-3,-5,-6,-7,-17,-22,+mar1,+mar2,+mar3[13] / 46,XX[2]
006-050	48,XY,del(3)(p21),-4,-5,-7,+8,+11,-17,add(19)(p13.3),add(20)(q13),+4mar[20]
006-052	47,XX,del(5)(q15q33),+8,?add(11)(q12),-14,add(16)(p13),+mar[20]
007-010	44,XY,t(1;3)(q11;q34),-5,-7[18]

007-011	43,XY,del(5)(q13q33),-7,-13,der(15)t(15;16)(p11;p11),del(17)(p13)[20]
007-037	47,XY, del(5)(q13q33),der(7)del(7)(q11)add(q11),add(17)(p13),+mar[11]/46,XY[9]
007-039	44,XY,del(5)(q22q23),-7,del(9)(q13),-13,add(20)(p13),add(21)(q22)[17]/81-91<4n>,idem[3]
007-041	44,XX,der(2)t(2;3)(q36;?pq),-3,del(5)(p15),del(5)(q15q33),-7,add(12)(p11),der(16)t(3;16)(?pq;q22)[20]
007-045	46,XY,der(7)del(7)(q22q34)ins(7;4)(q22;q21q?),ins(9;22)(q34;q11q?),del(17)(p11),inc[9]/46,idem,add(21)(q22)[10]/46,XY[1]
007-056	48,XY,del(5)(q31q35),der(13)t(13;19)(q11;q13),-19,der(21)t(19;21)(q13;q11),+3mar[13]/48,XY,del(5)(q31q35),del(7)(q22q34),+2mar[5]/46,XY[2]
007-064	47,XX,t(3;18)(q12;q11), +4, del(5)(q13), -7, der(12)dup(8)(q21)t(8;12)(q21;p12), del(17)(p11),+22[10]/46, XX[10]
007-073	47,XX,del(5)(q22;q35),der(7)ins(7;3)(q36;q26q?),+13[19]/46,XY[1]
007-076	Formula not available. FISH detects 17p monosomy, del(5q) and -5
007-082	46,XY,add(1)(?pq),der(5)t(5;7)(q35;q36),-7[6]/46,XY[14]
008-012	46,XX,del5,-7,der(12),t(12;14),+13,t(16;21),del(18),+22[20]
008-013	49,XY,+8,+11,+13[13]/49,idem,add(3)(q26) [3]
008-036	Monosomic karyotype. Formula not available.
008-048	53XY, dup(1)(q23q44), +3,+5,+6,+8,+12,+19,+20[20]
010-015	Hyperploid karyotype. Formula not available.
010-018	43-45,XY,-5,+8,+8,+9,+10,add(11)(q25),-12,-18,+mar1,+mar2,+mar3[cp20]
010-020	47,XY,+1,+1,-5,+10,-14,-17,-19,-19,-20,+21,+mar1,+mar2,+mar3[16]
010-038	44-46,X,-X,-1,-4,-7,-10,-11,-17,-18,-19,+7 mar [20cp]
010-054	45,X,-Y,-2,del(7)(q21),add(11)(q24),add(12)(p12),-18,+mar1,+mar2 [10] / 50, XY,+2,-10, +11, +13,+14,-18,+22,+mar3 [10]
011-002	47,XY,+8,del(11)(q22q23)[15]/47,idem,del(6)(q23q25)[5]/46,XY[8]
011-009	45,XY,-3,der(5)t(5;12)(p14;q13),+8,i(11)(q10),der(12)t(12;17)(q13;q12),-15,-17,der(18)t(18;19)(q10;q10),+mar[20]
011-013	47,XY,t(1;14)(p34.1;q32),der(6)t(5;6)(q35.3;q22.2)inv(6)(p21.1q2)(p21.1q22.2),+8[19]/46,XY[1]
011-046	46,XY,-2,add(3)(q13.1),add(3)(p13),+add(3)(p13),-5,-6,add(8)(q1 3),add(9)(p13),der(16)t(2;16)(p11.2;p13.3),-18,+21,-22,+3mar[29] /46,XY[2]
011-049	45,XX, del(5)(q12q33),add(8)(p23),add(12)(q24), -21[2]/44,XX,del(5)(q12q33),del(7)(q22),add(8)(p23),add(12)(q24),-17,-18[5]/44,idem,der(11)del(11)(p12)add(11)(q22)[7]/46,XX[11]
011-066	46,XX,del(1)(p21),t(2;4)(p23;q21),add(16)(p13)[20]

Resultados: segundo artículo

011-080	43,XY,-5,del(7)(q11.2q22),-8,-12,del(13)(q12q14),-17,+mar[20].
012-007	43-46,XX,-1,del(1)(p13),-4,-5,-6, der(7)t(1;7)(p22;q22), add(11)(p13),-12,-16,-17, +r1,+r2,+5mar[cp18]/46,XX[2]
013-008	Complex karyotype. Formula not available.
013-009	45,XY,del(2)(p15),-4,del(5)(q15q33),del(7)(q33),dup(8)(q21q24),add(10)(q25)[10]
013-013	46,XY,del(5)(q15q33)[1]/44,dic(2;19)(q10;p13),del(5)(q15q33),t(6;15)(p22;q22),-7,der(21)t(2;21)(q21;q22)[18]/46,XY[2]
013-014	46,XX,t(1;3)(p36;q21),del(5)(q22q35),del(8)(p12)[10]/92,XXX,t(1;3)(p36;q21),t(1;3)(p36;q21),del(5)(q22q35),del(5)(q22q35),del(8)(p12)[1]
013-037	45,X,-Y,der(7)t(7;11)(q22;q14),+8,i(8)(q10)x2,add(17)(p11)[20]
013-136	45,XY,add(2)(p23),del(2)(q33),del(5)(q14q33),-7, dic(8;11)(q24;q13q25),der(17)del(17)(p11)del(17)(q22),der(21)t(7;21)(p11;p11),+r[20]
013-205	45,XY,-17,der(19)t(17;19)(q21;p13),add(21)(q22)[17]/45,idem,t(1;8)(p32;p23),t(4;17;21)(?;?;?),-17,+mar[3]
014-001	47,XY,der(10),add(11)(q23),+r[17]/46,XY[3]
014-009	5,XX,-3,-5,del(6)(q21),add(11)(p11),del(11)(q23),add(12)(p13),-17+19,+22[20]
014-017	42-43,XY,del(1)(p22),del(3)(p21),+del(3)(p21),-5,del(7)(q22),add(8)(q24),add(13)(p13),-16,add(17)(p11),-18,-20[cp5].
014-021	45,XX,+1,-2,der(3)?t(3;?)(?;?),t(4;12)(p15;p23),-7,del(9)(?),-15,del(16)(?),-17,+mar[17]
015-009	44,XX,-5,-15,add(15)(p11),-21,-22,+2mar [3]/44,XX,idem,-17,+mar [2]/46,XX[26]
015-025	46,XX,del(7)(q22q35),+8,-17[8]/46,XX[1]
015-026	52,XX,+X,+6,+8,+10,+13,+22[4]/46,XX[16]
015-033	45,XY,del(5)(q15q35),-6,add(6)(p22),del(7)(p15),add(11)(q23),del(11)(q21),-13,-13,add(17)(p13),-18,del(20)(q11),add(21)(p11),+mar1,+mar2,+mar3[20]
015-044	44~49,XY,-1,-4,-5,-10,-10,-12,-16,-16,-21,-21,+12mar[14]/46,XY[6]
015-050	96,XXYY,del(11)(q23)x2,+19,+19,+21,+21[20]
015-059	48,XY,t(6;15)(p22;q24),-13,+19,-21,+mar1x2,+mar2[17]/46,XY[3]
018-002	46-49,add(X)(q22)[18],add(1)p36[19],del(1)(q42)[5],del(3)(p12)[18],-4[4],add(5)(q11)[19],add(7)(q21)[17],der(7;13)(q10;q10)[14],+8[6], add(8)(p11)[15],-10[2],t(12;15)(p10;p10)[17],-14[4],-16[15],+mar1[14],+mar2[15],+mar3[13],+mar4[15], +mar5[2],+mar6[5],+mar7[8][cp19]
018-014	46,XY,+4,add(10)(p11.2),del(11)(q14),-20[4]/46,XY,del(6)(q21),add(10)(p11.2),add(11)(p12),del(11)(q14),del(13)(q21)[13]/46,XY[3]
018-015	45,XY,del(1)(q21),del(4)(q28q33),-5,del(7)(q22q34), add(9)(q34),-11,-13,del(16)(q22),-19,-20,-21,+5mar[12]/ 46,XY[8]
018-040	46,XY,+8,+add(8)(q22),del(11)(q23),-22[7]/46,XY, add(10)(p11.2),del(11)(q23),del(13)(q21)[13]

Figure S8.1.- Complex karyotype chromosomal abnormalities

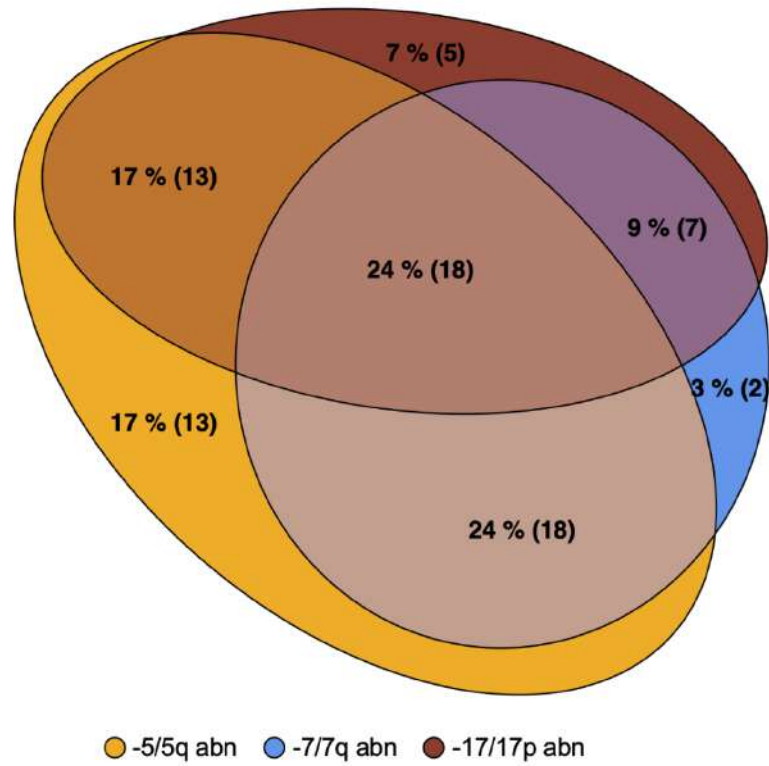


Figure S8.1.- Euler diagram representing chromosome common chromosomal abnormalities present in complex karyotypes. 13 complex karyotypes did not present any of the chromosomal abnormalities represented and 7 complex karyotypes could not be represented.

S9. Very adverse-risk subgroup (ELN Adv+)

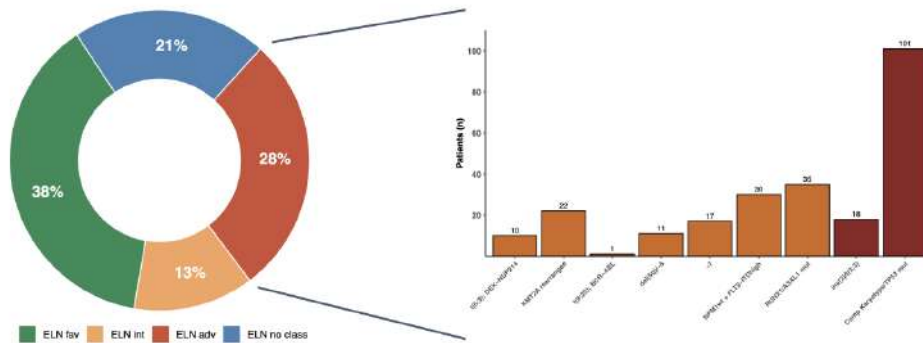


Figure S9.1.- Proportion of patients of the ELN 2017 adverse group. The barplot represents the different molecular subgroups within the ELN 2017 adverse group, in red those considered Adv+. The Comp. Karyotype/*TP53* mut group (n=101) includes patients with complex karyotype ± *TP53* mutation (n= 96) and patients without complex karyotype but *abn(17p)* or *TP53* mutation (n= 5).

	ELN Adv+ (n=119)	ELN Adv- (n=126)	p-value
Age, years median (range)	60 (18-71)	56 (20-70)	0.16
Sex, male n (%)	72 (61)	51 (41)	0.003
WBC, median (range) [$\cdot 10^9/L$]	3.7 (0.6-191)	8.2 (0.4-313)	<0.001
Hemoglobin, median (range) [g/L]	84 (39-159)	89 (38-143)	0.19
Platelet count, median (range) [$\cdot 10^9/L$]	56 (6-393)	69 (6-465)	0.15
PB blasts, median (range) [%]	16 (0-98)	25 (0-99)	0.1
BM blasts, median (range) [%]	50 (7-97)	66 (16-99)	0.005

Table S9.1.- Characteristics at diagnosis of ELN Adv+ and ELN Adv- subgroups.

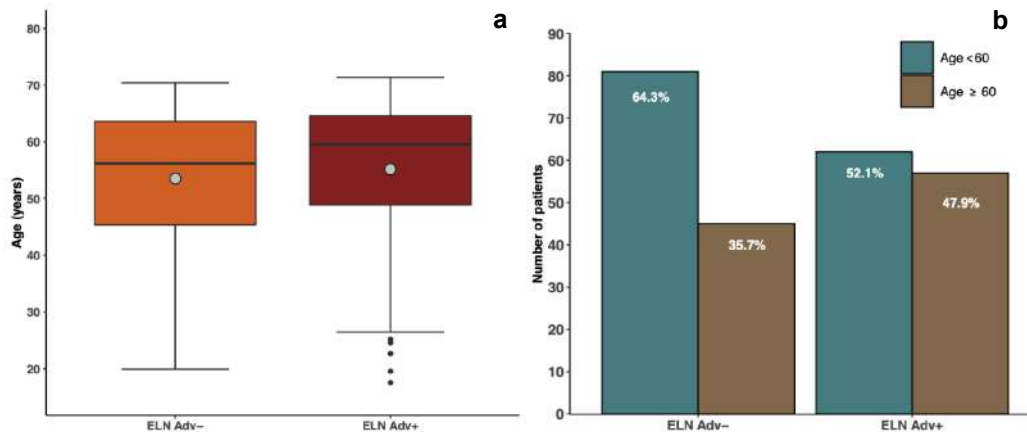


Figure S9.2.- a) Age distribution in ELN Adv- and Adv+. Grey dots represent mean. B) Frequency and absolute number of patients equal/above or below 60 years old in ELN Adv- and Adv+. Chi-square test comparison between frequencies of patients above or below 60 years old was not statistically significant ($p=0.07$).

	CR, n (%)	Death in induction, n (%)	≥ 2 cycles to CR, n (%)	2 and 5y OS, % (SE)	2y EFS, % (SE)	2y CI of relapse, % (SE)	2y CI of NRM, % (SE)
ELN Adv+ (n=119)	71 (60)	16 (13)	21 (30)	15 (3.5) 10 (3.4)	3 (1.6)	75 (5.5)	22 (4.3)
ELN Adv- (n=126)	102 (81)	9 (7)	17 (16)	49 (4.7) 36 (5)	33 (4.5)	35 (5.1)	14 (4.4)
p-value	<0.001	0.15	0.07	<0.001	<0.001	<0.001	0.21

Table S9.2.- Response and outcomes of ELN Adv+ and ELN Adv- subgroups.

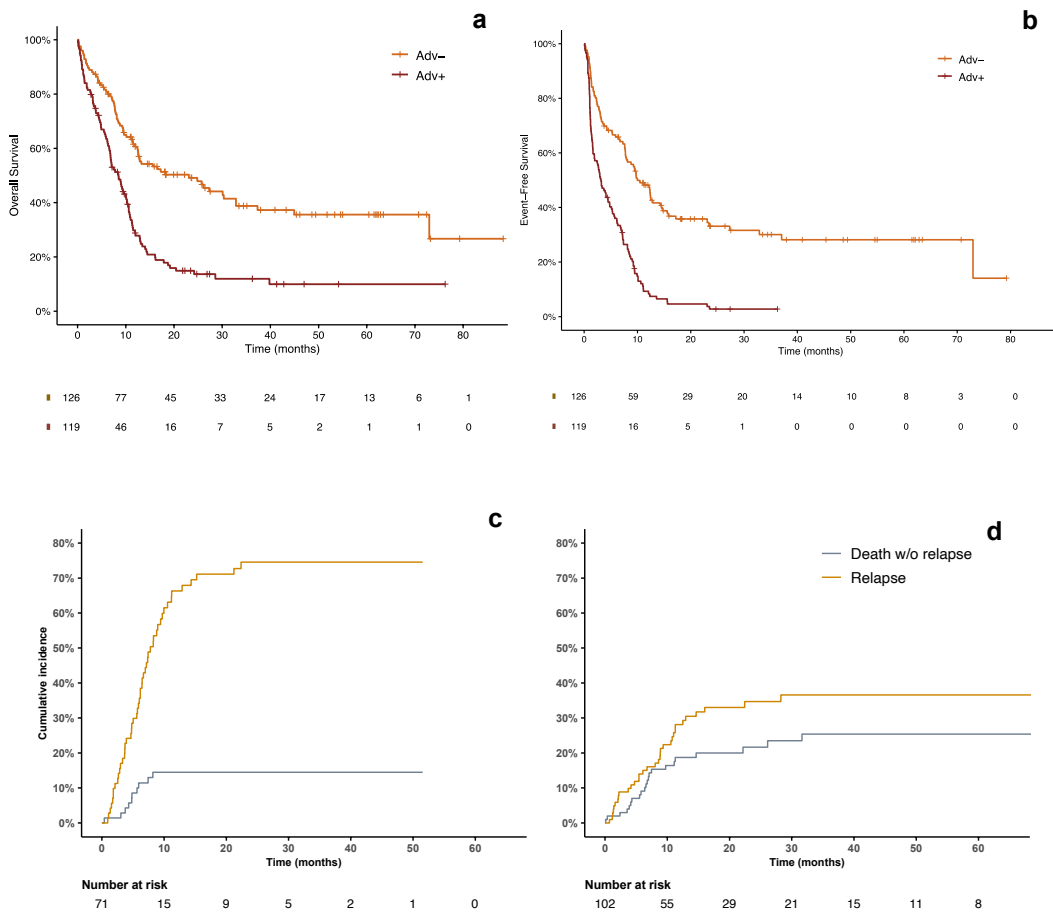


Figure S9.3.- Overall survival (a) and Event-Free Survival (b) according to ELN Adv+ and ELN Adv- subgroups. Cumulative incidence of relapse or death without relapse according to ELN Adv+ (c) and ELN Adv- (d).

	AlloSCT, n (%)	2y OS after alloSCT, % (SE)	2y EFS after alloSCT, % (SE)	2y CI of relapse after alloSCT, % (SE)	2y CI of NRM after alloSCT, % (SE)
ELN Adv+ (n=119)	55 (46)	28 (6.6)	22 (6)	61 (4.6)	17 (5.2)
ELN Adv- (n=126)	95 (75)	58 (5.6)	52 (5.6)	21 (7.1)	27 (5)
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.2

Table S9.3.- Effects of alloSCT in survival and cumulative incidence of relapse and death without relapse according to ELN Adv+ and ELN adv-.

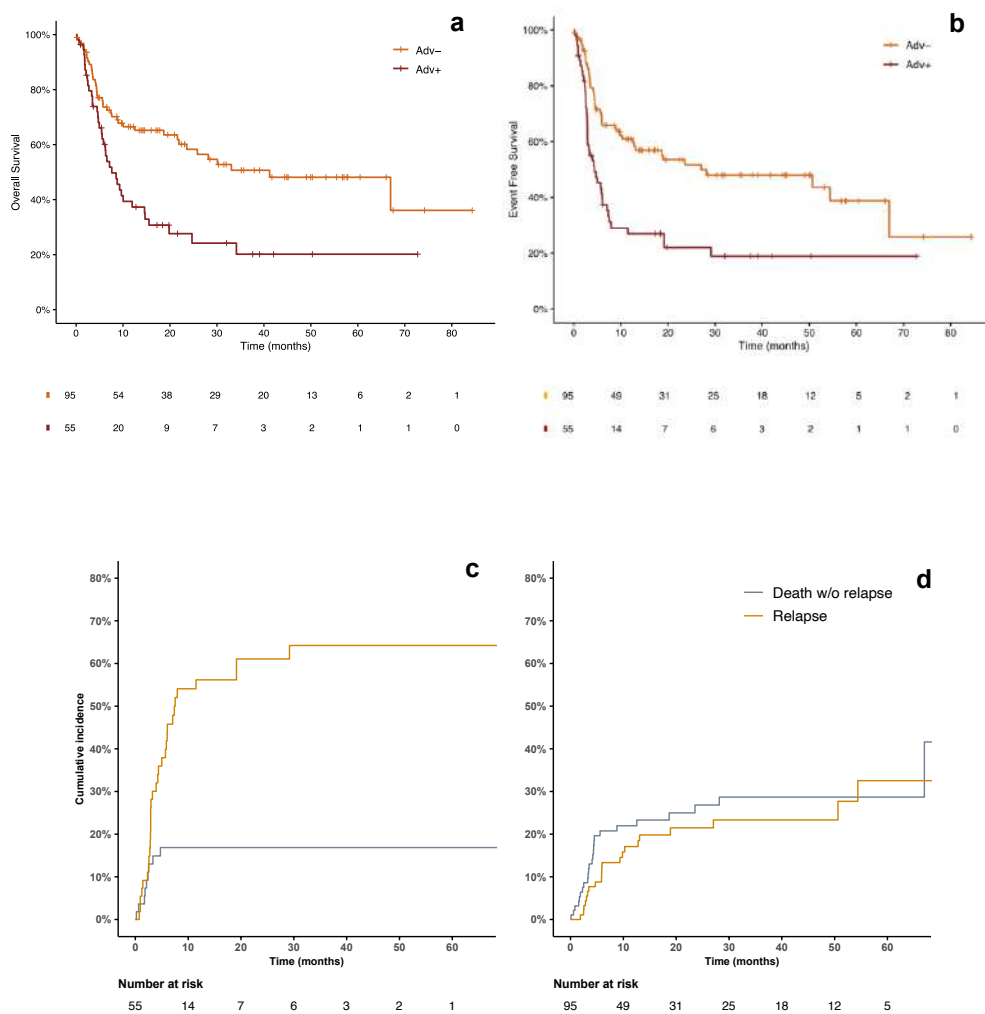


Figure S9.4.- Overall survival (a) and Event-Free Survival (b) after alloSCT according to ELN Adv+ and ELN Adv- subgroups. Cumulative incidence of relapse or death without relapse after alloSCT according to ELN Adv+ (c) and ELN Adv- (d).

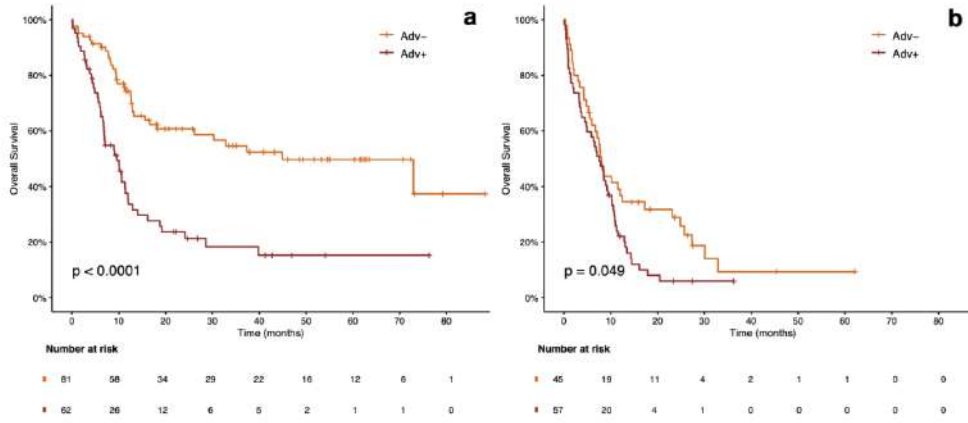


Figure S9.5.- Overall survival of ELN Adv+ and ELN Adv- subgroups according to age. Patients <60 years old (a) or ≥ 60 years old (b).

S10. Non-classifiable patients

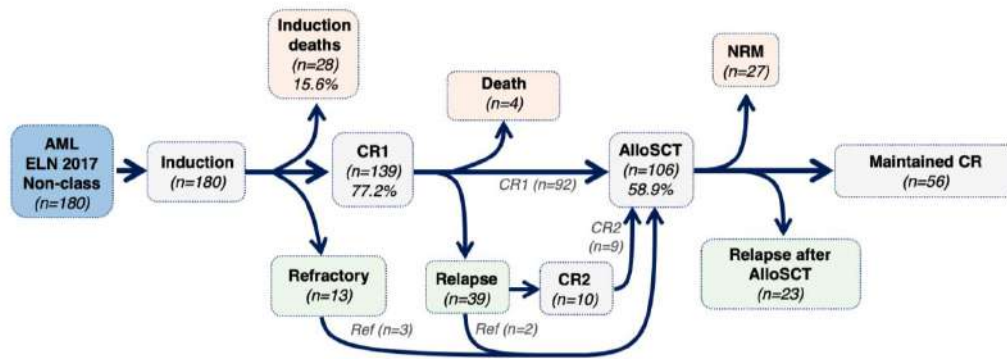


Figure S10.1.- Treatment disposition of non-classifiable patients according to responses and outcomes. CR2: Second complete response. NRM: Non-Relapse Mortality.

Characteristics and outcomes of ELN non-classifiable patients (n=180)					
Normal karyotype, n (%)	≥ 2 cycles to CR, n (%)	2 and 5y OS, % (SE)	2 and 5y EFS %, (SE)	2 and 5y CI of relapse, % (SE)	2 and 5y CI of NRM, % (SE)
112 (62%)	21 (15%)	44.6 (3.8) 29 (4.1)	32.8 (3.6) 24.8 (3.8)	39.5 (4.3) 46.2 (4.9)	16.6 (3.3) 20.3 (3.8)

Table S10.1.- Characteristics and outcome of non-classifiable patients.

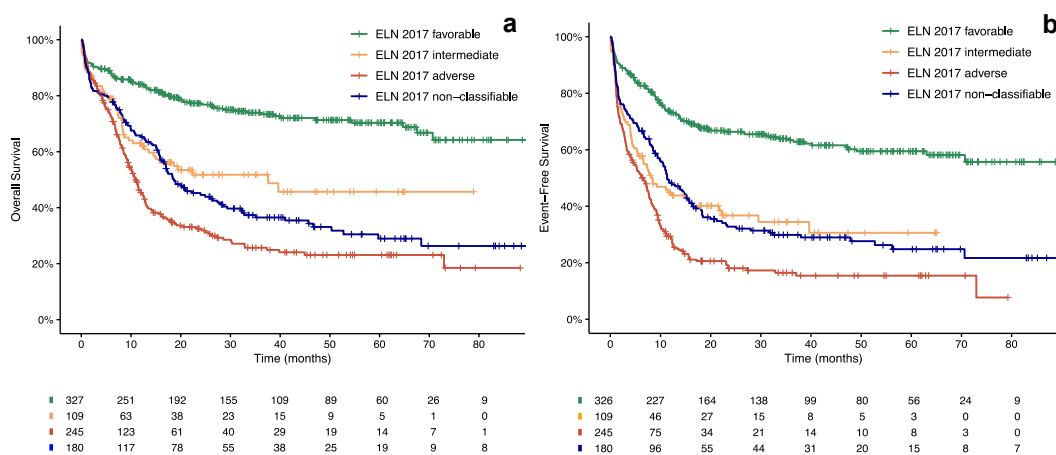


Figure S10.2.- OS (a) and EFS (b) off the entire cohort according to ELN category, including ELN 2017 non-classifiable patients.

Discusión

La LMA constituye una enfermedad heterogénea y potencialmente letal por lo que es menester un diagnóstico preciso para poder ofrecer el mejor tratamiento disponible al paciente. Para ello, la investigación de los mecanismos por los que se generan o persisten las células leucémicas supone el punto de partida para el diseño de técnicas diagnósticas y terapias dirigidas. En la actualidad, muchas de las características biológicas de la enfermedad están continuamente siendo descubiertas, si bien la compleja interacción entre las mismas, así como ciertos mecanismos leucemogénicos son aún un enigma. Esto, sumado a la gran heterogeneidad intrínseca de la LMA, la convierten en una entidad laberíntica en la que, además, los tratamientos no han evolucionado tan rápido como su conocimiento biológico.

Tal y como se ha expuesto previamente, la LMA se caracteriza por alteraciones biológicas recurrentes, como perfiles de expresión aberrantes, mutaciones, alteraciones citogenéticas o cambios epigenéticos. Las mutaciones y las alteraciones citogenéticas suponen un campo muy investigado debido a la relativa facilidad para detectarlas, así como su impacto directo en el pronóstico. Desde las primeras descripciones citogenéticas hasta la detección de mutaciones por técnicas de secuenciación masiva, se ha ido acumulando experiencia sobre la naturaleza de estas alteraciones, de manera que se ha podido correlacionar la presencia de ciertas lesiones genéticas con consecuencias a nivel clínico. A partir de estas consideraciones nacen las clasificaciones de riesgo, como la ELN 2017, que tratan de establecer un orden necesario para homogeneizar el tratamiento de los pacientes acorde al pronóstico que se les atribuye.

La clasificación de riesgo de la ELN 2017 supone la más actualizada herramienta de estratificación de pacientes generada por un consenso de expertos, ideada a partir de las clasificaciones anteriores y nuevas aportaciones en publicaciones científicas. Una vez publicada la clasificación ELN 2017, ha sido validada por pocos grupos de manera retrospectiva y con ciertas limitaciones. En primer lugar, Harada y colaboradores realizaron una primera validación retrospectiva en 197 pacientes con LMAs del protocolo japonés JALSG AML201²²⁶. Este protocolo incluyó pacientes de hasta 64 años, aleatorizando el tratamiento post-remisión en dos ramas de quimioterapia distintas y

Discusión

reservando el aloTPH en pacientes menores de 50 años con alteraciones citogenéticas consideradas adversas. Este estudio ya describió una buena capacidad discriminativa de la ELN 2017 con una SG a los 5 años de 59%, 33% y 23%, para los grupos favorable, intermedio y adverso, respectivamente. Aun así, supone una cohorte relativamente pequeña, con una randomización de tratamientos y una asignación al aloTPH no homogénea y con una población mas joven de lo habitual (el 89% de los pacientes tenía menos de 60 años y la edad máxima eran 64).

Posteriormente, Boddu y colaboradores también validaron la ELN 2017 con 715 pacientes tratados en el MD Anderson Cancer Center (MDACC)²²⁵. Este estudio también comprobó la capacidad de estratificación del riesgo de la ELN 2017, con una SG a los 5 años del 57%, 37% y 18% para los pacientes de riesgo favorable, intermedio y adverso. En este caso, también se trataba de una población joven (mediana de edad 51 años, siendo el máximo 60 años), con una distribución un tanto anómala, siendo casi el 50% de los pacientes de grupo de riesgo intermedio, en su mayoría pacientes del grupo "Anormalidades citogenéticas no clasificadas como favorable o adverso". Este ultimo grupo podría estar concurriendo en un sesgo dado que según reporta el estudio, los pacientes fueron analizados desde el año 2000 hasta el 2015, introduciéndose las técnicas de NGS en 2012, siendo muy probable que en ese subgrupo de pacientes haya una proporción considerable de pacientes con mutaciones de *ASXL1* y *RUNX1*, y en menor medida de *TP53*, que deberían ser clasificados de riesgo adverso. Además, las mutaciones bialélicas de *CEBPA* no fueron analizadas, por lo que una de las categorías de riesgo favorable no fue incluida ni analizada. También, en este estudio los tratamientos fueron variados, algunos bajo ensayo clínico y sin una política definida para realizar el aloTPH.

El estudio de Herold y colaboradores es quizás el estudio que mejor representa una validación de la clasificación de riesgo ELN 2017²²⁴. Un total de 771 pacientes de dos estudios multicéntricos fueron analizados de manera retrospectiva, aplicando los criterios de estratificación de riesgo de la clasificación ELN 2017, pudiendo comprobar el poder pronóstico de esta clasificación. En este caso, la SG por grupos a los 5 años fue de 54%, 31% y 12% para los pacientes de riesgo favorable, intermedio y

desfavorable. Aun así, en los protocolos terapéuticos incluidos se aleatorizaba el tratamiento quimioterápico y en el estudio solo el 16% de los pacientes recibieron un aloTPH, mientras que los pacientes de grupo intermedio y adverso representaban un 26 y un 36%, respectivamente.

Estos tres estudios presentados son hasta la fecha las validaciones más sólidas de la clasificación de la ELN 2017, donde se ha podido comprobar que pese a los resultados positivos, existen ciertas limitaciones para su extrapolación. En nuestro trabajo hemos podido validar la clasificación y soslayar la mayoría de las limitaciones que presentaban los estudios previamente descritos. En primer lugar, se incluyó una muestra grande (861 pacientes), de los cuales un 80% pudieron ser clasificados según la ELN 2017. Los grupos de riesgo favorable (n=327, 48%), intermedio (n=109, 16%) y desfavorable (n=327, 36%), mostraban una distribución similar a la presentada por Herold y colaboradores, si bien el grupo intermedio de nuestro estudio es claramente más pequeño. Esto se explica porque el grupo no clasificable de nuestra cohorte de estudio (n= 180; 21%) constaba de pacientes sin alteraciones genéticas definitorias de categorías de riesgo de la ELN 2017, que a la vez no tenían estudio mutacional por NGS, lo cual hacía imposible conocer el estado mutacional de *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53*, no pudiendo discernir si se trataba de pacientes de riesgo intermedio o adverso. Según Papaemmanuil y colaboradores así como Gaidzik VL y colaboradores, las mutaciones de *RUNX1* y *ASXL1* se encuentran en un 5-15% y 10-20% de las LMA, respectivamente, con especial incidencia en LMAs con cariotipos normales^{46,242}. Asimismo, un 20% de los pacientes con mutaciones de *RUNX1* presentan una mutación concomitante de *ASXL1*, y según Short NJ y colaboradores, un 9% de los pacientes con cariotipo normal presentan mutaciones de *TP53*²⁴³. Con estos datos, podríamos estimar que un 30% (21-37%) de los pacientes de la categoría no clasificable se podrían recolocar a la categoría de riesgo adverso, mientras que un 70% (63-79%) serían pacientes verdaderamente del grupo intermedio de la ELN 2017, con lo que virtualmente el grupo intermedio de nuestro estudio se compondría de hasta 246 pacientes (un 29%).

La aplicación de la clasificación de la ELN 2017 generó un grupo favorable mayoritariamente formado por pacientes con mutación de *NPM1*, hallazgo esperable

debido a su alta frecuencia en LMA. Se confirmó el relativo buen pronóstico de estos pacientes de riesgo favorable, con una SG y una IAR a los 5 años de 71% y 28%. Esta supervivencia es marcadamente mas elevada que la reportada en los estudios previamente mencionados, donde la SG se situaba entorno el 50-60%. En este sentido, la política de tratamiento preventivo recomendando un tratamiento de rescate que incluya un aloTPH ante la presencia de un FM es un hecho distintivo del protocolo CETLAM-12 y podría explicar este beneficio pronóstico. Este hecho explica que, aunque el aloTPH no estaba previsto en los pacientes de esta categoría, un 25% de los pacientes acabaron requiriéndolo, la mayoría por presentar un FM de su enfermedad. El beneficio de una intervención precoz en situación de FM ya se ha demostrado previamente en enfermedades como la LPA, como describieron Esteve, J. y colaboradores del grupo PETHEMA, en donde la SG a los 5 años de los pacientes tratados en estado de FM fue de 64% mientras que la de los pacientes con HemR fue de 24% ($p=0.01$)²⁴⁴.

En el caso de los subgrupos de LMA de la ELN 2017, hay pocos datos publicados de los resultados de estrategias preventivas de recaídas hematológicas basadas en EMR. En las LMA con mutación de CBF, un estudio publicado por Yalniz, FF. y colaboradores describía la en el pronóstico de la EMR post trasplante y en algunos pacientes establecieron una intervención precoz, con resultados esperanzadores²⁴⁵. En este sentido, en este trabajo también se ha explorado el beneficio de una intervención precoz en los pacientes con mutación de *NPM1*, que suponen el grupo mayoritario de los pacientes de riesgo favorable.

En total, 110 pacientes con LMA con mutación de *NPM1* del grupo de riesgo favorable de la ELN 2017 fueron analizados para este trabajo. Como era de esperar, presentaron un pronóstico bueno, con una SG a los 2 años del 81%. De estos, un 41% presentaron un MF (n=33) o un HemR (n=13), traducido en una supervivencia libre de evento molecular a los 2 años (molSLE) del 61%. Según el protocolo CETLAM-12, en estos pacientes que presentan una recaída durante el seguimiento, el tratamiento recomendado es la realización de un aloTPH, dejando a la elección del médico tratante la estrategia de tratamiento de rescate. En primer lugar, la SG a los dos años de estos pacientes presentado recaída (molecular o morfológica) fue del 66%, si bien los

pacientes que fueron tratados en estado de FM presentaron un una SG de 86%, mientras que la de los pacientes tratados en HemR fue de 42%. Este dato sugiere que la intervención precoz está asociada a un mejor pronóstico y por lo tanto defiende esta estrategia terapéutica. Respecto a la intervención terapéutica en el momento de FM, nuestro estudio incluye pacientes tratados o bien con quimioterapia/hipometilantes (n=12), o bien directamente interviniendo con un aloTPH (n=13). No encontramos diferencias en el pronóstico entre estas dos intervenciones, si bien el número de pacientes es reducido para obtener poder estadístico. De manera interesante, recientemente se ha publicado la experiencia del uso de venetoclax con quimioterapia de baja intensidad (LDAC o HMA), en la que 12 pacientes con FM fueron tratados, once de los cuales negativizaron la enfermedad molecular²⁴⁶. Esta novedosa combinación puede suponer un potencial beneficio a tener en cuenta en protocolos como CETLAM-12 que incluyan tratamientos preventivos en estado de FM.

Otra observación de este estudio es que el efecto de los linfocitos T alogénicos del aloTPH tiene una buena capacidad para mantener respuestas moleculares prolongadas. Esto es así porque 13 pacientes recibieron directamente un aloTPH sin presentar mayor incidencia de recaída posterior, y de los 23 pacientes que recibieron un aloTPH tras detectar un FM, solo 3 presentaron una recaída posterior. Estos datos son comparables con la experiencia publicada por Yalniz F.F. y colaboradores en pacientes con LMA con mutaciones de CBF, y contrastan con la experiencia publicada por Araki D. y colaboradores del *Fred Hutchinson Cancer Research Center*, que presentaron un riesgo de recaída post aloTPH del 67%^{245,247}. Esta diferencia con este último estudio se puede explicar porque su método de medida de la EMR pre aloTPH era por CF multiparamétrica, además que se trataba de pacientes de todos los grupos de riesgo. Así pues, es lógico generar la hipótesis de que el nivel de EMR pre aloTPH tiene impacto para predecir recaídas posteriores. Esta hipótesis fue trabajada por Dillon R. y colaboradores, que propusieron un sistema de predicción de recaída post aloTPH en pacientes con *NPM1*, basado en la EMR pre aloTPH y el status de *FLT3-ITD*²⁴⁸. Con esta estratificación, los pacientes clasificados de alto riesgo (EMR elevada, o positiva baja con *FLT3-ITD*) presentaban una SG a los 2 años del 17%, mientras que los de bajo riesgo

(EMR negativa o positiva baja sin *FLT3*-ITD) presentaban una SG a los 2 años de 82%. Tras la publicación de esta experiencia, en nuestro trabajo aplicamos los mismos factores de discriminación de riesgo, sin observar diferencias en el pronóstico de los supuestos grupos de riesgo alto y bajo. Esto se puede explicar por diferencias en las poblaciones de estudio de los dos trabajos. La población del estudio de Dillon R. y colaboradores representa una población de mas riesgo, al incluir pacientes con *FLT3*-ITD^{high} y de alto ratio según la puntuación de riesgo propuesta por el *UK National Cancer Research Institute*. Además, los regímenes de deplección de células T de los aloTPH son también distintos, con mas uso de alemtuzumab (anti-CD52) en los esquemas británicos, lo que puede impactar en el pronóstico post aloTPH. Por último, nuestro estudio tiene un tiempo de seguimiento mas corto y un menor número de pacientes, por lo que también podría explicar esta falta de resultados aplicando esta clasificación de riesgo.

Tras la exposición de estos datos derivados de nuestro estudio, es razonable la defensa de una intervención precoz en el FM seguido de un aloTPH en los pacientes con mutación de *NPM1* del grupo favorable de la ELN 2017. Aun así, nuestro trabajo muestra ciertas limitaciones a tener en cuenta. En primer lugar, aunque la política del protocolo CETLAM-12 recomendaba un seguimiento de la EMR para establecer una eventual intervención precoz, hubo 13 pacientes en los que se detectó una HemR sin un FM previo. Lo mas plausible es que estos casos ilustraran una recaída de un clon emergente extremadamente proliferativo, con el que no era posible su detección en estado de FM con la política de seguimiento propuesta. También, hubo 2 pacientes con recaídas hematológicas *NPM1* negativas, lo cual es un evento descrito en 10% de los casos, y no sería detectable con la estrategia de seguimiento de EMR propuesta^{249,250}. También, hubo 8 pacientes con FM detectable que por distintas razones no pudieron ser tratados en ese status y evolucionaron a HemR, siendo tratados en este estado, lo cual evidencia una debilidad logística de nuestro protocolo que puede ocurrir en el seguimiento de los pacientes. Por último, con nuestro protocolo seguimiento de la EMR detectamos 5 pacientes con FM que presentaron una eliminación espontánea de la carga de *NPM1*, 4 de ellos con FM tras el tratamiento de consolidación, y un paciente que presentó una reaparición de EMR autolimitada durante el seguimiento. Es por ello que en nuestro trabajo reforzamos la premisa de estudiar e interpretar con cautela la evolución de la

EMR, pues en estos pacientes las cifras de EMR eran bajas y las cinética eran descendientes. En estos casos, un seguimiento estrecho e individualizado supone la mejor estrategia para acabar de determinar si se trata o no de un FM establecido.

Volviendo a la validación de los otros grupos de la ELN 2017, el grupo antagónico al previamente descrito es el de riesgo adverso. Esta categoría incluye distintos subtipos de LMA, globalmente presentando en nuestro estudio una SG y una IAR a los 5 años de 23% y 53%, respectivamente. A simple vista destaca el mal pronóstico de este subgrupo, el cual representa un desafío a la hora de establecer un plan terapéutico, y en donde es evidente que se requiere de nuevas terapias o estrategias para mejorar el pronóstico de estos pacientes. Sin embargo, esta categoría de riesgo se caracteriza por una gran heterogeneidad en cuanto a los grupos moleculares que la componen. Así pues, encontramos tanto las LMAs con translocaciones de *KMT2A*, como pacientes con cariotipos complejos o pacientes con cariotipos normales y mutación de *RUNX1*. Debido a esta heterogeneidad, en este estudio analizamos los distintos grupos de la categoría de riesgo adverso de la ELN 2017, identificando un subgrupo de LMAs con un especial mal pronóstico. Este subgrupo (ELN Adv+) se compone de las LMAs con inv(3)/t(3;3) con el reordenamiento de los genes *GATA2* y *MECOM* o con cariotipo complejo (muchas veces incluyendo pérdidas del cromosoma 5q, 7q y/o 17p o mutaciones de *TP53*). El grupo ELN Adv+ presentó una SG a los 5 años inferior al 10%, y pese a que el protocolo CETLAM-12 defiende el papel del aloTPH en estos pacientes tras adquirir RC, solo un 60% consiguen llegar a RC tras la inducción y por consiguiente solo un 48% de estos pacientes acaban realizando un aloTPH. Además, en los que reciben un aloTPH, su SG a los dos años tras el trasplante es de 28%, con una IAR tras el trasplante de 61%.

Todos estos datos sobre la ELN Adv+ traducen un subgrupo de LMAs con alta resistencia primaria a los tratamientos convencionales, así como una facilidad para escapar del efecto de la terapia y generar recaídas. Estos subgrupos ya han estado previamente estudiados, sobretudo su resistencia al tratamiento. En concreto, las LMAs con alteraciones del 3q26 provocan una haploinsuficiencia del factor de transcripción *GATA2*, además de sobreexpresar el oncogén *MECOM* (*EVI1*), caracterizando una enfermedad con un pronóstico pobre en donde el aloTPH tampoco ofrece un beneficio

importante en supervivencia²³⁷. Por otro lado, las LMAs con cariotipo complejo se asocian a mal pronóstico, sobretodo influenciadas por la coexistencia de mutaciones *multihit* del gen *TP53*, induciendo una pérdida total de su función. Esto se traduce en una gran inestabilidad genética que consecuentemente otorga quimioresistencia a la célula tumoral. Estas alteraciones *multihit* de *TP53* han sido definidas previamente en los SMD, pero en nuestro estudio no dispusimos de las técnicas diagnósticas para poder profundizar en qué pacientes con cariotipo complejo presentaban una mutación bialélica de *TP53*²⁵¹. El pronóstico de las LMA con cariotipo complejo y/o alteraciones de *TP53/17p* es malo, incluso después del aloTPH, como se ha validado en otras series de pacientes^{235,252}. Es en estos pacientes del grupo ELN Adv+ donde urgen nuevas estrategias de tratamiento, tanto pre como post aloTPH. Algunas de estas han sido descritas en la introducción del trabajo, destacando innovadoras estrategias de administración de quimioterapia (CPX-351; Vyxeos®), o combinaciones sinérgicas con venetoclax. Otros agentes como magrolimab (anti-CD47) o eprenetapopt (fármaco restaurador de la función antitumoral de *TP53* mutado) están en vías de investigación, mostrando resultados esperanzadores para este subgrupo de tan alto riesgo.

La categoría de riesgo intermedio de la ELN 2017 de nuestro estudio es la menos representada en nuestro estudio, por los motivos que se han expuesto con anterioridad. Esto supone una limitación en nuestro estudio, pues cerca de 2/3 de esta categoría eran pacientes con *NPM1* mutado y *FLT3-ITD*^{high}, mientras que en el estudio de Herold T. y colaboradores, este subgrupo solo representaba el 40% de la categoría. Aun así, el pronóstico se sitúa diferencialmente entre los de riesgo favorable e intermedio (SG a los 5 años de 46%), tal y como se esperaría. Añadido a lo anterior, si analizamos el subgrupo de pacientes no clasificables de nuestro estudio (donde, como hemos expuesto anteriormente, inferimos que habrá un 30% de la categoría de riesgo adverso y un 70% de la categoría de riesgo intermedio), la supervivencia cae ligeramente por debajo de la categoría intermedia de la ELN 2017 (SG a los 5 años de 29%), explicándose por el peso en el pronóstico de el supuesto 30% de pacientes de riesgo adverso según la ELN 2017. Es importante concretar que el uso de inhibidores de *FLT3* (como midostaurina), fue mínimo tanto en este grupo como en los otros grupos de riesgo, pero se deberá tener en cuenta en futuros proyectos analizando la supervivencia de estos pacientes.

Analizando globalmente la validación de la clasificación ELN 2017 en nuestro protocolo CETLAM-12, podemos afirmar que se segregan tres grupos pronósticos claramente diferenciados, en una población de pacientes homogéneamente tratados donde el aloTPH solo estaba reservado en primera línea en los pacientes de riesgo intermedio y alto. Además, nuestro sub-análisis nos permite identificar un grupo de especial alto riesgo (ELN Adv+), mientras que el pronóstico del resto de pacientes del grupo adverso (ELN Adv-) se superponía al del grupo intermedio. Otros grupos también han propuesto refinamientos de la ELN 2017, identificando grupos de riesgo o posibles modificaciones de la presente. En concreto, Herold T. y colaboradores proponen una nueva distribución en 5 categorías de riesgo, separando del grupo favorable un grupo de especial buen pronóstico (*very favorable*) formado por los pacientes con inv(16)(t(16;16) y mutaciones bialélicas de CEBPA, y segregando del grupo adverso un grupo de especial mal pronóstico (*very adverse*) formado por los pacientes con mutación de *TP53* y cariotipo complejo. Extrapolado a nuestro estudio, como era de esperar se observa un especial mal pronóstico de los pacientes con cariotipo complejo y mutación de *TP53*, pero no evidenciamos diferencias significativas entre los pacientes del grupo favorable.

En otro contexto, Eisfeld A.K. y colaboradores también propusieron un refinamiento de la clasificación ELN 2017, aunque el análisis era en pacientes jóvenes (<60 años) y que no recibieron un aloTPH²⁵³. En este estudio, proponen una nueva clasificación refinada de la ELN 2017 teniendo en cuenta varias combinaciones de mutaciones. Así pues, destaca la comutación de *NPM1* y *WT1* como subgrupo adverso, así como las mutaciones de *ZRSR2* y *DNMT3A* sin mutaciones de buen pronóstico. También sitúa a las mutaciones de *BCOR*, *SETBP1* e *IDH2* como definitorias de entidades de riesgo intermedio. A medida que se va extendiendo el uso de las técnicas de secuenciación masiva (como la NGS), probablemente vayan surgiendo mas evidencias que permitan refinar los grupos pronósticos en LMA. En este sentido, todo apunta a que en un futuro no muy lejano gracias a algoritmos generados por inteligencia artificial se podrá calcular el riesgo asociado a un perfil mutacional, ponderado por variables clínicas del paciente, pudiendo a partir de este riesgo, decidir la actitud terapéutica a seguir. De momento, proyectos involucrados en el *big data* de LMA ya son una realidad, como el proyecto

HARMONY, que a día de hoy engloba datos de miles de pacientes con LMA tratados en Europa²⁵⁴.

Finalmente, en el campo de la predicción de riesgo en la LMA, además de los factores genéticos al diagnóstico discutidos, también existen factores dinámicos durante el seguimiento que cada vez mas cobran importancia para predecir la recaída. Es aquí donde juegan un papel crucial las técnicas de seguimiento de las LMA mediante detección de EMR, discutidas en la introducción de este trabajo. Además de la validación de la ELN 2017 y la evaluación del papel de un tratamiento preventivo del FM, en este trabajo se ha analizado el valor pronóstico de la EMR en los pacientes con *NPM1* de la categoría favorable de la ELN 2017. Estudios previos ya han demostrado el impacto pronóstico de los niveles de EMR de *NPM1* para identificar aquellos pacientes en riesgo de presentar una recaída^{240,255-258}. La mayoría coinciden en que la EMR es un factor predictor independiente de recaída y supervivencia, y el momento mas discriminativo para asesorar el riesgo coincide tras dos ciclos de quimioterapia. En la mayoría de estudios, la muestra elegida para mayor comodidad, es la sangre periférica, si bien Ivey A. y colaboradores destacan que normalmente el número de copias era mayor en médula ósea. En nuestro estudio, en concordancia con los otros estudios, el momento del tiempo que mejor discriminaba el riesgo de recaída (FM y/o HemR) era tras el primer ciclo de consolidación, habiendo recibido 2 ciclos de quimioterapia previos. Así pues, en ese momento, una ratio de *NPM1* (*NPM1/ABL1*·100) de 0,05 discrimina dos poblaciones de pacientes con pronóstico distinto a los dos años: supervivencia libre de recaída (FM o HemR) de 77% vs 40% ($p<0,001$) y SG de 95% vs 82% ($p=0,02$), para los pacientes por debajo vs pacientes por encima de la ratio descrita, respectivamente. Con estos datos es discutible plantear estrategias de seguimiento estrecho o incluso protocolos de tratamiento distinto para los pacientes con alto riesgo de recaída con tal de mejorar su pronóstico. En este contexto, con el avance de las técnicas de seguimiento de EMR (ya sea por RT-qPCR, PCR digital o NGS), cada vez mas se podrá asesorar el riesgo de recaída de una manera dinámica durante el seguimiento del paciente, permitiendo anticiparse a la recaída y, por consiguiente, mejorar el pronóstico de los pacientes con LMA.

Conclusiones

1. La LMA es una enfermedad con alteraciones citogenéticas y moleculares recurrentes. Algunas de estas alteraciones tienen impacto en el pronóstico de los pacientes, lo cual ha permitido el desarrollo de distintas clasificaciones de riesgo, como la clasificación MRC o las propuestas por la ELN.
2. La clasificación de la ELN 2017 tiene la capacidad de diferenciar tres grupos de riesgo genético (favorable, intermedio y adverso) con un pronóstico distinto, validada en una cohorte de pacientes con LMA tratados homogéneamente dentro del protocolo CETLAM-12.
3. Los pacientes con mutación de *NPM1* del grupo favorable de la ELN 2017 se benefician de un seguimiento estrecho por técnicas moleculares de cuantificación de EMR, teniendo un alto poder predictivo de recaída. Concretamente, en nuestra serie, la ratio de la mutación de *NPM1* tras la primera consolidación supone un dato capaz de discriminar dos grupos de riesgo con distinta supervivencia libre de recaída así como supervivencia global.
4. La intervención precoz en pacientes con mutación de *NPM1* del grupo favorable de la ELN en FM supone una estrategia viable y con una supervivencia claramente mayor a los pacientes tratados en HemR.
5. El grupo de riesgo adverso de la ELN 2017 es biológicamente heterogéneo. Dentro de este grupo, se identifican el grupo ELN Adv+ con un especial mal pronóstico, incluso tras la realización de un aloTPH.
6. El protocolo CETLAM-12 para el tratamiento de LMA ha demostrado ser un protocolo adecuado y que ofrece opciones consolidación de tratamiento adaptadas y adecuadas al riesgo genético de los pacientes.

Bibliografía

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(12):1136–1152.
2. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997;3(7):730–737.
3. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645–648.
4. Solh M, Solomon S, Morris L, Holland K, Bashey A. Extramedullary acute myelogenous leukemia. *Blood Rev.* 2016;30(5):333–339.
5. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006;107(9):2099–2107.
6. McHale CM, Zhang L, Smith MT. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis.* 2012;33(2):240–252.
7. Fircanis S, Merriam P, Khan N, Castillo JJ. The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: An updated meta-analysis of epidemiological studies. *Am. J. Hematol.* 2014;89(8):E125–E132.
8. Li CI, Nishi N, McDougall JA, et al. Relationship between Radiation Exposure and Risk of Second Primary Cancers among Atomic Bomb Survivors. *Cancer Res.* 2010;70(18):7187 LP – 7198.
9. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(17):1625–1638.
10. Pagano L, Pulsoni A, Mele L, et al. Acute myeloid leukemia in patients previously diagnosed with breast cancer: Experience of the GIMEMA group. *Ann. Oncol.* 2001;12(2):203–208.
11. Schonfeld SJ, Gilbert ES, Dores GM, et al. Acute Myeloid Leukemia Following

- Hodgkin Lymphoma: A Population-Based Study of 35 511 Patients. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2006;98(3):215–218.
12. Rowley JD, Olney HJ. International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: Overview report. *Genes, Chromosom. Cancer.* 2002;33(4):331–345.
 13. Vardiman JW, Arber DA, Brunning R, et al. Therapy-related myeloid neoplasms. *WHO Classif. Tumours Haematop. Lymphoid Tissues.* 2017;150–152.
 14. Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2014;27(3):214–221.
 15. Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Malignancies and survival patterns in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndromes cohort study. *Br. J. Haematol.* 2010;150(2):179–188.
 16. Kico JM, Mullighan CG. Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms. *Nat. Rev. Cancer.* 2021;21(2):122–137.
 17. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126(1):9–16.
 18. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2488–2498.
 19. Abelson S, Collord G, Ng SWK, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature.* 2018;559(7714):400–404.
 20. Desai P, Mencia-trinchant N, Savenkov O, et al. Leukemia Years Before Diagnosis. *Nat. Med.* 2018;24(July):
 21. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.

- CA. *Cancer J. Clin.* 2021;71(3):209–249.
22. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 2019;36:70–87.
 23. Roman E, Smith A, Appleton S, et al. Myeloid malignancies in the real-world: Occurrence, progression and survival in the UK's population-based Haematological Malignancy Research Network 2004-15. *Cancer Epidemiol.* 2016;42:186–198.
 24. Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study. 2019;
 25. Yi M, Li A, Zhou L, et al. The global burden and attributable risk factor analysis of acute myeloid leukemia in 195 countries and territories from 1990 to 2017: estimates based on the global burden of disease study 2017. *J. Hematol. Oncol.* 2020;13(1):72.
 26. Ghulam J. Mufti, John M. Bennett, Jean Goasguen, 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.* 2008;93(11 SE-Decision Making and Problem Solving):1712–1717.
 27. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–2406.
 28. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424–447.
 29. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood.* 2008;111(8):3941–3967.

30. Mason EF, Hasserjian RP, Aggarwal N, Seegmiller AC, Pozdnyakova O. Blast phenotype and comutations in acute myeloid leukemia with mutated NPM1 influence disease biology and outcome. *Blood Adv.* 2019;3(21):3322–3332.
31. Kita K, Nakase K, Miwa H, et al. Phenotypical Characteristics of Acute Myelocytic Leukemia Associated With the t(8;21)(q22;q22) Chromosomal Abnormality: Frequent Expression of Immature B-Cell Antigen CD19 Together With Stem Cell Antigen CD34. *Blood.* 1992;80(2):470–477.
32. Reinisch A, Chan SM, Thomas D, Majeti R. Biology and Clinical Relevance of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Semin. Hematol.* 2015;52(3):150–164.
33. Steffen B, Müller-Tidow C, Schwäble J, Berdel WE, Serve H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2005;56(2):195–221.
34. Suragani RNVS, Cadena SM, Cawley SM, et al. Transforming growth factor- β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat. Med.* 2014;20(4):408–414.
35. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosom. Cancer.* 2019;58(12):850–858.
36. Riemke P, Czeh M, Fischer J, et al. Myeloid leukemia with transdifferentiation plasticity developing from T-cell progenitors. *EMBO J.* 2016;35(22):2399–2416.
37. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes, Chromosom. Cancer.* 2019;58(12):850–858.
38. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1532–1542.
39. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(22):2059–2074.
40. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an

- Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(11):1058–1066.
41. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(23):2209–2221.
 42. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499(7457):214–218.
 43. Al-Harbi S, Aljurf M, Mohty M, Almohareb F, Ahmed SOA. An update on the molecular pathogenesis and potential therapeutic targeting of AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1. *Blood Adv.* 2020;4(1):229–238.
 44. Scandura JM, Boccuni P, Cammenga J, Nimer SD. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. *Oncogene.* 2002;21(21):3422–3444.
 45. Bellissimo DC, Speck NA. RUNX1 mutations in inherited and sporadic leukemia. *Front. Cell Dev. Biol.* 2017;5(DEC):1–11.
 46. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia.* 2016;30(11):2160–2168.
 47. Liu P, Liu J-P, Sun S-J, et al. CBFβ-MYH11 Fusion Sequesters RUNX1 in Cytoplasm to Prevent DNMT3A Recruitment to Target Genes in AML. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:1807.
 48. Shigesada K, Van De Sluis B, Liu PP. Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFβ/PEBP2B-MHY11. *Oncogene.* 2004;23(24):4297–4307.
 49. Scandura JM, Boccuni P, Cammenga J, Nimer SD. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. *Oncogene.* 2002;21(21):3422–3444.
 50. Lo-Coco F, Hasan SK. Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2014;27(1):3–9.
 51. Noguera NI, Catalano G, Banella C, et al. Acute promyelocytic Leukemia: Update on the mechanisms of leukemogenesis, resistance and on innovative treatment

- strategies. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1–21.
52. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, 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(13):3088–3091.
53. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia*. 2014;28(4):794–803.
54. Tien FM, Hou HA, Tsai CH, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations are associated with distinct clinico-biological features and outcomes different from GATA2 zinc finger 2 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2018;8(9):.
55. Theis F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Clinical impact of GATA2 mutations in acute myeloid leukemia patients harboring CEBPA mutations: A study of the AML study group. *Leukemia*. 2016;30(11):2248–2250.
56. Hou HA, Lin YC, Kuo YY, et al. GATA2 mutations in patients with acute myeloid leukemia-paired samples analyses show that the mutation is unstable during disease evolution. *Ann. Hematol*. 2015;94(2):211–221.
57. Birdwell C, Fiskus W, Kadia TM, et al. EVI1 dysregulation: impact on biology and therapy of myeloid malignancies. *Blood Cancer J*. 2021;11(3):.
58. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, et al. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell*. 2014;25(4):415–427.
59. Díaz-Beyá M, Labopin M, Maertens J, et al. Allogeneic stem cell transplantation in AML with t(6;9)(p23;q34);DEK-NUP214 shows a favourable outcome when performed in first complete remission. *Br. J. Haematol*. 2020;189(5):920–925.
60. Saito S, Cigdem S, Okuwaki M, Nagata K. Leukemia-Associated Nup214 Fusion Proteins Disturb the XPO1-Mediated Nuclear-Cytoplasmic Transport Pathway and

- Thereby the NF- κ B Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2016;36(13):1820–1835.
61. Sandén C, Gullberg U. The DEK oncoprotein and its emerging roles in gene regulation. *Leukemia.* 2015;29(8):1632–1636.
 62. Barbosa K, Li S, Adams PD, Deshpande AJ. The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. *Genes Chromosom. Cancer.* 2019;58(12):875–888.
 63. Jasek M, Gondek LP, Bejanyan N, et al. TP53 mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia.* 2010;24(1):216–219.
 64. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell.* 2017;170(6):1062–1078.
 65. Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2016;101(6):672–679.
 66. Leukemia M, Rampal R, Alkalin A, Figueroa ME, Levine RL. Article DNA Hydroxymethylation Profiling Reveals that WT1 Mutations Result in Loss of TET2 Function in Acute DNA Hydroxymethylation Profiling Reveals that WT1 Mutations Result in Loss of TET2 Function in Acute Myeloid Leukemia. *CellReports.* 2014;9(5):1841–1855.
 67. Krauth MT, Alpermann T, Bacher U, et al. WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia.* 2015;29(3):660–667.
 68. Van Vlierberghe P, Patel J, Abdel-Wahab O, et al. PHF6 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011;25(1):130–134.
 69. Kurzer JH, Weinberg OK. PHF6 Mutations in Hematologic Malignancies. *Front. Oncol.* 2021;11(July):4–6.
 70. Mousa NO, Gado M, Assem MM, Dawood KM, Osman A. assess their diagnostic / prognostic potential. 2021;20190268:1–9.

71. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(12):1079–1089.
72. Makishima H. Somatic SETBP1 mutations in myeloid neoplasms. *Int. J. Hematol.* 2017;105(6):732–742.
73. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, et al. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat. Genet.* 2013;45(8):942–946.
74. Thol F, Suchanek KJ, Koenecke C, et al. SETBP1 mutation analysis in 944 patients with MDS and AML. *Leukemia.* 2013;27(10):2072–2075.
75. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(3):254–266.
76. Falini B, Brunetti L, Sportoletti P, Paola Martelli M. NPM1-mutated acute myeloid leukemia: From bench to bedside. *Blood.* 2020;136(15):1707–1721.
77. Park DJ, Kwon A, Cho BS, et al. Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Blood Res.* 2020;55(1):17–26.
78. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(25):2424–2433.
79. Amaya ML, Pollyea DA. Targeting the IDH2 Pathway in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2018;24(20):4931 LP – 4936.
80. Montalban-bravo G, Dinardo CD. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. 2018;
81. Amaya ML, Pollyea DA. Targeting the IDH2 Pathway in Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2018;24(20):4931 LP – 4936.
82. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(5):934–942.
83. Tulstrup M, Soerensen M, Hansen JW, et al. TET2 mutations are associated with

- hypermethylation at key regulatory enhancers in normal and malignant hematopoiesis. *Nat. Commun.* 2021;12(1):6061.
84. Feng Y, Li X, Cassady K, Zou Z, Zhang X. TET2 Function in Hematopoietic Malignancies, Immune Regulation, and DNA Repair . *Front. Oncol.* . 2019;9:210.
85. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018;32(2):273–284.
86. Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE. The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2006;135(4):438–449.
87. Ballabio E, Milne TA. Molecular and Epigenetic Mechanisms of MLL in Human Leukemogenesis. *Cancers (Basel).* 2012;4(3):904–944.
88. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia.* 2013;27(1):82–91.
89. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: Prevalence and prognostic value. *Haematologica.* 2012;97(3):388–392.
90. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell.* 2012;22(2):180–193.
91. Sebastian Stasik, Jan M. Middeke, Michael Kramer, et al. EZH2 mutations and impact on clinical outcome: an analysis in 1,604 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2020;105(5 SE-Online Only Articles):e228–e231.
92. Rinke J, Chase A, Cross NCP, Hochhaus A, Ernst T. EZH2 in Myeloid Malignancies. *Cells.* 2020;9(7):1–15.
93. Kempf JM, Weser S, Bartoschek MD, et al. Loss-of-function mutations in the histone

- methyltransferase EZH2 promote chemotherapy resistance in AML. *Sci. Rep.* 2021;11(1):5838.
94. Damm F, Chesnais V, Nagata Y, et al. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood.* 2013;122(18):3169–3177.
95. Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, et al. Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood.* 2011;118(23):6153–6163.
96. Kelly MJ, So J, Rogers AJ, et al. Bcor loss perturbs myeloid differentiation and promotes leukaemogenesis. *Nat. Commun.* 2019;10(1):1–14.
97. Bamopoulos SA, Batcha AMN, Jurinovic V, et al. Clinical presentation and differential splicing of SRSF2, U2AF1 and SF3B1 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34(10):2621–2634.
98. Taylor J, Lee SC. Mutations in spliceosome genes and therapeutic opportunities in myeloid malignancies. *Genes Chromosom. Cancer.* 2019;58(12):889–902.
99. Chen S, Benbarche S, Abdel-Wahab O. Splicing factor mutations in hematologic malignancies. *Blood.* 2021;138(8):599–612.
100. Chen S, Benbarche S, Abdel-Wahab O. Splicing factor mutations in hematologic malignancies. *Blood.* 2021;138(8):599–612.
101. Ishikawa Y, Kawashima N, Atsuta Y, et al. Prospective evaluation of prognostic impact of KIT mutations on acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1 and CBFβ-MYH11. *Blood Adv.* 2020;4(1):66–75.
102. Qin YZ, Zhu HH, Jiang Q, et al. Heterogeneous prognosis among KIT mutation types in adult acute myeloid leukemia patients with t(8;21). *Blood Cancer J.* 2018;8(8):1–4.
103. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core

- binding factor leukemias: An Italian retrospective study. *Blood*. 2006;107(9):3463–3468.
104. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;
105. Grafone T, Palmisano M, Nicci C, et al. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol. Rev.* 2012;6:64–74.
106. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014;13(11):828–851.
107. Wang S, Wu Z, Li T, et al. Mutational spectrum and prognosis in NRAS-mutated acute myeloid leukemia. *Sci. Rep.* 2020;10(1):1–9.
108. Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, et al. Activating mutations of the Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2004;64(24):8816–8820.
109. Stasik S, Eckardt JN, Kramer M, et al. Impact of PTPN11 mutations on clinical outcome analyzed in 1529 patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2021;5(17):3279–3289.
110. Alfayez M, Issa GC, Patel KP, et al. The Clinical impact of PTPN11 mutations in adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2021;35(3):691–700.
111. Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, et al. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(3):1022–1024.
112. Katzav S, Schmitz ML. Mutations of c-Cbl in myeloid malignancies. *Oncotarget*. 2015;6(13):10689–10696.
113. Yap YS, McPherson JR, Ong CK, et al. The NF1 gene revisited -from bench to bedside. *Oncotarget*. 2014;5(15):5873–5892.
114. Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. NF1 mutations are recurrent in adult

- acute myeloid leukemia and confer poor outcome. *Leukemia*. 2018;32(12):2536–2545.
115. Viny AD, Levine RL. Cohesin mutations in myeloid malignancies made simple. *Curr. Opin. Hematol.* 2018;25(2):61–66.
116. Fisher JB, McNulty M, Burke MJ, Crispino JD, Rao S. Cohesin Mutations in Myeloid Malignancies. *Trends in Cancer*. 2017;3(4):282–293.
117. Jann J-C, Tothova Z. Cohesin mutations in myeloid malignancies. *Blood*. 2021;138(8):649–661.
118. Tuval A, Shlush LI. Evolutionary trajectory of leukemic clones and its clinical implications. *Haematologica*. 2019;104(5):872–880.
119. Martignoles JA, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic hierarchy of acute myeloid leukemia: From clonal hematopoiesis to molecular residual disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(12):.
120. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*. 2017;547(7661):104–108.
121. Saygin C, Hu E, Zhang P, et al. Genomic analysis of cellular hierarchy in acute myeloid leukemia using ultrasensitive LC-FACSeq. *Leukemia*. 2021;35(12):3406–3420.
122. Potter N, Miraki-Moud F, Ermini L, et al. Single cell analysis of clonal architecture in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2019;33(5):1113–1123.
123. Morita K, Wang F, Jahn K, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat. Commun.* 2020;11(1):1–17.
124. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(12):1090–1098.
125. Scholl S, Fleischmann M, Schnetzke U, Heidel FH. Molecular Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Ongoing Challenges and

- Future Treatments. *Cells* . 2020;9(11):.
126. Wang F, Morita K, DiNardo CD, et al. Leukemia stemness and co-occurring mutations drive resistance to IDH inhibitors in acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* 2021;12(1):2607.
 127. Tettamanti S, Pievani A, Biondi A, Dotti G, Serafini M. Catch me if you can: how AML and its niche escape immunotherapy. *Leukemia.* 2022;36(1):13–22.
 128. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat. Rev. Cancer.* 2020;20(5):285–298.
 129. Toffalori C, Zito L, Gambacorta V, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat. Med.* 2019;25(4):603–611.
 130. Christopher MJ, Petti AA, Rettig MP, et al. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2018;379(24):2330–2341.
 131. Jan M, Leventhal MJ, Morgan EA, et al. Recurrent genetic HLA loss in AML relapsed after matched unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv.* 2019;3(14):2199–2204.
 132. Chen C, Liang C, Wang S, et al. Expression patterns of immune checkpoints in acute myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 2020;13(1):1–5.
 133. Kamal M. A, Nabih A. N, Elleboudy S. N, Radwan M. S. Expression of immune check point gene TIM-3 in patients newly diagnosed with acute myeloid leukemia: Significance and impact on outcome. *Oncol Lett.* 2021;21(4):325.
 134. Chao MP, Takimoto CH, Feng DD, et al. Therapeutic Targeting of the Macrophage Immune Checkpoint CD47 in Myeloid Malignancies . *Front. Oncol.* . 2020;9:.
 135. Le Dieu R, Taussig DC, Ramsay AG, et al. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood.* 2009;114(18):3909–

- 3916.
136. Lim SH, Worman CP, Jewell AP, Goldstone AH. Cellular cytotoxic function and potential in acute myelogenous leukaemia. *Leuk. Res.* 1991;15(7):641–644.
 137. Mussai F, De Santo C, Abu-Dayyeh I, et al. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood.* 2013;122(5):749–758.
 138. Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;43(August):8–15.
 139. Baragaño Raneros A, Martín-Palanco V, Fernandez AF, et al. Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia. *Genes Immun.* 2015;16(1):71–82.
 140. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002;99(10):3661–3667.
 141. Pyzer AR, Stroopinsky D, Rajabi H, et al. MUC1-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;129(13):1791–1801.
 142. Yahya S. Al-Matary, Lacramioara Botezatu, Bertram Opalka, et al. Acute myeloid leukemia cells polarize macrophages towards a leukemia supporting state in a Growth factor independence 1 dependent manner. *Haematologica.* 2016;101(10 SE-Articles):1216–1227.
 143. Passaro D, Di Tullio A, Abarategi A, et al. Increased Vascular Permeability in the Bone Marrow Microenvironment Contributes to Disease Progression and Drug Response in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell.* 2017;32(3):324-341.e6.
 144. Duarte D, Hawkins ED, Akinduro O, et al. Inhibition of Endosteal Vascular Niche

- Remodeling Rescues Hematopoietic Stem Cell Loss in AML. *Cell Stem Cell*. 2018;22(1):64-77.e6.
145. Müller L, Tunger A, Wobus M, et al. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update . *Front. Cell Dev. Biol.* . 2021;9:.
146. Laetitia Boutin, Pierre Arnautou, Aurélie Trignol, et al. Mesenchymal stromal cells confer chemoresistance to myeloid leukemia blasts through Side Population functionality and ABC transporter activation. *Haematologica*. 2020;105(4 SE-Articles):987–9998.
147. Diaz de la Guardia R, Lopez-Millan B, Lavoie JR, et al. Detailed Characterization of Mesenchymal Stem/Stromal Cells from a Large Cohort of AML Patients Demonstrates a Definitive Link to Treatment Outcomes. *Stem Cell Reports*. 2017;8(6):1573–1586.
148. Cancilla D, Rettig MP, DiPersio JF. Targeting CXCR4 in AML and ALL . *Front. Oncol.* . 2020;10:.
149. Moschoi R, Imbert V, Nebout M, et al. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood*. 2016;128(2):253–264.
150. Mouggiakakos D. The Induction of a Permissive Environment to Promote T Cell Immune Evasion in Acute Myeloid Leukemia: The Metabolic Perspective. *Front. Oncol*. 2019;9(November):1–9.
151. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood*. 2017;129(10):1320–1332.
152. Li S, Mason CE, Melnick A. Genetic and epigenetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 2016;36:100–106.
153. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M -T, et al. Proposals for the Classification of the

- Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br. J. Haematol.* 1976;33(4):451–458.
154. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, et al. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. *Ann. Intern. Med.* 1985;103(4):620–625.
155. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL M-T, et al. Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7). *Ann. Intern. Med.* 1985;103(3):460–462.
156. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br. J. Haematol.* 1991;78(3):325–329.
157. Arber DA, Stein AS, Carter NH, et al. Prognostic Impact of Acute Myeloid Leukemia Classification: Importance of Detection of Recurring Cytogenetic Abnormalities and Multilineage Dysplasia on Survival. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003;119(5):672–680.
158. Woessner Casas S, Florensa Brichs L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Grupo Acción Médica; 2006.
159. DiNardo CD, Wei AH. How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs. *Blood.* 2020;135(2):85–96.
160. Heuser M, Ofran Y, Boissel N, et al. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann. Oncol.* 2020;31(6):697–712.
161. Lichtman MA. A historical perspective on the development of the cytarabine (7days) and daunorubicin (3days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2013;50(2):119–130.
162. Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica.* 2020;105(12 SE-Centenary Review):2716–2729.
163. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous Infusion of Bone Marrow

- in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 1957;257(11):491–496.
164. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front. Oncol.* 2019;9:.
165. Carreras E, Rovira M, Zebeiro I, Valcarcel D. Manual de Trasplante Hematopoyético. Editorial Antares; 2016.
166. Yanada M, Konuma T, Mizuno S, et al. Predicting non-relapse mortality following allogeneic hematopoietic cell transplantation during first remission of acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(2):387–394.
167. Styczyński J, Tridello G, Koster L, et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55(1):126–136.
168. Sorror ML, Giralt S, Sandmaier BM, 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.* 2007;110(13):4606–4613.
169. 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(10):579–590.
170. Sorror ML, Storb RF, Sandmaier BM, et al. Comorbidity-Age Index: A Clinical Measure of Biologic Age Before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2014;32(29):3249–3256.
171. Lori S. Muffy, Masha Kocherginsky, Wendy Stock, et al. Geriatric assessment to predict survival in older allogeneic hematopoietic cell transplantation recipients. *Haematologica.* 2014;99(8 SE-Articles):1373–1379.

172. Antar AI, Otrrock ZK, Jabbour E, Mohty M, Bazarbachi A. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. *Leukemia*. 2020;34(3):682–696.
173. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(5):454–464.
174. Haubner S, Perna F, Köhnke T, et al. Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML. *Leukemia*. 2019;
175. van der Jagt RHC, Badger CC, Appelbaum FR, et al. Localization of Radiolabeled Antimyeloid Antibodies in a Human Acute Leukemia Xenograft Tumor Model. *Cancer Res.* 1992;52(1):89 LP – 94.
176. Hamann PR, Hinman LM, Hollander I, et al. Gemtuzumab Ozogamicin, A Potent and Selective Anti-CD33 Antibody–Calicheamicin Conjugate for Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Bioconjug. Chem.* 2002;13(1):47–58.
177. Petersdorf SH, Kopecky KJ, Slovak M, et al. A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(24):4854–4860.
178. Appelbaum FR, Bernstein ID. Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(22):2373–2376.
179. Castaigne S, Pautas C, Terré C, 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*. 2012;379(9825):1508–1516.
180. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, 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.* 2014;15(9):986–996.
181. Kim HP, Gerhard B, Harasym TO, Mayer LD, Hogge DE. Liposomal encapsulation

- of a synergistic molar ratio of cytarabine and daunorubicin enhances selective toxicity for acute myeloid leukemia progenitors as compared to analogous normal hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* 2011;39(7):741–750.
182. Lancet JE, Cortes JE, Hogge DE, 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. 2014;123(21):3239–3247.
183. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2018;36(26):2684–2692.
184. Bernard J, Weil M, Boiron M, et al. Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. *Blood.* 1973;41(4):489–496.
185. Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hamatol. Bluttransfus.* 1989;32(2):88–96.
186. Degos L, Wang ZY. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 2001;20(49 REV. IIS. 6):7140–7145.
187. Chen G, Zhu J, Shi X, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood.* 1996;88(3):1052–1061.
188. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, et al. Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(2):111–121.
189. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: Updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2019;133(15):1630–1643.
190. Arellano M, Carlisle JW. How I treat older patients with acute myeloid leukemia.

- Cancer*. 2018;124(12):2472–2483.
191. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009;10(3):223–232.
192. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2010;28(4):562–569.
193. Stomper J, Rotondo JC, Greve G, Lübbert M. Hypomethylating agents (HMA) for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: mechanisms of resistance and novel HMA-based therapies. *Leukemia*. 2021;35(7):1873–1889.
194. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, 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*. 2012;30(21):2670–2677.
195. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 2015;126(3):291–299.
196. Santini V, Ossenkoppele GJ. Hypomethylating agents in the treatment of acute myeloid leukemia: A guide to optimal use. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2019;140(May):1–7.
197. Jin S, Cojocari D, Purkal JJ, et al. 5-Azacitidine Induces NOXA to Prime AML Cells for Venetoclax-Mediated Apoptosis. *Clin. Cancer Res*. 2020;26(13):3371–3383.
198. DiNardo CD, Pratz KW, Letai A, et al. Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute

- myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol.* 2018;19(2):216–228.
199. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, et al. Efficacy and biological correlates of response in a phase II study of venetoclax monotherapy in patients with acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* 2016;6(10):1106–1117.
200. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(7):617–629.
201. DeWolf S, Tallman MS. How I treat relapsed or refractory AML. *Blood.* 2020;136(9):1023–1032.
202. Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, et al. Curability of Patients With Acute Myeloid Leukemia Who Did Not Undergo Transplantation in First Remission. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(10):1293–1301.
203. Forman SJ, Rowe JM. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult. *Blood.* 2013;121(7):1077–1082.
204. Bejanyan N, Weisdorf DJ, Logan BR, et al. Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015;21(3):454–459.
205. DiNardo CD, Stein EM, De Botton S, et al. Durable remissions with ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML. *N. Engl. J. Med.* 2018;378(25):2386–2398.
206. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;130(6):722–731.
207. Isidori A, Cerchione C, Daver N, et al. Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia: Where We Stand. *Front. Oncol.* 2021;11(May):
208. Gill SI. How close are we to CAR T-cell therapy for AML? *Best Pract. Res. Clin.*

- Haematol.* 2019;32(4):101104.
209. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2006;107(9):3481–3485.
210. Barbara Deschler, Gabriele Ihorst, Uwe Platzbecker, et al. Parameters detected by geriatric and quality of life assessment in 195 older patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia are highly predictive for outcome. *Haematologica.* 2013;98(2 SE-Articles):208–216.
211. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, 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.* 2007;136(4):624–627.
212. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, et al. Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2002;20(10):2480–2485.
213. Bloomfield CD, Goldman A, Hossfeld D, de la Chapelle A. Clinical Significance of Chromosomal Abnormalities in Acute Nonlymphoblastic Leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1984;11(3):332–350.
214. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, et al. The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1989;40(2):203–216.
215. Berger R, Bernheim A, Ochoa-Noguera ME, et al. Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: A study of 343 patients. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1987;28(2):293–299.
216. Fenaux P, Preudhomme C, Laï JL, et al. Cytogenetics and their prognostic value in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 283 cases. *Br. J. Haematol.* 1989;73(1):61–67.
217. 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. *Blood*. 1998;92(7):2322–2333.
218. Grimwade D, Hills RK, Moorman A V, et al. Refinement of cytogenetic classification in AML Younger adult patients treated in UKMRC. *Blood*. 2010;116(3):354–366.
219. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29–41.
220. 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(3):453–474.
221. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede 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*. 2011;29(20):2758–2765.
222. Mrożek 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(36):4515–4523.
223. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu 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(14):2734–2738.
224. Herold T, Rothenberg-Thurley M, Grunwald V V., et al. Validation and refinement of the revised 2017 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34:3161–3172.
225. Boddu PC, Kadia TM, Garcia-Manero G, et al. Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with NPM1 and FLT3-

- internal tandem duplication genotypes. *Cancer*. 2019;125(7):1091–1100.
226. Harada Y, Nagata Y, Kihara R, et al. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. *Leuk. Res.* 2018;66(December 2017):20–27.
227. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009;114(14):3024–3032.
228. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740–3746.
229. Sakaguchi M, Yamaguchi H, Najima Y, et al. Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2018;2(20):2744–2754.
230. Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, et al. Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9;11)(p22;q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 1997;90(11):4532–4538.
231. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;32(2):273–284.
232. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3 -ITD – positive AML with respect to allogeneic transplantation. 2018;124(23):3441–3450.
233. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute

- myeloid leukemia and with distinct gene and microRNA expression signatures. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(25):3109–3118.
234. Molica M, Mazzone C, Niscola P, de Fabritiis P. TP53 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Still a Daunting Challenge? *Front. Oncol.* 2021;10(February):1–16.
235. Mrózek K, Eisfeld AK, Kohlschmidt J, et al. Complex karyotype in de novo acute myeloid leukemia: typical and atypical subtypes differ molecularly and clinically. *Leukemia.* 2019;33(7):1620–1634.
236. Rogers HJ, Hsi ED. Myeloid Neoplasms with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2). *Surg. Pathol. Clin.* 2013;6(4):677–692.
237. Sitges M, Boluda B, Garrido A, et al. Acute myeloid leukemia with inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2): Study of 61 patients treated with intensive protocols. *Eur. J. Haematol.* 2020;105(2):138–147.
238. Neuendorff NR, Hemmati P, Arnold R, et al. BCR-ABL1 acute myeloid leukemia: Are we always dealing with a high-risk disease? *Blood Adv.* 2018;2(12):1409–1411.
239. Soupier CP, Vergilio JA, Dal Cin P, et al. Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: A rare aggressive leukemia with clinicopathologic features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007;127(4):642–650.
240. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(5):422–433.
241. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2003;21(24):4642–4649.
242. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(23):2209–2221.

243. Short NJ, Montalban-Bravo G, Hwang H, et al. Prognostic and therapeutic impacts of mutant TP53 variant allelic frequency in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2020;4(22):5681–5689.
244. Esteve J, Escoda L, Martín G, et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. *Leukemia.* 2007;21(3):446–452.
245. Yalniz FF, Patel KP, Bashir Q, et al. Significance of minimal residual disease monitoring by real-time quantitative polymerase chain reaction in core binding factor acute myeloid leukemia for transplantation outcomes. *Cancer.* 2020;126(10):2183–2192.
246. Tiong IS, Dillon R, Ivey A, et al. Venetoclax induces rapid elimination of NPM1 mutant measurable residual disease in combination with low-intensity chemotherapy in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2021;192(6):1026–1030.
247. Araki D, Wood BL, Othus M, 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.* 2016;34(4):329–336.
248. Dillon R, Hills RK, Freeman SD, et al. Molecular MRD status and outcome after transplantation in NPM1 mutated AML: results from the UK NCRI AML17 study. *Blood.* 2020;
249. Cocciardi S, Dolnik A, Kapp-Schwoerer S, et al. Clonal evolution patterns in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation. *Nat. Commun.* 2019;10(1):1–11.
250. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122(1):100–108.
251. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, et al. Implications of TP53 allelic state for

- genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat. Med.* 2020;26(10):1549–1556.
252. Britt A, Mohyuddin GR, McClune B, et al. Acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome with chromosome 17 abnormalities and long-term outcomes with or without hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk. Res.* 2020;95:106402.
253. Eisfeld A-K, Kohlschmidt J, Mims A, et al. Additional gene mutations may refine the 2017 European LeukemiaNet classification in adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged <60 years. *Leukemia.* 2020;34:3215–3227.
254. Radakovich N, Cortese M, Nazha A. Acute myeloid leukemia and artificial intelligence, algorithms and new scores. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2020;33(3):101192.
255. Krönke J, Schlenk RF, Jensen K-O, et al. Monitoring of Minimal Residual Disease in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Study From the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(19):2709–2716.
256. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood.* 2009;114(11):2220–2231.
257. Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. 2018;35(2):.
258. Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML.

Bibliografia

Blood. 2013;122(1):83–92.

