

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA CON TRANSLOCACIÓN t(8;16)(p11;p13) Y
REORDENAMIENTO *MYST3-CREBBP*

Tesi presentada per
Mireia Camós Guijosa
per aspirar al grau de Doctora en Medicina

Director de la tesi Dr. Jordi Esteve i Reyner

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Tutor de la tesi: Prof. Emili Montserrat i Costa

Barcelona, 2007

I. INTRODUCCIÓN

Introducción

1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

1.1. Definición

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad en la que se produce una expansión clonal de células neoplásicas de estirpe mieloide denominadas blastos, cuyo origen radica en la transformación maligna de precursores hematopoyéticos (Lowenberg et al, 1999). La definición de LMA según la clasificación de la *World Health Organization* (WHO) requiere la presencia de un mínimo de un 20% de blastos en médula ósea, cifra que la distingue de los síndromes mielodisplásicos (SMD), en los que el porcentaje de blastos es menor (Harris et al, 1999; Vardiman et al, 2002; Cheson et al, 2003). La LMA engloba, en realidad, un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por presentar un bloqueo de la maduración de las células mieloides y un aumento de la proliferación de las mismas, como consecuencia de diversos eventos moleculares complementarios (Lowenberg et al, 1999; Hiddemann et al, 2005)

La LMA puede presentarse como un proceso *de novo*, en aquellos casos sin antecedente de SMD o síndrome mieloproliferativo crónico (SMPC) ni exposición conocida a agentes leucemógenos. Por el contrario, en la LMA secundaria los pacientes presentan alguno de dichos antecedentes, ya sea un SMD/SMPC o bien tratamientos con capacidad leucemogénica, principalmente fármacos alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II (Cheson et al, 2003).

1.2. Incidencia

La incidencia estimada de la LMA *de novo* es de 3,4 por 10⁵ habitantes/año y aumenta progresivamente con la edad, siendo de 17 por 10⁵ habitantes/año en adultos mayores de 64 años (*SEER Cancer Statistics Review, 1977-2003*, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/).

La LMA secundaria representa el 10-20% de todas las LMA y su incidencia se ha incrementado en los últimos años debido al uso creciente de tratamientos que lesionan el ADN en pacientes con cáncer y a la prolongación de la supervivencia de estos pacientes (Smith et al, 1996). El riesgo de LMA secundaria en los pacientes tratados con quimioterapia se incrementa en un 0,25-1% por año, empezando dos años después del inicio del tratamiento y hasta 5-7 años después del final del mismo (Pedersen-Bjergaard, 2005).

1.3. Etiología

La etiología de la LMA es por lo general desconocida, si bien en una pequeña proporción de pacientes se han identificado una serie de factores predisponentes y algunos posibles agentes leucemógenos (tabla 1).

Tabla 1. Factores que han sido implicados en la etiología de la LMA.

Enfermedades congénitas
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Down • Síndromes de insuficiencia medular congénita <ul style="list-style-type: none"> - Anemia de Fanconi - Neutropenia congénita grave (Síndrome de Kostmann y otras entidades) - Síndrome de Shwachman-Diamond - Anemia de Diamond-Blackfan • Síndrome de Bloom • Ataxia-telangiectasia • Neurofibromatosis de tipo 1 (enfermedad de von Recklinghausen)
Radiaciones ionizantes
Neoplasias hematológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Síndromes mielodisplásicos • Síndromes mieloproliferativos crónicos
Agentes tóxicos
<ul style="list-style-type: none"> • Benceno y otros hidrocarburos aromáticos • Tratamientos quimioterápicos <ul style="list-style-type: none"> - Alquilantes - Inhibidores de la topoisomerasa II - Otros

Diferentes anomalías citogenéticas se asocian a un mayor riesgo de desarrollar una LMA, tales como la trisomía del cromosoma 21 en el síndrome de Down. Se ha estimado que el riesgo de LMA en estos pacientes es 10 a 20 veces superior al de la población normal, presentando con especial frecuencia LMA de línea megacariocítica. En estos casos se ha identificado una mutación

en el factor de transcripción *GATA1*, que tiene un importante papel en la diferenciación de los precursores eritroides y megacariocíticos (Muntean et al, 2006).

Otra de las enfermedades con alto riesgo de desarrollar una LMA es la anemia de Fanconi, una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por presentar anomalías del desarrollo, una insuficiencia medular y una elevada incidencia de SMD, LMA y tumores sólidos. Se ha reconocido como base genética de esta enfermedad la presencia de mutaciones en uno o más de los 11 genes que forman el llamado complejo proteico de Fanconi, relacionado con vías de respuesta al daño del ADN por agentes genotóxicos (Tischkowitz et al, 2004; Bagby et al, 2006).

Por otro lado, la neutropenia congénita grave (NCG) comprende diversas enfermedades que se caracterizan por una importante neutropenia, que predispone a infecciones bacterianas graves desde la infancia. En el 60% de los casos se encuentra una mutación en el gen *ELA2*, pero es frecuente encontrar mutaciones añadidas debido a una importante inestabilidad genética (Welte et al, 2006). Aquellos pacientes con NCG en los que se han detectado mutaciones en el receptor de G-CSF presentan un mayor riesgo de desarrollar una LMA (Dong et al, 1995).

1.4. Manifestaciones clínicas

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

1.4.1. Insuficiencia medular

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

1.4.2. Afección extramedular

Las leucemias con diferenciación monocítica son las que con mayor frecuencia presentan manifestaciones clínicas extramedulares. Aunque

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

1.4.3. Coagulopatía

Las hemorragias en los pacientes con LMA pueden ser desencadenadas o agravadas por la quimioterapia y son secundarias en parte a la presencia de una coagulopatía intravascular diseminada (CID) o una fibrinólisis anormal, como ocurre típicamente en la leucemia promielocítica aguda (LPA) y en algunos casos de LMA monocítica (Tallman, 2004). En la LPA la causa de la coagulopatía es compleja debido a la combinación del efecto de citocinas liberadas por los blastos, una hiperfibrinólisis y una CID, (Arbuthnot et al, 2006). La hiperfibrinólisis de la LPA se explicaría fundamentalmente por una sobreexpresión de anexina II en la superficie de los promielocitos leucémicos, lo que daría lugar a un exceso en la formación de plasmina y un consiguiente aumento de la fibrinólisis (Menell et al, 1999). El tratamiento con ácido *all-trans*-retinoico (ATRA), y también con trióxido de arsénico, disminuye la producción de anexina II, lo que explicaría la rápida resolución de la coagulopatía en los pacientes que reciben estos fármacos (Zhang et al, 2002).

1.4.4. Leucostasis

La leucostasis es una complicación infrecuente pero grave, que suele presentarse en pacientes con una elevada cifra de leucocitos. Consiste en el acúmulo de blastos leucémicos que ocupan la luz vascular en la microcirculación, con o sin presencia de fibrina. El mecanismo patogénico de la leucostasis es probablemente complejo, y en él interviene un daño directo de la célula endotelial, probablemente mediado por citocinas liberadas durante la interacción entre blastos leucémicos y el endotelio vascular (Porcu et al, 2000). Tras la lesión endotelial se produciría una migración de los blastos al espacio perivascular. Parece por tanto que la capacidad de los blastos de responder a unas citocinas quimiotácticas y la expresión de determinadas moléculas de adhesión, como CD54 o CD56 son probablemente más importantes en la patogenia de la leucostasis que el número de blastos circulantes (Porcu et al, 2002; Novotny et al, 2006). Las principales manifestaciones clínicas de la leucostasis se dan a nivel del SNC, y van desde la cefalea al coma, y a nivel pulmonar, con manifestaciones respiratorias que incluyen el distrés respiratorio o la hipoxemia.

1.4.5. Trastornos metabólicos

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

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

1.5. Clasificación de la LMA

Existen diversos subtipos de LMA causados por distintos mecanismos patogénicos, que se traducirán en entidades con un comportamiento clínico y biológico diferente. En los últimos años, el avance en las técnicas diagnósticas ha permitido ampliar de forma notable el conocimiento de la biología de las leucemias; este hecho queda reflejado en las sucesivas clasificaciones de la LMA que se han utilizado en las últimas décadas.

1.5.1. Clasificación FAB

La primera de las clasificaciones de la LMA fue la del grupo FAB (Francés-Americano-Británico). Esta clasificación se basó inicialmente en criterios morfológicos y citoquímicos, y buscaba identificar el equivalente leucémico de las células mieloides para cada estadio de diferenciación. Inicialmente se definieron 7 categorías (Bennett et al, 1976), pero en revisiones posteriores se añadieron las definiciones de los subtipos M0 y M7 al incorporar criterios inmunológicos (tabla 2) (Bennett et al, 1985; Bennett et al, 1991).

Tabla 2. Clasificación FAB de las LMA.

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

MPO: Mieloperoxidasa. NS: Negro Sudán

* Subtipos definidos posteriormente incorporando criterios inmunológicos.

** Las células son positivas para algún antígeno mieloide por inmunofenotipo

† Las células son positivas para α -naftil-acetato esterasa y para el factor VIII o la glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa y negativas para la naftil-butirato-esterasa.

1.5.2. Clasificación MIC

La clasificación MIC (*morphology-immunophenotype-cytogenetics*) fue posterior e integraba los datos morfológicos-citoquímicos, el inmunofenotipo y la citogenética (tabla 3) (First MIC Cooperative Study Group, 1986; Second MIC Cooperative Study Group, 1988).

Tabla 3. Clasificación MIC de la LMA.

Anomalía cromosómica	FAB	Frecuencia	Genes implicados
• t(8;21)(q22;q22)	M2	~ 5-10 %	AML1-ETO
• t(15;17)(q22;q21)	M3	~ 10-15 %	PML-RAR α
• inv(16)/t(16;16)	M4	~ 5-10 %	CBFB-MYH11
• Anomalías en 11q23	M4/M5	~ 5-10 %	MLL
- t(9;11)(p21-22;q23)	M5	~ 5 %	AF9-MLL
- t(11;19)(q23;p13.1)			MLL-ELL
- t(11;19)(q23;p13.3)			MLL-ENL
- Otras			
• t(6;9)(q23;q34)	M2/M4	~ 1 %	□EK-CAN
• t(8;16)(p11;p13)	M4/M5	< 1 %	MOZ-CBP
• Anomalías en 3q26			
- inv(3)(q21;q26)/t(3;3)	M4	3-5 %	EVI1
- t(3;21)(q26;q22)		1 %	EVI1-AML1
- t(1;3)(p36;q21)		< 1 %	EVI1
• t(9;22)(q34;q11)	M1	3 %	BCR-ABL
• t(1;22)(p13;q13)	M7	< 1 %	OTT-MAL

1.5.3. Clasificación WHO

La clasificación de la WHO es la más reciente y define las principales categorías de LMA en función de las anomalías moleculares subyacentes. Además, esta clasificación ha aportado el reconocimiento de nuevas subentidades como la LMA con displasia multilínea (LMA-DM), o la consideración de los antecedentes de hemopatía previa o de exposición a leucemógenos que definen la leucemia como secundaria (Harris et al, 1999; Vardiman et al, 2002) (tabla 4). De esta manera, esta clasificación estratifica las LMA en cuatro grupos principales: el primero lo constituyen aquellos subtipos con anomalías citogenéticas y moleculares recurrentes, como las LMA con t(15;17), la t(8;21), la inv(16) y las anomalías del cromosoma 11q23 afectando al gen *MLL*. Por otro lado se define la LMA-DM, ya sea secundaria o no a un SMD/SMPC previo. Se reconoce un tercer grupo de leucemias secundarias a tratamientos quimio o radioterápicos. El resto de pacientes no definidos en las categorías descritas son clasificados según su estirpe y el grado de diferenciación de los blastos.

Tabla 4. Clasificación WHO de la LMA.

LMA con anomalías genéticas recurrente*s
<ul style="list-style-type: none"> • LMA con t(8;21)(q22;q22), (<i>RUNX1-RUNX1T1</i> o <i>AML1-ETO</i>) • LMA con eosinófilos anormales en médula ósea e inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22), (<i>CBFβ-MYH11</i>) • Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12), (<i>PML-RARα</i>) y variantes • LMA con anomalías en 11q23 (<i>MLL</i>)
LMA con displasia multilinea
<ul style="list-style-type: none"> • Secundaria a SMD/SMPC • Sin antecedente de SMD/SMPC
LMA secundaria a tratamiento
<ul style="list-style-type: none"> • Relacionados con tratamientos alquilantes / radiaciones ionizantes • Relacionados con inhibidores de la topoisomerasa II • Otros
LMA no clasificable por los criterios anteriores
<ul style="list-style-type: none"> • LMA mínimamente diferenciada • LMA sin maduración • LMA con maduración • Leucemia aguda mielomonocítica • Leucemia aguda monoblástica y monocítica • Leucemia aguda eritroide (eritroide/mieloide y eritroleucemia pura) • Leucemia aguda megacarioblástica • Leucemia aguda de basófilos • Panmielosis aguda con mielofibrosis • Sarcoma mieloide

* En cursiva se detalla el reordenamiento molecular correspondiente a la translocación.

1.6. Pronóstico

La LMA es una enfermedad muy grave y sin la administración de tratamiento su pronóstico es infausto en pocas semanas. Sin embargo, el uso de tratamientos intensivos ha permitido que hasta una tercera parte de los pacientes adultos con LMA curen de su enfermedad. En general, el pronóstico de los pacientes con LMA varía en función de diversos parámetros dependientes del paciente (la edad) y, principalmente, de las características biológicas de la propia enfermedad.

1.6.1. Cariotipo

Más de la mitad de los pacientes adultos con LMA presentan aberraciones cromosómicas recurrentes, como las translocaciones recíprocas, inversiones, deleciones, trisomías y monosomías. Hoy en día se considera que el cariotipo en el momento del diagnóstico es el factor pronóstico más importante en los pacientes con LMA (Grimwade et al, 1998; Slovak et al, 2000; Byrd et al, 2002; Mrozek et al, 2004). De esta manera, la citogenética distingue tres grupos de diferente pronóstico: favorable, intermedio y desfavorable (Grimwade et al, 1998; Slovak et al, 2000; Byrd et al, 2002; Frohling et al, 2005), con diferencias en cuanto a la tasa de respuestas completas (RC) y supervivencia global (SG) (tabla 5 y figura 1).

Tabla 5. Estratificación pronóstica de la LMA en función de las anomalías citogenéticas, según diferentes grupos cooperativos.

Riesgo	MRC	SWOG/ECOG	CALGB*
Favorable	t(8;21)	t (8;21)	t(8;21)
	inv(16)/t(16;16)	inv(16)/t(16;16)/del(16q)	inv(16)/t(16;16)
	t(15;17)	t(15;17)	**
			del(9q)***
Intermedio	cariotipo normal	cariotipo normal	cariotipo normal
	+8	+8	
	del(7q)		del(7q)
		-Y	-Y
	anomalías 11q23		t(9;11)
			del(11q)
			+11
		del(12p)	anomalías 12p
	+21		+21
	+22	+6	+13
del(9q)		del(5q)	
otras anomalías		del(20q)	
		del(9q)***	
Desfavorable	anomalías 3q	anomalías 3q	inv(3)/t(3;3)
	-7	-7/del(7q)	-7
	-5/del(5q)	-5/del(5q)	
	complejo [∂]	complejo ^ψ	Complejo ^ψ
		t(6;9)	t(6;9)
		anomalías 11q	t(11;19)
			t(6;11)
		t(9;22)	+8
		anomalías 9q	
		anomalías 17p	
	anomalías 20q		
	anomalías 21q		

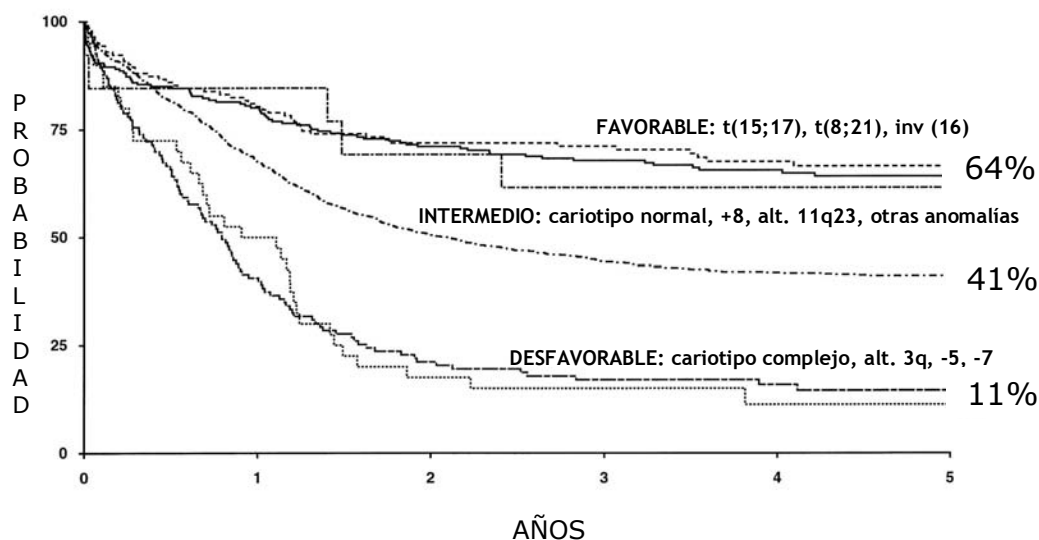
MRC: Medical Research Council, (Grimwade et al, 1998).

SWOG/ECOG: Southwest Oncology Group Eastern Cooperative Oncology Group (Slovak et al, 2000).

CALGB: Cancer and Leukemia Group B (Byrd et al, 2002). * Categorías de riesgo para la supervivencia global. ** No se incluyeron pacientes con t(15;17) en este estudio. *** Los pacientes con del(9q) pasaban a riesgo intermedio si sólo se analizaban los casos que no recibían un trasplante de progenitores hematopoyéticos.

∂ ≥5 aberraciones. ψ ≥3 aberraciones.

Figura 1. Supervivencia global de los pacientes con LMA según el riesgo citogenético definido por el grupo MRC (adaptado de (Grimwade et al, 1998).



1.6.1.1. LMA DE PRONÓSTICO FAVORABLE

El grupo de LMA consideradas de buen pronóstico incluye la LPA y las leucemias con translocaciones que involucran al *core-binding factor* (CBF). La LPA presenta la translocación t(15;17)(q22;q21), que produce la fusión de los genes *PML* y *RAR α* . Las leucemias CBF (LMA-CBF) están constituidas por la LMA con translocación t(8;21)(q22;q22) y la LMA con inv(16)(p13;q22) o más raramente t(16;16)(p13;q22). En estas leucemias se halla involucrada alguna de las dos subunidades, alfa y beta, respectivamente, del CBF, un factor de transcripción fundamental en la regulación de la hematopoyesis normal (Steffen et al, 2005). Globalmente, este subgrupo de leucemias (LPA y LMA-

CBF) presenta una supervivencia a largo plazo superior al 60% (Grimwade et al, 2001).

1.6.1.2. LMA DE PRONÓSTICO DESFAVORABLE

La presencia de un cariotipo complejo, la delección o monosomía de los cromosomas 5 y/ó 7 y las anomalías del cromosoma 3q definen un grupo de LMA de pronóstico desfavorable. Este grupo de leucemias se caracterizan por una pobre respuesta a la quimioterapia y un alto riesgo de recidiva, lo que se traduce en una supervivencia inferior al 20% (Grimwade et al, 1998).

1.6.1.3. LMA DE PRONÓSTICO INTERMEDIO

El amplio conjunto de leucemias que integran el grupo de pronóstico intermedio, con una supervivencia de alrededor del 30-40% con los protocolos terapéuticos actualmente empleados, es heterogéneo. En él se incluyen tanto los casos con citogenética normal como aquellos que presentan otras anomalías cromosómicas no descritas en los anteriores grupos.

1.6.2. Otros factores pronósticos

Se ha sugerido un valor pronóstico para diferentes anomalías biológicas como la leucocitosis, la presencia de proteínas transportadoras transmembrana que confieren una resistencia al tratamiento (Leith et al, 1999), o las mutaciones o sobreexpresión de genes específicos como *FLT3* (Kiyoi et al, 1999; Kottaridis et al, 2001; Thiede et al, 2002), *nucleofosmina*

(*NPM*) (Schnittger et al, 2005; Dohner et al, 2005; Thiede et al, 2006), *c/EBP α* (*CEBPA*) (Preudhomme et al, 2002; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al, 2003a; Frohling et al, 2004), *EVI1* (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al, 2003b; Valk et al, 2004), *c-KIT* (Care et al, 2003; Paschka et al, 2006), *BAALC* (Baldus et al, 2006), *ERG* ((Marcucci et al, 2005b), o la ratio de *BCL2-BAX* (Kohler et al, 2002) (tabla 6).

Tabla 6. Variables con posible valor pronóstico en la LMA.

Variable	Pronóstico	Referencias
• Mutaciones de <i>CEBPA</i>	Favorable	(Preudhomme et al, 2002; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al, 2003a; Frohling et al, 2004)
• Mutaciones de <i>NPM</i>	Favorable*	(Schnittger et al, 2005; Dohner et al, 2005; Thiede et al, 2006)
• <i>FLT3-IT\square</i>	Desfavorable	(Kiyoi et al, 1999; Kottaridis et al, 2001; Thiede et al, 2002)
• Sobreexpresión de <i>EVI1</i>	Desfavorable	(Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al, 2003b; Valk et al, 2004)
• Mutaciones de <i>c-KIT</i>	desfavorable en LMA-CBF	(Care et al, 2003; Paschka et al, 2006)
• Mutaciones de <i>RAS</i>	Desfavorable	(Bowen et al, 2005)
• Sobreexpresión de <i>BAALC</i>	Desfavorable	(Baldus et al, 2006)
• Sobreexpresión de <i>ERG</i>	Desfavorable	(Marcucci et al, 2005a)
• Ratio de <i>BCL2-BAX</i>	Desfavorable	(Kohler et al, 2002)
• Proteínas transportadoras transmembrana (<i>M\squareR</i>)	Desfavorable	(Leith et al, 1999)

- En ausencia de *FLT3-IT \square* .
- MDR: multidrug resistance.

1.7. Tratamiento

1.7.1. Principios generales

El mayor conocimiento de la biología de la LMA permite establecer de manera más precisa el pronóstico en un paciente dado y, con ello, diseñar un tratamiento más adecuado al riesgo específico, concepto conocido como tratamiento adaptado al riesgo (*risk-adapted therapy*). La estrategia de tratamiento de la LMA puede sistematizarse en dos fases: la primera es la quimioterapia de inducción, que tiene como objeto lograr una aparente normalización morfológica de la médula ósea y la sangre, lo que se conoce como remisión completa (RC); la segunda fase, conocida como tratamiento post-remisión, tiene como finalidad la erradicación de la carga tumoral oculta responsable de la recidiva ulterior. La quimioterapia de inducción a la remisión se basa en la combinación de un antraciclínico (fundamentalmente daunorrubicina o idarrubicina) y citarabina, tratamiento con el que se logra la RC en aproximadamente el 70% de los enfermos (revisado en (Tallman, 2005; Tallman, 2006). Se han sugerido diversas estrategias para aumentar la tasa de RC obtenidas con el tratamiento de inducción tales como: el incremento de las dosis de citarabina (Shepherd et al, 1996; Kern et al, 2006); la adición de otros agentes como etopósido; el empleo de factores de crecimiento como G-CSF para aumentar la proporción de blastos leucémicos en fase S del ciclo celular y, de este modo, lograr mayor sensibilidad a la acción de los citostáticos (Lowenberg et al, 2003); la utilización del anticuerpo monoclonal

frente a CD33 conjugado con caliqueamicina (Kell et al, 2003) o la utilización de fármacos con capacidad de contrarrestar la acción de la glicoproteína P como mecanismo de quimiorresistencia (Mahadevan et al, 2004). Aunque existen resultados preliminares favorables, ninguna de estas estrategias ha mostrado de manera firme por el momento una mayor eficacia en el logro de respuestas frente a la combinación estándar.

El tratamiento post-remisión consiste, en la mayor parte de casos, en la administración de un número variable de ciclos de quimioterapia que contienen diversas combinaciones de citarabina a dosis altas, seguida posteriormente en muchos casos por un trasplante de progenitores hemopoyéticos (TPH), ya sea autólogo o alogénico a partir de un donante histocompatible (Brunet et al, 2004). Pese a este tratamiento aproximadamente la mitad de los enfermos que han mostrado una respuesta inicial presentarán una recidiva de la enfermedad, lo que se traduce en la curación de únicamente una tercera parte de los pacientes que reciben un tratamiento estándar.

Una consideración importante es la aplicabilidad restringida de la quimioterapia intensiva a los pacientes con una edad por lo general inferior a los 70 años y sin comorbilidad significativa, dada la marcada mielotoxicidad asociada a la quimioterapia, lo que hace desaconsejable su empleo en otros grupos de enfermos. Por tanto, dada la edad mediana de presentación de la LMA, sólo la mitad de los enfermos van a poder recibir un tratamiento con potencial curativo en el momento actual.

1.7.2. Tratamiento adaptado al riesgo

El refinamiento pronóstico de la LMA ha derivado en un intento de individualizar el tratamiento, con el cual se intenta conjugar: el riesgo intrínseco de la leucemia, el potencial antileucémico de las principales opciones post-remisión (quimioterapia, TPH autólogo, TPH alogénico), y la toxicidad asociada al tratamiento (tabla 7).

Tabla 7. Tratamiento adaptado al riesgo: principales opciones terapéuticas post-remisión en la LMA.

	Citarabina a dosis altas	TPH autólogo	TPH alogénico
Potencial antileucémico	Menor	≥ quimioterapia	Mayor
Toxicidad	Baja (MRT<5%)	Baja (MRT=5-10%)	Mayor (MRT≥30%)
Indicación	LMA-CBF	¿LMA-CBF? LMA de riesgo intermedio	LMA de alto riesgo ¿LMA de riesgo intermedio?

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

MRT: mortalidad relacionada con el tratamiento.

LMA-CBF: LMA con translocaciones que involucran el *core binding factor*: t(8;21) e inv(16)

Sin embargo, sólo en una minoría de casos existen claras evidencias de cual es el tratamiento óptimo, mientras que en la mayoría de los enfermos el conocimiento actual no muestra un beneficio evidente de una opción sobre otra (revisado en (Visani et al, 2006). La LPA y la LMA-CBF constituyen el paradigma de subentidades de LMA con un tratamiento más diferenciado.

1.7.2.1. TRATAMIENTO DE LA LPA

En la LPA el tratamiento con el agente diferenciador ácido *all-trans*-retinoico (ATRA) en distintas fases del tratamiento (inducción, consolidación, mantenimiento) ha mejorado sustancialmente el pronóstico de la enfermedad (Mandelli et al, 1997; Fenaux et al, 1999; Burnett et al, 1999; Sanz et al, 1999; Lengfelder et al, 2000; Tallman et al, 2002; Sanz et al, 2004). En este sentido, la combinación de ATRA y quimioterapia exclusivamente basada en antraciclínicos permite una tasa de curación del 80%, según la experiencia del grupo cooperativo PETHEMA (Sanz et al, 1999; Sanz et al, 2004). En los casos de recaída el trióxido de arsénico muestra una gran actividad como agente de rescate (Niu et al, 1999; Soignet et al, 2001; Thomas et al, 2006b). Además, se está analizando el papel de nuevos tratamientos como gemtuzumab-ozogamicina en el tratamiento de primera línea o recaída de la LPA (Petti et al, 2001; Estey et al, 2002; Lo Coco et al, 2006). El TPH queda reservado, por tanto, a las fases avanzadas de la enfermedad (Lo Coco et al, 2003; de Botton et al, 2005; Esteve et al, 2007) Una identificación más precisa de factores iniciales asociados a un mayor riesgo de recidiva, como la hiperleucocitosis, puede dar lugar al desarrollo de estrategias específicas (intensificación de la quimioterapia, adición de agentes utilizados en segunda línea) para disminuir el riesgo en subgrupos específicos de enfermos (Sanz et al, 2000).

1.7.2.2. TRATAMIENTO DE LA LMA-CBF

Los pacientes con reordenamientos del CBF, ya sean t(8;21) o inv(16), son particularmente sensibles a las dosis altas de citarabina en la fase de intensificación (Bloomfield et al, 1998; Byrd et al, 1999; Bloomfield et al, 2004; Byrd et al, 2004; Schlenk et al, 2004), aunque no se conocen los mecanismos que expliquen esta mayor sensibilidad a este quimioterápico. Una vez más, el trasplante alogénico no sería recomendable en las fases tempranas de la enfermedad y quedaría reservado a los enfermos que presentan un fracaso al tratamiento de primera línea. Con todo, una tercera parte de estos enfermos pueden presentar una recidiva. Diversos factores se han relacionado con un mayor riesgo de recaída (alteraciones citogenéticas adicionales, coexpresión de marcadores antigénicos como CD56, hiperleucocitosis o, más recientemente, mutaciones de *c-KIT*), lo que permitiría realizar una intensificación del tratamiento de primera línea en los subgrupos de pacientes con mayor riesgo.

Dado que el mecanismo patogénico de estas leucemias implica el reclutamiento aberrante de proteínas con actividad deacetilante de histonas (HDAC), se ha sugerido que el uso de inhibidores de HDAC podría ser útil en estos pacientes.

1.7.3. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

Durante las últimas dos décadas se ha consolidado el papel del TPH alogénico como tratamiento de consolidación en los pacientes con LMA, debido a la suma del efecto citorreductor del régimen de acondicionamiento y el efecto inmune alorreactivo contra la leucemia (efecto *graft-versus-leukemia*, *GVL*) (Cornelissen et al, 2005; Messner, 2006). Sin embargo, los beneficios del TPH alogénico a menudo se ven contrarrestados por sus complicaciones, relacionadas mayoritariamente con la enfermedad de injerto contra el huésped y las medidas de inmunosupresión destinadas a su prevención. Como consecuencia de la elevada mortalidad relacionada con el procedimiento, el TPH alogénico, pese a disminuir de forma significativa la recaída en los pacientes con LMA, sólo consigue mejorar de forma discreta la supervivencia global y se traduce en beneficio en algunos estudios y en subgrupos determinados de enfermos (Cassileth et al, 1998; Suciú et al, 2003). Por este motivo su indicación se ha de restringir a aquellos pacientes con un riesgo alto de recidiva, aunque la definición de los grupos de riesgo es todavía motivo de controversia. Así, mientras que el papel del TPH alogénico en los pacientes con citogenética de alto riesgo parece bien establecido, su potencial terapéutico en subgrupos de enfermos portadores de anomalías moleculares como la mutación interna en tándem del gen *FLT3* (*FLT3-ITD*) no está aún bien definido (ver tabla 8).

Tabla 8. Indicaciones establecidas de alo-TPH en LMA (adaptado de Cornelissen y Lowenberg, 2005)

Subgrupo pronóstico	Primera RC	Fase avanzada
• LMA de pronóstico favorable		
- LPA	No	Sí
- LMA-CBF	No	Sí
• LMA de pronóstico intermedio	Dudoso*	Sí
• LMA de pronóstico desfavorable		
- Edad ≤ 50 años	Sí	Sí
- Edad > 60 años	Posible (Investigacional)	Posible (Investigacional)

• La presencia de determinadas alteraciones moleculares con valor pronóstico recientemente reconocido (mutaciones de NPM, FLT3-IT⁺) probablemente contribuirá a delimitar el papel del TPH alogénico en esta situación.

Más recientemente, se han desarrollado esquemas de acondicionamiento de intensidad reducida, con el objeto de disminuir la toxicidad del procedimiento preservando el efecto GVL derivado de las células del donante, lo que permite, además, ampliar la población que podría beneficiarse de un TPH alogénico. Aunque dicha estrategia parece traducirse en una significativa disminución de la mortalidad, el potencial antileucémico de este procedimiento debe evaluarse todavía de manera más exhaustiva (Aoudjhane et al, 2005; Mohty et al, 2005; Herr et al, 2007).

1.7.4. Nuevos tratamientos

El descubrimiento de algunos de los mecanismos de leucemogénesis subyacentes en la LMA ha permitido identificar potenciales dianas de tratamiento. Algunas de las estrategias desarrolladas en los últimos años se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Nuevos tratamientos en fase de ensayos clínicos en LMA.

<i>Clase</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Diana</i>
• <i>Anticuerpos monoclonales/ inmunoconjugados</i>	Gemtuzumab ozogamicin	CD33
• <i>Inhibidores de M^{DR}</i>	Valspodar, Ciclosporina, Zosuquidar	Glicoproteína P
• <i>Inhibidores de farnesil-transferasa</i>	Tipifarnib	<i>Ras</i>
• <i>Inhibidores de RTK:</i>		
- <i>FLT3</i>	PKC-412, CEP-701, MLN518, SU11248	<i>FLT3-ITD</i>
- <i>c-KIT</i>	Imatinib	<i>c-KIT</i>
• <i>Inhibidores de H^{AC}</i>	Ácido valproico, fenilbutirato	HDAC
• <i>Inhibidores del proteasoma</i>	Bortezomib	Proteasoma
• <i>Agentes antiangiogénicos</i>	Bevacizumab, SU5416	VEGF
• <i>Inhibidores de apoptosis</i>	Oblimersen	BCL-2
• <i>Análogos de nucleósidos</i>	Clofarabina, troxacitabina	ADN
• <i>Hipometilantes</i>	Azacitidina, decitabina	Metilación ADN

MDR: *multidrug resistance*. HDAC: *histone deacetyl-transferase activity*. VEGF: vascular endothelial growth factor. RTK: receptores tirosin-quinasa.

1.8. Mecanismos de leucemogénesis

En la patogénesis de la LMA se han implicado múltiples alteraciones moleculares que interrumpen procesos celulares diversos, tales como la regulación de la proliferación, diferenciación, supervivencia, control del ciclo celular, reparación del ADN y estabilidad de la cromatina. Las anomalías más habitualmente observadas son translocaciones cromosómicas y mutaciones, que, en general, pueden producir un aumento de la función del gen implicado o, por el contrario, una pérdida o disminución de su función. En otras ocasiones se produce una anomalía a nivel epigenético, con el resultado del silenciamiento o activación de una determinada diana celular. Estos eventos moleculares actúan en diferentes etapas, y pueden sistematizarse en dos grupos complementarios. Un grupo de alteraciones, conocido como de tipo II, comprende las anomalías que afectan a factores de transcripción o correuladores, que conllevan un bloqueo de la diferenciación hematopoyética y/o adquisición aberrante de propiedades de auto-renovación de los progenitores hematopoyéticos. El otro grupo (tipo I) incluye las mutaciones que activan vías de transducción de señales, lo que resulta en un aumento de la proliferación y/o supervivencia de los progenitores hematopoyéticos (Frohling et al, 2005; Hiddemann et al, 2005; Steffen et al, 2005). Estos dos tipos de anomalías moleculares presentarían una gran interdependencia entre ellos, y es frecuente observar la coexistencia de alteraciones de los dos grupos en un mismo paciente; por el contrario,

raramente parecen coincidir dos alteraciones del mismo tipo en un mismo caso.

1.8.1. Alteraciones de factores de transcripción

Las anomalías genéticas asociadas a la LMA involucran frecuentemente a numerosas moléculas que regulan la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Ejemplos de este tipo son el complejo de transcripción CBF, CEBPA, RAR α , y MLL, así como los componentes del complejo de coactivación transcripcional CREBBP, MYST3 y TIF2. Los reordenamientos que afectan a estas proteínas juegan un papel importante en la activación de vías de autorrenovación, que son críticas para la leucemogénesis y para el mantenimiento del fenotipo leucémico.

1.8.1.1. PROTEÍNAS DE FUSIÓN

En la LMA es frecuente observar la presencia de translocaciones cromosómicas recurrentes balanceadas que producen la fusión de dos genes. La proteína de fusión resultante frecuentemente contiene un factor activador de la transcripción con su dominio de unión al ADN intacto, unido a una proteína inductora de represión de la transcripción. Como consecuencia de la fusión la proteína aberrante inhibe de forma dominante la transcripción regulada por el factor de transcripción truncado.

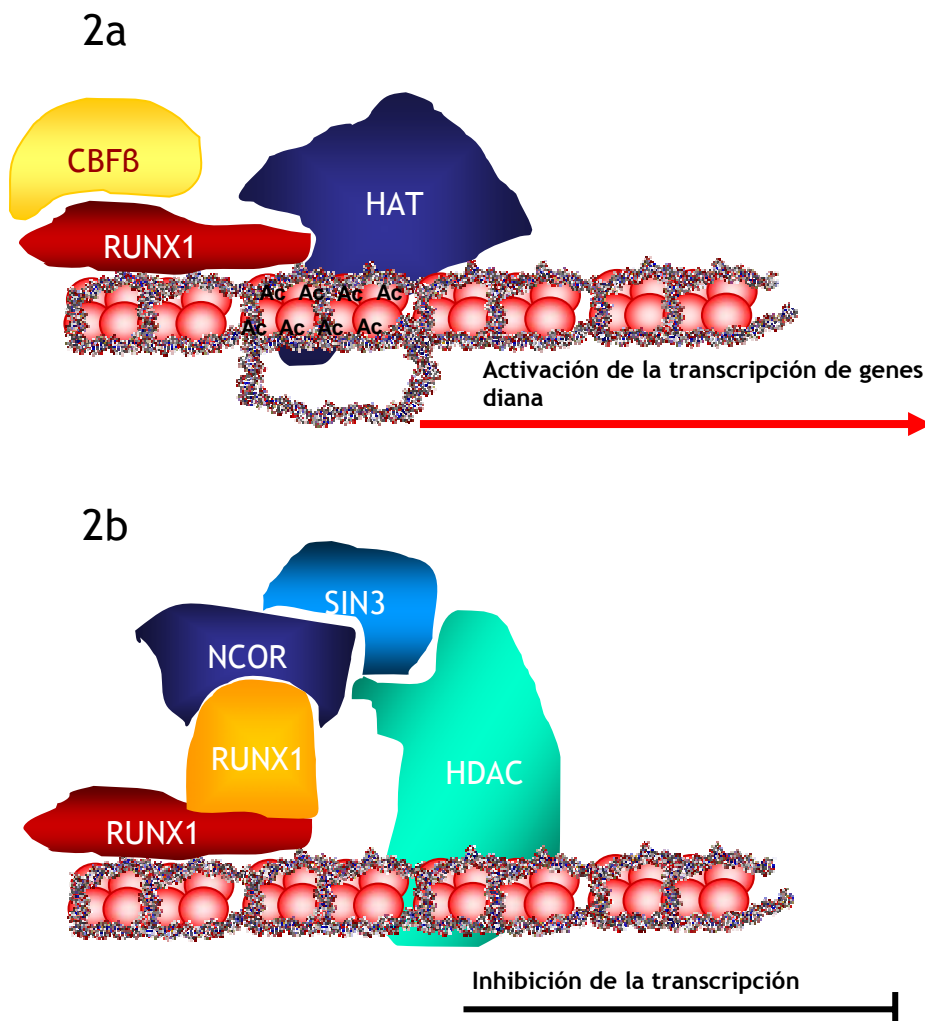
a) Alteraciones del complejo de transcripción CBF

El complejo de transcripción CBF, imprescindible para la hematopoyesis normal, está formado por la interacción de las proteínas RUNX1 (también denominada AML1, $CBP\alpha 2$ o $PEBP2\alpha\beta$), codificada por un gen en el cromosoma 21q22, y la proteína $CBF\beta$, codificada en 16q22 (figura 2a)(Downing, 1999; Speck et al, 2002; Blyth et al, 2005). Las dos subunidades funcionan como un activador transcripcional heterodimérico, con la actividad de unión a ADN presente en RUNX1. La desorganización del complejo, secundaria a las translocaciones $t(8;21)$, la inversión $inv(16)$ y la $t(16;16)$, se observa en un 15% de los casos de LMA.

Figura 2. Represión de la transcripción de los genes diana de RUNX1 por la t(8;21) con reordenamiento RUNX1-RUNX1T1.

2a. Regulación en progenitores hematopoyéticos normales: RUNX1 y CBF β se unen a factores coactivadores con actividad acetiladora de histonas (HAT) y se activa la transcripción.

2b. Regulación en células leucémicas con el reordenamiento RUNX1-RUNX1T1. Se reclutan correpresores con actividad deacetiladora de histonas (H \square AC) y se inhibe la transcripción.



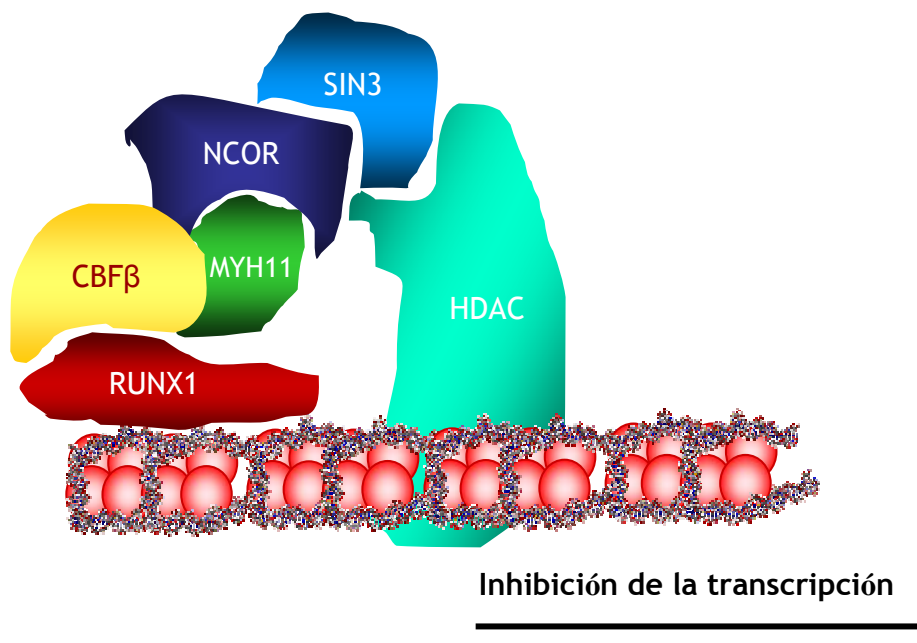
a.1. t(8;21)(q22;q22) con reordenamiento *RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)*

Esta translocación aparece en un 10% de los casos de LMA y se incluye, junto con la inv(16) y la t(15;17), en la categoría citogenética de buen pronóstico (Mrozek et al, 2004). En esta translocación *RUNX1 (AML1)* se une al gen represor *RUNX1T1* (conocido anteriormente como *ETO*). La proteína de fusión resultante tiene una capacidad represora de la transcripción ya que, por un lado, contiene intactos los dominios de *RUNX1T1* que interaccionan con el complejo nuclear correpresor con actividad HDAC y, por otro lado, mantiene el dominio de *RUNX1* que interacciona con genes específicos de la hematopoyesis (figura 2b) (Durst et al, 2003; Blyth et al, 2005). Como consecuencia, se produce una represión de los genes diana de *RUNX1* y un bloqueo de la diferenciación granulocítica, a través de la supresión de la función de CEBPA (Westendorf et al, 1998; Pabst et al, 2001; Cilloni et al, 2003). Además, la proteína aberrante *RUNX1-RUNX1T1* produce una alteración de diferentes mecanismos celulares, entre los que se encuentra una disminución de la apoptosis, con la consiguiente prolongación de la supervivencia, y un aumento de la proliferación de los progenitores hematopoyéticos, a través de la regulación de la expresión de p14^{ARF} y BCL2 (Klampfer et al, 1996; Hiebert et al, 2003).

a.2. inv(16)/t(16;16)(p13;q22) con reordenamiento CBF β -MYH11

La inv(16) y la más infrecuente t(16;16) ocurren en el 5% de los casos de LMA y producen la fusión de CBF β con MYH11 (SMMHC) (Mrozek et al, 2004). Al igual que en la t(8;21), la proteína anómala CBF β -MYH11 se asocia de forma aberrante a complejos correpresores, lo que lleva al reclutamiento de HDAC y el consiguiente silenciamiento génico (figura 3)(Durst et al, 2003). Además, CBF β -MYH11 puede secuestrar a la proteína RUNX1 en complejos citoplásmicos y así interferir con la actividad de unión al ADN del complejo CBF (Kanno et al, 1998; Shigesada et al, 2004).

Figura 3. Represión de la transcripción en células leucémicas con inv(16)(p13;q22). Se reclutan correpresores con actividad H \square AC y se inhibe la transcripción de diversos genes diana.



b) Leucemia promielocítica aguda con reordenamiento de RAR α

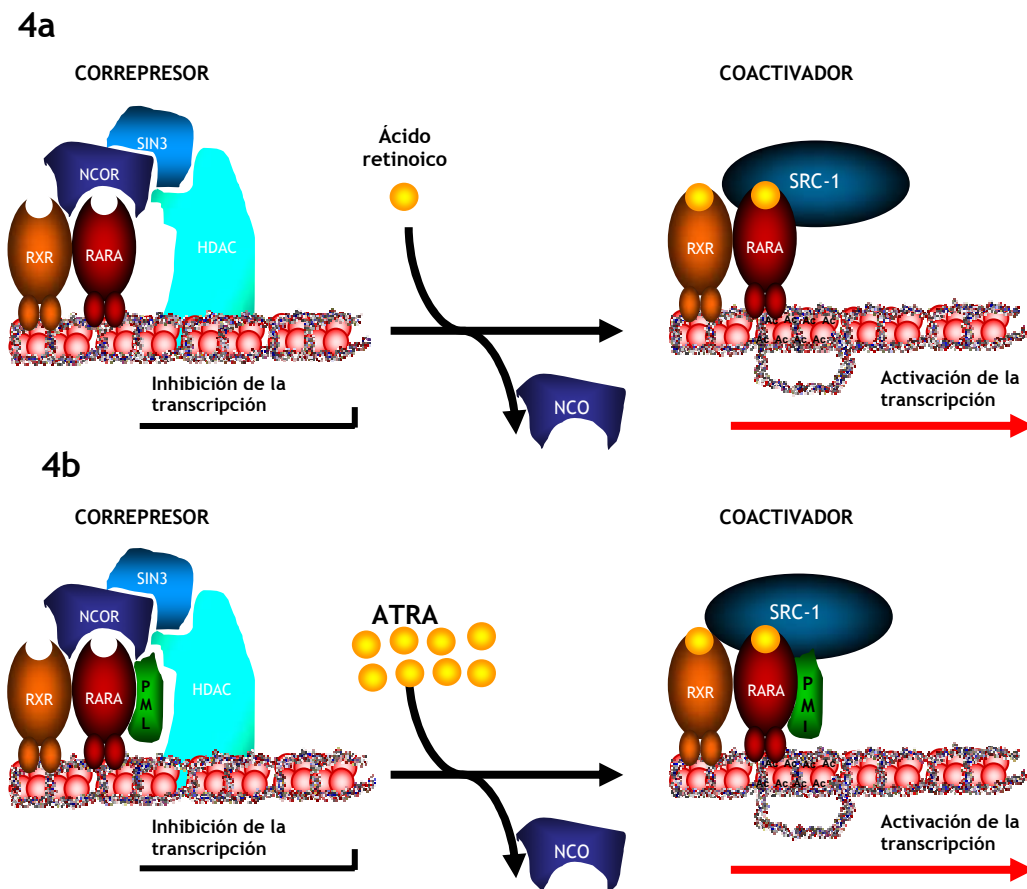
La leucemia promielocítica aguda (LPA; LMA FAB M3), que involucra al gen *RAR α* en 17q12, representa el 10-15% de las LMA (Mrozek et al, 2004). En la gran mayoría de los casos se produce la translocación t(15;17)(q22;q21), que genera la proteína PML-RAR α . Sin embargo, existen casos más raros de LPA con las translocaciones t(11;17)(q23;q12), t(5;17)(q35;q12), t(17;17)(q11;q12) o t(11;17)(q13;q12), que dan como resultado proteínas quiméricas que fusionan RAR α con PLZF, NPM, STAT5b o NuMA, respectivamente (Redner, 2002). En condiciones fisiológicas, RAR α es un receptor hormonal nuclear que, en ausencia de su ligando, inhibe la transcripción reclutando correpresores y HDAC. La unión del ácido 9-*cis*-retinoico a RAR α libera los factores represores y activa la transcripción de genes clave para la diferenciación mieloide (Pandolfi, 2001). La proteína anómala PML-RAR α en la LPA altera la respuesta normal de RAR α al ácido retinoico, de manera que las concentraciones fisiológicas de éste no consiguen liberar los correpresores (figura 4). Por el contrario, dosis altas del ácido *all-trans*-retinoico (ATRA) liberan el mecanismo represor y convierten a PML-RAR α en un activador transcripcional que inducirá la diferenciación de los promielocitos atípicos. Por otro lado, PML es esencial para la inducción de la apoptosis y control del ciclo celular bajo determinadas condiciones de estrés celular. En este sentido, la proteína PML-RAR α no sólo bloquea la diferenciación mieloide, sino que acelera la progresión del ciclo celular a

través de la sobre-expresión de ciclina A1 (Muller et al, 2000) y confiere una ventaja proliferativa al inhibir las funciones normales de PML (Pandolfi, 2001).

Figura 4. Represión de la transcripción de los genes diana de RAR en ausencia de ligando en condiciones fisiológicas y en la $t(15;17)$ con reordenamiento PML-RAR α .

4a. Regulación en progenitores hematopoyéticos normales. RAR α se une a factores correpresores en ausencia de ligando. La unión del ácido retinoico libera el complejo correpresor y activa la transcripción.

4b. Regulación en células leucémicas con el reordenamiento PML-RAR α . Las dosis fisiológicas de ácido retinoico no consiguen liberar los factores represores; se necesitan altas concentraciones de ATRA para sobrepasar el mecanismo represor y activar la transcripción.



1.8.1.2. MUTACIONES SOMÁTICAS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MIELOIDES

a) Mutaciones de CEBPA

El factor de transcripción CEBPA es una molécula crucial en la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos a neutrófilos maduros (Tenen, 2003). En los últimos años se han descrito mutaciones de CEBPA en un 10% de los casos de LMA, de forma predominante en los subgrupos FAB M1 o M2 (Nerlov, 2004; Leroy et al, 2005). Los dos tipos de mutaciones observados producen una inhibición de la función normal de CEBPA, y se han relacionado con un pronóstico favorable (Preudhomme et al, 2002; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al, 2003a; Frohling et al, 2004).

b) Otros factores de transcripción

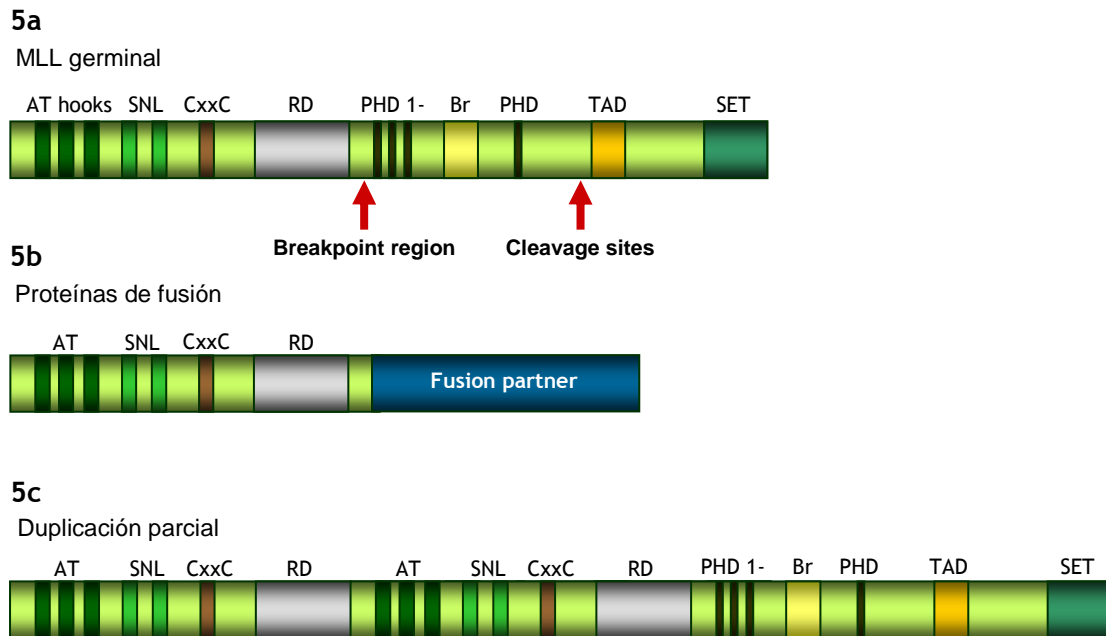
En los últimos años se han descrito las mutaciones somáticas de otros factores de transcripción como RUNX1, Pu.1 o GATA1 (Mueller et al, 2002; Blyth et al, 2005; Steffen et al, 2005).

1.8.1.3. ALTERACIONES DEL GEN *MLL*

El gen *MLL*, localizado en el cromosoma 11q23, se encuentra implicado en el desarrollo embriogénico y la hematopoyesis normal. La proteína *MLL* funciona en un gran complejo de al menos 29 proteínas que está involucrado en la remodelación, acetilación, deacetilación y metilación de nucleosomas e histonas. En este complejo proteico *MLL* se asocia a proteínas con dominio de unión metil-CpG, proteínas con actividad HDAC y a CREBBP, entre otras. La propia proteína *MLL* contiene dominios con actividad metiladora de histonas (HMT), dominios de unión al ADN y un dominio activador de la transcripción (figura 5a). Durante la embriogénesis normal la proteína *MLL* se une a los promotores de los genes *homeobox (HOX)* y mantiene su expresión mediante cambios de conformación de la cromatina (Milne et al, 2002).

Las aberraciones del gen *MLL* se han encontrado en leucemias agudas de diferentes estirpes, mieloides y linfoides, que pueden presentarse *de novo* o de forma secundaria a la quimioterapia, en especial tras tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II (Schoch et al, 2003). Los reordenamientos del gen *MLL* se producen como consecuencia de translocaciones recíprocas con diversos cromosomas o bien mediante una duplicación parcial en tándem del propio gen (figura 5b y 5c, respectivamente).

Figura 5. Estructura de la proteína MLL en estado germinal (5a) y tras producirse su reordenamiento, ya sea mediante una translocación cromosómica que produce una proteína de fusión aberrante (5b) o mediante una duplicación parcial en tándem (5c).



a) Translocaciones en 11q23

Las translocaciones cromosómicas que condicionan el reordenamiento del gen *MLL* se encuentran en el 80% de leucemias diagnosticadas en niños menores de 2 años (Satake et al, 1999). En adultos, el reordenamiento de *MLL* ocurre en un 5% de los casos de LMA *de novo* y en más del 85% de los casos de leucemia mieloide secundaria tras tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II (Grimwade et al, 2001; Schoch et al, 2003). En estos últimos casos, la leucemia aparece tras un periodo de latencia de unos 2-3 años tras el tratamiento. Hasta el momento se han descrito más de 71 translocaciones en la región 11q23 y más de 51 *partners* conocidos de *MLL* (Huret et al, 2005; <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MLL.html>). Todas las proteínas de

fusión conservan intacto el extremo N-terminal de *MLL*, incluyendo el dominio de unión al ADN y el dominio represor, mientras que la mayoría de los genes de fusión conocidos, como *MLLT1* (*ENL*), *MLLT3* (*AF9*) y *AFF1* (*AF4*, *MLLT2*) contienen un dominio de activación de la transcripción (figura 9b). Las proteínas de fusión *MLL* producen un aumento de función del gen *MLL* mediante dos mecanismos: los *partners* de *MLL* que producen una proteína nuclear (*AFF1*, *MLLT1* y otros) aportan un dominio de transactivación, con lo que transfieren una actividad transcripcional constitutiva; por otra parte, los *partners* citoplasmáticos, como *GAS7*, promueven la dimerización de *MLL* (Yokoyama et al, 2004). Esta capacidad de dimerizar de las proteínas de fusión *MLL* se ha mostrado esencial para immortalizar los progenitores hematopoyéticos e inhibir su diferenciación (So et al, 2003; Martin et al, 2003). Las proteínas de fusión *MLL* aumentan la expresión de los genes *HOXA9* y el cofactor *Meis1* en células progenitoras hematopoyéticas (Milne et al, 2002); esta regulación de la expresión de los genes *HOX* es parcialmente responsable de la capacidad de las quimeras de *MLL* de immortalizar los progenitores mieloides. En este sentido, Ayton y colaboradores mostraron que *HOXA9* y *HOXA7* son necesarios para la capacidad oncogénica de las proteínas *MLL* (Ayton et al, 2003). Recientemente se ha identificado la proteína menina, un producto del gen supresor de tumores *MEN1*, como parte del complejo proteico con actividad HMT al que se une *MLL* (Yokoyama et al, 2004). La proteína menina parece estar implicada en la replicación y reparación del ADN y la pérdida de su función juega un importante papel en múltiples tumores endocrinos. En la LMA esta proteína es un cofactor esencial para la

leucemogénesis asociada a MLL y la sobreexpresión de *HOXA9* (Yokoyama et al, 2004; Yokoyama et al, 2005; Milne et al, 2005).

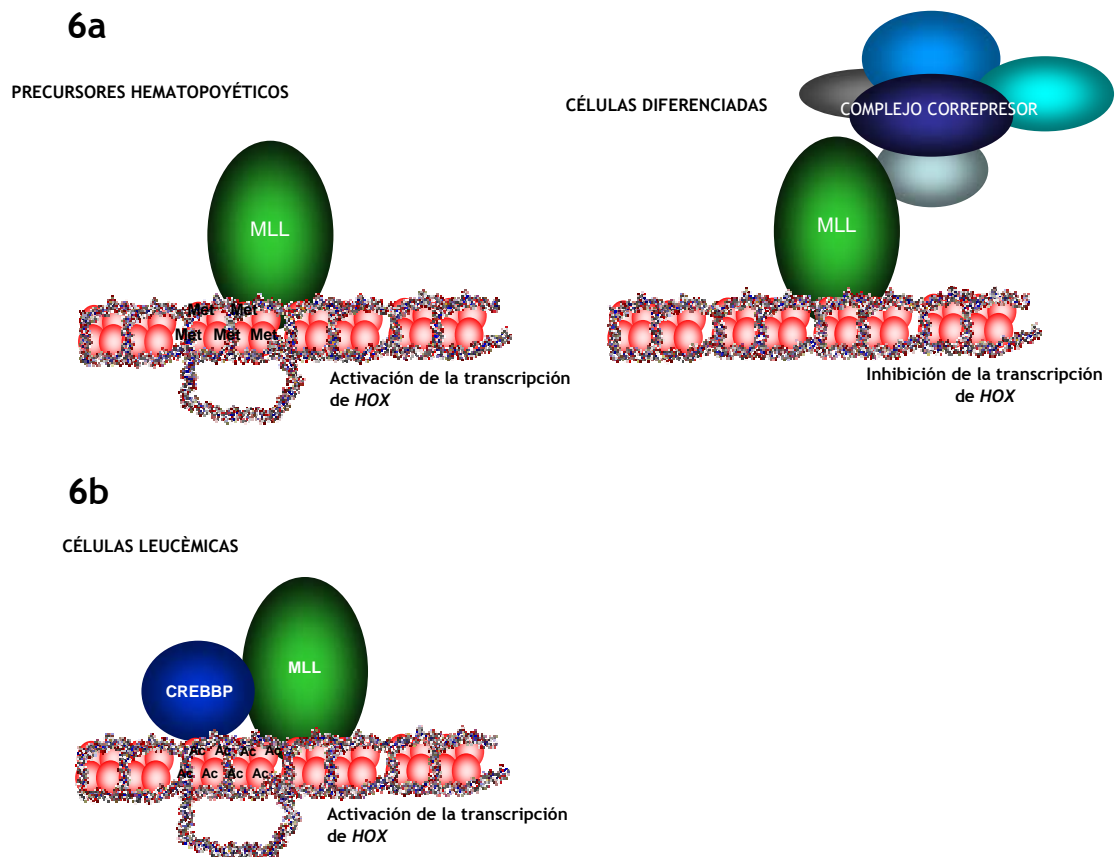
Por otra parte, en las translocaciones t(11;16) y t(11;22) se generan unas proteínas de fusión (MLL-CREBBP y MLL-p300 respectivamente), que contienen el dominio HAT de CREBBP y p300, por lo que se ha sugerido que podría producirse un aumento de actividad acetiladora de histonas en regiones genómicas dependientes de MLL (Daser et al, 2004).

Por tanto, y a modo de resumen, en las proteínas de fusión MLL se produce una activación de la transcripción, a diferencia de las proteínas de fusión generadas en las LMA-CBF y la LPA, en las que se produce una represión transcripcional (figura 6).

Figura 6. Acción de MLL sobre la transcripción y activación de la expresión de genes HOX en condiciones fisiológicas (6a) y en células leucémicas (6b).

6a. En precursores hematopoyéticos normales, MLL mantiene la expresión de los genes HOX. En células diferenciadas, MLL se encuentra unido a un gran complejo proteico correpresor que inhibe la expresión de los genes HOX.

6b. En células leucémicas, la unión de MLL con un gen con actividad HAT como CREBBP podría derivar en una activación de la transcripción con sobreexpresión de los genes HOX.



b) Duplicación parcial en tándem de *MLL*

La duplicación parcial en tándem de *MLL* (*MLL*-PTD), que provoca una duplicación de la parte 5' del gen (figura 5b), se encuentra en un 3-10% de los pacientes adultos con LMA, y es mucho menos frecuente en las formas pediátricas (Schnittger et al, 2000; Steudel et al, 2003). La *MLL*-PTD se asocia a menudo a la trisomía 11, aunque también se puede detectar en un 10% de pacientes con citogenética convencional normal. Se ha descrito que su presencia se asocia a un pronóstico desfavorable (Schnittger et al, 2000; Dohner et al, 2002). En algunos estudios se observó una frecuencia significativamente superior de *MLL*-PTD en pacientes que, a su vez, presentaban una duplicación interna en tándem del gen *FLT3* (*FLT3*-ITD), especialmente en aquellos casos con más altos niveles de expresión de *Flt3*. Se cree que esto pudiera ser debido a que tanto *FLT3* como *MLL* son sensibles a agentes genotóxicos con mecanismos de daño de ADN similares (Libura et al, 2003).

c) Amplificación de *MLL*

Se han descrito en pacientes con LMA amplificaciones intracromosómicas de la región 11q23, con un aumento de la expresión del gen *MLL* sin reordenamiento del mismo (Dolan et al, 2002). En particular, la amplificación de *MLL* se ha observado con una mayor frecuencia en casos de LMA y SMD secundarios al tratamiento con agentes alquilantes y se ha


relacionado con la presencia de un cariotipo complejo y mutaciones de *p53* (Andersen et al, 2001). Mediante estudios con técnica de *FISH* (*fluorescence in situ hybridization*) se han identificado tres patrones de amplificación (Poppe et al, 2004): el primer grupo lo constituyen los casos con un bajo número de copias de *MLL* debido a la presencia de material de cromosoma 11 en cromosomas derivativos, adicionales o en anillo; en otros casos se comprueba por *FISH* la amplificación de *MLL* sin observarse alteraciones cariotípicas evidentes; por último, el tercer perfil está representado por casos con un elevado número de copias de *MLL* y la presencia de cromosomas con *homogeneously staining regions* (HSR) o *double minutes* (DM). Un estudio reciente observó que esta amplificación conlleva un aumento de la función del gen *MLL* y una sobreexpresión de *HOXA9*, *Meis1*, *PROML1*, *A¹⁰AM10*, *NKG2⁺* e *ITPA*, de forma similar a la observada en casos de LMA con translocación involucrando al gen *MLL* (Poppe et al, 2004).

1.8.1.4. GENES HOMEBOX

Los 39 genes *HOX* se organizan en 4 grupos (A-D) en los cromosomas 7, 17, 12 y 2, respectivamente (tabla 10). Las proteínas HOX tienen un papel importante en la formación axial durante la embriogénesis y son también importantes reguladoras de la hematopoyesis (Owens et al, 2002; Grier et al, 2005). Las proteínas HOX influyen en la transcripción a través de su unión al ADN como monómeros o como heterómeros con los productos de los genes *Pbx* o *Meis1*, de la familia TALE (*three amino acid loop extension*). De este modo, *Meis1* se une a las proteínas HOX como un cofactor, regulando su actividad

transcripcional. En la hematopoyesis normal existe un patrón cronológico muy bien definido de expresión de los genes *HOX*, de forma que, por ejemplo, el gen *HOXA9* está muy expresado en los progenitores inmaduros, mientras que ya no se detecta en las células más diferenciadas.

Tabla 10. Listado de los genes homeobox

<i>Anterior</i>	<i>HOXA</i> crom 7	<i>HOXB</i> crom 17	<i>HOXC</i> crom 12	<i>HOXD</i> crom 2	3'
	A1	B1	-	D1	
	A2	B2	-	-	
	A3	B3	-	D3	
	A4	B4	C4	D4	
	A5	B5	C5	-	
	A6	B6	C6	-	
	A7	B7	-	-	
	-	B8	C8	D8	
	A9	B9	C9	D9	
	A10	-	C10	D10	
	A11	-	C11	D11	
	A12	-	C12	D12	
	A13	-	C13	D13	
<i>Posterior</i>					5'

Dirección de transcripción de los genes *HOX*

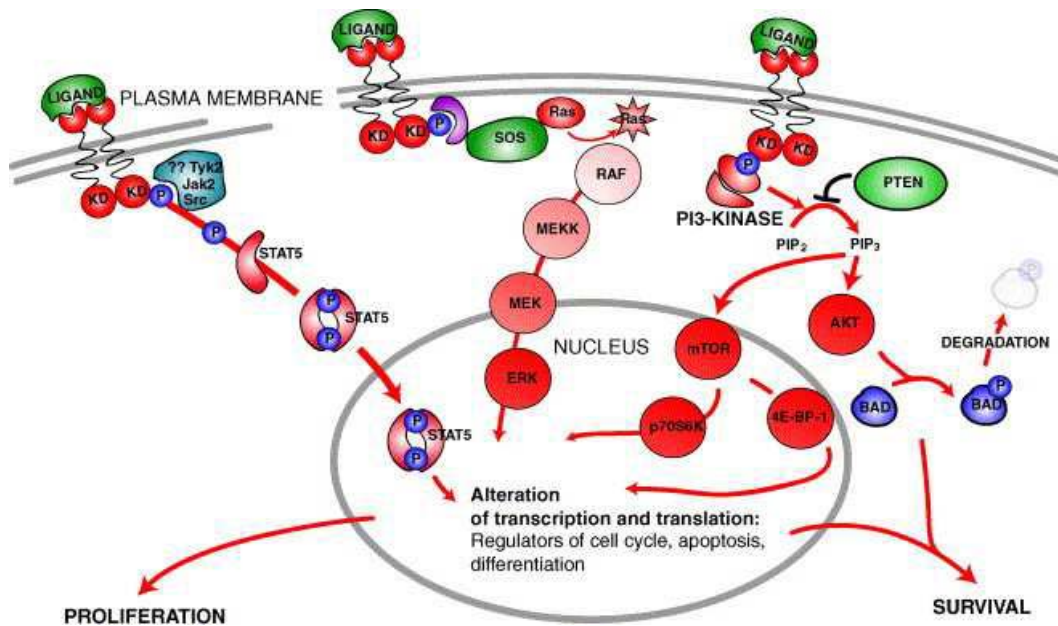
Los genes *HOX* se encuentran implicados en la patogenia de la leucemia aguda a través de dos mecanismos: la disregulación de su expresión o mediante su participación directa en translocaciones cromosómicas. Así, se ha descrito una sobreexpresión global y asincrónica de los genes *HOX* en diferentes subtipos de LMA, especialmente en aquellos con reordenamiento del gen *MLL* (Drabkin et al, 2002; Armstrong et al, 2002; Debernardi et al, 2003; Roche et al, 2004). En este sentido, la sobreexpresión de los genes *HOX* tendría un papel clave en la capacidad transformadora de los reordenamientos de *MLL* (Milne et al, 2002).

Por otro lado, las infrecuentes translocaciones t(7;11) y t(2;11) afectan directamente al gen *NUP98*, localizado en el cromosoma 11p15, y a los genes *HOXA9*, en 7p15 y *HOXD13*, en 2q31 respectivamente. La capacidad oncogénica de la proteína de fusión NUP98-HOXA9 viene mediada por su unión al coactivador de la transcripción CREBBP/p300 (Kasper et al, 1999).

1.8.2. Alteraciones en vías de transducción de señales

Según la teoría de las múltiples etapas en la patogénesis de la LMA, las alteraciones de tipo I son aquellas que afectan diferentes vías de transducción de señales y regulan señales de proliferación y supervivencia de los progenitores hematopoyéticos. En este grupo se encuentran las mutaciones de *FLT3*, *RAS* y *KIT*, que regulan diferentes funciones celulares a través de las vías de STAT (*signal transducer and activator of transcription*), MAP-quinasa (*mitogen activated protein-kinase*, MAP-K) y PI3-quinasa (*phosphoinositide3 kinase*, PI3-K) (figura 7).

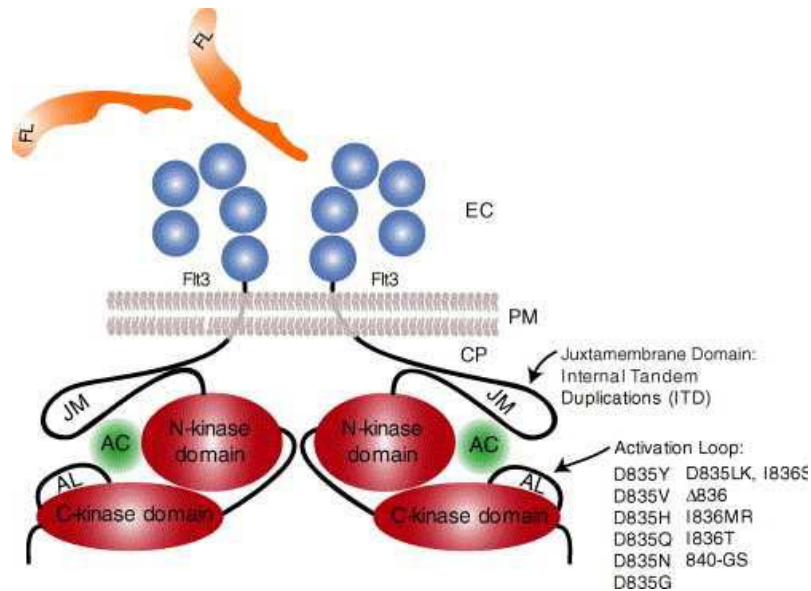
Figura 7. Vías de transducción de señales con funciones de regulación de la proliferación y supervivencia celular.



1.8.2.1. ANOMALÍAS DE *FLT3*

El gen *FLT3* (*Flk-2*, *STK1*), localizado en 13q12, codifica una proteína de clase III de los receptores tirosin-quinasa (RTK); otros miembros de la misma familia son PDGFR, c-FMS/M-CSF y KIT. Todos ellos están constituidos por un dominio extracelular y un dominio intracelular con actividad quinasa (Kiyoi et al, 2006). *FLT3* se encuentra expresado en progenitores multipotentes hematopoyéticos y en células con diferenciación monocítica; por el contrario, se pierde su expresión en los elementos con diferenciación linfoide B y en la maduración granulocítica (Muller-Tidow et al, 2004). Cuando se une a su ligando (FL), *FLT3* activa mediante fosforilación las vías de STAT5a, RAS/MAP-K y PI3-K. En conjunto, la unión de *FLT3* a su ligando activa una serie de procesos intracelulares de señalización que incrementan la proliferación y supervivencia de las células. *FLT3* se expresa en dos tercios de los casos de LMA, con un nivel de expresión superior al observado en los progenitores hematopoyéticos normales (Drexler, 1996; Stacchini et al, 1996). Existen diferentes mecanismos activadores de *FLT3* en la LMA (figura 8): mutaciones en el dominio yuxtamembrana en forma de duplicaciones internas en tándem (*FLT3-ITD*), mutaciones puntuales en el dominio de activación de quinasas (*FLT3-PM*) (Nakao et al, 1996; Yamamoto et al, 2001) y la sobreexpresión de *FLT3* no asociada a mutaciones del gen (Libura et al, 2003; Ozeki et al, 2004).

Figura 8. Estructura de *FLT3* y localización de las anomalías más frecuentes: duplicaciones internas en tándem (ITD) en el dominio yuxtamembrana y mutaciones puntuales (PM) en el bucle de activación.



a) Duplicaciones internas en tándem de *FLT3*

La consecuencia funcional de la *FLT3*-ITD es la autoactivación independiente de ligando de la proteína (Kiyoi et al, 1998). Sin embargo, se han encontrado diferencias en la transducción de señales activada por *FLT3* en condiciones fisiológicas y la transducción aberrante secundaria a la mutación *FLT3*-ITD (Minami et al, 2003). Así, la mutación *FLT3*-ITD conduce a una activación constitutiva e intensa de las vías de STAT5, RAS/MAP-K y PI3-K pero, por otro lado, produce una inhibición de factores de transcripción mieloides como CEBPA y Pu.1 (Hayakawa et al, 2000; Tse et al, 2000). Por tanto, la *FLT3*-ITD provoca un aumento de la proliferación y supervivencia de

las células y ejerce también una acción de bloqueo sobre la diferenciación mieloide.

La *FLT3*-ITD se encuentra en aproximadamente un 20-25% del total de las LMA y es más frecuente en los casos con citogenética normal; en este subgrupo de pacientes se observa hasta en un tercio de los casos (Moreno et al, 2003). La presencia de *FLT3*-ITD confiere un pronóstico desfavorable en la LMA de riesgo intermedio (Kiyoi et al, 1999; Kottaridis et al, 2001; Frohling et al, 2002; Schnittger et al, 2002; Thiede et al, 2002). El pronóstico parece ser aún peor si se produce una pérdida de expresión del alelo germinal (Whitman et al, 2001; Kottaridis et al, 2001; Thiede et al, 2002). Recientemente se ha sugerido que una duplicación de más de 40 nucleótidos se correlacionaría con un peor pronóstico (Stirewalt et al, 2006).

En la leucemia promielocítica, la *FLT3*-ITD se asocia frecuentemente a hiperleucocitosis, a la forma variante de la enfermedad (M3v), a la isoforma bcr3 del transcrito PML-RAR α y a la expresión del transcrito recíproco RAR α -PML (Kuchenbauer et al, 2005; Gale et al, 2005; Callens et al, 2005). Sin embargo, la *FLT3*-ITD en la LPA no parece conferir un valor pronóstico desfavorable independiente de la hiperleucocitosis.

b) Mutaciones puntuales de *FLT3*

Alrededor del 7% de los pacientes con LMA presentan mutaciones en el bucle de activación de *FLT3*, una estructura localizada en la porción distal del dominio con actividad quinasa (figura 8) (Moreno et al, 2003). La mutación más frecuente es la que provoca la sustitución de ácido aspártico en la posición 835 (*FLT3-D835*) por diferentes aminoácidos (bu-Duhier et al, 2000; Yamamoto et al, 2001). A diferencia de la *FLT3-ITD*, el valor pronóstico de las *FLT3-PM* es controvertido y hasta el momento sólo hay un estudio que las asocia a un peor pronóstico (Frohling et al, 2002).

c) Sobre-expresión de *FLT3*

Si bien *FLT3* se expresa en dos tercios de los casos de LMA, los niveles más elevados de expresión de este gen se han asociado a *FLT3-ITD*, *FLT3-D835* y *MLL-PTD* (Libura et al, 2003; Ozeki et al, 2004). Además, los pacientes con niveles elevados del transcrito mostraron una tendencia a una menor supervivencia, incluso en ausencia de mutaciones del gen (Ozeki et al, 2004). Se ha sugerido que la correlación entre mutaciones de *FLT3* con altos niveles de expresión del gen y las duplicaciones del gen *MLL* podría explicarse por un origen genotóxico común tras una exposición a inhibidores de la topoisomerasa II (Libura et al, 2003).

1.8.2.2. MUTACIONES DE KIT

KIT es un receptor tirosin-quinasa de clase III implicado en la transducción de señales en diferentes tipos celulares. Se han descrito mutaciones de este gen en la mastocitosis sistémica y en tumores del estroma gastrointestinal, así como en algunos casos de LMA. Existen dos tipos de mutaciones activadoras: aquellas que sustituyen un aspartato-816 en el bucle de activación, que son particularmente frecuentes en las leucemias CBF, representando el 8 y el 10% de las leucemias con inv(16) y t(8;21), respectivamente. El segundo tipo de mutación descrito se produce en el exón 8 del gen y está presente en el 24% de los casos de LMA con inv(16). Las mutaciones de *KIT* en estos subtipos de LMA se han relacionado recientemente con una mayor probabilidad de recidiva (Care et al, 2003; Boissel et al, 2006; Paschka et al, 2006).

1.8.2.3. MUTACIONES DE RAS

Las mutaciones activadoras de *N-RAS* se han descrito en un 10-27% de los casos de LMA; las mutaciones de *K-RAS* se observan en el 5-10% de los pacientes pediátricos y adultos con LMA, mientras que las mutaciones de *H-RAS* son muy infrecuentes (Kiyoi et al, 1999; Bacher et al, 2006). El significado pronóstico de estas anomalías es aún controvertido y se cree que las mutaciones de *RAS* representan un factor de progresión más que un evento inicial en la leucemogénesis (Bowen et al, 2005).

1.8.2.4. ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS STAT

Las proteínas STAT constituyen una familia de factores de transcripción implicados en múltiples funciones celulares, como son el crecimiento, diferenciación, apoptosis, desarrollo fetal, inflamación y respuesta inmune (Benekli et al, 2003). Se ha demostrado una activación constitutiva de las proteínas STAT3 y STAT5 en la LMA, especialmente en pacientes con mutaciones de *FLT3* y de *KIT* (Birkenkamp et al, 2001; Ning et al, 2001; Spiekermann et al, 2001). Además, en un estudio se relacionó la activación de STAT3 con un peor pronóstico (Benekli et al, 2002).

1.8.3. Mutaciones de *nucleofosmina*

La nucleofosmina (NPM, B23, numatrin o NO38) es una proteína multifuncional involucrada en diferentes procesos celulares, relacionados tanto con proliferación como con supresión del crecimiento celular (Grisendi et al, 2006). Según el nivel de expresión, la NPM puede tener funciones oncogénicas o antioncogénicas.

En el contexto de las hemopatías malignas se puede producir un reordenamiento de *NPM1* mediante diferentes mecanismos: por un lado, existen diversas translocaciones cromosómicas que afectan directamente al gen, como son la t(5;17)(q34;q21), con la formación de la proteína de fusión NPM-RAR α ; la t(3;5)(q25;q34) con reordenamiento *NPM1-MLF1* en leucemias

agudas mieloides, y la t(2;5)(p23;q35), que da lugar a la proteína NPM-ALK en los linfomas anaplásicos.

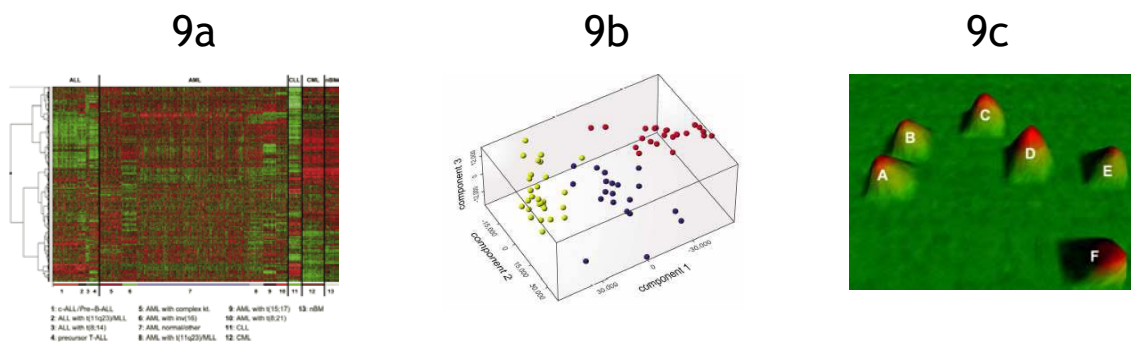
Por otra parte, recientemente se ha descrito la existencia de mutaciones en el exón 12 de *NPM1* que producen una deslocalización citoplásmica aberrante de la proteína en una proporción elevada de pacientes con LMA (Falini et al, 2005; Grisendi et al, 2005). Dichas mutaciones se observan en un 35% de todos los casos de LMA y en la mitad de los pacientes con cariotipo normal, en los que se asocian a un pronóstico favorable si no presentan una *FLT3*-ITD concomitante (Schnittger et al, 2005; Dohner et al, 2005; Thiede et al, 2006). Las mutaciones de *NPM1* se observan preferentemente en mujeres y en leucemias hiperleucocitósicas de los subtipos FAB M1 o M4/M5. Morfológicamente los blastos suelen presentar un núcleo hendido (*cuplike* o signo de la impronta de dedo) y en el fenotipo destaca la negatividad para CD34 de las células leucémicas (Chen et al, 2006). Recientemente se ha demostrado mediante un estudio realizado con microarrays que las LMA con mutaciones de *NPM1* tienen un perfil genómico específico, con expresión de genes característicos de una *stem cell* o célula precursora multipotencial y una sobreexpresión global de genes *HOX* (Alcalay et al, 2005). A pesar de que el mecanismo de leucemogénesis en estas leucemias no está completamente esclarecido, se ha sugerido que la deslocalización citoplasmática de la proteína aberrante llevaría a una alteración de la vía de *p53*. En este sentido, la proteína NPM fisiológica es necesaria para una correcta estabilización y localización nucleolar de *Arf* (p19), un importante regulador de la vía de *p53*. En la LMA con mutación de

NPM1 se produce un complejo NPM-Arf a nivel del citoplasma, lo que conllevará una mayor degradación de Arf y, de forma secundaria, una alteración de la vía de *p53*.

1.9. Estudios genómicos

La introducción de la genómica en los últimos años en el estudio de los tumores ha supuesto un avance muy importante en el conocimiento de la biología de los mismos. El estudio del perfil de expresión génica (PEG) o del transcriptoma mediante la tecnología de los microarrays de ADN permite el análisis simultáneo de la expresión de decenas de miles de genes en una sola hibridación (Ebert et al, 2004; Margalit et al, 2005). El análisis no supervisado de los datos permite agrupar las muestras según su similitud en la expresión de genes y descubrir, de esta manera, subtipos de enfermedades con perfiles génicos diferenciados (*class discovery*). Estos resultados pueden visualizarse mediante diversos métodos, como el agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering analysis*), el análisis de componentes principales (PCA) o mediante el programa VxInsight® (figuras 9 a, b y c, respectivamente). Por otro lado, en el análisis supervisado se comparan subtipos previamente definidos; de esta manera se pueden construir perfiles predictivos de un determinado subtipo, que permitirán la detección de casos biológicamente homólogos en muestras independientes (*class prediction*).

Figura 9. Visualización del análisis no supervisado mediante agrupamiento jerárquico (9a), análisis de componentes principales (9b) y el programa VxInsight® (9c)



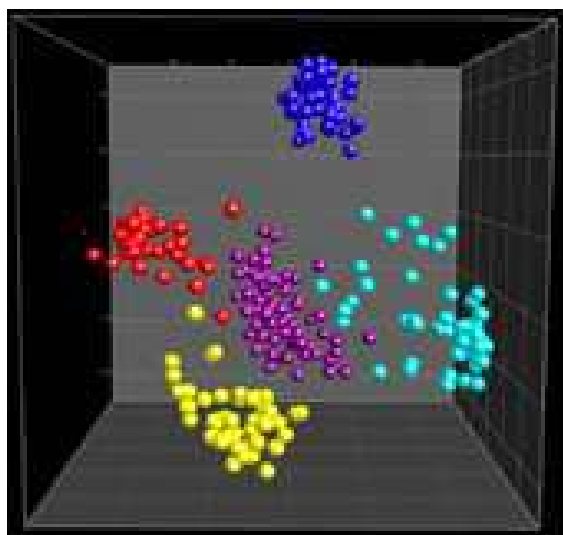
En el contexto de las leucemias agudas, la aplicación de los microarrays ha mostrado utilidades diagnósticas, pronósticas y terapéuticas (Dunphy, 2006). De este modo, además de confirmar los subtipos de LMA ya conocidos (Golub et al, 1999; Schoch et al, 2002; Kohlmann et al, 2003; Debernardi et al, 2003), ha permitido mejorar los sistemas de clasificación de las leucemias al descubrir nuevos grupos con un PEG similar no asociados a características moleculares conocidas (Valk et al, 2004; Bullinger et al, 2004; Vey et al, 2004), identificar PEG asociados con respuesta o resistencia a diferentes tratamientos (Park et al, 2003; Song et al, 2006) e identificar nuevas dianas diagnósticas o terapéuticas (Armstrong et al, 2003a; Armstrong et al, 2003b).

El primer estudio de microarrays en tumores humanos fue el llevado a cabo por Golub et al en 1999, en el que se observó como la expresión de 1100 genes distinguía las leucemias de estirpe mieloide de las leucemias linfoides agudas (LLA) (Golub et al, 1999). Posteriormente, otros trabajos realizados con microarrays confirmaban las diferencias biológicas entre algunos

subgrupos morfológicos de LMA (Haferlach et al, 2003; Haferlach et al, 2005a), y los subtipos citogenéticos descritos hasta el momento, principalmente la LPA, las LMA-CBF y leucemias con reordenamiento del gen *MLL* (Schoch et al, 2002; Kohlmann et al, 2003; Gutierrez et al, 2005; Haferlach et al, 2005b) (figura 10).

En los últimos años se ha analizado el PEG de leucemias con otras anomalías moleculares definidas, como la *Flt3*-ITD (Valk et al, 2004; Bullinger et al, 2004; Vey et al, 2004; Neben et al, 2005; Serrano et al, 2006), *MLL*-PTD (Haferlach et al, 2003), mutaciones de *CEBPA* (Valk et al, 2004; Gutierrez et al, 2005), de *Ras* (Valk et al, 2004; Neben et al, 2005) y de *NPM* (Alcalay et al, 2005).

Figura 10. Análisis no supervisado mediante análisis de componentes principales (PCA) del PEG de diferentes subtipos citogenéticos de LMA (adaptado de (Kohlmann et al, 2005).

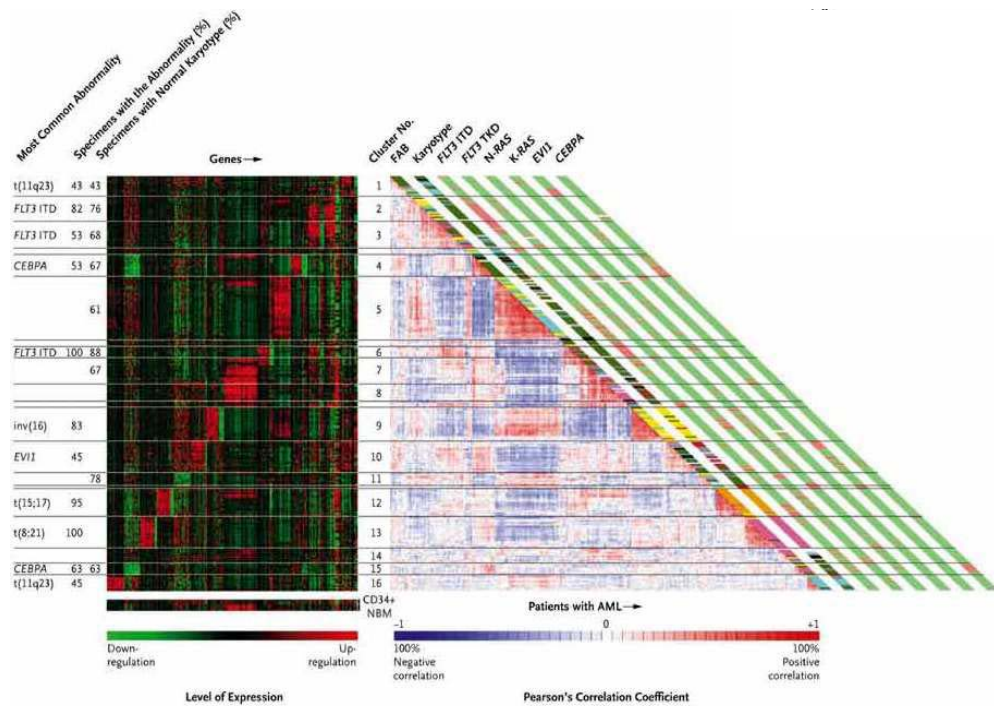


- LMA con t(8;21)
- LMA con inv(16)
- LMA con t(15;17)
- LMA con t(11q23) y reordenamiento de MLL
- LMA con cariotipo complejo

Otros estudios realizados con tecnología de microarray en el contexto de la LMA han mostrado un valor pronóstico. Un estudio fundamental lo constituye el realizado por Valk et al con 285 muestras de pacientes con LMA (figura 11) (Valk et al, 2004). Los autores realizaron un análisis no supervisado seleccionando 2856 genes que diferenciaban 16 grupos o *clusters* de expresión génica diferente, la mayoría de los cuales correlacionaban con alteraciones citogenéticas/moleculares conocidas. Así, los *clusters* más homogéneos correspondían a las translocaciones t(15;17), t(8;21) e inv(16). Los perfiles de expresión de aquellos pacientes con t(11q23), así como los casos de *Flt3*-ITD y

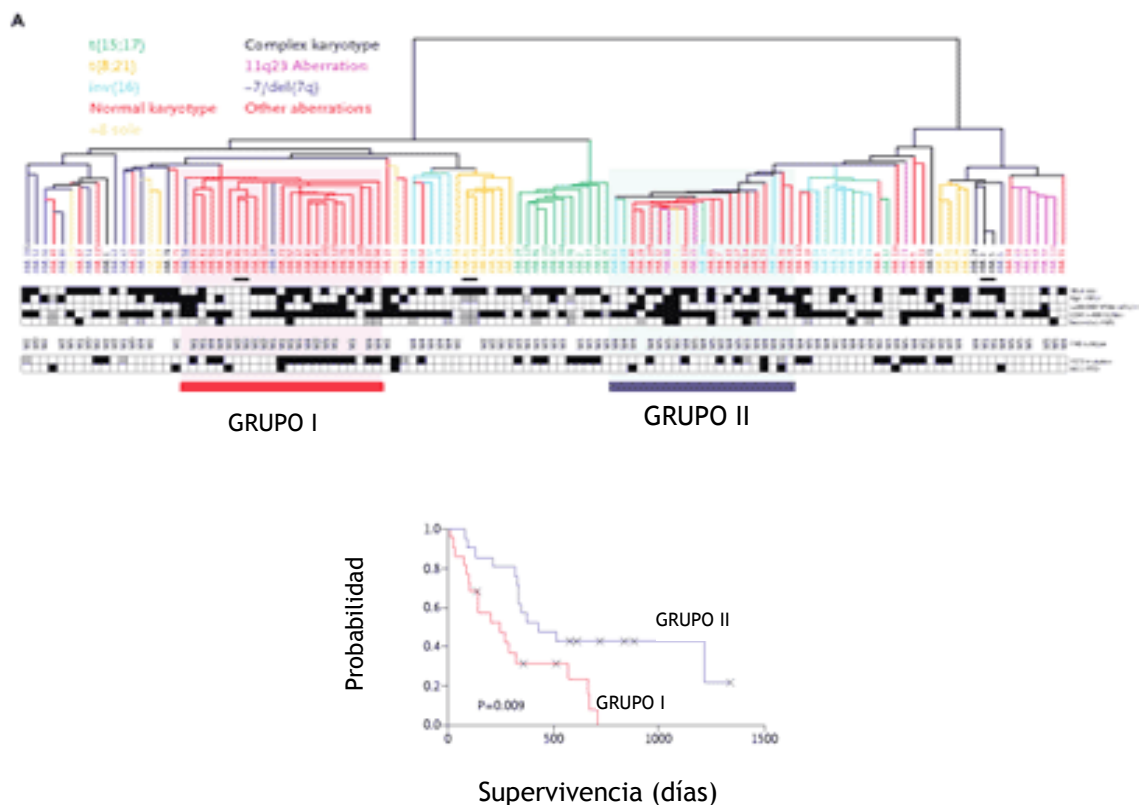
aquellos con mutaciones de *CEBPA* resultaron más heterogéneos, ya que dichas alteraciones se observaban en dos o más *clusters*. Los autores atribuyen esta heterogeneidad en el perfil génico a la existencia de combinaciones de lesiones moleculares adicionales en estos casos (Valk et al, 2005). Sin embargo, en cinco de los 16 *clusters* no se encontró una correlación con una anomalía molecular definida hasta la fecha, con lo que se identifican nuevos subtipos de LMA con perfiles de expresión génica característicos. Es importante resaltar que los diferentes *clusters* se traducían en diferencias significativas en la supervivencia global de los pacientes.

Figura 11. Visualización del análisis no supervisado mediante agrupamiento jerárquico de 285 casos de LMA: diferenciación de 16 clusters mediante la selección de 2856 genes (adaptado de (Valk et al, 2004).



En otro estudio realizado por Bullinger y colaboradores en 116 pacientes con LMA (Bullinger et al, 2004) el análisis no supervisado mostró dos subgrupos de pacientes con citogenética normal que presentaban diferencias significativas en cuanto a la supervivencia global (figura 12). En este mismo trabajo se obtuvo mediante un análisis supervisado una selección de 133 genes que diferenciaban a los pacientes del estudio en dos grupos con diferente pronóstico en términos de supervivencia global.

Figura 12. Análisis no supervisado de 116 pacientes con LMA: los diferentes colores corresponden a las diferentes categorías citogenéticas. Se observan dos subgrupos dentro de los casos con cariotipo normal (grupo I y II), con diferente supervivencia global (adaptado de (Bullinger et al, 2004).



2. LMA CON TRANSLOCACIÓN t(8;16)(p11;p13)

2.1. Definición e incidencia

La translocación t(8;16)(p11;p13) es una anomalía citogenética que se presenta de forma recurrente en la LMA, pero con una baja frecuencia (Hanslip et al, 1992; Stark et al, 1995; Velloso et al, 1996; Sun et al, 2001). Hasta el año 2004 se habían descrito en la literatura menos de 50 casos de LMA con t(8;16) (Mitelman Database, CGAP-NCBI, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/>), principalmente en forma de casos aislados o en series con un bajo número de pacientes (Quesnel et al, 1993; Demuyne et al, 1995; Giles et al, 1997).

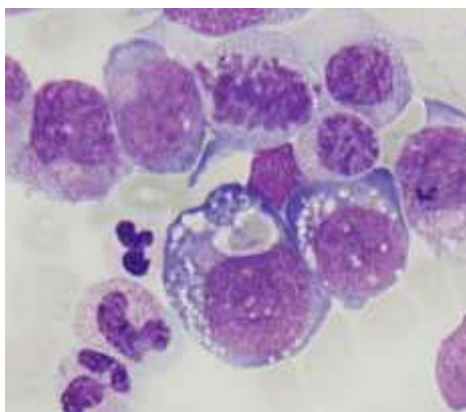
La LMA con t(8;16) puede presentarse *de novo*, tanto en pacientes adultos como, en algún caso aislado, en neonatos; sin embargo, en más de un tercio de los casos, aparece como una leucemia secundaria tras un tratamiento quimioterápico, fundamentalmente con inhibidores de la topoisomerasa II, en especial tras el uso de antraciclinas (Bernasconi et al, 2000; Tasaka et al, 2004).

2.2. Características clínico-biológicas

Los pacientes con t(8;16)(p11;p13) presentan de forma frecuente afectación extramedular, con afectación del sistema nervioso central o de la piel. Además, es característica una coagulopatía severa causada por una hiperfibrinólisis (Hanslip et al, 1992; Stark et al, 1995; Velloso et al, 1996; Sun et al, 2001).

Desde el punto de vista morfológico, este subtipo de leucemia se caracteriza por la presencia de blastos de gran tamaño, que muestran una diferenciación mielomonocítica. Es frecuente observar un fenómeno de hemofagocitosis (figura 13). Desde el punto de vista citoquímico, los blastos presentan de forma peculiar una doble positividad simultánea en las tinciones de mieloperoxidasa y esterasas inespecíficas, reflejo de su componente mieloide y monocítico (figura 14).

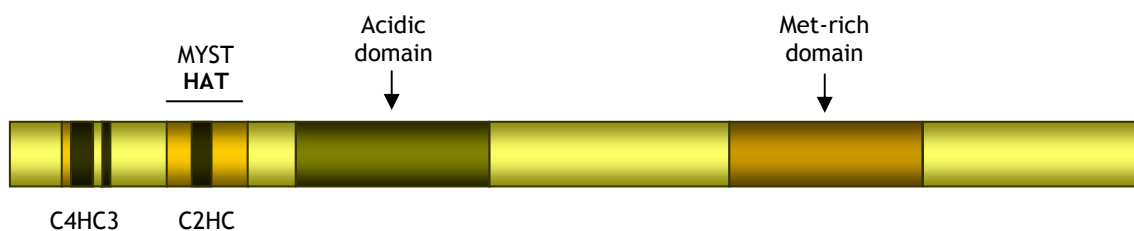
Figura 13. Blasto de gran tamaño con diferenciación monocítica y eritrofagocitosis. Médula ósea, May-Grünwald Giemsa.



2.2.1. MYST3

MYST3 es un gen de 121 kb, compuesto por 17 exones (Panagopoulos et al, 2003), que codifica una proteína de la familia MYST (MOZ/YBF2/SAS2/TIP60), con actividad acetiltransferasa. La proteína MYST3 contiene múltiples dominios (ver figura 15): un dominio con actividad de acetilación de histonas (HAT) de la familia MYST, un dominio N-terminal de represión de la transcripción y un dominio C-terminal de transactivación (Champagne et al, 2001; Kitabayashi et al, 2001a). Además, MYST3 contiene dos regiones C4HC3 y un motivo C2CH de reconocimiento de nucleosomas (Borrow et al, 1996). Esta estructura compleja sugiere que MYST3 puede unirse a otras proteínas y a la cromatina, puede acetilar histonas y modular la transcripción (Miller et al, 2004). La proteína MYST3 se localiza en el núcleo, parcialmente concentrada en unas agrupaciones diferentes de los denominados *PML nuclear bodies* (PML-NB)(Kindle et al, 2005b; Collins et al, 2006b). Recientemente se ha descrito un papel importante de MYST3 en la hematopoyesis, contribuyendo a la auto-renovación de las células progenitoras más inmaduras (Katsumoto et al, 2006; Thomas et al, 2006a). Además, MYST3 se une físicamente a PU.1, RUNX1 (AML1) y RUNX2 (AML3 o CBFA1). En este sentido, se ha sugerido que MYST3 funciona como coactivador de PU.1 y de RUNX1 y regula la transcripción de sus respectivos genes diana (Jacobson et al, 1999; Kitabayashi et al, 2001a; Katsumoto et al, 2006). Además, durante la diferenciación monocítica normal de las células hematopoyéticas, se ha descrito una presencia progresivamente mayor del complejo proteico MYST3-RUNX1.

Figura 15. Estructura de los diferentes dominios de la proteína MYST3



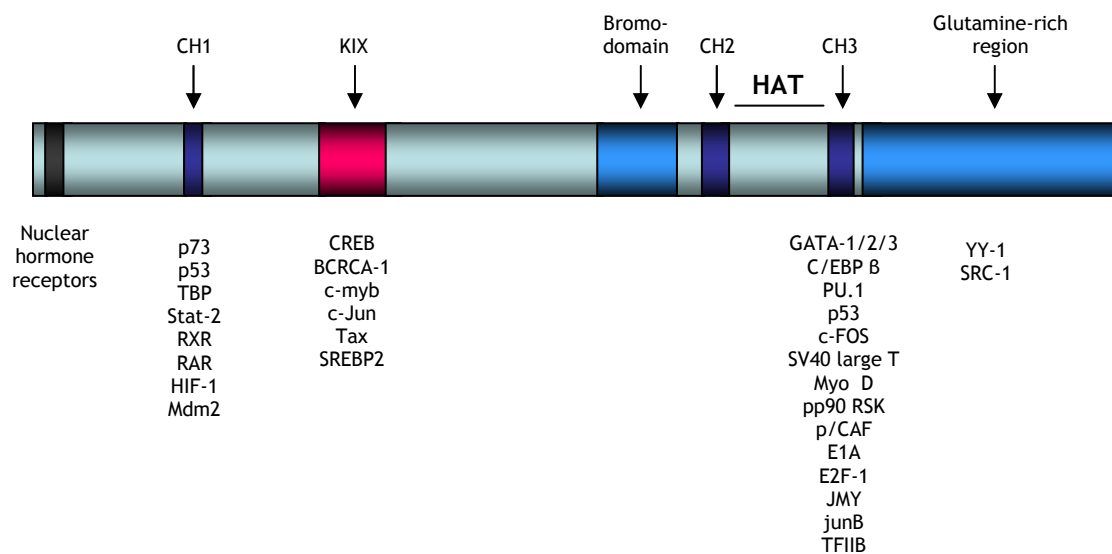
El dominio MYST de la proteína MYST3 se mantiene intacto en las diferentes translocaciones en las que se encuentra implicado este gen, lo que ha hecho suponer una acetilación aberrante como mecanismo fundamental de leucemogénesis en estos pacientes (Champagne et al, 2001; Kitabayashi et al, 2001a; Panagopoulos et al, 2003). Se han descrito otras dos leucemias agudas con anomalías cromosómicas que implican a *MYST3*, las cuales presentan un cuadro clínico y fenotípico similar: la inv(8)(p11;q13) y la translocación t(8;22)(p11;q13), que dan lugar a las proteínas de fusión MYST3-TIF2 y MYST3-EP300, respectivamente (Carapeti et al, 1998; Liang et al, 1998; Chaffanet et al, 2000; Kitabayashi et al, 2001b). Se ha observado que las proteínas quiméricas MYST3-TIF2 y MYST3-CREBBP producen una localización nuclear aberrante de MYST3, independiente de los *PML-NB*, lugar donde se encuentra la proteína CREBBP germinal (Kindle et al, 2005a; Troke et al, 2006; Collins et al, 2006a).

2.2.2. CREBBP

Por su parte, *cyclic AMP response element-binding* (CREB) *binding protein* (CREBBP) es un gen con múltiples dominios que funciona como coactivador de la transcripción (figura 16). Al igual que MYST3, CREBBP también posee un dominio con actividad HAT; además, presenta otros dominios de unión a diversas proteínas, como CREB. Las proteínas CREBBP y p300, con la que comparte una alta homología, interaccionan con el complejo basal de transcripción y forman un puente físico de unión entre los diferentes componentes, con lo que se consigue una estabilización de dicho complejo. Además, mediante la acetilación de histonas pueden cambiar la conformación de la cromatina, permitiendo la accesibilidad del DNA a otras proteínas activadoras de la transcripción (Kalkhoven, 2004). De esta manera, CREBBP y p300 funcionan como cofactores de una serie de proteínas (ver figura 16) relacionadas con la diferenciación (CEBPA, PU.1, GATA1, entre otras), la replicación y la reparación de DNA, la regulación del ciclo celular y la apoptosis, como p53 y NF-KB. En este sentido, se ha demostrado que CREBBP controla los niveles de p53 y, además, forma complejos específicos con NF-KB para potenciar su actividad transcripcional en la inhibición del ciclo celular y/o apoptosis en respuesta al daño de ADN o estrés celular (Jacobson et al, 1999). La proteína CREBBP se localiza en unas estructuras subnucleares denominadas PML-NB, dentro de las cuales se encuentra también la proteína PML, junto al menos otras 9 proteínas (LaMorte et al, 1998; von Mikecz et al, 2000; Boisvert et al, 2001). Se ha demostrado mediante experimentos *knock-*

out con ratones que una correcta cantidad de proteína CREBBP es crucial para el correcto desarrollo embrionario y la renovación de los precursores hematopoyéticos (Kung et al, 2000; Rebel et al, 2002).

Figura 16. Estructura de los diferentes dominios de la proteína CREBBP; algunas de las proteínas con las que interacciona CREBBP se encuentran detalladas junto a su dominio de unión.



Múltiples alteraciones estructurales y funcionales de CREBBP se han asociado con diferentes enfermedades en humanos. Algunas translocaciones, microdeleciones y mutaciones puntuales producen la haploinsuficiencia de CREBBP (es decir, la falta de un alelo funcional de este gen), y dan lugar al síndrome de Rubinstein-Taybi, trastorno de herencia autosómica dominante. En esta enfermedad se producen malformaciones craneales y digitales, retraso mental y predisposición a desarrollar tumores, por lo que se cree que la cantidad de CREBBP, y en especial el correcto funcionamiento de su actividad

HAT, son importantes en el desarrollo embrionario y en el control del crecimiento (Kalkhoven et al, 2003).

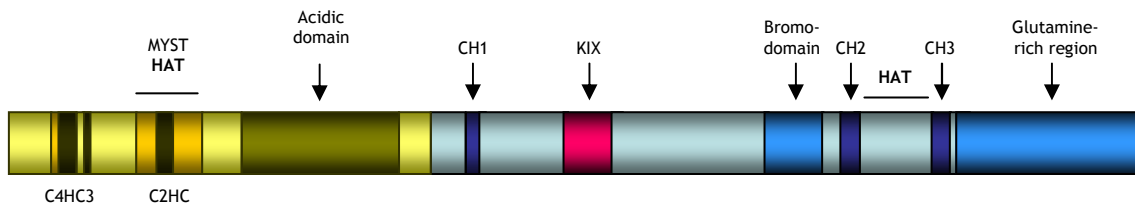
Por otro lado, la función HAT de CREBBP también parece crítica para la prevención de algunas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington. En estos pacientes se ha observado una inactivación funcional de la proteína CREBBP a través de su secuestro en agregados de poliglutaminas de forma paralela a la progresión de la enfermedad (Kalkhoven et al, 2003).

En el contexto de las leucemias agudas, CREBBP se encuentra también implicado en diferentes translocaciones cromosómicas: la más frecuente es la t(8;16)(p11;p13) con reordenamiento *MYST3-CREBBP*, pero también se han descrito ocasionalmente casos de LMA con t(11;16)(q23;p13) y t(10;16)(q22;p13), que producen la fusión de *CREBBP* con los genes *MLL* y *MYST4 (MORF)*, respectivamente (Rowley et al, 1997; Panagopoulos et al, 2001; Vizmanos et al, 2003). Los pocos casos descritos hasta el momento de t(11;16)(q23;p13) se han dado en LMA o SMD secundarios al tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II (principalmente etopósido), tras un periodo de latencia mediano de 20 meses. Por otra parte, el gen *MYST4*, reordenado con *CREBBP* en la t(10;16), es un gen que posee una elevada homología con *MYST3*, y tiene también capacidad activadora de la transcripción a través de un dominio con actividad HAT (Champagne et al, 1999; Pelletier et al, 2003).

2.2.3. MYST3-CREBBP

La t(8;16)(p11;p13) produce una proteína de fusión que contiene el extremo N-terminal de MYST3 y prácticamente la secuencia completa de CREBBP (figura 17).

Figura 17. Estructura de la proteína quimérica MYST3-CREBBP



En el momento de iniciar este trabajo, eran pocos los casos de LMA estudiados desde el punto de vista molecular. Para la detección del reordenamiento se utilizaban principalmente técnicas de citogenética convencional, *FISH* y *Southern blot* (Borrow et al, 1996; Giles et al, 1997). La amplificación del transcrito quimérico *MYST3-CREBBP* mediante RT-PCR había resultado difícil, de forma que tan sólo 4 casos habían sido estudiados con éxito con esta técnica (Borrow et al, 1996; Panagopoulos et al, 2000; Panagopoulos et al, 2002). En estos cuatro casos estudiados mediante RT-PCR se amplificaron cuatro tipos diferentes de transcrito *MYST3-CREBBP*: el denominado tipo I, en el que el nucleótido (nt) 3745 del gen *MYST3* (Nº acceso U47742) se unía de forma funcional (*in frame*) con el nt 284 del gen *CREBBP* (NM_004380); y el transcrito tipo II, en el que el nt 3745 de *MYST3* se unía de

forma no productiva (*out of frame*) con el nt 997 de *CREBBP* (Panagopoulos et al, 2000). Un estudio posterior (Panagopoulos et al, 2003) localizó los puntos de ruptura en estos casos en el intrón 16 de *MYST3* y en el intrón 2 del gen *CREBBP*, lo que daba lugar a una proteína quimérica con la mayoría de dominios de *CREBBP* y *MYST3* intactos, incluyendo el dominio *MYST* con actividad HAT (figura 17). Los otros dos tipos de transcrito se describieron en dos casos de LMA y t(8;16) con puntos de ruptura diferentes, localizados en el exón 17 de *MYST3* y el intrón 3 de *CREBBP* (Borrow et al, 1996; Panagopoulos et al, 2002).

Muy recientemente se describieron dos casos de LMA con t(8;16) y dos nuevos tipos de transcrito *MYST3-CREBBP*, denominados tipo IV y tipo V, en los que el exón 15 de *MYST3* se fusiona con los exones 4 o 5 de *CREBBP*, respectivamente. A pesar de haber perdido el exón 16 de *MYST3*, la proteína quimérica *MYST3-CREBBP* mantiene intacto el dominio *MYST* de *MYST3*, así como la mayoría de dominios funcionales de *CREBBP*, incluyendo su dominio con actividad HAT (Murati et al, 2007).

Por otra parte, la amplificación del transcrito recíproco *CREBBP-MYST3* requería una RT-PCR anidada, lo que parecía traducir una menor expresión; además, no se amplificó en todos los casos un producto funcional, lo que hizo sugerir que *MYST3-CREBBP*, y no *CREBBP-MYST3*, era el transcrito implicado principalmente en la leucemogénesis. En los tres tipos de transcrito *CREBBP-MYST3* detectados se producía la unión a nivel del exón 17 de *MYST3* y del

exón 2 de *CREBBP* (Panagopoulos et al, 2000) o bien a nivel del exón 15 de *MYST3* y del exón 4 o 5 de *CREBBP* (Murati et al, 2007).

El análisis a nivel de ADN genómico del reordenamiento *MYST3-CREBBP* mostró la presencia de varias secuencias repetitivas de ADN en las zonas de ruptura (Panagopoulos et al, 2003). Se ha sugerido que el agrupamiento de dichas secuencias puede originar una inestabilidad de la región, favoreciendo la posibilidad de reordenamientos. Este hallazgo, junto con la presencia de cambios genómicos adicionales, fruto de múltiples roturas de ADN, ha hecho hipotetizar que una alteración en los mecanismos de reparación de ADN se encontraría en la génesis de la translocación t(8;16) (Panagopoulos et al, 2003). Es importante señalar que no se encontraron diferencias en los puntos de ruptura en los casos de LMA *de novo* respecto los casos de leucemia secundaria.

Por otro lado, los mecanismos de leucemogénesis originados por la translocación en este subtipo de leucemia no son bien conocidos. La fusión de dos genes reguladores de la cromatina, que aportan a la proteína de fusión su dominio HAT intacto (figura 17), ha hecho suponer como mecanismo patogenético una acetilación aberrante de histonas debido a una regulación alterada, cambios en los genes diana o pérdida de función de uno de los genes implicados (Borrow et al, 1996; Jacobson et al, 1999). Por otro lado, se había demostrado que *MYST3* es un potente activador de *RUNX1* y que la formación de la proteína de fusión *MYST3-CREBBP* inhibe la transcripción mediada por *RUNX1* (Kitabayashi et al, 2001a). En este sentido, se ha sugerido que dicha

inhibición podría deberse a una unión competitiva de la proteína anómala con RUNX1 que impidiera la formación normal del complejo de transcripción. Como alternativa, MYST3-CREBBP podría inhibir la transcripción impidiendo la unión de cofactores a RUNX1, o de las proteínas germinales MYST3 y CREBBP, o bien mediante la acetilación aberrante de otras proteínas (Kitabayashi et al, 2001a).