

Estudio del impacto de la sobreexpresión de los genes *MN1* y *BAALC* en una serie de pacientes con LMA homogéneamente tratados con un esquema de inducción con idarrubicina y citarabina



## Índice.

Índice.....	3
Resumen de abreviaturas más frecuentes .....	6
1.- Introducción.....	9
2.- Revisión del problema: Estado actual de la Leucemia Mieloblástica Aguda.....	13
2.1 Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). Concepto y epidemiología.....	13
2.1.1 Definición.....	13
2.1.2 Antecedentes históricos.....	13
2.1.3 Etiología de la Leucemia Mieloide aguda.....	20
2.1.4 Epidemiología.....	24
2.1.5 Clasificación.....	26
2.1.6 Factores pronósticos.....	27
2.1.6.1 Dependientes del paciente.....	27
2.1.6.2 Dependientes de la enfermedad.....	29
2.1.6 Bases de tratamiento.....	35
2.1.6.1 Tratamiento de inducción.....	36
2.1.6.2 Terapia post remisión. Tratamiento adaptado al riesgo.....	37
2.2 Patobiología de la LMA. Modelo actual de leucemogénesis .....	41
2.2.1 Regulación de la hematopoyesis.....	41
2.2.1.1 Visión global de la mielopoyesis.....	41
2.2.1.2 Reguladores de la mielopoyesis.....	43
2.2.1.2.1 Factores de Transcripción. Genes <i>HOX</i> .....	43
2.2.1.2.2 Factores de crecimiento hematopoyéticos.....	48
2.2.1.2.3 Mecanismos epigenéticos. ARN de interferencia (miRNA).....	50
2.2.2 Fisiopatología y bases moleculares de la LMA.....	53
2.2.2.1 Proceso Secuencial. Evidencia a favor de leucemogénesis como modelo multi-step.....	54
2.2.2.2 Mutaciones en LMA.....	59
2.2.2.2.1 Mutaciones en NPM1.....	59
2.2.2.2.2 Factores de transcripción: fusiones y mutaciones.....	61
2.2.2.2.3 Maquinaria epigenética del ADN. Genes de metilación y modificadores cromatina.....	62
2.2.2.2.4 Supresores tumorales.....	69
2.2.2.2.5 Mutaciones en genes de vías señalización celular.....	70
2.2.2.2.6 Mutaciones en la maquinaria de splicing.....	72
2.2.2.2.7 Mutaciones en el complejo de la cohesina.....	73

2.3 Sobreexpresión de genes en LMA. Utilidad de la sobreexpresión de genes en el manejo clínico de LMA. Arrays de expresión y clasificación. Los genes MN1 y BAALC.	73
2.3.1 Expresión de genes. Técnicas de estudio en ARNm	73
2.3.2 Perfiles de expresión: Gene Expression Profile (GEP) en LMA	75
2.3.3 Sobreexpresión de genes en LMA	78
2.3.4 <i>MN1</i>	81
2.3.5 BAALC	91
3.- Fundamento del presente trabajo. Utilidad de la sobreexpresión de genes MN1 y BAALC en el manejo de los pacientes con LMA	97
4.- Objetivos	101
4.1 Objetivo principal:	101
4.2 Objetivos secundarios:	101
5.- Material y métodos	103
5.1 Planteamiento metodológico y población a estudio	103
5.2 Procedimientos técnicos	103
5.2.1 Diagnóstico de LMA	103
5.2.2 Análisis citogenético y FISH.	105
5.2.3 Estudio de citometría.	105
5.2.4 Estudios moleculares.	106
5.2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADNc.	106
5.2.4.2 Mutaciones NPM1 y FLT3.	107
5.2.4.3 Estudio de sobreexpresión de los genes MN1 y BAALC	108
5.3 Definiciones y variables a estudio.	109
5.3.1 Clasificación LMA	109
5.3.2 Clasificación por tratamiento	109
5.3.3 Sobreexpresión de los genes a estudio MN1 y BAALC	109
5.3.4 Definición de las respuestas obtenidas.	111
5.3.5 Definición de tiempos de supervivencia.	112
5.4 Método de recogida y explotación de datos.	113
6.- Resultados.	115
6.1 Análisis descriptivo de la serie. Características demográficas, biológicas y terapéuticas.	115
6.2 Características de las variables a estudio	120
6.2.1 Características descriptivas y analíticas de la variable expresión <i>MN1</i> en relación al resto de variables.	120

6.2.2 Características descriptivas y analíticas de la variable expresión <i>BAALC</i> en relación al resto de variables. -----	123
6.3 Análisis bivalente y mutivariante de la probabilidad de fracaso a la quimioterapia de inducción, de supervivencia global y libre de progresión. -----	126
6.3.1 Análisis respecto a la remisión completa y persistencia -----	126
6.3.1.1 Influencia de MN1 y <i>BAALC</i> sobre la RC y persistencia -----	129
6.3.1.2 Modelos multivariantes respecto a la influencia de las variables categóricas en la persistencia tras inducción. -----	140
6.3.2 Estudio de supervivencia global de la serie. -----	145
6.3.2.1 Impacto de las variables MN1 y <i>BAALC</i> en la supervivencia global -----	152
6.3.3 Estudio de supervivencia libre de progresión. -----	156
6.3.3.1 Influencia en la supervivencia libre de progresión de las variables MN1 y <i>BAALC</i> -----	158
6.4 Estudio de los niveles de expresión de MN1 y <i>BAALC</i> medidos tras primer ciclo de quimioterapia. Frecuencia de RC e impacto pronóstico. -----	160
6.4.1 Asociación del nivel de expresión de MN1 y <i>BAALC</i> tras el primer ciclo de quimioterapia con la respuesta morfológica. -----	163
6.4.2 Impacto pronóstico de los niveles de expresión de MN1 y <i>BAALC</i> medidos tras primer ciclo de inducción en la supervivencia global -----	163
6.5 Patrones de expresión de los genes MN1 y <i>BAALC</i> medidos en el momento de la recaída de los pacientes. Estudio descriptivo. -----	170
7.- Discusión de resultados. -----	176
7.1 Características generales de la serie. -----	176
7.2 Características globales de las variables MN1 y <i>BAALC</i> -----	180
7.2.1. Variable MN1 -----	180
7.2.2 Variable <i>BAALC</i> -----	182
7.2.3 Asociación entre MN1 y <i>BAALC</i> -----	183
7.3 Análisis de MN1 y <i>BAALC</i> al diagnóstico y asociación con persistencia de la enfermedad tras primer ciclo de quimioterapia. -----	184
7.4 Impacto de MN1 y <i>BAALC</i> al diagnóstico en la probabilidad de supervivencia global y libre de progresión. -----	188
7.5 Análisis de niveles de MN1 y <i>BAALC</i> post primera quimioterapia de inducción. -----	191
7.6 Análisis de MN1 y <i>BAALC</i> en el momento de la recaída. -----	195
7.7 Limitaciones del presente trabajo. -----	197
7.8 Vías de potencial desarrollo futuro. -----	197
8.- Conclusiones: -----	199
9.- Bibliografía -----	202

## Resumen de abreviaturas más frecuentes

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**Alo-TPH:** Trasplante alogénico progenitores hematopoyéticos.

**AUC:** Área bajo la curva.

**CFU:** unidad formadora de colonias.

**CFU-GEMM:** Célula formadora de colonias Mieloide-monocítica-eritroide-magacariocítica.

**CFU-L:** célula formadora de colonias linfoides.

**CG:** Citogenética.

**DS:** Desviación estándar.

**ELN:** European LeukemiaNET.

**EMR:** Enfermedad mínima residual.

**FT:** Factor de transcripción.

**FC:** Factor de crecimiento.

**GEP:** Perfil de expresión génica.

**HR:** hazard ratio.

**HSC:** Célula madre hematopoyesis.

**IC:** Intervalo de confianza.

**LMA:** Leucemia mieloblástica aguda.

**LMC:** Leucemia mieloide crónica.

**LLA:** Leucemia linfoblástica aguda.

**MO:** Médula ósea.

**NMPC:** Neoplasia mieloproliferativa crónica.

**P50:** percentil 50.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.

**PETHEMA:** Programa de estudio y tratamiento de hemopatías malignas.

**RC:** remisión completa.

**RR:** Riesgo relativo.

**SG:** Supervivencia global.

**SLP:** Supervivencia libre de progresión.

**SP:** Sangre periférica.

**SMD:** síndrome mielodisplásico.

**TAPH:** Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

**TCGA:** The Cancer Genome Atlas Research Network.

**VPP:** valor predictivo positivo.

**VPN:** valor predictivo negativo.



## 1.- Introducción.

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) constituye una neoplasia de progenitores hematopoyéticos comprometidos hacia la línea mieloide de la hematopoyesis, y aparece como consecuencia de alteraciones genéticas y epigenéticas que alteran procesos claves en el desarrollo de la mielopoyesis como son la auto-renovación, proliferación y diferenciación de la célula stem hasta los estadios madurativos finales. (Arber et al., 2008; Faderl & Kantarjian, 2012).

El avance en el conocimiento en su patobiología ha puesto de manifiesto que se trata de una enfermedad tremendamente compleja y **heterogénea**, con más de 100 alteraciones citogenéticas recurrentes descritas, con una media de 13 mutaciones en regiones codificantes por paciente, (Cancer Genome Atlas Research, 2013) y que se expresa clínicamente con una situación de fallo medular, con alta prevalencia de procesos infecciosos y diátesis hemorrágica sobre los que si no se interviene, acaba en un curso clínico fatal de rápida evolución

Según la información disponible de los registros nacionales, en especial del SEER de EEUU (Dores, Devesa, Curtis, Linet, & Morton, 2012) y del Registro Nacional de Tumores de Suecia (Juliusson et al., 2009), la edad media de presentación de la LMA se sitúa a partir de la sexta década de la vida, entre los 63 y los 67 años según la fuente consultada, con una muy baja incidencia en los menores de 10 años, que va aumentando progresivamente con los años de vida ganados, de tal manera que la prevalencia pasa de 3,5 casos por 100000/año a los 50 años de edad hasta los 35 casos por 100000/ año para mayores de 90 años (Faderl & Kantarjian, 2012).

En definitiva, y citando a Kenneth Miller en la introducción al tratamiento de la LMA en la cuarta edición del Manual Hoffman de Hematología, desde hace ya más de diez años debemos asumir que la “la LMA no es una enfermedad única sino un conjunto heterogéneo de entidades neoplásicas caracterizadas por la proliferación y acumulación de células hematopoyéticas inmaduras”(Kenneth Miller, 2004), por lo

que esta variabilidad genética y clínica debe ser la base a la hora de afrontar el manejo clínico de estos pacientes.

La etiología de la LMA continúa siendo desconocida en la mayoría de los casos, con una aparición esporádica sin poderse relacionar con un agente causal. Se ha descrito la relación con la exposición laboral a elementos químicos como los derivados del benceno que solo sería reseñable para aquellos sometidos a exposiciones muy elevadas, así como la relación con las radiaciones ionizantes, en especial la radioterapia con fines terapéuticos y la quimioterapia.

El conocimiento de la leucemia como entidad nosológica nos lleva hasta el siglo XIX, cuando la mejora de los métodos ópticos de microscopía permiten la observación de los elementos formes de la sangre. Le corresponde el honor de asentar el nombre de “leucemia” al patólogo alemán Rudolf Virchow que lo usa por vez primera en 1845, el mismo año que J.H. Bennet describe con profusión de datos morfológicos dos casos de lo que él denominó previamente como leucocitemia. En las décadas siguientes, médicos como Paul Ehrlich y Otto Naegeli, entre otros, introducen conceptos claves, algunos todavía vigentes, como la tendencia a la proliferación, la presencia del hiato leucémico, expresión morfológica del bloqueo madurativo, y gracias al desarrollo de la citología, al desarrollo de las primeras clasificaciones entre leucemias mieloides y linfoides (Piller, 2001).

Estos conocimientos iniciales de la biología de la LMA tardan en tener contraprestación en el desarrollo de una terapéutica eficaz. Hemos de esperar a la década de los años 70 del siglo XX para presenciar los primeros tres hitos claves en el manejo clínico actual de la LMA (Piller, 2001):

- a) La combinación de citarabina con un antraciclínico como terapia de elección.
- b) La definición de la remisión completa morfológica como objetivo del tratamiento,
- c) El desarrollo de la clasificación morfológica de consenso por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB).

Conseguir de manera rutinaria la remisión completa con la quimioterapia de inducción, era una aproximación claramente insuficiente pero necesaria para plantear el siguiente desafío terapéutico, la curación de la enfermedad.

Este hito se pudo empezar a plantear a lo largo de la década de los 80 con el desarrollo de las terapias de intensificación, en especial la quimioterapia con altas dosis de Ara-C y el impulso del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, aproximaciones terapéuticas que durante los años 90 demostraron tasas de supervivencia libre de progresión de aproximadamente el 40% a los cinco años del diagnóstico (Mayer et al., 1994).

Pero el conocimiento biológico de la enfermedad también iba a entroncar con este desarrollo clínico, en especial con la publicación en 1998 del trabajo del grupo cooperativo británico MRC de la importancia de la citogenética al diagnóstico en la probabilidad de supervivencia de los pacientes con LMA (David Grimwade & John Rees, 1998).

A partir de este momento se abren las puertas a una nueva etapa en el tratamiento de la LMA que consiste en el desarrollo de estrategias terapéuticas adaptadas, incluso individualizadas según el riesgo clínico y biológico del paciente, de tal manera que a partir de un tronco inicial, común, de terapia de inducción, se selecciona al paciente en función de su edad, citogenética y perfil mutacional de los genes *NPM1* y *FLT3*, para elegir la terapia post remisión o de intensificación más adecuada a sus características (Dohner et al., 2010). Pero lo cierto es que a pesar de todas las variables descritas, aun sigue existiendo un 20-30% de pacientes en los que ni la citogenética ni las mutaciones de *NPM1* ni *FLT3* aportan información suficiente.

Es por ello que se han intentado trasladar a la práctica clínica nuevos biomarcadores capaces de ayudar en la toma de decisiones, para poder optimizar el tratamiento.

En este contexto de búsqueda, surgen en la pasada década los marcadores de sobreexpresión de genes mediante la cuantificación del número de copias de ARNm por PCR en las muestras al diagnóstico.

Estudios retrospectivos de cohortes de pacientes homogéneamente tratados, han demostrado que la sobreexpresión de *BAALC* y *MN1* tiene una implicación pronóstica estadísticamente significativa en la supervivencia global y en la probabilidad de fracaso a la quimioterapia de inducción (Baldus et al., 2003; Heuser et al., 2006).

Si bien estos trabajos son de diseño retrospectivo y carecen de validación en cohortes de pacientes tratados prospectivamente, el conocimiento reciente de la biología de la LMA, con el auge que tienen las alteraciones en los mecanismos de control de la expresión génica en la leucemogénesis, como son las mutaciones en los genes encargados de la regulación epigenética, o de la maduración del ARN mensajero, (Cancer Genome Atlas Research, 2013) han generado un interés creciente por el papel que puedan tener la sobreexpresión génica en la LMA.

Por todo surge la presente tesis doctoral, cuyo objetivo consiste en analizar de manera retrospectiva el impacto que tiene en la probabilidad de alcanzar la remisión completa morfológica tras un ciclo de quimioterapia (combinación de citarabina con antraciclínico) la sobreexpresión de los genes *MN1* y *BAALC* en una serie de 119 pacientes afectos de LMA con respuesta evaluada.

Además comparemos dos puntos de corte distintos para definir la sobreexpresión, entre los que incluimos un valor que no precisa de la población de pacientes enfermos para ser definida y que definimos a partir de una población control, por lo que permite una asignación a apriorística de los pacientes y por último se estudiará el posible papel que tiene en el seguimiento en la enfermedad de los pacientes, si poseen capacidad para predecir recaídas, de tal manera que se pretende explorar si la sobreexpresión de estos genes puede jugar un papel clínico, no solo en el momento del diagnóstico sino aportar información relevante durante la evolución de la LMA.

## **2.- Revisión del problema: Estado actual de la Leucemia Mieloblástica Aguda**

### ***2.1 Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). Concepto y epidemiología.***

#### **2.1.1 Definición.**

En su edición de 2008 de la clasificación de los tumores de la hematopoyesis y de los órganos linfoides, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la LMA como “neoplasia de progenitores de la hematopoyesis comprometidos hacia la línea mieloide” que se caracteriza por la proliferación y el bloqueo en la maduración de estos progenitores. Esta clasificación, vigente en la actualidad se caracteriza por integrar la información genética y clínica con los hallazgos morfológicos, con la finalidad de definir entidades “clínico-patológicas-genéticas” específicas, como expresión de la tremenda heterogeneidad clínica de esta enfermedad. Esta heterogeneidad es la expresión de las características biológicas subyacentes, motivo por el cual se reconocen en esta edición de 2008 hasta 22 tipos de LMA y 2 entidades provisionales (S.H. Swerdlow, 2008). En la actualidad se asume que **“no es una enfermedad única**, sino un conjunto heterogéneo de neoplasias caracterizadas por la proliferación y acumulación de células hematopoyéticas en la médula ósea y sangre” (Kenneth Miller, 2004) según palabras de Kenneth Miller y Philip Daoust en la cuarta edición del manual Hoffman de Hematología.

#### **2.1.2 Antecedentes históricos.**

El concepto de Leucemia como entidad nosológica no se establece hasta la llegada del siglo XIX coincidiendo con el desarrollo y progreso de las técnicas de microscopía óptica. Así pues, no es posible encontrar referencias en los textos clásicos de la medicina egipcia, griega o romana.

El punto de partida se debe situar en 1674 cuando Anton van Leeuwenhoek hace la primera descripción conocida de la existencia de elementos formes en la circulación sanguínea, pero hemos de esperar hasta el siglo XIX para que se correlacionen esos hallazgos morfológicos al microscopio con la génesis de enfermedad. El concepto

imperante era el de la supuración de la sangre cuando se observaban aumentos de glóbulos blancos en las muestras observadas al microscopio.

La primera referencia clave corresponde al equipo médico del Edinburgh Royal Infirmary quienes encabezados por John Hughes Bennett publican en 1845 un caso de hipertrofia de bazo e hígado en el que: "la muerte tuvo lugar por supuración de la sangre". Es pues este el primer cambio en el paradigma vigente. Son los primeros autores que afirman que la presencia exacerbada de leucocitos en la sangre no son una consecuencia, sino la causa de la muerte del paciente (Piller, 2001). No solo eso, J.H Bennett hace una descripción morfológica rigurosa, extremadamente cuidadosa y prolija en detalles, y lleva sus conclusiones al papel con el desarrollo por primera vez de esquemas que ilustran estos hallazgos morfológicos. Es pues, el comienzo de la citología hematológica.

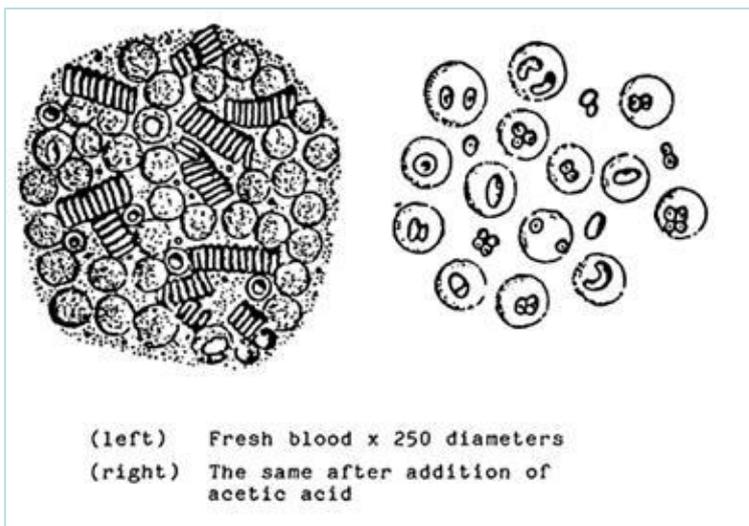


Figura 2.1 Representación gráfica creada por J.H. Bennet en su trabajo original

Casi inmediatamente a este caso, sólo seis semanas después, un becario de la cátedra de Patología del Hospital Charité en Berlín, llamado Rudolf Virchow, publicaba un caso, esta vez con finalidad descriptiva, de un paciente con una inversión del normal cociente entre glóbulos blancos y rojos, y en 1847, ya como profesor de Anatomía Patológica, introduce por primera vez el concepto de "leucemia" a través de la expresión germana "weisses blut", adelantándose a Bennet, quien posteriormente introduciría el concepto "leucocitemia" para definir este nuevo grupo de entidades.

En las décadas siguientes progresara el debate de quienes aún se aferran a la creencia que estos hallazgos son expresión de padecimientos crónicos, pero que van cediendo ante la creciente evidencia a favor de una enfermedad primaria de la sangre.

El siguiente paso debe a los trabajos de Paul Erlich, quien gracias al desarrollo de las tinciones citológicas, con combinaciones de tres ácidos y anilina es capaz de mejorar el reconocimiento celular y definir los gránulos presentes en las células. Esto permitirá clasificar las leucemias según el origen celular, dando pie a la primera clasificación en base a los hallazgos morfológicos, y que es sintetizada en 1900 por Ernest Neumann, quien define tres tipos

- Forma linfática con grandes ganglios.
- Forma lineal con aumento del bazo.
- Forma mielógena con alteración de la médula ósea.

El siguiente avance, le corresponde al hematólogo suizo Otto Naegeli. Sus trabajos confirman los hallazgos morfológicos descritos por Paul Ehrlich, pero van un paso más allá, porque pone el acento en la célula precursora, identificando precursores linfoides y mieloides. El mismo, los define como mieloblasto, y remarca, con gran énfasis, que el hecho diferencial para abordar estas entidades debe ser el tipo de célula *“a partir de 50.000 leucocitos se incluía la afección en las leucemias, pero esto es completamente inadmisible (...) lo decisivo es la variedad celular no el numero ni el tamaño”* (Naegeli, 1934) Sus trabajos le llevan a concluir una serie de dictados claves para entender las leucemias y que sientan las bases del conocimiento morfológico de la LMA. Así, en la década de los 30 describe dos conceptos que mantienen su plena vigencia hasta nuestros días:

- a) **“Proliferación** muy tumultuosa, con producción celular intensísima, que cesa el desarrollo normal de células (...) originando insidiosamente la suplantación del sistema mieloide”
- b) **“Hiatus leucémico** (...) en la sangre existen neutrófilos completamente maduros, pero sin presentar formas intermedias sino casi únicamente mieloblastos inmaduros y patológicos”

Es decir, en estos dos puntos, define con claridad y en base a la simple observación del microscopio las bases que ha sustentado la patogenia de la LMA hasta fechas recientes: La ventaja proliferativa y el bloqueo en la maduración de la mielopoyesis.

A partir de este y otros autores se empieza ya a distinguir la presencia de leucemias agudas y de formas crónicas, por lo que podemos afirmar que entre los años 20 y 30 del pasado siglo concluye el entramado argumental que lleva a la definición como entidad de la LMA, casi 90 años después de ser introducido el término leucemia por R. Virchow y J.H. Bennett.

Y si lento ha sido el reconocimiento como entidad nosológica propia, más ardua ha sido la tarea de desarrollo de terapias eficaces para la LMA.

Si los trabajos y autores descritos, y otros muchos aquí no reseñados, eran prolíficos en las interpretaciones morfológicas y hábiles en la comprensión de las bases de la enfermedad, esto no iba de la mano de avances en el soporte terapéutico. Hasta la década de los 40, las únicas opciones disponibles eran la Solución de Fowler, un remedo empírico para las fiebres creado a finales del siglo XVIII, con el que se observaba mejorías sintomáticas y temporales en algunos pacientes, siempre limitadas en el tiempo y la posibilidad de la radioterapia, que se hacía de manera casi constante sobre el lecho esplénico, que en manos de algunos grupos conseguía aumentar la supervivencia de las leucemias crónicas (Naegeli, 1934) y en combinación con la solución de Fowler muy discretas ventajas en las variantes agudas.

Sin embargo, merece la pena detenernos en una pequeña anécdota. Otto Naegeli, también pasa por ser el primer autor en describir una curación de LMA, tal y como se muestra en el gráfico adjunto reproducido de la 5ª edición de su manual de Hematología

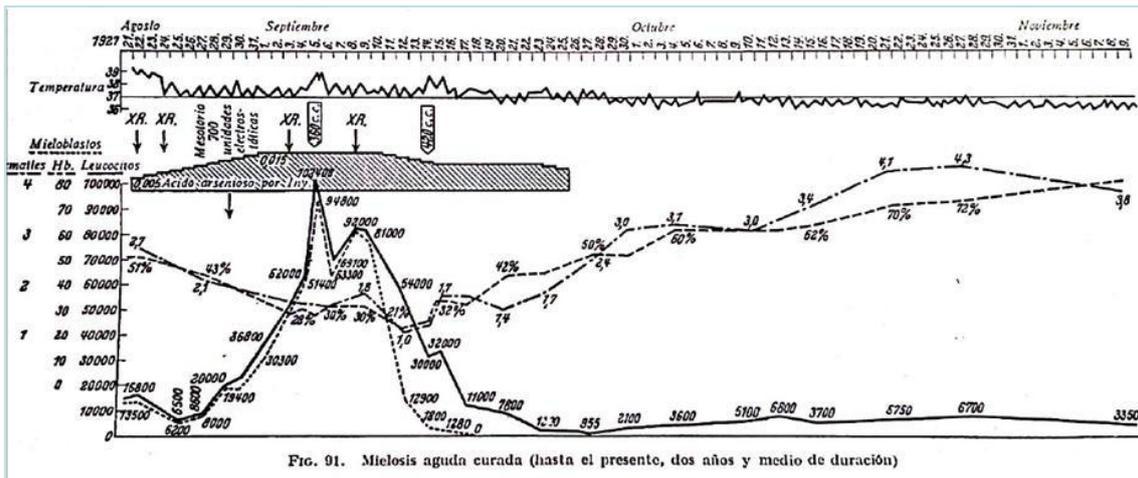


Fig. 91. Mielosis aguda curada (hasta el presente, dos años y medio de duración)

Figura 2.1 Esquema de evolución de un paciente con LMA y tratamiento con solución de Fowler. Tomado de O. Naegeli

La base del tratamiento de este caso, acontecido a finales de los años 20 del siglo pasado consistía en el principio activo de la Solución de Fowler: Trióxido arsénico. Con los conocimientos actuales es tentador especular, que probablemente estaríamos ante la primera curación de una leucemia promielocítica aguda.

Hemos de esperar hasta la llegada de la década de los 40 para ver surgir el nacimiento de la quimioterapia como tal.

Es conocido que los primeros trabajos se realizaron en base a mostazas nitrogenadas y que su primera aplicación clínica fue en el contexto de los linfomas, en especial, del linfoma de Hodgkin (Goodman et al., 1948) donde en 1946 se observaron respuestas iniciales prometedoras con el uso de estos compuestos, pero es en 1948 cuando se publica el primer trabajo específico dirigido hacia pacientes con leucemias agudas.

El trabajo fue dirigido Sidney Farber, quien siendo conocedor de los avances en la fisiología de la hematopoyesis, en particular de la importancia de los metabolitos del ácido fólico, plantea la hipótesis experimental que el uso de este puede contribuir a recuperar el equilibrio inicial a favor de la hematopoyesis sana en perjuicio de los blastos leucémicos. Los resultados iniciales fueron desalentadores pero esto dio pie a plantear la hipótesis contrario mediante el uso de inhibidores del ácido fólico puede inhibir la ventaja proliferativa de los blastos leucémicos (Mukherjee, 2011)

La fase experimental fue rápida y el 3 de junio de 1948 se publicaba en el New England Journal of Medicine el trabajo que por primera vez documentaba la presencia de remisiones en el manejo de pacientes con leucemias agudas.

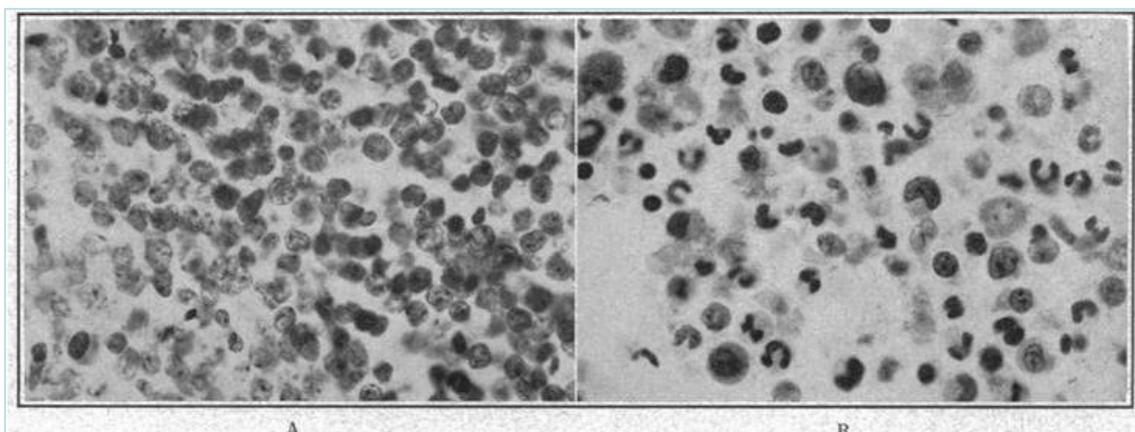


Figura 2.3 Imágenes de la médula ósea de uno de los pacientes antes y después de ser tratados con aminopterina. Extraída del artículo original. Farber, S. et al (1948)

El trabajo recurría a fotografías de la médula y a la descripción de la evolución clínica y de las analíticas de los pacientes para poder sostener el impacto del hallazgo (Sidney Farber, Louis Diamond, Robert Mercer, Robert Sylvester, & Wolff, 1948), y casi inmediatamente, aparecía el siguiente hito, el descubrimiento de la utilidad de los esteroides en las leucemias infantiles (Piller, 2001).

Pero a pesar de que durante la década de los 50 comienza una carrera de síntesis de nuevos fármacos, las armas terapéuticas disponibles hasta bien entrados los años 60 muestran una eficacia limitada en la LMA tal y como se recoge en el cuadro adjunto. (Farreras, 1963).

Tipo leucémico	Reacciones citoquímicas (técnicas de coloración)			Terapéutica de elección
	Peroxidasas (granulocitos)	Sudán negro B (lípidos)	PAS o r. de Schiff (glucógeno)	
L. mieloblástica	+	+	+	6-mercaptopurina
L. linfoblástica	—	—	±	glucocorticoides
L. monocítica	±	+	—	glucocorticoides + 6-mercaptopurina
L. parablástica o indiferenciada	—	—	—	6-mercaptopurina + glucocorticoides.

Figura 2.4 Esquema de abordaje diagnóstico y terapéutico de las leucemias agudas publicado en Patología y Clínica Médicas. Pedro Farreras. 3ªd 1963.

De tal manera que en 1966, William Damesheck concluía: “dudamos que cualquiera de los agentes antileucémicos disponibles representen un avance significativo en el manejo de la LMA (Damesheck, 1966)

Sin embargo los cambios eran inminentes. A finales de la década de los 60, y a lo largo de los 70, el germen del grupo cooperativo CALGB, lidera trabajos con nuevos fármacos que por primera vez mostrarán resultados esperanzadores en LMA.

En 1968 se publican los resultados iniciales del tratamiento con citarabina en monoterapia para la LMA (Rose Ruth Ellison, 1968) y en 1973, su experiencia con daunorrubicina, un antibiótico obtenido por investigadores franceses desde cultivos de cepas de *Actinomyces*, y que desde 1967 había sido documentada su actividad en LMA (Marise Weil, Cuttner, & Silver, 1973) estos hallazgos dieron pie inmediatamente a los primeros ensayo exploratorios usando combinaciones, para concluir publicando en 1981 lo que continúa siendo el estándar de tratamiento de inducción para la LMA en nuestros días: La combinación de una infusión continua durante 7 días de Ara-C junto con tres días de administración en bolo de daunorrubicina (CD Bloomfield, Prager, KR Rai, & Henry, 1981; Fernandez, 2010)

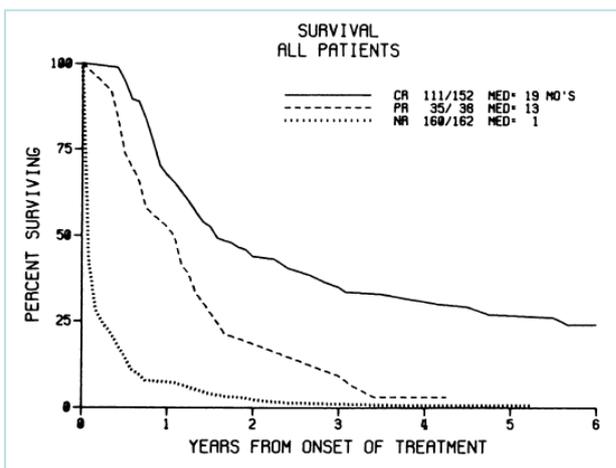


Figura 2.5 Resultados en supervivencia del trabajo inicial del CALGB según respuesta morfológica alcanzada. Tomado K Rai et al Blood 1981

Además, desde sus publicaciones en 1968, estos autores introducen el concepto de Remisión completa y lo definen de manera conjunta con las cifras en sangre periférica (< de 5% de blastos en el aspirado de médula ósea, más de 1500 neutrófilos,

hemoglobina >11 gr/dl), criterios que con discretas modificaciones se mantienen hoy en día de plena vigencia (Cheson et al., 2003).

Estos hallazgos terapéuticos son correlativos con los avances en los esfuerzos por homogeneizar los criterios diagnósticos, de tal manera que en 1976 se publican los criterios diagnósticos basados en los hallazgos morfológicos propuestos por el grupo cooperativo FAB, (Bennett et al., 1976) quedando definidas las leucemias agudas, en tres subtipos de leucemias linfoblásticas agudas y en seis las leucemias mieloblásticas agudas.

De tal manera que a comienzos de la década de 1980, momento en el que damos por finalizada esta introducción ya existen criterios uniformes para definir, diagnosticar y clasificar la LMA, y se dispone de protocolos terapéuticos específicos para su abordaje.

#### **Resumen de los principales hitos en la evolución de la LMA:**

1847. J.H Bennet, R Virchow: concepto de Leucemia

1880-1890 Paul Erlich: Leucemias mieloides y linfoides

1900-1930: Otto Naegeli, Paul Ernest: Enfermedad de progenitores. Mieloblastos.  
Leucemias agudas vs leucemias crónicas

1948: Sidney Farber: Primera quimioterapia específica para leucemias agudas

1968: Rose Elliot et al: Citarabina. Primera quimioterapia eficaz para LMA

1968: Concepto de RC validado por el Acute Leukemia Group B

1978: Clasificación FAB

1980: Congreso ASH: 7+3 tratamiento de elección como inducción.

#### **2.1.3 Etiología de la Leucemia Mieloide aguda.**

*"(...) al final del congreso Americano de Hematología, noviembre de 1959, el presidente invitó a los 600 concurrentes a que expresaran su opinión acerca de la naturaleza etiológica del proceso (LMA). Obtuvo 26 votos a favor de las radiaciones, 15 a favor*

*agentes químicos, 15 factores genéticos, 10 por virus y el resto, no quisieron pronunciarse” (Farreras, 1963)*

En aproximadamente el 80% de los casos de LMA no es posible identificar el agente desencadenante del daño genotóxico que acaba iniciando el proceso de leumogénesis, de tal manera que en la actualidad la mayoría de los pacientes son etiquetados como leucemias *de novo* o espontáneas sin que se puede identificar exposición a agente causal. El conocimiento creciente del proceso de patogénesis de la LMA, sugiere que se trata de un proceso “multistep” de larga evolución por lo que con los estudios epidemiológicos actuales resulta difícil identificar agentes desencadenantes (Deschler & Lübbert, 2006). Una salvedad serían los casos de LMA secundarias al uso terapéutico de radiaciones ionizantes y quimioterapia, que constituyen entre el 10-20% de los casos totales de LMA (Kenneth Miller, 2004).

Los factores con potencial leucemógeno se pueden resumir de la siguiente manera.(Kenneth Miller, 2004; Stock & Thirman, 2014)

- a) Factores genéticos: LMA familiar y síndromes predisponentes
- b) Factores ambientales
- c) Radioterapia y quimioterapia.

Entre los **factores genéticos** predisponentes se ha demostrado epidemiológicamente el mayor riesgo para el desarrollo de LMA infantil en pacientes afectos de síndromes hereditarios en los que la inestabilidad genética y cromosómica es clave. Así se ha demostrado para enfermedades como la Anemia de Fanconi, Ataxia-telangiectasia de Friedrich, Síndrome de Bloom, sdr de Li-Fraumeni, o síndrome de Klinefelter que en trabajos de casos y controles se ha documentado este aumento de la incidencia.

De especial relevancia es la asociación encontrada entre Síndrome de Down (trisomía cromosoma 21), con una incidencia de LMA diez veces mayor que para la población sana, y 500 veces más frecuente si hacemos referencia al subtipo concreto LMA M7 de la FAB (Kenneth Miller, 2004). En estos casos se ha descrito la presencia de mutaciones en el factor de transcripción GATA1, elemento esencial en la regulación de la

maduración eritroide y megacariocítica (Xavier & Taub, 2010) y que en el contexto de la trisomía 21 produce un transcrito anómalo *GATA1s*, que favorece la proliferación mieloides anómala. Este conjunto de hallazgos, ha motivado que actualmente la OMS clasifique estas LMA como una entidad propia, con la definición de “Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down” (Arber et al., 2008).

Entre las alteraciones congénitas se debe valorar también la presencia de casos de agregación familiar y LMA congénitas.

Son casos en principio, extremadamente infrecuentes, con mecanismos genéticos definidos en los últimos años, que no están en la rutina de trabajo de los laboratorios de hematología, por lo que es extraordinariamente complejo saber cuál es su incidencia real. Se caracterizan por la presencia de mutaciones en línea germinal que predisponen al desarrollo de LMA, pero que por sí mismas no son suficientes para establecer el diagnóstico de LMA (Churpek & Godley, 2014; Owen, Barnett, & Fitzgibbon, 2008). Entre los síndromes más conocidos destacan:

- LMA familiar con mutaciones en *CEBPA*.
- Desordenes familiares asociados a alteraciones de plaquetas con:
  - Mutaciones en *RUNX1*
  - Mutaciones en *ANKRD26*
- LMA familiar con mutaciones en *GATA2*

Entre los **factores ambientales** destaca la exposición a solventes orgánicos, en especial al benceno que es el modelo más estudiado y sobre el que existe legislación específica desde 1947 en las administraciones de salud pública de EEUU y Europa. El más reciente meta-análisis publicado en 2010, confirma la asociación, dependiente de dosis de exposición para LMA y LLC, pero no para LLA y LMC (Khalade, Maritta S Jaakkola, Pukkala, & Jaakkola, 2010).

En lo referente a radiaciones, la experiencia en supervivientes a la bomba atómica de Hiroshima confirma un aumento del riesgo asociado para LMA y LLA que parece mostrar una relación lineal con las dosis recibida (distancia superviviente a zona

impacto) y que no se confirmó para linfomas o mielomas con una tasa de exceso de riesgo de 1,1 casos por 10.000 habitantes/año (Preston et al., 1994).

Si bien estos hallazgos son congruentes con literatura previa que documentaban el aumento de incidencia de LMA en profesionales sanitarios expuestos a radiaciones ionizantes antes de la universalización de las medidas de protección, en la actualidad no se puede definir con claridad el riesgo inherente a la realización de estudios radiológicos convencionales. Únicamente se ha objetivado un discreto aumento de la incidencia de leucemia para pacientes que han recibido antes de los 22 años, una dosis equivalente a la realización de 5 TAC craneales (Stock & Thirman, 2014).

En cuanto a factores ambientales con efecto cancerígeno conocido, como tabaco o la exposición solar parecen tener un papel marginal sin clara asociación en los estudios epidemiológicos publicados hasta la fecha (Stock & Thirman, 2014).

Sin embargo, todos estos factores anteriormente descritos juegan un papel casi marginal en la etiología de LMA en cuanto a su impacto real en el número de casos. De todos los agentes etiológicos conocidos sin duda el más importante es **la quimioterapia y el uso de la radioterapia**, de tal manera que la clasificación oficial OMS 2008 los reconoce como entidad propia y separada del resto de LMA, definiéndolas como “Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia” (Arber et al., 2008).

Entre los agentes quimioterápicos, destacan dos grupos de fármacos bien diferenciados (Stock & Thirman, 2014).

a) LMA secundaria al uso de agentes alquilantes. (Metocloretamina, busulfán, clorambucil, ciclofosfamida o cisplatino): generalmente la aparición se difiere en el tiempo unos 3-5 años tras la exposición al fármaco, suele venir precedida de un síndrome mielodisplásico (SMD) y al diagnóstico puede presentar alteraciones citogenéticas características de SMD como monosomías de los cromosomas 3, 5 o 7.

b) LMA secundaria al uso de inhibidores de la Topoisomerasa II. (Fármacos como etopósido, antraciclínicos): en este caso el tiempo medio de presentación es

inferior, aproximadamente un año y se caracteriza por la asociación a cariotipos con reordenamientos de *MLL* (región 11q23).

Sin embargo la clasificación OMS actual, no los reconoce como entidades clínico-patológicas independientes, y opta por agruparlas todas dentro del epígrafe LMA relacionadas con el tratamiento (Arber et al., 2008) en el que se reconoce el efecto de cualquier agente quimioterápico o radiación ionizante con intención terapéutica (Deschler & Lübbert, 2006).

En los últimos años ha cobrado importancia las LMA secundarias que aparecen después de quimioterapia a altas dosis seguido de rescate con progenitores hematopoyéticos criopreservados (TAPH). Recientemente autores italianos han definido una incidencia global de LMA/SMD de aproximadamente el 4,5 % a los diez años del TAPH a través del estudio de una cohorte de más de 1300 pacientes con LNH-B con más de 20 años de seguimiento (Tarella et al., 2011) .

#### **2.1.4 Epidemiología.**

La LMA es una neoplasia que se presenta a cualquier edad de la vida, con casos documentados de LMA al nacimiento e incluso con presencia de mutaciones intra útero (Wiemels et al., 2002). Sin embargo, su incidencia aumenta progresivamente con los años de vida alcanzando su pico de incidencia en la séptima década de la vida (Faderl & Kantarjian, 2012).

La información disponible actualmente para el análisis de aspectos epidemiológicos de la LMA proviene especialmente de los registros de Swedish National Acute Leukemia Registry en Suecia y los registros poblacionales vinculados al registro SEER-17 del programa Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) desarrollado por el National Cancer Institute de Estados Unidos (EEUU).

La incidencia estimada por 1.000.000 hab/año para LMA en EEUU es de 38 casos, con predominio de varones sobre mujeres, pero con una distribución por edad bimodal, con un discreto aumento en menores de 1 años (10-15 casos/1.000.000 y año) para después descender y aumentar progresivamente desde la tercera década de la vida

hasta alcanzar incidencias por encima de 100 casos/1.000.000 año a partir de la séptima década de la vida. Todo ello, configura un panorama general con una edad media de presentación de 66 años (Dores et al., 2012).

Los hallazgos provenientes del estudio sueco, son similares, con la salvedad de una edad media de presentación de 72 años, debido a que en Swedish National Acute Leukemia Registry se excluyen casos de menores de 14 años, pero igualmente se objetiva el aumento progresivo de la incidencia según aumenta la edad, con menos de 10 casos/año por millón de habitantes para el segmento de menores 35 años que contrasta con una incidencia de 120 casos/1.000.000 para mayores de 74 años.(Juliusson et al., 2009)

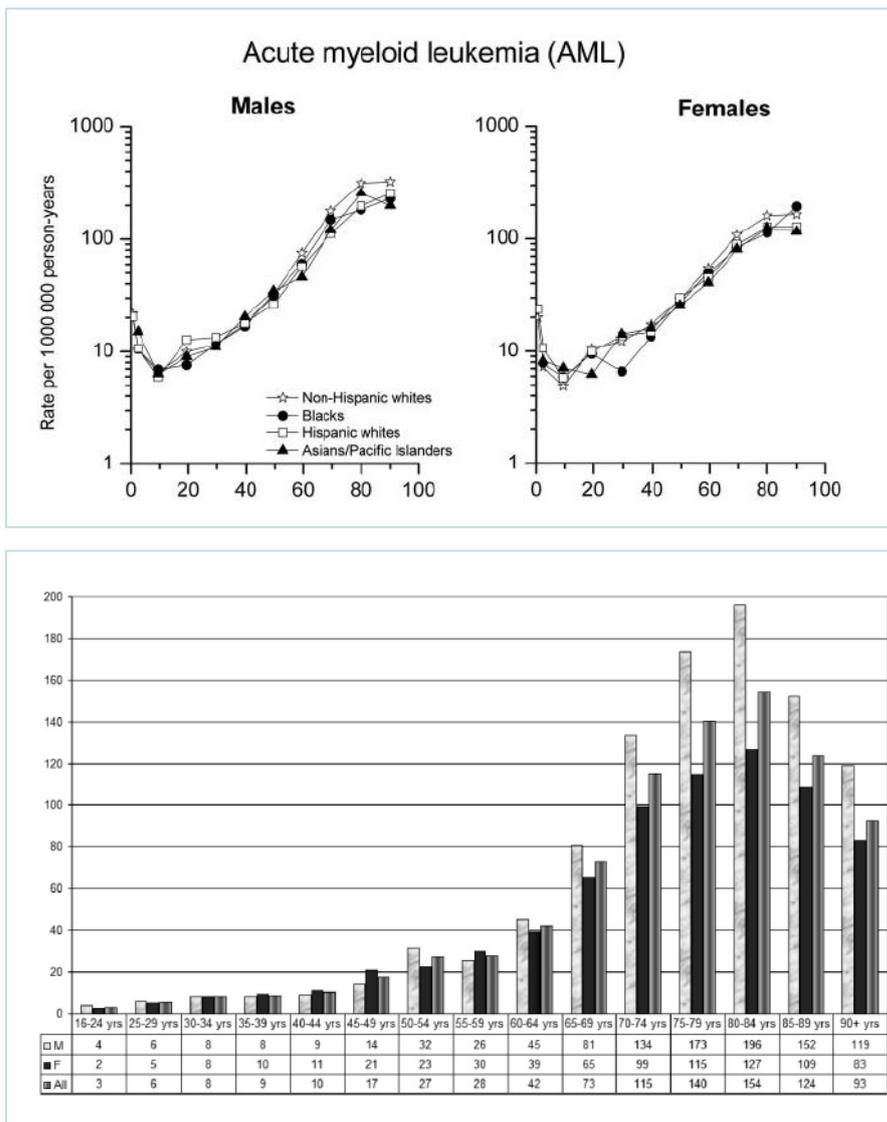


Figura 2.6 Relación incidencia LMA con edad de los pacientes. Estudios poblacionales de EEUU (arriba) y Suecia (abajo). Citas referidas en el texto

### **2.1.5 Clasificación.**

La clasificación vigente en la actualidad es la publicada en el año 2008 por el conjunto de expertos definidos por la OMS y que se muestra en la figura 2.7 (Arber et al., 2008).

La principal novedad de esta clasificación es la incorporación, por su valor pronóstico, de la información genética y molecular ya que define entidades nosológicas concretas con necesidad de tratamiento específico.

Así, se reconoce un primer grupo constituido por aquellas LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes, como LMA t(8;21), (15;17) o inv16 y a las que se les une las que portan cariotipo normal con mutaciones en *NPM1* o *CEBPA*.

A continuación, se les da entidad propia a las LMA relacionadas con displasia, para lo cual se debe valorar no solo los hallazgos morfológicos sino también los provenientes de la citogenética, de igual manera que se crea una entidad homogénea para las Neoplasias mieloides relacionada con terapia, los Sarcomas mieloides, y las Proliferaciones mieloides relacionados con el síndrome de Down. Por último se reconoce un grupo de LMA, definidas como “Not otherwise specified”, en la que se incluyen todas aquellas que no cumplan los criterios referidos para los otros subgrupos y que se clasificarán de acuerdo a los hallazgos morfológicos, tal y como se realiza desde la clasificación propuesta por el grupo FAB (Bennett et al., 1976).

Table 58-1 Classification of Acute Myeloid Leukemia According to the Revised World Health Organization Classification (2008)	
Category	Subtype/Definition
AML with recurrent cytogenetic abnormalities	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1* inv(16)(p13.1q22); CBFB-MYH11* t(16;16)(p13.1q22); CBFB-MYH11* t(15;17)(q22;q12); PML-RARA* t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL t(6;9)(p23;q34); DEK-Nup214 inv(3)(q21q26.2); RPN1-EVI1 t(3;3)(q21,q26.2); RPN1-EVI1 t(1;22)(p13q13); RBM15-MKL1
AML with MDS-related changes	Morphologic features of MDS, or Prior history of MDS or MDS/MPN, or MDS-related karyotype, and None of the recurrent genetic abnormalities above
Therapy-related myeloid neoplasms	Late complications of cytotoxic chemotherapy (alkylating agents, topoisomerase II inhibitors) and/or ionizing radiation therapy
AML, not otherwise specified	AML with minimal differentiation AML without maturation AML with maturation Acute myelomonocytic leukemia Acute monoblastic/monocytic leukemia Acute erythroid leukemia Acute megakaryoblastic leukemia Acute basophilic leukemia Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma	
Myeloid proliferations related to Down syndrome	Transient abnormal myelopoiesis Myeloid leukemia associated with Down syndrome
Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm	
Acute leukemia of ambiguous lineage	Acute undifferentiated leukemia Mixed-phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 t(v;11q23); MLL rearranged Mixed-phenotype acute leukemia, B/myeloid, NOS Mixed-phenotype acute leukemia, T/myeloid, NOS
Provisional entities	AML with mutated NPM1 AML with mutated CEBPA NK-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Figura 2.7 Clasificación oficial de LMA según la OMS (Ed 2008)

### 2.1.6 Factores pronósticos.

Seguindo a las recomendaciones del European LeukemiaNET (ELN) podemos agrupar los factores pronósticos de la siguiente manera (Dohner et al., 2010).

#### 2.1.6.1 Dependientes del paciente.

- Edad: La edad continúa siendo un marcador pronóstico independiente que se mantiene constante en todas las series. Si bien existe consenso entre los autores en que la edad por sí sola no debe ser considerada como factor único en la toma de decisiones terapéuticas, su valor nunca debe ser olvidado.

En la figura 2.8 se muestran a modo de ejemplo los resultados obtenidos en los sucesivos protocolos por el grupo cooperativo CETLAM y como las diferencias en

probabilidad de supervivencia son estadísticamente significativas para pacientes menores de 70 años tratados con protocolos homogéneos (Sierra & Brunet, 2009)

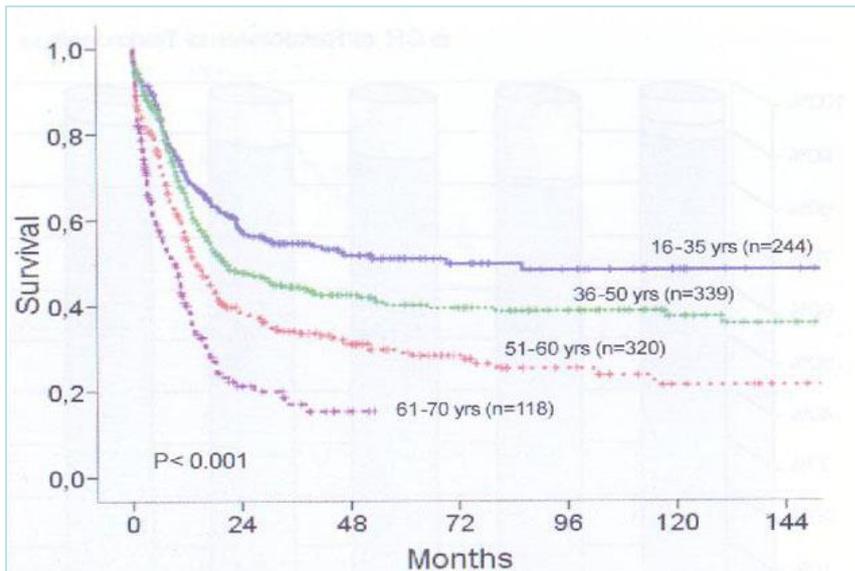


Figura 2.8 Supervivencia global según edad de los pacientes. Tomado de Sierra & Brunet 2009

- Situación general: En la actualidad los trabajos publicados ofrecen resultados contradictorias acerca del impacto de las honorabilidades del paciente en el pronóstico. Así por ejemplo autores americanos han demostrado la utilidad de del score pronóstico Hematopoietic cell transplantation comorbidity index (HCTCI) para predecir la mortalidad precoz y la supervivencia global en pacientes con LMA que reciben tratamiento quimioterápico (Dohner et al., 2010) o por ejemplo autores de los grupos cooperativo británico MRC (Wheatley et al., 2009), del francés ALFA (Malfuson et al., 2008) o del MD Anderson (Kantarjian et al., 2010) han validado en sus cohortes históricas de pacientes, el valor pronóstico de una puntuación mayor a 2 en la escala de valoración del estado general según el modelo ECOG en pacientes mayores de 65 años. Pero por el contrario, recientemente autores suecos, han demostrado que el ECOG no debe ser un criterio para seleccionar pacientes ancianos como candidatos o no a tratamiento quimioterápico al demostrar que en su experiencia los pacientes con peor ECOG obtienen beneficio significativo de recibir tratamiento intensivo (Juliusson et al., 2009).

En definitiva, podemos concluir con las recomendaciones del grupo ELN que, concluye que “los índices de comorbilidad es un campo activo de investigación y deberían

contribuir a una mejor definición de los pacientes considerados no adecuados para tratamiento intensivo”(Dohner et al., 2010).

### **2.1.6.2 Dependientes de la enfermedad.**

- Citogenética: El valor de la citogenética (CG) es el factor biológico pronóstico independiente más potente reconocido en la actualidad, tal y como se ha demostrado en múltiples cohortes de pacientes históricas desde finales de los años 80 (Keating et al., 1988), lo cual ha permitido definir grupos de riesgo tanto para la probabilidad de alcanzar remisión completa, como para la SLP y supervivencia global.

Estos hallazgos fueron sólidamente reproducidos por el grupo británico en un cohorte de más de 1600 pacientes publicada en 1998 (David Grimwade & John Rees, 1998) que permitió definir tres grandes grupos de pacientes según los hallazgos obtenidos en el estudio de CG. Esto dio pie a la universalización de dicha estratificación pronóstica y a su implantación en los diversos protocolos asistenciales. En general se pueden resumir de la siguiente forma(Faderl & Kantarjian, 2012; D. Grimwade et al., 2010):

a) Grupo de buen Pronóstico: sólo dos alteraciones citogenéticas se incluyen en este grupo  $t(8;21)$  y la  $inv(16)$ . Ambas tienen en común que resultan en dos transcritos que engloban los genes encargados de la codificación de los dos heterodímeros del “core binding factor” (CBF), con tasas de remisión completa a la inducción superiores al 80% y con probabilidad de supervivencia a largo plazo superiores al 55% sin necesidad de intensificación sin trasplante.

b) Grupo de pronóstico Adverso: Portadores de alteraciones etiquetadas como de mal pronóstico. Estos pacientes muestran un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción, con tasas inferiores al 60% de RC y con una elevada probabilidad de recidiva y por ello una baja supervivencia global (5-14%).

c) Grupo de riesgo intermedio: Constituido por aquellos pacientes con cariotipo normal, aquellos que son portadores de alteraciones no clasificables en los grupos de riesgo favorable o alto. Se trata de un grupo altamente heterogéneo, que comprende a la mayoría de pacientes con LMA, y en el que se trabaja activamente para identificar nuevos biomarcadores que permitan una mejor estratificación de los pacientes.

En la tabla 2.1 se resumen los resultados obtenidos por los principales grupos cooperativos (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

	n	RC (%)	RR (%)	SG (%)	Grupo
<b>Favorable</b>	377	91	35	65	MRC
	177	88	21	55	CALGB
	121	84	--	55	SWOG/ECOG
<b>Intermedio</b>	1072	86	51	41	MRC
	800	67	67	24	CALGB
	278	76	--	38	SWOG/ECOG
<b>Desfavorable</b>	163	63	76	14	MRC
	147	32	92	5	CALGB
	184	55	--	11	SWOG/ECOG

RC: remisión completa; RR: riesgo de recaída; SG: supervivencia global.

Tabla 2.1 Resumen del impacto pronóstico de los distintos grupos citogenéticos. Tabla resumen obtenida del protocolo PETHEMA LMA 2007.

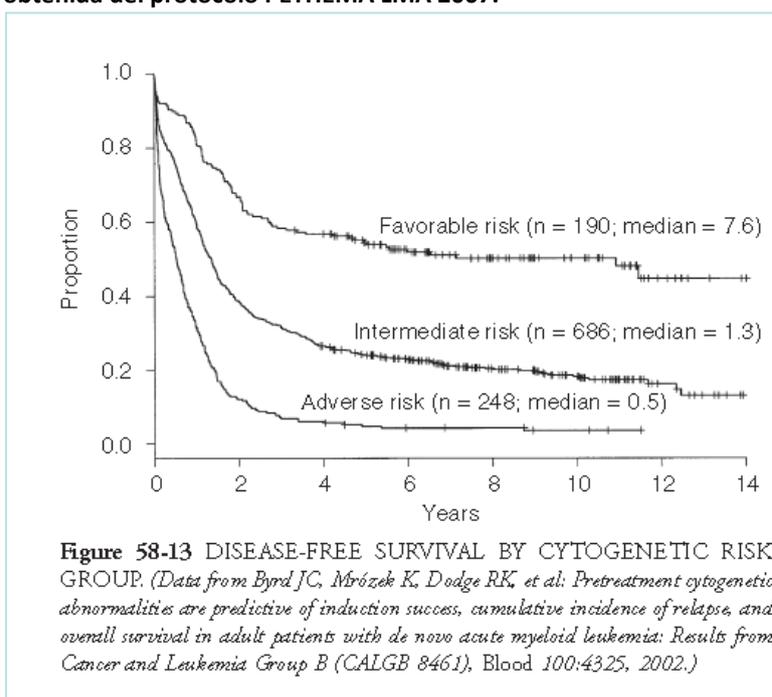


Figura 2.9 Ejemplo de la potencia pronóstica del cariotipo al diagnóstico. Diferencias en supervivencia global en un protocolo de tratamiento homogéneo (CALGB 8461). Gráfica reproducida de Hematology, basic and clinical practice. 6ª ed, 2012. p 870

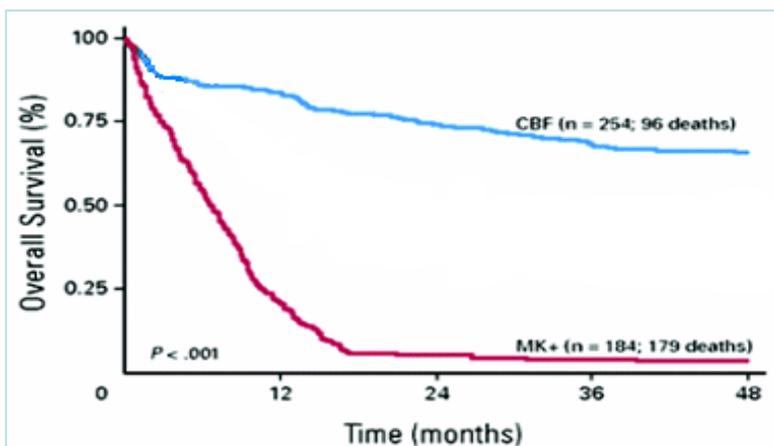


Figura 2.10 Comparativa entre LMA con cariotipo de buen pronóstico frente al subgrupo propuesto por el grupo alemán, definido como monosómico. Modificado de Kayser, et al Blood 2012

A modo de resumen, se muestra la clasificación de riesgos citogenéticos que definió el grupo PETHEMA en su protocolo del año 2010, por ser la que se toma como referencia en este trabajo (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

Grupos Pronóstico	Alteraciones citogenéticas
Favorable	t(8;21), inv(16)
Intermedio	Normal, +8, +21, +22, abn(11q23), del(9q), otras
Desfavorable	-5/del(5q), -7/del(7q), abn(3q), 20q, 21q, 17p, t(6;9), t(9;22), cariotipos complejos con $\geq 3$ anomalías

Tabla 2.2 Clasificación según hallazgos citogenéticos en protocolo PETHEMA LMA 2010 (M.A. Sanz & Moscardó, 2010).

- **Marcadores moleculares:** A pesar de todos los avances observados en la clasificación pronóstica basada en la citogenética, todavía persiste aproximadamente un 40% de los pacientes que muestran un cariotipo normal al diagnóstico y se sitúan por tanto en el grupo de riesgo intermedio el 50-60% de los pacientes. Si bien es cierto que la supervivencia global en este grupo es mejor que la observada para el de mal pronóstico, existe una amplia variabilidad y heterogeneidad en la evolución clínica de estos pacientes. Por ello se hace necesario refinar el pronóstico de este subgrupo mediante el empleo de nuevo marcadores moleculares.

Las principales determinaciones, recomendadas para el abordaje clínico de los pacientes por el comité de expertos de la red European Leukemia Net son las siguientes (Dohner et al., 2010):

a) Mutaciones en FLT3.

Pertenece a la familia de los receptores tirosina quinasa de clase 3, conocido también como stem cell quinasa 1 (STK1) y se expresa fundamentalmente en las células hematopoyéticas progenitoras y media la diferenciación y proliferación de las mismas. El gen se encuentra en el cromosoma 13q12. Se han descrito mutaciones asociadas a LMA que dan como resultado una activación del receptor (Grafone, Palmisano, Nicci, & Storti, 2012). Entre las alteraciones más importantes destacan por su frecuencia e implicación pronóstica las duplicaciones internas en tándem de FLT3 (FLT3-ITD) que observan en LMA con una prevalencia entre el 20 y 27%, siendo tema de debate si la carga alélica, definida por la ratio entre alelo mutado y germinal es clave para definir el mal pronóstico de estos pacientes (Thiede et al., 2002), pero con hallazgos en la literatura contradictorios (Dohner et al., 2010). El otro tipo de alteraciones encontradas son las mutaciones puntuales de Asp 835 afectando al dominio tirosina quinasa de *FLT3*, con una frecuencia en torno al 7% en los pacientes con LMA y su relación con el pronóstico mucho más discutible (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2007).

En conjunto, se asume que la presencia de mutaciones en *FLT 3 ITD* en pacientes con cariotipo normal y en ausencia de otras mutaciones, en especial *NPM1* se asocia con un mayor riesgo de recaída y que ello impacta negativamente en el pronóstico de los pacientes (Dohner et al., 2010; David Grimwade & Hills, 2009; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

b) mutaciones en NPM1.

El gen se encuentra localizado en el cromosoma 5q35 con mutaciones constantes en el exon12. Su función no es del todo conocida, pero se cree que juega un papel en la inducción de la apoptosis por su interacción con ARF para activar la vía de P53 (Brunangelo Falini et al., 2005). Se encuentra en una frecuencia alta en LMA con cariotipo normal donde representa el 25-35 % de los casos (Dohner et al., 2010).

La evidencia actual parece ser concluyente en que la presencia de la mutación de NPM1 en pacientes con cariotipo normal y ausencia de mutaciones de en FLT3, se asocia a una mayor tasa de remisiones completas a la quimioterapia de inducción y una menor probabilidad de recaídas (Dohner et al., 2010; David Grimwade & Hills, 2009; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

c) mutaciones en CEBPA.

El gen CEBPA se localiza en el cromosoma humano 19q13.1 y codifica para un factor de transcripción pertenecientes a la familia “CCAAT/enhancer binding protein” (C/EBP) que parece jugar un papel clave en la maduración de los progenitores mieloides. Su frecuencia es relativamente baja, de aproximadamente el 10% de todas las LMA, pero en el que su valor pronóstico aparece limitado solo para aquellos con presencia de mutación en los dos alelos del gen (Dohner et al., 2010).

Recientemente un estudio retrospectivo de los grupos HOVON/SAKK y AMLSG ha demostrado el buen pronóstico en forma de SLP y SG superiores al 75% a los 5 años, pero solo para aquellos pacientes que reciben trasplante hematopoyético en primera remisión completa (Schlenk et al., 2013) .

d) Otros genotipos: la afectación de otros genes se ha propuesto para mejorar la clasificación pronóstica del grupo de riesgo intermedio. Así, la existencia de múltiples mutaciones y la sobreexpresión de genes se han barajado como de potencial utilidad e interés pronóstico para el manejo clínico de estos pacientes (Damm et al., 2011; Dohner et al., 2010; David Grimwade & Hills, 2009). Las alteraciones con un mayor papel parecen la sobreexpresión del gen EVI1 (Valk et al., 2004), y nuevas mutaciones, especialmente en la maquinaria epigenética, como son DNMT3A, IDH1/2, o TET2. Hasta la fecha el trabajo de mayor complejidad y potencia estadística es el publicado por Patel y et al en 2012 (Jay P. Patel, Kety Huberman, & Omar Abdel-Wahab, 2012) donde mediante el análisis de las mutaciones de estos genes implicados en la maquinaria epigenética (DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2, y ASXL1) asociados a los descritos previamente, son capaces de redefinir nuevos subgrupos dentro de las LMA de riesgo intermedio. Sin embargo, estos hallazgos requieren de validación prospectiva, para ser trasladados a la práctica clínica asistencial.

- **Cifra de Leucocitos:** Tradicionalmente la hiperleucocitosis ha sido considerado un factor de riesgo independiente (Kenneth Miller, 2004), pero existe discordancia en cuanto a definir un punto de corte, con valores que oscilan entre las distintos autores y series publicadas. En cualquier caso, en la actualidad no se considera en los protocolos asistenciales como un factor pronóstico independiente que permita definir de manera apriorística el abordaje terapéutico del paciente salvo en dos situaciones concretas (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

a) Paciente ancianos: Los distintos scores predictivos publicados por los grupos ALFA (Malfuson et al., 2008), SAL (Rollig et al., 2010) y MDACC (Kantarjian et al., 2010), han demostrado que la hiperleucocitosis es una variable que confiere mal pronóstico a los pacientes mayores candidatos a recibir quimioterapia.

b) Pacientes con LMA CBF. En este grupo de especial buen pronóstico y buena sensibilidad a la quimioterapia, la leucocitosis al diagnóstico es uno de los factores que anulan el buen pronóstico de la citogenética (Paschka & Döhner, 2013), de tal manera que en la actualidad se recomiendan cambios en la estrategia terapéutica para pacientes con LMA CBF que asocian hiperleucocitosis al momento del diagnóstico. (Schlenk, 2014).

- **Respuesta obtenida al tratamiento.** Distintas series de pacientes en ensayos clínicos han demostrado que el fallo a la quimioterapia de inducción en conseguir una respuesta completa morfológica se configura como un indicador de especial mal pronóstico (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010; Schlenk, 2014) por lo que debe de implicar un cambio en la terapia de intensificación del paciente independiente del riesgo citogenético inicial.

A modo de resumen podemos concluir que en el momento actual, y gracias al aumento de información sobre los factores biológicos de la LMA disponemos de una auténtica avalancha de datos que permiten individualizar la aproximación terapéutica de los pacientes. La propuesta que asumimos como vigente es la publicada por el grupo de expertos del European LeukemiaNET publicada en 2010, que mantiene la definición de cariotipo complejo a partir de 3 alteraciones genéticas estructurales y la propuesta del grupo cooperativo PETHEMA en su protocolo asistencial LMA 2010 (v.

febrero 2011) (Dohner et al., 2010; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010), que integra los hallazgos de la citogenética, mutaciones de FLT3, NPM1, CEBPA y respuesta al tratamiento de inducción, para asignar el tratamiento post-remisión.

1. GRUPO DE RIESGO FAVORABLE

Se consideran pacientes de riesgo favorable los que presentan uno o más de los siguientes criterios:

- LMA con inv(16) o t(16;16), o bien el reordenamiento molecular correspondiente (CBF $\beta$ /MYH11), con EMR negativa ( $\leq 0,1\%$ ) y que hayan alcanzado RC con el primer ciclo de inducción.
- LMA con t(8;21) o bien el reordenamiento molecular correspondiente (AML1/ETO), con EMR negativa ( $\leq 0,1\%$ ) y que hayan alcanzado RC con el primer ciclo de inducción.
- Mutaciones de NPM1 en paciente con cariotipo normal y ausencia de mutaciones de FLT3-ITD y de otros factores de mal pronóstico.
- Mutaciones bialélicas de CEBP $\alpha$  en pacientes con cariotipo normal en ausencia de mutaciones de FLT3 y de otros factores de mal pronóstico.

2. GRUPO DE RIESGO INTERMEDIO

Se consideran pacientes de riesgo intermedio los que no presenten ninguno de los factores de buen pronóstico ni de mal pronóstico.

3. GRUPO DE ALTO RIESGO

Se consideran pacientes de alto riesgo los pacientes que presenten al menos uno de los siguientes criterios:

- EMR > 0.1%
- Alteraciones citogenéticas catalogadas como de alto riesgo
- Duplicaciones en tándem de FLT3 con ratio  $\geq 0.8$
- Pacientes que no hayan alcanzado RC con el primer ciclo de inducción y la alcancen con un segundo ciclo

**Tabla 2.3 Estratificación de riesgo del grupo PETHEMA en su protocolo asistencial PETHEMA LMA 2010.**

### **2.1.6 Bases de tratamiento.**

Desde que a finales de los años 70 se estableciera la combinación de un antraciclínico con una perfusión continua de citarabina como el tratamiento estándar de inducción de los pacientes con LMA (esquema 3+7) y dado que dicha combinación se asocia a unas altas probabilidades de alcanzar remisión completa (CD Bloomfield et al., 1981), el tratamiento de la LMA en las últimas décadas ha ido orientado a buscar las estrategias

post-remisión o de intensificación adecuadas para conseguir la eventual curación de los pacientes.

Actualmente, nuestra terapia de inducción sigue consistiendo en el esquema de 3+7, pero a partir de ese punto los pacientes se individualizan en función de su riesgo clínico y biológico. Es lo que se conoce como terapia adaptada al riesgo (Schlenk, 2014; Sierra & Brunet, 2009).

En líneas generales la decisión de asignar un paciente a una estrategia de intensificación se basará en las probabilidades que existan a priori de tener una recaída después de alcanzar la remisión completa y si esas probabilidades no superan las de la morbi-mortalidad asociada al procedimiento más eficaz como terapia de intensificación como es el trasplante alogénico de médula ósea (Alo-TPH en adelante) (Dombret, 2012; Schlenk, 2014).

#### **2.1.6.1 Tratamiento de inducción.**

El tratamiento estándar consiste en el esquema clásico “3+7” en el que se administra durante 7 días una perfusión continua de citarabina a dosis entre 100 y 200 mgr/m<sup>2</sup> en combinación con la administración durante 3 días de un bolo de un fármaco antraciclínico.

La citarabina es un antimetabolito, que compite con la pirimidin-citidina, y que requiere transformación a su forma trifosfato (ara-CTP) para ser activo incorporándose al ADN. Tiene una vida media corta de apenas 15 minutos. Los antraciclínicos son (daunorrubicina, idarrubicina) fármacos que actúan sobre la unión del ADN con la enzima Topoisomerasa II, por lo que acaban induciendo la muerte celular (Faderl & Kantarjian, 2012).

Desde la introducción del esquema clásico se han probado nuevas aproximaciones, añadiendo un tercer fármaco (mitoxantrone, etopósido, tioguanina, fludarabina, topotecan) aumentando la dosis de los fármacos (escalada de dosis de daunorrubicina, citarabina a altas dosis) añadir factor estimulante de colonias (G-CSF) en inducción,

pero en líneas generales ninguna de estos cambios ha supuesto una mejora significativa en las tasa de remisión completa ni supervivencia global, por lo que el estándar 3+7 continúa siendo en la actualidad el tratamiento de elección, siguiendo las recomendaciones de European LeukemiaNET y el protocolo asistencial PETHEMA LMA 2010(Dohner et al., 2010; Fernandez, 2010; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

### **2.1.6.2 Terapia post remisión. Tratamiento adaptado al riesgo.**

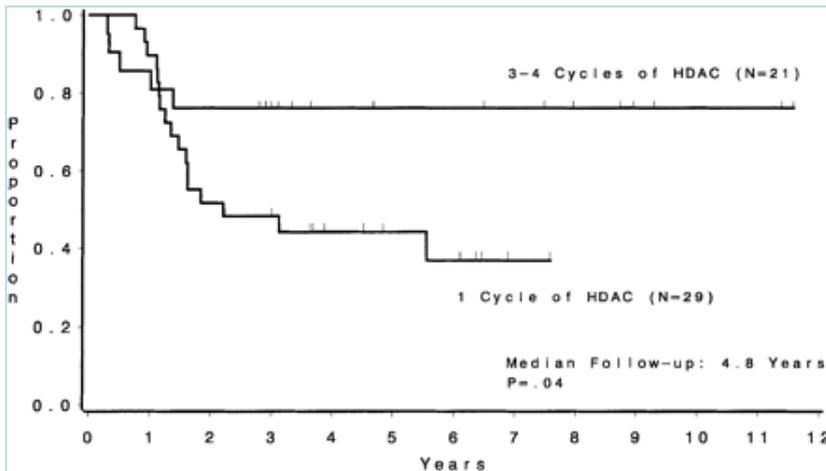
Una vez alcanzada la remisión completa con la quimioterapia de inducción, los pacientes se asignan a una terapia de intensificación que se deberá elegir en virtud del riesgo biológico de la clona leucémica, las características del paciente y de la morbimortalidad de las distintas opciones terapéuticas disponibles para la intensificación. Es lo que se conoce como terapia adaptada al riesgo (Dohner et al., 2010; Dombret, 2012; Stone, 2013).

A continuación se describen las opciones de terapia post-remisión para cada uno de los grupos de riesgo biológico.

#### **a) Pacientes de buen pronóstico.**

Incluimos en este grupo a los pacientes con LMA CBF (aquellos con t (8;21), con inv16 o con t(16;16)); LMA con cariotipo normal y el genotipo NMP1 mutado con FLT3 germinal; y LMA con cariotipo normal y presencia de mutaciones bialélicas de CEBPA (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

El estudio clásico para este subtipo de LMA fue el publicado por el Cancer and Leukemia Group B (CALGB) en 1999 en el que se demostraba que la administración de 3-4 ciclos de altas dosis de citarabina (HiDAC) era claramente superior en términos de supervivencia global y probabilidad de recaída frente a 1 ciclo, convirtiéndose en el estándar de tratamiento para este subgrupo la intensificación con altas dosis de quimioterapia con una dosis total de citarabina administrada máxima de 72 gr/m<sup>2</sup> a lo largo de 3-4 ciclos (Byrd et al., 1999).



**Figura 2.11** Gráfica original de los trabajos del CALGB sobre intensificación post remisión completa. Probabilidad de supervivencia para pacientes con LMA t (8;21) según reciban 1 ciclo o 3 o-4 de HiDAC. Cita referida en el texto.

Sin embargo desde esa fecha numerosos trabajos han encontrado resultados similares en cuanto a supervivencia global y probabilidad de recaída con distintas aproximaciones, modificando dosis, número de ciclos y fármacos incluidos.

De tal forma que en la actualidad, es una cuestión abierta definir con exactitud la mejor terapia de intensificación para este grupo de pacientes en cuanto al número de ciclos, dosis de citarabina y si es preciso asociar otros fármacos (Dombret, 2012).

Aún mas, el uso del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) se ha demostrado como una aproximación tan eficaz como la HiDAC, con similares tasas de RC, y menor probabilidad de recaída en algún estudio, como el del grupo HOVON/SAKK (Löwenberg et al., 2011) por lo que se mantiene su recomendación como terapia de intensificación para este grupo de pacientes, no en vano para el protocolo PETHEMA LMA 2010 (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010) el abordaje terapéutico de estos pacientes consiste en 2 ciclos de HiDAC y concluir con un TAPH.

En lo referente al Alo-TPH, los estudios publicados en la pasada década han demostrado razonablemente que no procede su realización en primera remisión completa para este grupo de pacientes, por no aportar ventajas en supervivencia global, tal y como se reconoció en el metaanálisis publicado en 2009 en JAMA (Koreth et al., 2009), mientras que el grupo cooperativo German–Austrian Acute Myeloid

Leukemia Study Group, demostró que el Alo-TPH no aporta ventaja para el genotipo NPM1 mutado FLT germinal ni en términos de SLP ni de SG (Schlenk et al., 2008)

De esta manera en el momento actual, y dado que este grupo de pacientes se caracteriza por marcadores moleculares reproducibles y validados para el seguimiento de la enfermedad mínima residual (Yin et al., 2012), la indicación de Alo-TPH queda reservada para aquellos pacientes definidos como de alto riesgo por cualquiera de los siguientes circunstancias (Jourdan et al., 2013; Kadia, Ravandi, O'Brien, Cortes, & Kantarjian, 2015):

- Fracaso a la inducción
- LMA CBF con hiperleucocitosis
- Persistencia de enfermedad tras consolidación o reaparición de la EMR por PCR en el seguimiento post tratamiento.

#### **b) pacientes de riesgo intermedio.**

Se incluyen en este grupo aquellos pacientes con cariotipo normal y alteraciones no características de los grupos de buen y mal pronóstico (Dohner et al., 2010; David Grimwade & Hills, 2009; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

Tres son los estudios claves que han marcado las directrices a seguir en la terapia post remisión de los pacientes con cariotipos de riesgo intermedio. En el primer lugar, el estudio publicado en 1994 por Mayer y et al en que compararon tres dosis de citarabina durante cuatro ciclos post remisión: Dosis de 3 gr/m<sup>2</sup> cada 12 por 6 dosis, 400 mgr/m<sup>2</sup> cada 12 por 6 dosis, y 1gr/m<sup>2</sup> cada 12 horas por 6 dosis, cada uno administrada por cuatro ciclos. Las conclusiones demostraron una ventaja significativa para los pacientes que recibieron una dosis total de 72 gr/m<sup>2</sup> post remisión (Mayer et al., 1994), lo cual comienza a generar una corriente de opinión claramente favorable hacia el uso de quimioterapia a altas dosis como terapia de consolidación que se ve reforzada por el trabajo intergrupos americano publicado en 1998 en el que esta aproximación con altas dosis de citarabina es superior a TAPH y Alo-TPH (Cassileth et al., 1998), como se puede comprobar en la revisión que sobre la LMA publican autores tan consolidados como Elihu Estey y Hartmut Döhner en The Lancet en 2006, donde

la opción del Alo-TPH queda restringida a los pacientes con citogenéticas de mal pronóstico o fracasos a la quimioterapia de inducción (Estey & Döhner, 2006).

Sin embargo, en 2009 se produce la publicación del mayor metaanálisis sobre el papel del Alo-TPH, donde tras la revisión de 24 ensayos clínicos con metodología prospectiva, se confirma la ventaja para el Alo-TPH en términos de supervivencia tanto libre de progresión como global para los pacientes con cariotipos de riesgo intermedio (Koreth et al., 2009).

Por todo ello, actualmente la recomendación en pacientes jóvenes con donante, es proceder a Alo-TPH en primera remisión, pero siempre con la valoración individualizada previa de sus comorbilidades y del riesgo de mortalidad asociado al procedimiento, así como considerar regímenes de intensidad reducida o fuentes alternativas de progenitores (Dohner et al., 2010).

En nuestro entorno, el protocolo asistencial del grupo PETHEMA, mantiene como primera recomendación la opción de Alo-TPH y en caso de no disponer de donante, realizar TAPH con ciclo previo de citarabina a altas dosis (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

### **c) pacientes de alto riesgo citogenético.**

Se incluyen los pacientes con cariotipos con  $-5/\text{del}(5q)$ ,  $-7/\text{del}(7q)$ ,  $\text{abn}(3q)$ ,  $20q$ ,  $21q$ ,  $17p$ ,  $t(6;9)$ ,  $t(9;22)$ , cariotipos complejos con 3 o más anomalías, aquellos que fracasan a la inducción, o con FLT3 mutados y NPM1 germinal (David Grimwade & Hills, 2009; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010).

Este grupo de pacientes son especialmente pobres respondedores a la quimioterapia, por lo que se deben considerar como candidatos para Alo-TPH en primera remisión completa, con un nivel de evidencia bastante alto, no solo por el resultado del metaanálisis anteriormente citado (Koreth et al., 2009), si no por nueva evidencia publicada a posteriori de ensayos clínicos prospectivos, tanto de grupos cooperativos franceses (Hospital et al., 2012) grupo cooperativo Alemán-austriaco (Schlenk et al., 2010) o los resultados del ensayo AML12 del MRC británico, (Alan K. Burnett et al.,

2010) que muestran superioridad para el Alo-TPH en pacientes de mal pronóstico por citogenética.

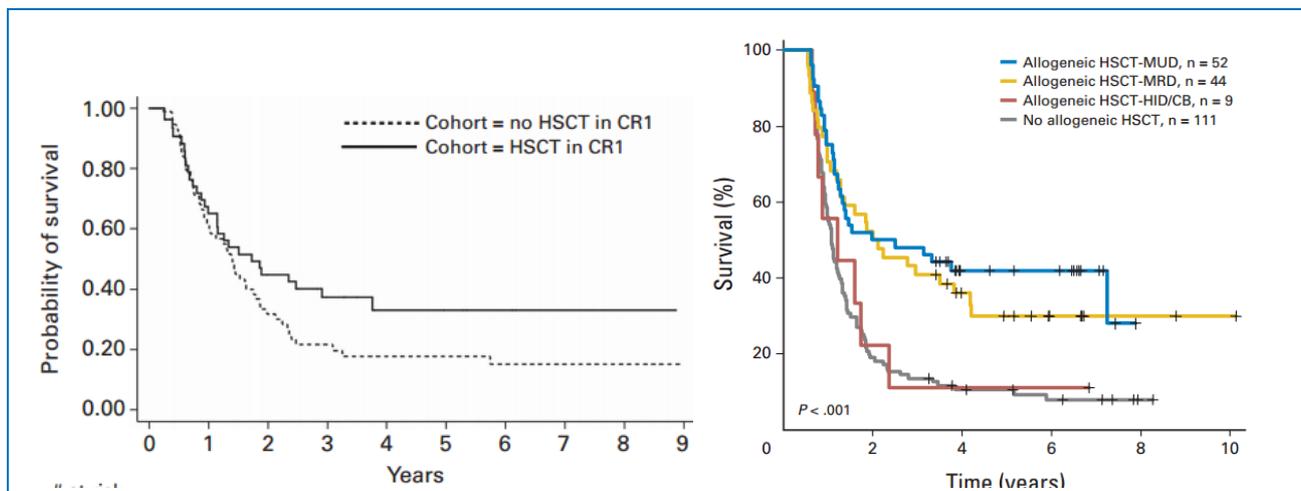


Figura 2.12 Probabilidad de supervivencia global en dos ensayos clínicos prospectivos para pacientes de alto riesgo según procedan a Alo TPH o no. A la izquierda datos de el ensayo francés (Hospital et al., 2012) y a la derecha datos del grupo Austriaco-alemán (Schlenk et al., 2010)

## 2.2 Patobiología de la LMA. Modelo actual de leucemogénesis

### 2.2.1 Regulación de la hematopoyesis.

#### 2.2.1.1 Visión global de la mielopoyesis.

Definimos como mielopoyesis el proceso mediante el cual se obtienen los elementos maduros de la serie mieloide a partir de una célula madre pluripotencial (Berliner, 2012).

Estas células con capacidad stem, en el contexto de la hematología, se definen como células madres de la hematopoyesis (HSC, en adelante). Definidas mediante técnicas de citometría, sorting y enriquecimiento de medios de cultivos, de tal manera que es conocido su fenotipo mediante la combinación CD34+/CD38-. Son las células que, a continuación, se dividirán y originarán la célula definida unidad formadora de colonias mieloide-monocítica-eritroide-magacariocítica (CFU-GEMM) capaz de crear colonias de granulocitos, monocitos, eritrocitos y megacariocitos y por otro lado la unidad

formadora de colonias linfoides (CFU-L) de la cual descienden las poblaciones linfoides (Chute, 2012).

Es importante destacar, que las HSC poseen las características que define a todo tipo de célula madre (Sieff, 2015a):

- Capacidad pluripotencial: a partir de ellas puede surgir cualquier célula de la hematopoyesis.
- Capacidad de autorrenovación.

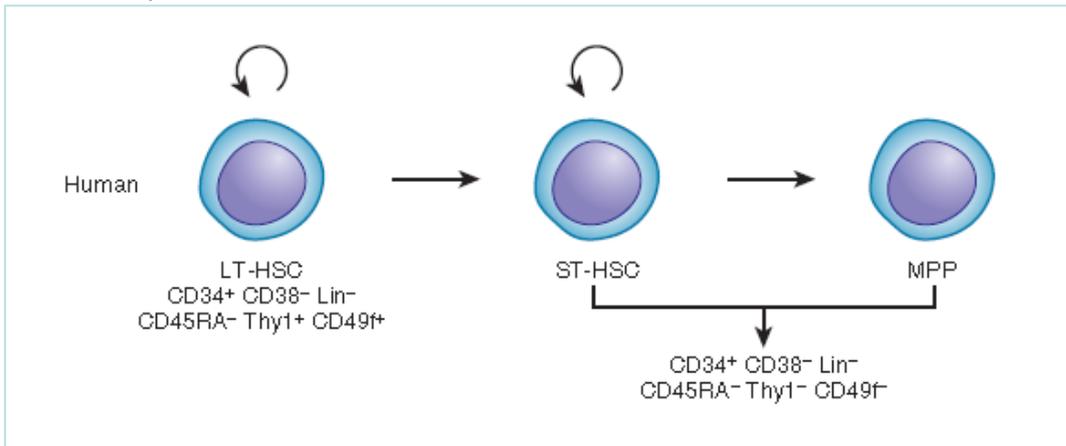


Figura 2.13 Compartimentos precoces de HSC con su fenotipo característico. Una vez alcanzado el estadio de CFU, se pierde la capacidad de autorrenovación. Adaptado de Hoffman 6ª Ed 2012.

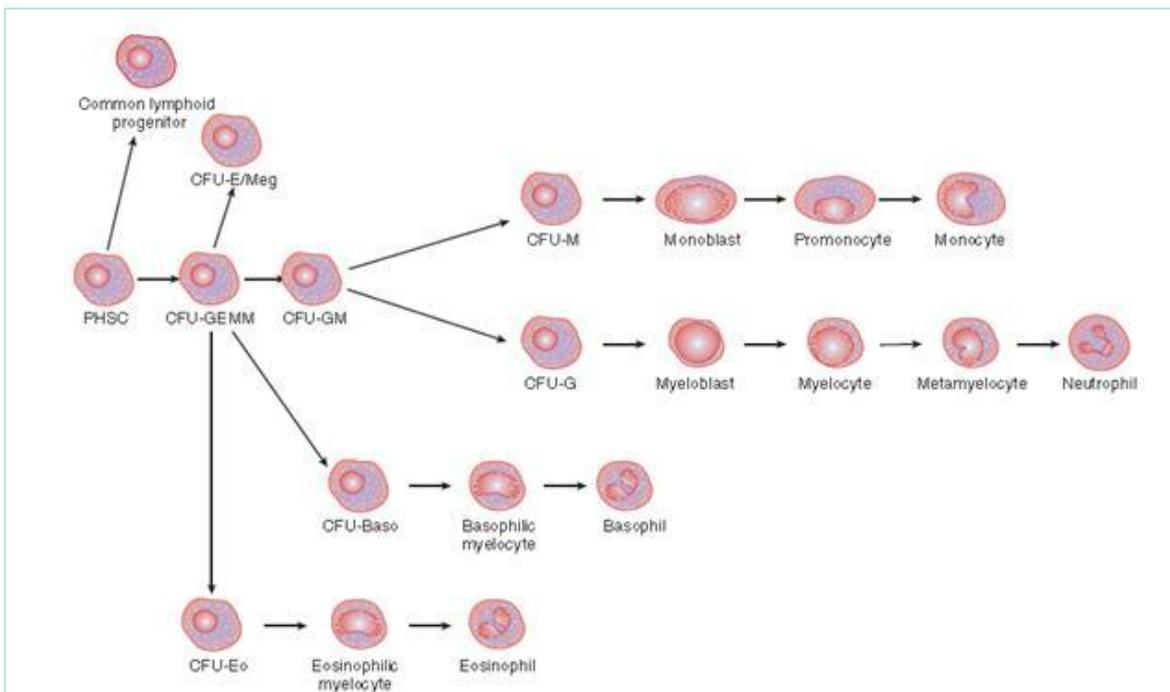


Figura 2.14 Visión global de la hematopoyesis. Adaptado de Hoffman 6ª Ed 2012.

Los mecanismos de control de este proceso son extremadamente complejos y se basan en la interacción de varios elementos. Los principales protagonistas serían:

- a) Factores de transcripción
- b) Factores de crecimiento hematopoyético.
- c) Mecanismos epigenéticos
- d) MicroRNA.

Globalmente, se han propuestos dos modelos teóricos para explicar cómo se produce la interacción entre todos estos factores, que conlleva si una HSC progresa hacia el siguiente paso de maduración o si por el contrario inicia el proceso de autorrenovación (Sieff, 2015a).

En el primer modelo intrínseco o estocástico, este proceso se regula de manera probabilística en base a la presencia de factores intrínsecos a las células que determina la expresión de determinados factores de transcripción.

El siguiente modelo, conocido como extrínseco, considera que este proceso viene dominado por la presencia de factores externos que influyen sobre la HSC y modifican su programa de expresión génica, confiriendo un papel primordial a los factores de crecimiento hematopoyéticos que serían los encargados de vehiculizar ese proceso. Actualmente, existen corrientes de opinión que propugnan un tercer modelo, que apoya una visión integradora de ambas (Berliner, 2012).

#### 2.2.1.2 Reguladores de la mielopoyesis.

##### **2.2.1.2.1 Factores de Transcripción. Genes *HOX*.**

Los FT son por definición, cualquier proteína necesaria para iniciar el proceso de transcripción. Generalmente actúan mediante el reconocimiento de secuencias específicas de ADN que forman parte de las regiones promotoras de los genes, si bien en ocasiones pueden existir FT que se unan directamente a la propia RNA polimerasa.

Estas secuencias de ADN a las que se unen los FT suelen ser cortas y altamente conservadas entre especies y se encuentran dentro de los promotores de los genes.

Algunos de estos elementos y factores son comunes a varios genes, como por ejemplo la secuencia contenida en la caja TATA. (Huret, 2012).

El papel de los FT en la mielopoyesis está bien establecido y se ha podido definir un grupo relativamente pequeño de agentes implicados. Además, varios de ellos han sido identificados como elementos claves en la leucemogénesis por su implicación en ejemplos concretos de LMA (Sieff, 2015b).

Entre los principales factores implicados en la mielopoyesis, destacan:

a) PU.1

Es un FT perteneciente a la familia Ets. Se ha descrito que actúa uniéndose a regiones promotoras de los genes que codifican para los receptores de G-CSF, de GM-CSF, de M-CSF, de cadenas ligeras y el CD11b.

En modelos murinos, la ausencia de PU.1 se traduce muerte intra-útero con ausencia de monocitos, granulocitos y linfocitos. Además, la diferenciación *in vitro* de embriones PU.1 -/- muestra hematopoyesis sin marcadores de madurez, lo cual sugiere que PU.1 juega un papel clave en los estadios finales de la maduración mieloide (Berliner, 2012) (Sieff, 2015b).

b) Familia CEBP

Este conjunto de FT se corresponden a un familia de proteínas con capacidad de unirse a la secuencia promotora CCAAT (el acrónimo CEBP proviene de **CCAAT/enhancer Binding Protein**).

Se reconocen varios elementos con importancia crucial en la hematopoyesis aunque con distintos niveles de expresión entre los distintos estadios y compartimentos celulares. Entre los principales destacan C/EBP-alpha, C/EBP-beta, C/EBP-gamma, C/EBP-delta y C/EBP-epsilon.

El más destacado y estudiado es C/EBP-alpha, el cual se ha implicado en el desarrollo de hepatocitos, adipocitos y la diferenciación mieloide. Actúa como FT uniéndose a

la región promotora del gen que codifica para el receptor de G-CSF. En modelos animales (ratones C/EBP-alpha -/-) se aprecia muerte precoz sin presencia de elementos maduros de la mielopoyesis y sin detectarse niveles de ARNm del receptor del G-CSF (Sieff, 2015b). Además, en colaboración PU.1, es clave para el desarrollo de macrófagos a partir de fibroblastos, por lo cual se supone que estos dos FT son fundamentales en la línea monocítica (Alvarez-Errico, Vento-Tormo, Sieweke, & Ballestar, 2015).

c) Familia CBF.

Esta familia de FT se relaciona con la transcripción de genes claves en la mielopoyesis, como son los que codifican para la producción de mieloperoxidasa y elastasa. Además se ha documentado que regula la expresión de PU.1.

Se caracterizan por una estructura de dos subunidades, la primera de unión al ADN conocida como subunidad alfa, y que puede ser AML1 o RUNX1, y una subunidad Beta que fortalece la unión y que se denomina CBF $\beta$ .

Se ha demostrado su papel clave en la mielopoyesis mediante estudios de expresión, permaneciendo constantemente elevada (en especial RUNX1 y CBF $\beta$ ) a lo largo de todos los estadios mieloides, pero descendiendo progresivamente en los elementos de la maduración eritroide, linfoide y plaquetar hasta ser casi inexistente en las células maduras de estas series (Marella de Bruijn, 2004).

Otros datos a favor de su importancia son que los modelos murinos CBF -/- mueren intraútero sin vestigios de hematopoyesis y que las translocaciones que afectan a este complejo de FT son claves en el proceso de leucemogénesis, como demuestran los casos de LMA con t(8;21) y con inv 16 (Berliner, 2012) (Sieff, 2015b).

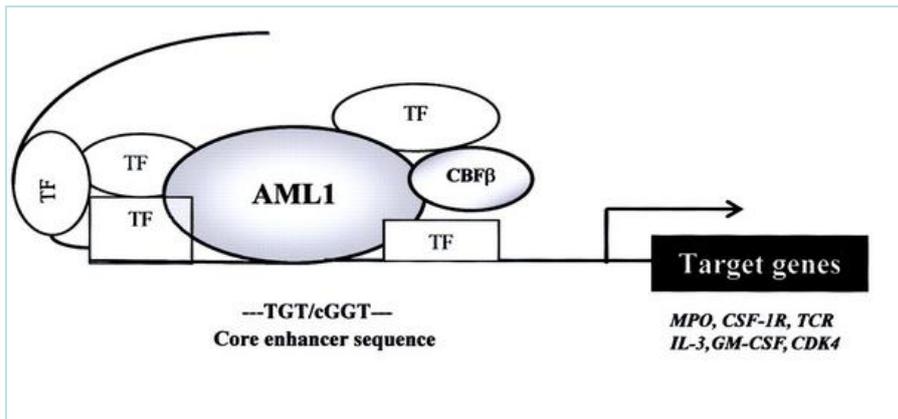


Figura 2.15 Representación esquemática del complejo CBF compuesto AML1-CBFbeta  
Tomado de <http://www.lookfordiagnosis.com>

d) Ácido retinoico.

El ácido retinoico actúa como mensajero intracelular mediante la unión a receptores nucleares, lo cual le permite intervenir sobre la expresión de genes, actuando en la práctica como un factor de transcripción. Su papel en la hematopoyesis queda demostrado por dos grupos de evidencias. En primer lugar el déficit de vitamina A se asocia con déficits hematológicos y, por último, la translocación que afecta a un grupo de receptores intranucleares del ácido retinoico (llamados RAR $\alpha$ , para generar un gen quimérico PML-RAR $\alpha$ ) es clave en el proceso de leucemogénesis de la leucemia promielocítica aguda (Sieff, 2015b).

e) Genes *HOX*

Los genes *HOX* son un conjunto de genes, altamente conservados entre especies, que codifican en mamíferos para un total de 39 FT. Está claramente establecido su papel clave durante la embriogénesis y morfogénesis del eje antero posterior. Se agrupan en cuatro cluster, localizados en cuatro cromosomas diferentes, denominados *HOXA* (7p15), *HOXB* (17q21), *HOXC* (12q13) y *HOXD* (2q31).1, con expresión variable durante el desarrollo de cada parte del organismo. Este hecho está claramente contrastado en modelos animales como la *Drosophilla melanogaster* (RA Alharbi, 2013)

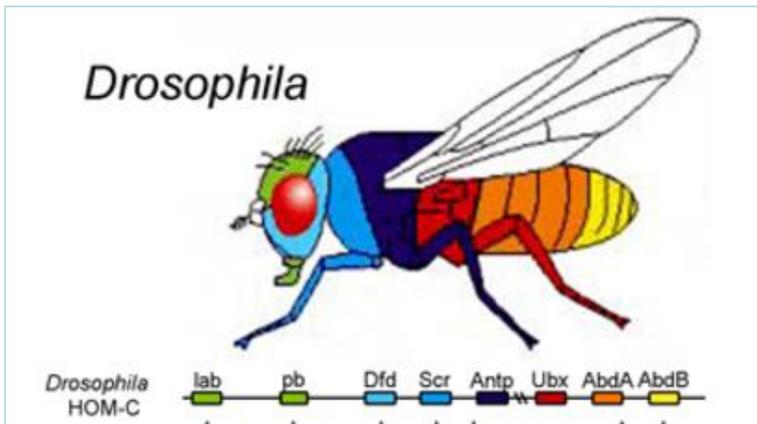


Figura 2.16 Distribución de la expresión de los cluster de genes HOX en relación a la morfogénesis de drosophila. Tomado de <http://www.molgen.mpg.de/>

En la hematopoyesis, los genes *HOX* se expresan en HSC y demás progenitores con patrones característicos que varían según el nivel de maduración y la línea a la que estén comprometidos. Se ha documentado la sobreexpresión de 22 de los 39 genes *HOX* en células CD34+ de mamíferos, de hecho se ha propuesto una selección de línea entre los distintos cluster de genes *HOX*. Así el conjunto de genes *HOXA* están más expresados en serie mieloide, *HOXB* en eritroide y *HOXC* en linfoide (RA Alharbi, 2013).

Por último, hay que recalcar su papel en la leucemogénesis, estudiado a partir de las LMA con reordenamientos en *MLL*. Hasta un 10% de las LMA secundarias y un 5% de las *de novo* presentan reordenamientos del gen *MLL* (Slany, 2009) Este gen codifica para la proteína MLL que se caracteriza por ser un FT que actúa como uno de los principales reguladores positivos de la expresión de los genes *HOXA*, (Méreau & Schwaller, 2013) Esta regulación se realiza a través la modificación de las histonas que contienen los genes *HOX*, de tal manera que MLL es una proteína del tipo histona metil-transferasa encargada de la metilación del residuo H3K4.

Los reordenamientos de MLL, generalmente conducen a la producción de proteínas de fusión capaces de activar la replicación de los genes *HOX* (en especial *HOXA*), dando lugar a la sobreexpresión de estos y la consecuente expansión de la serie mieloide con bloqueo madurativo (Muntean & Hess, 2012).

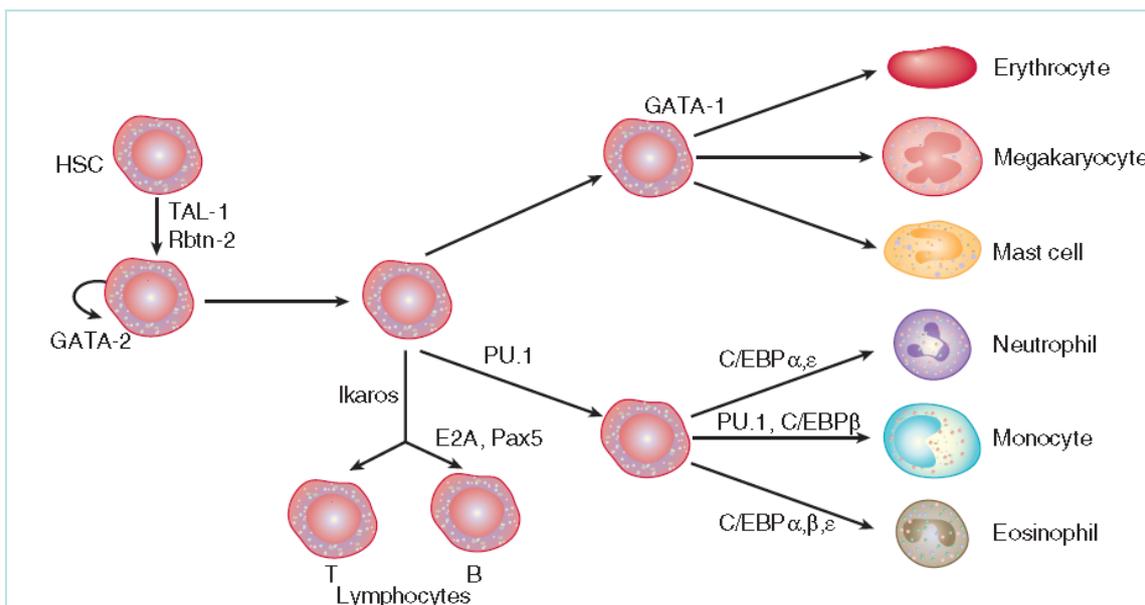


Figura 2.17 Representación esquemática de los principales factores de transcripción implicados en hematopoyesis y en los pasos en que su papel es primordial. Adaptado de Hoffman 6ª Ed 2012.

### 2.2.1.2.2 Factores de crecimiento hematopoyéticos.

Los **factores de crecimiento** (FC) son sustancias, la mayoría de naturaleza proteica, que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular mediante el control externo del ciclo celular, induciendo en la célula receptora del estímulo el abandono de la quiescencia (G0) y la entrada en fase G1 (Sieff, 2015b).

Si bien los estadios más iniciales de la maduración las células de la hematopoyesis expresan receptores para múltiples citoquinas a medida que van avanzando en el desarrollo y comprometiéndose hacia una determinada línea va disminuyendo el número de receptores.

Ejemplos de receptores de FC son los de G-CSF, TPO, EPO y GM-CSF, pertenecientes a la familia de los receptores ligados a JAK-STAT. Una vez se ha producido la unión ligando-receptor se produce el cambio estructural (generalmente homodimerización), lo cual induce la fosforilación de la quinasa JAK que activa los segundos mensajeros de la vía STAT. Estos acaban pasando al núcleo donde actúan como factores de transcripción capaces de iniciar el ciclo celular (Berliner, 2012).

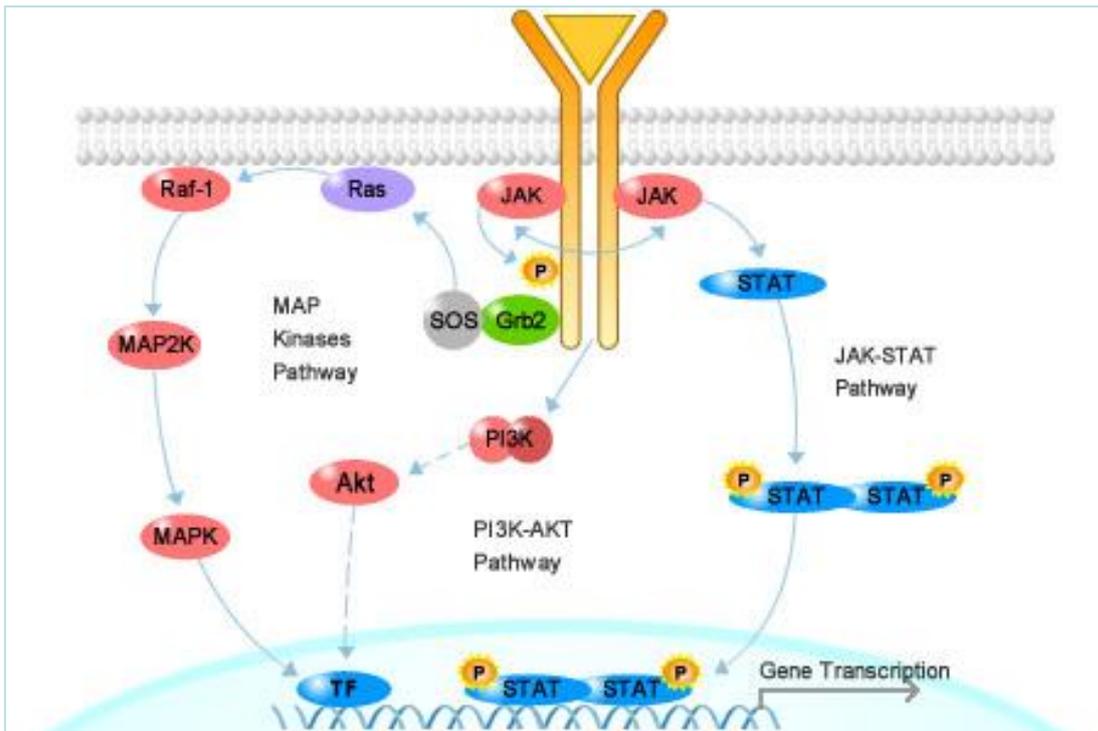
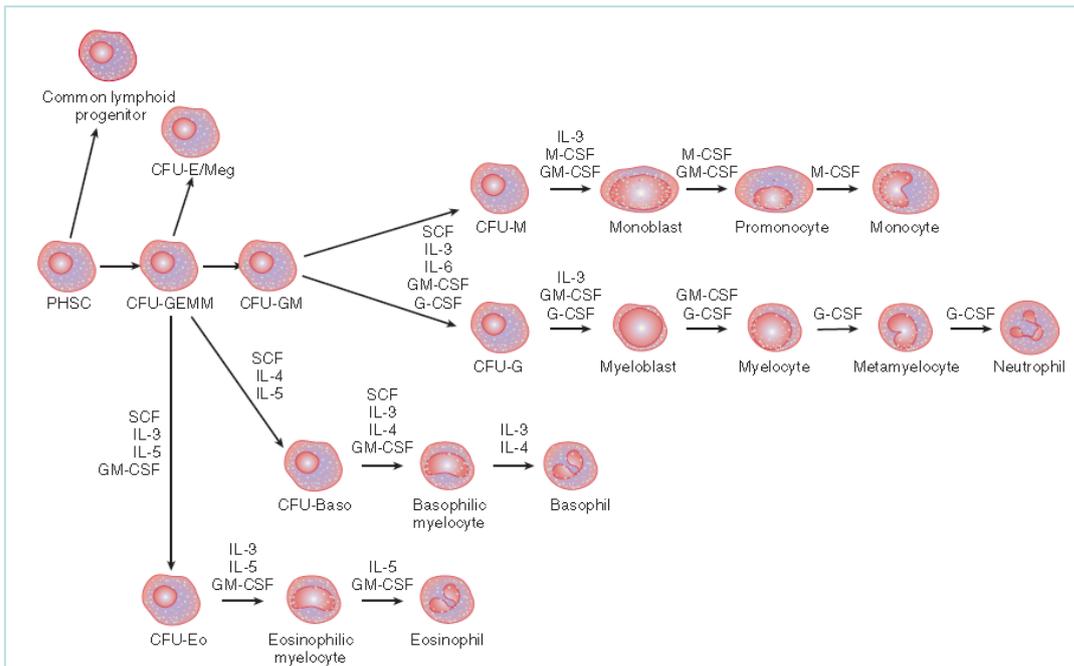


Figura 2.18 Esquema general de señalización de los receptores de citoquinas y factores de crecimiento. Tomado de <http://www.sinobiological.com>

En conjunto, se podría definir un grupo de FC de acción temprana (IL-1, IL-3, IL-6, ligando FLT3, CSF, GM-CSF) con capacidad para estimular los HSC no comprometidas a línea y un segundo grupo de acción tardía (EPO, TPO, G-CSF, M-CSF, IL-5) con afinidad para las CFU comprometidas.

Dentro de los de acción temprana, parece ser IL-3 la que muestra especial afinidad para dirigir HSC hacia CFU-GEMM, así como GM-CSF muestra una actividad no restringida a línea mieloide, pudiendo estimular también a CFU-E. Las citoquinas mas tardías como CSF-G y CSF-M muestran afinidad de línea para los estadios finales de la maduración mieloide, de igual manera que TPO y EPO lo hacen para la series plaquetar y eritroide respectivamente (Kaushansky, 2006).



**Figura 2.19 Representación esquemática de las principales citoquinas implicadas en los distintos estadios de la hematopoyesis. Tomado de Hoffman 6ª ed 2012.**

### 2.2.1.2.3 Mecanismos epigenéticos. ARN de interferencia (miRNA).

En condiciones normales la mayor parte del ADN en una célula se muestra inaccesible a la maquinaria transcripcional, en virtud de la estructura terciaria y cuaternaria en la que se encuentra empaquetado el ADN. La accesibilidad de determinados genes en un momento concreto para proceder a su transcripción no se produce al azar sino que se encuentra regulado por múltiples factores que inciden sobre esta superestructura. Estos mecanismos de control que influyen en la expresión genética sin interferir en la secuencia del ADN es lo que se conoce como epigenética (Chute, 2012).

Los principales mecanismos de regulación epigenética incluyen las modificaciones de las histonas, principalmente mediante introducción en regiones concretas de residuos de grupos acetilos y metilos. Las histonas en las que predomina la acetilación favorecerán la expresión de los genes que contienen, mientras que la desacetilación implica un perfil de represión de la transcripción. Los cambios en el perfil de acetilación lo realizan enzimas específicas (histonas acetiltransferasa o HAT e histonas deacetiltransferasas o HDAC).

Por el contrario la metilación influye de una manera más específica, pues en función de la posición del residuo cambiará el patrón de expresión. Por ejemplo la presencia de un residuo metilo en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me) implica transcripción abierta, mientras que la metilación de H3K27 condiciona un cierre del programa de lectura.

El otro gran mecanismo de control es la metilación en posición 5' de la citosina en regiones de alta repetición de pares CpG en la secuencia de ADN (conocidas como islas CpG) que se sitúan próximas a los promotores (Alvarez, 2014). En situación basal, la mayoría de las regiones CpG se encuentran metiladas, pero existen regiones de alta variabilidad en el patrón de metilación, denominadas orillas de las islas CpG, y que son las regiones dianas para intervenir en la regulación de la expresión génica.

La maquinaria enzimática encargada del control de la metilación lo constituyen la DNMT1, que mantiene el perfil de metilación existente durante la replicación celular, y DNMT3A y DNMT3B que son las encargadas de la metilación *de novo*. El proceso de desmetilación se encuentra dirigido por las enzimas TET, en especial TET2 que cataliza el paso de citosina metilada (5' mC) a 5-hidroxi-metil-citosina (5' hmC).

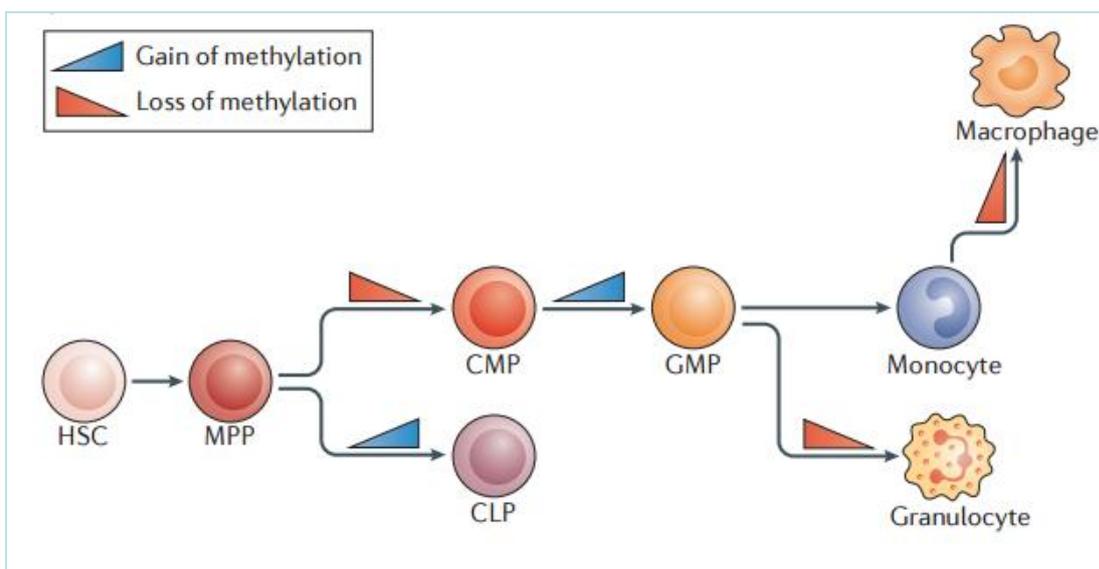
En líneas generales, se puede asumir que una región con alta incidencia de metilación se encuentra cerrada para la transcripción genética y que la hidroximetilación equivale funcionalmente a la desmetilación de los residuos de citosina (Chedin, 2011; Shih, Abdel-Wahab, Patel, & Levine, 2012).

Con estos antecedentes, es lógico suponer que la regulación epigenética debe jugar un papel clave en la hematopoyesis, controlando la expresión de los FT necesarios en cada momento de la mielopoyesis.

Los trabajos realizados en modelos murinos confirman que enzimas como DNMT3A y DNMT3B son necesarias para el control de los genes que mantienen activo el programa de células stem. (Alvarez-Errico et al., 2015) Así mismo, se ha demostrado que los patrones de metilación durante la hematopoyesis no se distribuyen al azar (Ji et al., 2010) sino que existe un control exquisito de las regiones que muestran

patrones cambiantes de metilación y modificación de histonas. De esta manera, “la diferenciación celular es un proceso epigenético que requiere programas específicos y altamente ordenados de modificación de la metilación del ADN y modificación de histonas”(Issa, 2013).

En general se asume que existe una tendencia progresiva a la hipometilación a lo largo de la maduración, pero con cambios puntuales, probablemente por la necesidad de silenciar la expresión de genes relacionados con funciones stem.



**Figura 2.20** Representación esquemática de los cambios en los patrones de metilación a lo largo de la mielopoiesis (Alvarez-Errico, et al 2015).

Finalmente, otro nivel de regulación de interés creciente, es la constituida por el ARN de interferencia o microARN. Consiste en pequeños fragmentos de ARN no codificante, monocatenario que tiene la capacidad de unirse a ARNm circulante con lo que es capaz de bloquear su traducción.(Chute, 2012) Si bien se ha demostrado que un microRNA puede inhibir la expresión de múltiples genes, en los últimos años se ha demostrado la importancia de miR-115, miR-125b, miR-126, miR-130 y miR-223 en el desarrollo del compartimento mieloide. Sin embargo la tremenda complejidad de estas redes de control dificulta el desarrollo de un modelo esquemático global de su papel en la hematopoyesis(MF Alemdehy, 2012).

## 2.2.2 Fisiopatología y bases moleculares de la LMA.

Desde los trabajos realizados a principios del siglo 20, se ha puesto de relieve la importancia de los mecanismos que inducen ventaja proliferativa y bloqueo en el proceso madurativo de la célula tienen en el desarrollo de la LMA (Naegeli, 1934).

Estos datos iniciales, basados en la observación de los cambios citológicos, han tenido una reproducibilidad importante con los hallazgos moleculares y citogenéticos observados durante las últimas décadas del siglo 20, documentándose mutaciones que sustentaban esa ventaja proliferativa (mutaciones en FLT3 o K-RAS) y translocaciones genéticas que explicaban el bloqueo en la maduración mieloide (PML-RAR $\alpha$ , AML1-ETO...).

De esta manera, a comienzos del siglo 21 se postula como idea dominante un modelo basado en la cooperación de dos tipos de mutaciones o alteraciones genéticas: mutaciones tipo I, encargadas de dar ventaja proliferativa a la clona tumoral y tipo II, que interfieren sobre el proceso de maduración celular. (Gilliland & Griffin, 2002)

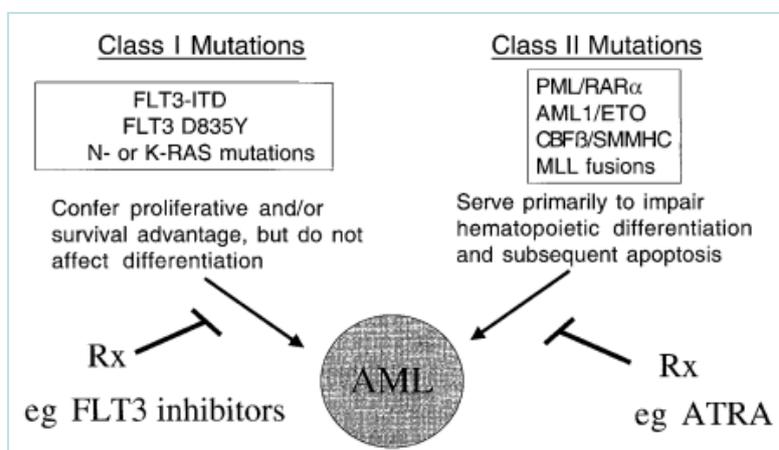


Figura 2.21 Esquema original de Guilliland publicado en 2002 en el que se hace referencia a la necesidad y cooperación de dos tipos de eventos genéticos (Guilliland & Griffin, 2002).

Sin embargo, este modelo de doble hit se ha visto superado en los últimos años por el aumento de información disponible por la mejora de las técnicas de análisis de secuencias de ADN y de perfiles de expresión de ARNm, la proteómica, el descubrimiento de los microARN y la definición del epigenoma.

De tal manera que se ha podido definir un perfil de expresión de ARNm característico para las distintas LMA (Valk et al., 2004) se ha propuesto una clasificación basada en los hallazgos de proteómica (Kornblau et al., 2009) , por los cambios de expresión de microRNA, (K. M. z. Guido Marcucci, Michael D. Radmacher, Ramiro Garzon, Clara D. Bloomfield, 2011) y de perfiles epigenéticos (Cancer Genome Atlas Research, 2013) que pudieran relacionarse con los distintos subtipos de LMA y aportar valor pronóstico.

En definitiva, se ha puesto de relieve un panorama muchos más complejo en el que se producen interacciones a múltiples niveles de la expresión génica, de tal manera que podemos concluir, citando a J. Chen et al, quienes en 2010 definieron la leucemogénesis como un proceso en el que están implicados algo más que mutaciones de genes, y titularon literalmente su artículo como “Leukemogenesis: more than mutant genes”(Chen, Odenike, & Rowley, 2010).

### **2.2.2.1 Proceso Secuencial. Evidencia a favor de leucemogénesis como modelo multi-step.**

El modelo de “doble hit” implica que la LMA es la consecuencia de al menos dos mutaciones o alteraciones genéticas.

Actualmente se asume que este proceso es mucho más complejo, y que la génesis de la LMA es consecuencia de múltiples hits genéticos que van generando un proceso de selección clonal de tal manera que en el momento del diagnóstico puedan coexistir varias clonas(Murati et al., 2012). La evidencia a favor de la existencia de múltiples hits genéticos que generan un **proceso secuencial** es amplia y se basa en los siguientes aspectos:

a) Modelos animales: Existen múltiples modelos de leucemogénesis en los que se observa que la presencia de una única alteración genética no es capaz de inducir un fenotipo de LMA. Por ejemplo, Moriya et al, demostraron que la inserción mediante retrovirus de genes K-ras y MLL-AF10 mutados por separado eran incapaz de inducir

LMA, sin embargo cuando se insertaba ambas alteraciones simultáneamente se desarrollaba LMA en un corto periodo de tiempo (Moriya et al., 2012).

Hallazgos similares han sido reproducidos en LMA con alteraciones genéticas bien definidas, como son la translocación t(8;21) o la t(15;17) que, a pesar de inducir su expresión en ratones, precisan de segundos eventos genéticos para desarrollar la leucemia (Kelly et al., 2002) (Higuchi et al., 2002).

b) LMA secundarias a otras neoplasias mieloides: Aproximadamente un 20% de las LMA son secundarias a enfermedades hematológicas previas, lo que las convierte en buenos modelos para el estudio de la evolución a leucemogénesis.

En 2012, M. Walter, mediante técnicas de secuenciación masiva en las muestras al diagnóstico de SMD y del momento de su transformación a LMA secundaria, describieron los cambios genéticos observados en esta transición. Como hechos destacados, encontraron un aumento en el número de clones y que la progresión venía dada por la ganancia de nuevas mutaciones en los clones presentes en el momento del diagnóstico de SMD (Matthew J. Walter, 2012).

c) LMA en recaída: El estudio citogenético convencional ya había demostrado que las LMA en recaída se caracterizaban por la ganancia de nuevos eventos genéticos (OM Garson, 1989), pero la llegada de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido profundizar en este campo. Ding et al secuenciaron las muestras al diagnóstico y recaída de una serie de pacientes, observando dos patrones moleculares distintos en las recaídas. En primer lugar, encontraron pacientes en los que la recaída provenía del clon mayoritario al diagnóstico pero con ganancia de nuevas mutaciones, y otros en los que la recaída acontecía de un clon minoritario, pero que durante la evolución adquiría nuevas mutaciones y se transformaba en el mayoritario en el momento de la recaída.

En ambos casos, la presencia de nuevas mutaciones es clave para el desarrollo de la recaída clínica de la LMA (Ding et al., 2012).

d) Secuenciación masiva al diagnóstico: Entre las conclusiones del proyecto The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) sobre LMA, se encontró la presencia de al menos un subclón minoritario al diagnóstico en más de la mitad de los pacientes, y un máximo de 5 subclones por paciente (Cancer Genome Atlas Research, 2013).

Previamente, investigadores del grupo de Washington describieron la evolución clonal de LMA. Así, observaron como una mutación que confiere ventaja a una célula HSC (definidas como driver), era transmitida junto con todas las mutaciones no leucémicas (“passengers”) a la siguiente progenie. Luego, sucesivos hits genéticos iban añadiendo mutaciones de ambos tipos hasta el desarrollo clínico de la enfermedad, en la que se pueden identificar los distintos subclones cada uno con sus mutaciones drivers y “passengers” características (Welch et al., 2012).

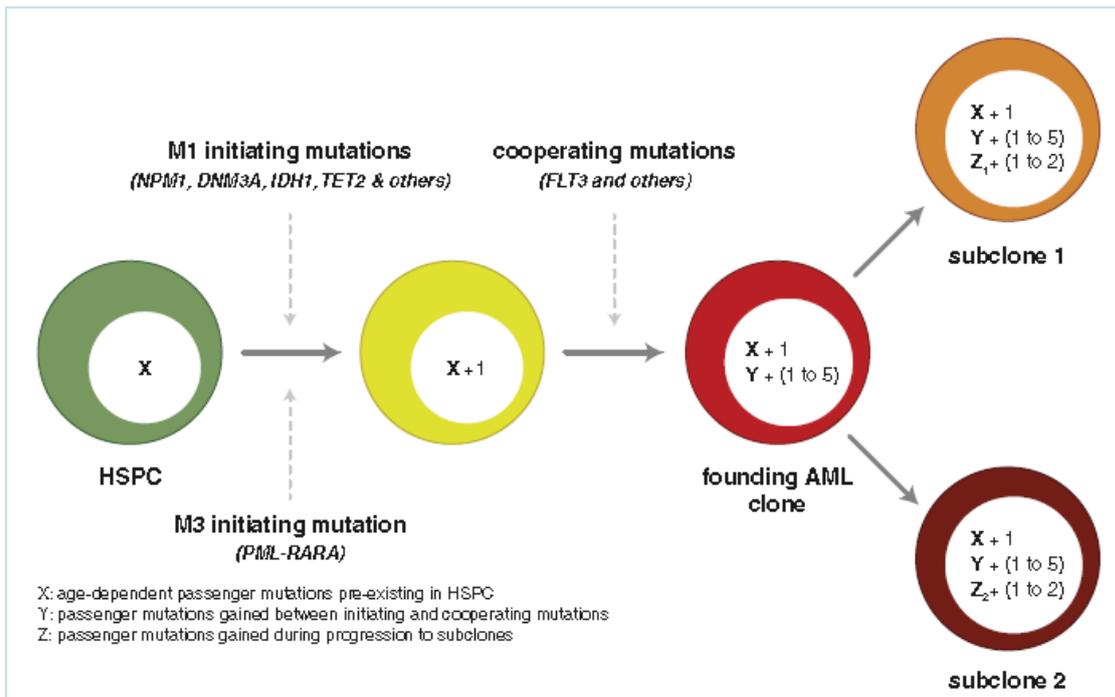


Figura 2.22 Evolución clonal propuesta por investigadores del grupo de Washington. Donde “X” define las mutaciones inherentes al proceso de división de toda HSC, al que se van sumando mutaciones driver que en sucesivas divisiones se irán transmitiendo a los clones con todo el cortejo de mutaciones no leucemogénicas, definidas como passengers (representadas como “X”, “Y” ó “Z”) de nueva adquisición (Welch et al., 2012)

e) LMA CBF: Las LMA con reordenamientos del CBF permiten el seguimiento de los pacientes mediante técnicas de PCR por tratarse de una alteración genética estable y considerada imprescindible para el desarrollo del clon leucémico. Sin embargo se ha demostrado la persistencia del transcrito AML1-ETO en largos supervivientes fuera de

tratamiento e incluso en pacientes con trasplante alogénico, todos ellos en situación en remisión completa (Jurlander et al., 1996). Estos hallazgos sugieren que la presencia del transcrito AML1-ETO, si bien es un evento inicial necesita de otras lesiones cooperantes para el desarrollo clínico de la LMA.

Igualmente, Wiemels y et al desarrollaron un trabajo en 12 niños con diagnóstico de LMA CBF con t(8;21) de los cuales se recuperaron muestras al nacimiento. Consiguieron demostrar la presencia del reordenamiento AML1-ETO en cinco de ellos, observando periodos de latencia hasta la presentación clínica de la LMA de 3 a 10 años, lo cual ahonda en la necesidad de lesiones cooperantes aún a pesar de tratarse de LMA con lesiones genéticas bien definidas (Wiemels et al., 2002).

f) Hematopoyesis clonal en pacientes ancianos sin evidencia de LMA: Recientemente dos grupos han demostrado de manera simultánea la presencia de mutaciones asociadas a LMA en pacientes ancianos, sin evidencia de neoplasia hematológica activa. Ambos coinciden en que, la frecuencia aumenta con la edad, observando diferencias significativas incluso entre los segmentos de edad entre 70 y 90 años, y en que las mutaciones de la maquinaria epigenética y del splicing son las más frecuentes.

Estos trabajos ponen en evidencia la presencia de hematopoyesis clonal como lesiones pre-malignas en población anciana, que aumentan el riesgo de desarrollo de LMA especialmente cuando se asocian dos o más lesiones. Este hecho constituye una prueba de concepto importante a favor de la presencia de mutaciones como DNMT3A, TET, ASXL1, como lesiones pre leucémicas y de la necesidad de eventos genéticos sucesivos para el desarrollo de la enfermedad (McKerrell et al., 2015) (Jaiswal et al., 2014).

En conjunto, y citando a Murati y Welch, ante la evidencia disponible se puede concluir que la leucemogénesis es un proceso secuencial donde una serie de mutaciones iniciales o drivers confieren una ventaja inicial a la HSC sobre la que ha ocurrido este primer evento y que ya cuenta con una serie de mutaciones no codificantes que

denominamos “passenger”. Como diana de estas mutaciones drivers se han propuesto genes como, NPM1, DNMT3a, TET2 y AXL1 entre otros. A continuación, sucesivos daños irán confiriendo nuevas ventajas evolutivas a los clones que irán progresando con las nuevas mutaciones tanto drivers como “passengers”, hecho que nos permite identificar los distintos clones que componen la enfermedad. El número de pasos necesarios para el desarrollo de la leucemia dependerá de las características de las lesiones iniciales y sucesivas, de tal manera que podemos concluir que existen múltiples mecanismos genéticos y múltiples vías para establecer el desarrollo de un cuadro de LMA. (Welch et al., 2012) (Murati et al., 2012)

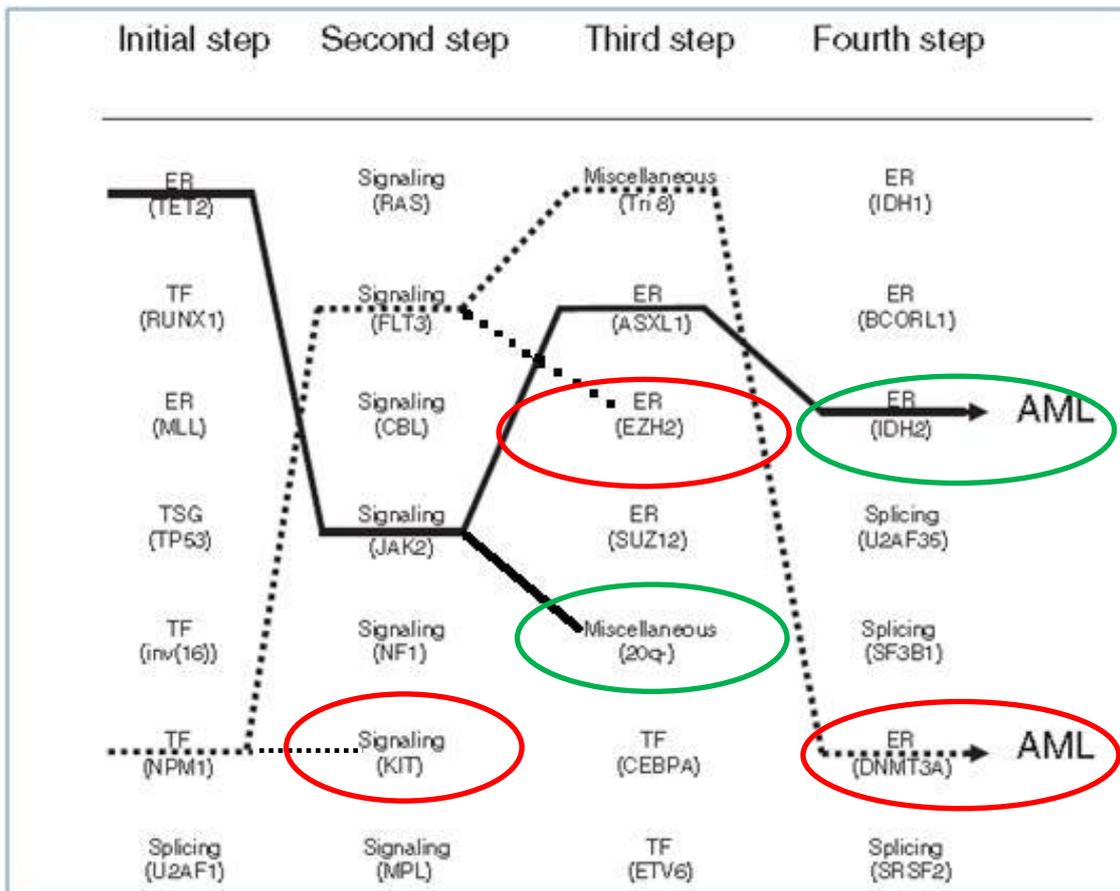


Figura 2.23 Esquema de leucemogénesis modificado del propuesto por Murati. Tras una primera lesión que confiere ventaja a la HSC se van añadiendo sucesivos eventos genéticos hasta el desarrollo clínico de la LMA. Este modelo permite explicar tanto la evolución secuencial como policlonal, y en especial la heterogeneidad biológica y clínica de la LMA. Se observa como la LMA señalada en rojo, se asocia con otros dos subclones que no han desarrollado LMA y el modelo verde, con otro subclón (Murati et al., 2012).

Es importante remarcar que estos modelos de evolución secuencial están fuertemente validados fuera de la hematología, con abundante evidencia a su favor en el contexto de neoplasias de órgano sólido, como por ejemplo el cáncer colorrectal, donde existen publicaciones desde hace más de 30 años (Vogelstein et al., 1988). Recientemente, investigadores británicos han ido un paso más allá al demostrar con solidez el concepto de heterogeneidad tumoral, mediante la demostración de la coexistencia en un mismo paciente y en la misma neoplasia de distintos clones tumorales (Gerlinger et al., 2012).

### **2.2.2.2 Mutaciones en LMA**

Ante la gran variedad de mutaciones descritas en la LMA, se seguirá la clasificación propuesta por el TCGA (Cancer Genome Atlas Research, 2013) con la intención de favorecer un desarrollo lo más didáctico y de reconocer la importancia que ha supuesto en el avance de la génesis de la LMA. Esta clasificación destaca la presencia de una media 13 mutaciones en secuencias codificantes por paciente y pone de manifiesto la necesidad de múltiples hits genéticos para el desarrollo de la leucemogénesis.

#### **2.2.2.2.1 Mutaciones en NPM1.**

En el año 2005 autores del grupo GIMEMA describieron por primera vez la presencia de la mutación de esta fosfoproteína que funciona de lanzadera intracelular entre núcleo y citoplasma en LMA. En este trabajo inicial, la frecuencia fue del 35% con fuerte asociación con cariotipo normal y LMA *de novo* (Falini et al., 2005). Trabajos posteriores, como el citado del TCGA, sitúan la frecuencia entre el 30-35% de los casos y confirman esa fuerte asociación con cariotipo normal (Cancer Genome Atlas Research, 2013).

Su función se relaciona con la prevención de la agregación de proteínas nucleolares y la regulación del gen supresor tumoral *TP53* a través de *p19ARF*, localizándose en condiciones fisiológicas a nivel nucleolar. La mutación de *NPM1* implica el acumulo de la proteína a nivel citoplasmático lo que, junto a que sea excluyente con las

mutaciones *TP53*, apoyan a que esta sea la vía (interfiriendo en el mecanismo de apoptosis vía ARF mediada por P53) por la que interviene en el desarrollo de la leucemia (Michael Andreeff, 2012).

Actualmente se cree que la mutación *NPM1* es un evento de alto poder leucemógeno de aparición precoz en el desarrollo de la LMA. Esto se apoya principalmente en dos observaciones biológicas. En primer lugar, en estudios en población anciana sin datos de hemopatía activa, en los que se objetivan datos de hematopoyesis clonal con presencia de mutaciones pre-leucémicas como *DNMT3A* o *TET2*, pero en los que no se encontraron individuos sanos con *NPM1* mutado (Jaiswal et al., 2014; McKerrell et al., 2015). Y por otro lado, en su alta estabilidad en los pacientes secuenciados en el momento de la recaída de tal manera que, cuando está presente al diagnóstico de la LMA, la clona responsable de la recaída conserva la mutación en *NPM1* en más del 90% de los casos (Kronke et al., 2013).

Además, es conocido su papel como factor pronóstico, asociándose a mayor quimiosensibilidad de tal manera que actualmente los pacientes con cariotipo normal y presencia de *NPM1* mutado, no son considerados para ALo-TPH en primera remisión por disponer de similares probabilidades de supervivencia con intensificación con quimioterapia que con trasplante, de aproximadamente 40% a los 5 años, (Schlenk et al., 2008)

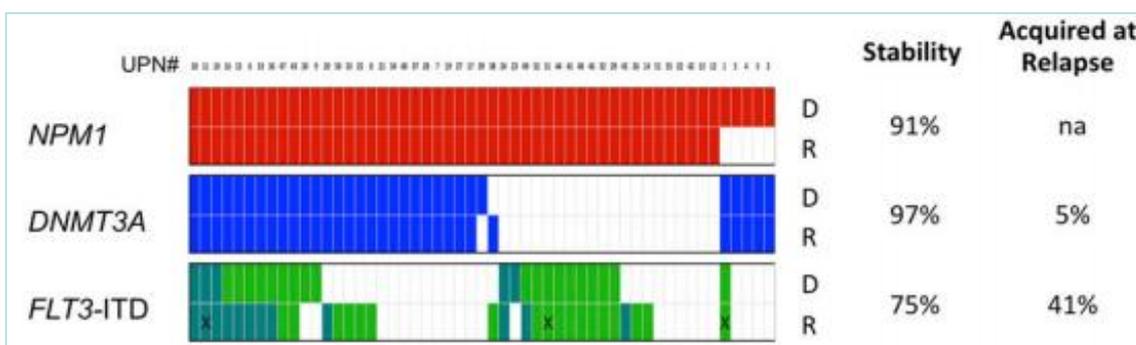


Figura 2.24 Gráfico tomado de Krönke et al, en el que se muestra la estabilidad de las mutaciones en *NPM1* y *DNMT3A* al diagnóstico (D) y recaída (R) y como por el contrario *FLT3* es un evento secundario que se puede perder o adquirir en las recaídas (Kronke et al., 2013)

### **2.2.2.2 Factores de transcripción: fusiones y mutaciones.**

En el estudio del TGCA se describieron hasta 71 fusiones de genes, en los que mayoritariamente estaban implicados factores de transcripción (FT), seguidos por los reordenamientos de *MLL*. Además de estos reordenamientos, se demostraron mutaciones que afectaban a regiones codificantes de FT como *CEBPA* o *RUNX1*, y se objetivó que los diversos eventos genéticos para FT eran excluyentes entre sí (Cancer Genome Atlas Research, 2013). Las principales alteraciones genéticas referidas a FT de la mielopoyesis son las siguientes:

#### a) Reordenamientos Core Binding Factor (CBF)

En global, representan hasta un 15% de las LMA (Michael Andreeff, 2012) y se caracterizan por su relativo buen pronóstico.

Las translocaciones más frecuentes son, con mucho, la t(8;21) AML1/ETO y la inv(16)(p13q22) CBFb/MYH11. Los reordenamientos de estos genes con estos y otros “partners”, dan lugar a proteínas quiméricas que alteran el complejo CBF y resultan en graves consecuencias en el programa de transcripción de la mielopoyesis, de tal manera que las LMA con t (8;21) AML1/ETO, inv(16)(p13q22) o mutaciones de *CEBPA* se caracterizan por tener un perfil de expresión de genes propio y característico y que les distingue de otras LMA (Valk et al., 2004).

Otras translocaciones que afectan a componentes del CBF, pero no definidos dentro del subgrupo de LMA de buen pronóstico sería los reordenamientos t(12;21) TEL-AML1 o t(3;21) EVI1-AML1.

#### b) Mutaciones en factores de transcripción.

Los más conocidos son las mutaciones que afecta a la secuencia de *RUNX1* (AML1) y *CEBPA*.

*RUNX1* es la subunidad  $\alpha$  del CBF también denominada AML1. En modelos animales, el desarrollo de mutaciones en AML1 inactivantes producen un fenotipo similar al observado en la translocación AML1-ETO, (Huang et al., 2003) hallazgo corroborado

por el hecho de que son mutuamente excluyentes . Su frecuencia global en LMA *de novo* es baja, por debajo del 5% y no se ha podido aclarar su papel pronóstico (Cancer Genome Atlas Research, 2013).

El gen CEBPA codifica para un FT clave para la diferenciación mieloide. Su mutación se ha descrito con una frecuencia de entre el 10-15% de los pacientes con LMA y cariotipo normal. Esta mutación origina un transcrito incompleto con resultado de pérdida de función que, según estudios en modelos animales, se traduce en una ventaja proliferativa del componente mieloide con fenotipos que remedan a síndromes mieloproliferativos (Porse et al., 2005) y pérdida de la capacidad de autor renovación de las células HSC (Hasemann et al., 2014).

### **2.2.2.2.3 Maquinaria epigenética del ADN. Genes de metilación y modificadores cromatina.**

Desde hace años existe una evidencia creciente a favor del papel fundamental que las mutaciones que codifican para la maquinaria enzimática que controla la expresión epigenética en el desarrollo de las neoplasias mieloides, tanto de LMA como síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos (Shih et al., 2012).

Los resultados de estudios de secuenciación masiva del TCGA han confirmado estos hallazgos y han estimado en un 44% de mutaciones y eventos genéticos relacionados con la metilación del ADN, centrada en los genes DNMT3A, DNMT3B, DNMT1, IDH1, IDH2, TET1 y TET2.

Además, se observaron alteraciones en el 30% de la serie en genes encargados de la modificación de la cromatina, especialmente MLL, EZH2 y ASXL1 (Cancer Genome Atlas Research, 2013).

#### **a) Mutaciones en genes que regulan metilación de ADN.**

Destacan las mutaciones de los genes que codifican para la familia de las metiltransferasas (constituida por la DNMT3A, DNMT3B, encargadas de la metilación *de novo* y la DNMT1, de transmitir las marcas epigenéticas en la división celular) (Goll

& Bestor, 2005) y , por otra parte, de TET2 que es la encargada de la retirada de estas marcas mediante la hidroximetilación y de sus reguladores metabólicos IDH1/2 (Schoofs, Berdel, & Muller-Tidow, 2014).

La presencia de mutaciones en DNMT3A fue descrita en 2010 por Ley et al.,(Ley et al., 2010) y se caracteriza por el desarrollo de una proteína truncada, generalmente por mutaciones de cambios de lectura, cuya alteración más frecuente, la R882, condiciona una pérdida de la capacidad de unión al ADN, que se traduce en modelos *in vitro* a una menor metilación del ADN. Sin embargo en modelos *in vivo* esto no ha podido ser reproducido, aunque se asume una situación de hipometilación selectiva, y por lo tanto silenciamiento de determinados genes que participan en el mantenimiento del fenotipo stem de las HSC (Schoofs et al., 2014).

En general se asume una frecuencia aproximada del 20% de las LMA, y parecen tener un impacto pronóstico negativo aunque estos hallazgos requieren de valoración prospectiva y no han sido incluidos en las guías clínicas asistenciales para la asignación de riesgo biológico de los pacientes (Thol et al., 2011).

Por el contrario las mutaciones en DNMT1 y DNMT3B son extraordinariamente infrecuentes en neoplasias mieloides, con una incidencia en LMA <1% (Chedin, 2011).

Por su parte las enzimas del grupo TET son enzimas dependientes de hierro y  $\alpha$ -ketoglutarato que catalizan la conversión de 5 metilcitosina (5-mC) a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), lo que equivale funcionalmente a las pérdidas de las marcas de metilación (Alvarez, 2014).

Los estudios de secuenciación masiva han puesto de manifiesto que la incidencia de mutaciones de *TET1* es menor al 1%, mientras que la frecuencia de alteraciones genéticas en la otra isoforma, *TET2* oscila entre el 7-23 % (Schoofs et al., 2014).

Las mutaciones de *TET2* condicionan una proteína con pérdida de función, lo cual implica una disminución global de 5-hmC y un aumento de la hipermetilación del ADN. Sin embargo, estos hallazgos reportados inicialmente en LMA, no han podido de

reproducidos en otras neoplasias mieloides con mutaciones en TET2 como SMD NMP. Es por esto por lo que en la actualidad no se puede asumir que las mutaciones de TET2 condicionen una hipermetilación global del ADN, de igual manera que las de DNMT3A tampoco condicionan una hipometilación general. Se asume por tanto, que condicionan cambios en las marcas de metilación de determinados genes implicados en la hematopoyesis (Chen et al., 2010; Schoofs et al., 2014; Shih et al., 2012).

Por último, se deben mencionar las mutaciones en los reguladores metabólicos de las enzimas TET, las enzimas IDH 1 e IDH2, que forman parte del ciclo de Krebs en el que se encargan del paso del metabolito isocitrato a  $\alpha$ -ketoglutarato ( $\alpha$ -KG), producen un patrón similar de metilación del ADN a las de TET2.

Los reguladores metabólicos de TET2, constan de dos isoformas, IDH1 de localización citoplasmática e IDH2 mitocondrial. Se han identificado mutaciones de IDH1 de forma recurrente en distintos tumores de órgano sólido, como glioblastomas o cáncer colorrectal (Cohen, Holmen, & Colman, 2013). En el contexto de LMA fueron inicialmente descubiertas en IDH1 y a continuación se observaron en IDH2 con una frecuencia algo más elevada, y que oscila en LMA de cariotipo normal entre 7-8% según las series consultadas (Marcucci et al., 2010).

Las mutaciones son generalmente heterocigotas y la consecuencia de estos cambios es una ganancia de nueva función (mutación neomórfica) en la que se convierte el  $\alpha$ -KG, necesario para el funcionamiento de TET2, en 2-Hidroxiglutarato (2-HG), de tal manera que en pacientes con LMA y mutación en IDH1/2 es posible identificar aumentos en los niveles séricos de 2-HG (Ward et al., 2010).

La consecuencia funcional se cree que es una pérdida del poder de desmetilación enzimática del ADN, probablemente por pérdida de los metabolitos necesarios para el correcto funcionamiento de la hidroximetilación de TET (Figueroa et al., 2010).

Esta correlación funcional entre TET2 y las enzimas IDH se ve reforzado por dos hallazgos. En primer lugar, el TGCA ha puesto de manifiesto que las mutaciones entre

ambas son excluyentes entre sí (Cancer Genome Atlas Research, 2013) y en segundo lugar, estudios de patrones de metilación muestran que las mutaciones de ambos genes muestran un perfil de metilación del ADN similar, caracterizada por la hipermetilación global de regiones promotoras. Es por esto que, citando a Ross Levine “las mutaciones de IDH1/2 y TET2 constituyen un nuevo grupo funcional mutacional en LMA” (Shih et al., 2012).

#### b) Mutaciones en genes modificadores de histonas.

Los cambios en la expresión de genes motivados por los cambios estructurales en la configuración de las histonas son claves para el correcto desarrollo de una hematopoyesis sana (Chen et al., 2010). En los estudios de secuenciación masiva se han identificado dos grupos de eventos: las alteraciones en MLL, y por el otro las que afectan al complejo Polycomb, en especial PRC2.

##### 1. Alteraciones en MLL

La proteína MLL forma parte de un complejo con actividad histona metiltransferasa, encargado de mantener la transcripción del locus de genes HOX mediante control epigenético a través de la metilación del residuo de lisina 4 en la histona 3 (H3K4), que condiciona un cambio estructural en la histona que se asocia con actividad transcripcional. El gen se encuentra localizado en el cromosoma 11 región q23. (Zhang, Chen, Yan, & Huang, 2012)

Las leucemias con alteraciones en MLL representan hasta el 85 % de las LMA infantiles y aproximadamente el 10% de las LMA de adultos.

El principal mecanismo genético es el reordenamiento con otro gen, que producen una translocación balanceada entre la región amino terminal de MLL con la región C-terminal del “partner” habiéndose identificado más de 100 posibles combinaciones, y por otro, las mutaciones en tándem de extremo N-Terminal (MLL-PTD) (Muntean & Hess, 2012).

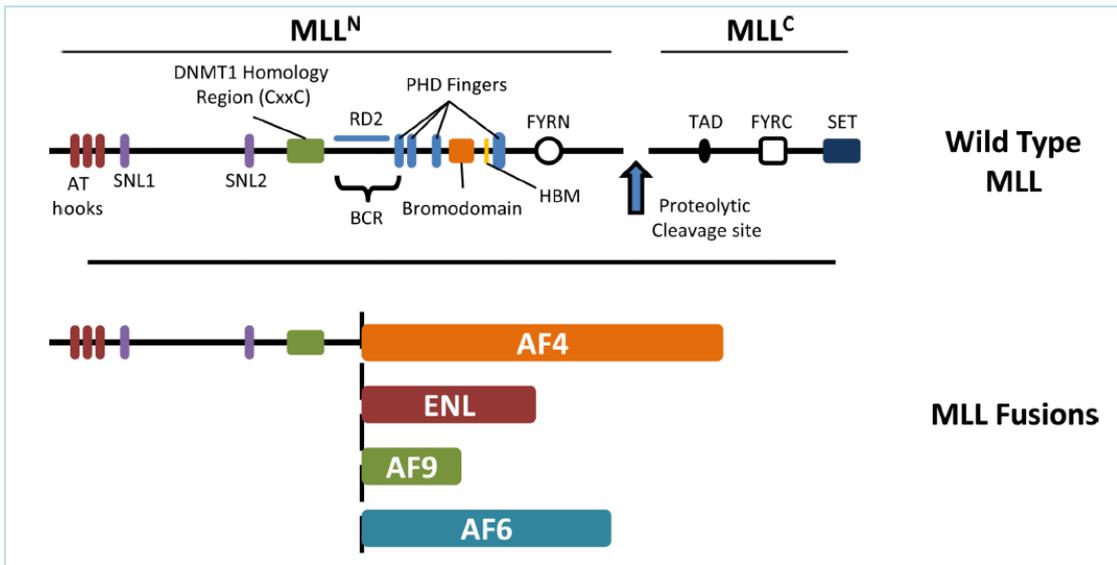


Figura 2.25 Representación esquemática de la estructura de MLL y del punto de corte de algunos de los principales reordenamientos conocidos (Muntean & Hess, 2012).

El gran número de genes acompañantes con los que se puede reordenar MLL hace difícil definir una función común, de manera esquemática, se asume que se pierde la capacidad de catalizar la metilación de H3K4, pero con aumento de actividad de otro de los componentes del complejo, en concreto la proteína Dot1L que aumenta su actividad de dimetilación de H3K79 que se asocia a aumento de la actividad transcripcional del locus de genes HOXA (Zhang et al., 2012).

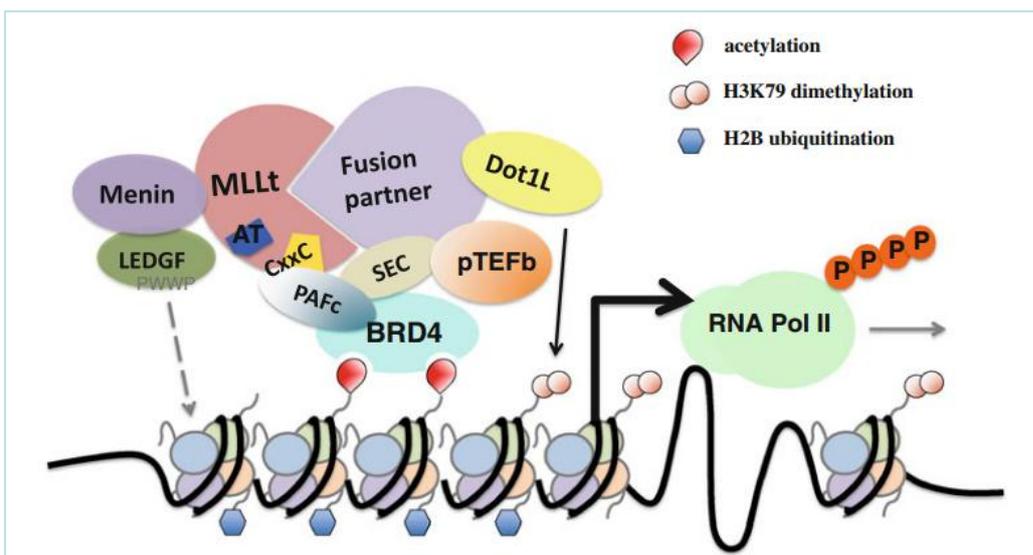


Figura 2.26 Consecuencia de las fusiones de MLL y aumento actividad BRD4 y de poder de dimetilación de DOT1L (Zhang, Chen, Yan, & Huang, 2012).

La importancia funcional que tienen estos reordenamientos, se aprecia en el hecho que este grupo de LMA es la que necesita menor número de mutaciones cooperantes, solo una media de 2,09 mutaciones además de la alteración de MLL (Cancer Genome Atlas Research, 2013). Además las translocaciones de MLL son especialmente frecuentes en LMA secundarias a quimioterapia, da idea de la potencia leucemógena de las alteraciones de este complejo enzimático.

## 2. Mutaciones en EZH2 y ASXL1

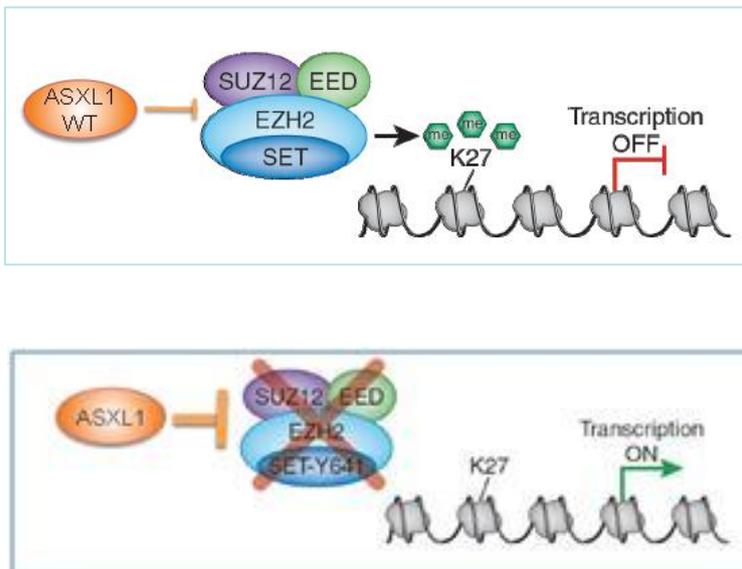
Ambas enzimas forman parte del conjunto de proteínas Polycomb (PcG) encargados de actuar como represores de la transcripción mediante la inducción de cambios en la estructura de las histonas. PcG se encuentra altamente conservado en mamíferos y se organiza a través de dos complejos enzimático conocidos como PRC1 y PRC2, siendo este último el de papel y función mejor conocida especialmente en el contexto de la mielopoyesis y las hemopatías malignas. Está constituido por cuatro miembros principales: EZH1 o EZH2, EED, SUZ12 y JARID12, mientras que ASXL1 es responsable del reclutamiento y estabilización de estos cuatro componentes del complejo (Margueron & Reinberg, 2011).

La función de EZH2 a nivel molecular se realiza a través de su actividad metiltransferasa sobre el residuo H3K27, en concreto cataliza la trimetilación de dicho residuo, tras lo cual se producen cambios estructurales con condensación de la cromatina que conducen al silenciamiento transcripcional.

La frecuencia de las mutaciones de EZH2 en hemopatías malignas es variable, pues oscila entre el 7 y el 20% en neoplasias linfoides del centro germinal, en donde acontecen mutaciones con ganancia de función (Kahn, 2013), mientras que en el contexto de neoplasias mieloides la frecuencia muestra un patrón distinto. Así en LMA secundarias a neoplasias mieloproliferativas, se observa en aproximadamente entre 8-12%, mientras que en LMA *de novo*, baja hasta el 2-3 % de los casos (Shih et al., 2012) .

Los estudios *in vitro* han demostrado que estas mutaciones en el contexto de neoplasias mieloides confieren pérdida de función, por lo que se asume que esto

conduciría a una situación de aumento de la transcripción de los genes implicados, entre los que se ha demostrado que la pérdida de expresión de EZH2 implica un aumento de la del cluster HOXA9 (Kahn, 2013).



**Figura 2.27** Representación esquemática y funcional del complejo PRC2 y ASXL1 y sus implicaciones funcionales en la transcripción génica. Arriba situación en condiciones fisiológicas, y abajo con pérdida de función del reclutador ASXL1 Modificado de Sara Álvarez: "Epigenética en LMA" Congreso Nacional SEHH 2014

Por su parte, ASXL1, se encuentra mutado en LMA en aproximadamente en un 5% de los casos, y de igual manera a EZH2 también se encuentra mutado con frecuencias entre el 5-25% en otras neoplasias mieloides como SMD, NMP o SMD/NMP. (Shih et al., 2012).

La función fisiológica de ASXL1 es la de reclutar y estabilizar el complejo PRC2 para que lleve a cabo su función. Sin embargo, parece menos claro las consecuencias funcionales de las mutaciones, estando descritas, tanto como para pérdida como para ganancia de función, si bien en el contexto de neoplasias mieloides se han relacionado con más frecuencia los eventos que conducen a una situación de pérdida de actividad (Alvarez-Errico et al., 2015; Shih et al., 2012).

#### **2.2.2.2.4 Supresores tumorales.**

La presencia de mutaciones en los mecanismos celulares de muerte celular, tanto en respuesta a situaciones externas como internas de la célula está bien establecida como uno de las vías básicas de oncogénesis. Ya en el año 2000, Hanahan y Weinberg, consideraron que toda célula tumoral debería desarrollar capacidades para evadir la apoptosis y ser resistentes las señales exógenas de inhibición del crecimiento, de tal manera que, en su opinión eran dos de las seis capacidades básicas que permitían a la célula tumoral desarrollarse (Douglas Hanahan, 2000).

En general, estas funciones son realizadas por los genes supresores tumorales, en especial TP53 o RB que actúan como integradores de toda una red de señales, tanto externas como internas de la célula y la traducen a los puntos de control del ciclo celular encargados de activar las vías de muerte celular programada con el fin de minimizar los errores genéticos que puedan conducir al desarrollo del cáncer u otras enfermedades (Arnold Levine, 2004).

En el contexto de LMA, el trabajo del TCGA, ha confirmado la presencia de mutaciones en varios genes supresores tumorales, en especial TP53, WT1 y PHF6. A continuación se describen las principales características de las mutaciones de TP53 y WT1.

##### **a) Mutaciones en TP53**

El gen TP53 es el más frecuentemente mutado en tumores humanos con frecuencias que alcanzan el 50% de los casos en tumores digestivos como esófago (Vogelstein, Lane, & Levine, 2000), Esto es debido al papel clave de TP53 en el control de ciclo celular en respuesta a situaciones de estrés celular como daño al ADN siendo capaz de activar una series de vías intracelulares que conducen a la parada del ciclo celular, activar los mecanismos de reparación ADN, y en última instancia si fuera preciso, inducir la apoptosis celular (Soussi, 2012).

El gen se encuentra alojado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y codifica para una proteína con cinco regiones siendo la sección central de unión al ADN dónde se concentran la mayoría de las mutaciones (80%) (Vogelstein et al., 2000).

En el contexto de la LMA, las mutaciones en TP53 tiene una frecuencia que oscila entre el 5-8% según series (Cancer Genome Atlas Research, 2013), con clara asociación con citogenéticas de mal pronóstico (Zhao et al., 2010), por lo que no es de sorprender el impacto pronóstico negativo que muestra en la supervivencia de los pacientes (Frank G. Rucker et al., 2012)

#### b) Mutaciones en WT1.

El gen del WT1 se encuentra alojado en el cromosoma 11p13 y codifica para una proteína con estructura en dedos de Zn, que se considera con función de FT. En el contexto de la hematopoyesis se asume que tiene un función de supresor tumoral, con capacidad de controlar el ciclo celular, por lo que en LMA, sus mutaciones se han considerado que son de pérdida de función en base a los altos niveles de ARNm observados (Yang, Han, Saurez Saiz, & Minden, 2007).

La frecuencia de mutaciones en LMA es baja, entre 5-10% (Hou et al., 2010) y se consideran en general de mal pronóstico. A pesar de esta baja frecuencia, parecen mostrar un patrón mutuamente excluyente con mutaciones en otros supresores tumorales (Cancer Genome Atlas Research, 2013).

En la actualidad, es campo activo de investigación el estudio de los niveles de expresión de WT1 por su potencial como marcador pronóstico tras la quimioterapia de inducción (Buccisano et al., 2012; David Grimwade & Hills, 2009).

#### **2.2.2.2.5 Mutaciones en genes de vías señalización celular.**

Desde que en la década pasada se postuló la teoría de los eventos tipo I y tipo II se reconocía que era obligatorio la presencia de mutaciones en las vías de señalización celular para el desarrollo de la LMA (Gilliland & Griffin, 2002). En la actualidad los estudios de secuenciación masiva han puesto de manifiesto que sólo entre 50 y el 60% de los casos muestran mutaciones en alguno de los elementos de estas vías de señalización celular.

A pesar de ello, continúan siendo el grupo más frecuentemente mutado, si bien son múltiples los genes afectados en este grupo. Entre los más importantes por su frecuencia destacan FLT3, KIT y KRAS/NRAS (Cancer Genome Atlas Research, 2013).

Las vías de señalización celular ligadas a estímulos externos, están bien establecidas como elemento etiológico en la oncología molecular y constituyen vías moleculares bien definidas, pero con múltiples redundancias que hacen difícil su control farmacológico. Las alteraciones las podemos encontrar a nivel de cantidad de ligando, alteraciones estructurales de receptores o lesiones que configuran ganancia o pérdida de función en segundos mensajeros, o traductores de la señal intracelular. Con diferencia, el efecto genético más frecuentemente alterado son las mutaciones en los efectores situados debajo de los receptores (Hanahan & Weinberg, 2011).

A modo de resumen, podríamos identificar como principales vías intracelulares en la hematopoyesis mieloide las siguientes (Grafone et al., 2012; Hanahan & Weinberg, 2011; Krause & Van Etten, 2005):

- La vía RAS: Que a través de segundos mensajeros como Raf-MEK y las MAP quinasas puede llegar a inducir el paso nuclear de Myc y traducir el estímulo de proliferación celular.

- La vía JAK-STAT. Muy vinculada a receptores de la hematopoyesis como TPO y EPO, y que traducen estímulos de proliferación celular

- La vía PI3K-AKT. Que a través del estímulo sobre mTOR puede inducir supervivencia celular.

- La vía de IK $\beta$ - NF $\kappa$  $\beta$ . capaz de actuar sobre la apoptosis.

Los resultados del TCGA mostraron una frecuencia de mutaciones en FLT3 similar a la descrita en la bibliografía, de aproximadamente el 35% en pacientes con cariotipo normal, de aproximadamente el 5 % en KIT y del 10% para NRAS/KRAS. Sin embargo, lo más relevante, fue el hecho de que muchas de estas mutaciones fueron excluyentes entre sí, lo cual da pie a establecer que solo es preciso una mutación en este conjunto de genes para el desarrollo de la LMA (Cancer Genome Atlas Research, 2013)

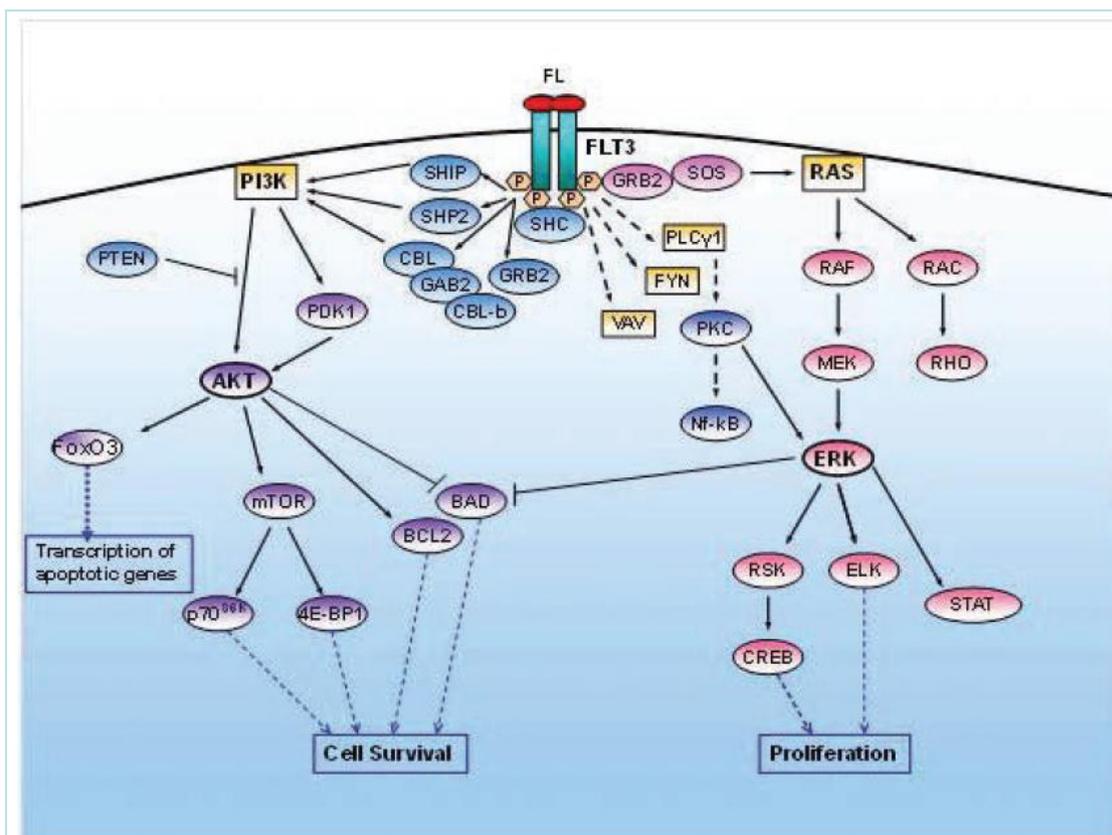


Figura 2.28 Vías moleculares relacionadas con FLT3 ligado. A pesar de tratarse de una representación esquemática con fines didácticos se aprecian las interconexiones y redundancias de las vías por debajo del receptor (Grafone, Palmisano, Nicci, & Storti, 2012).

### 2.2.2.2.6 Mutaciones en la maquinaria de splicing.

La presencia de mutaciones en la maquinaria genética encargada del splicing, constituida por ocho elementos (SF3B1, SRSF2, U2AF35, ZRSR2, U2AF65, SF1, SF3A1 y PRPF40B) fue inicialmente puesta de manifiesto en los pacientes con SMD, en especial en las formas con sideroblastos en anillo donde la mutación de SF3B1, se posiciona como un criterio diagnóstico cada vez con mayor peso.

Algunos grupos han descrito una incidencia global de mutaciones en este grupo del 27% en pacientes con LMA secundaria a SMD (Dolnik et al., 2012), pero a través de los trabajos de secuenciación masiva se ha puesto de manifiesto que en pacientes con LMA *de novo* también pueden existir mutaciones en este grupo de genes, con incidencias globales que oscila entre el 15% del trabajo TCGA y el 7% de otros grupos (Cancer Genome Atlas Research, 2013; Taskesen et al., 2014).

En la actualidad es difícil conocer el impacto pronóstico de estas lesiones, pero lo es aún más intuir el impacto funcional en el desarrollo de la leucemogénesis de estas mutaciones que afectan al proceso de maduración del ARNm, con lo que se pueden producir múltiples formas de transcritos alternativos o desarrollo de proteínas truncadas, con ganancia o pérdidas de función (Visconte, Makishima, Maciejewski, & Tiu, 2012).

#### **2.2.2.2.7 Mutaciones en el complejo de la cohesina.**

La cohesina es un complejo de proteínas involucrado en la separación de las cromátidas, y de mediar su unión en la metafase. Es pues uno de los complejos proteicos responsables de mantener la estructura de los cromosomas, y su estructura consta de dos proteínas de gran tamaño, SMC1A y SMC3, encargadas de dar estabilidad estructural a las cromátidas y de otras dos proteínas STAG1/STAG2, con función de adaptar el complejo (Thota et al., 2014).

Dado esta función de estabilizar cromátidas durante la mitosis, se ha postulado su relación con cariotipos complejos e inestabilidad cromosómica. Sin embargo, los trabajos más sólidos hasta la fecha han descartado esta asociación, por lo que en la actualidad su mecanismo de acción en la leucemogénesis continua siendo desconocido, si bien parece juegan un papel en la evolución clonal, siendo más frecuentes en las recaídas que en el momento del diagnóstico, por lo que se les postula como lesiones cooperantes, más que iniciadoras (Thol et al., 2014; Thota et al., 2014).

### ***2.3 Sobreexpresión de genes en LMA. Utilidad de la sobreexpresión de genes en el manejo clínico de LMA. Arrays de expresión y clasificación. Los genes MN1 y BAALC.***

#### **2.3.1 Expresión de genes. Técnicas de estudio en ARNm**

El dogma central de la biología molecular propuesto por Francis Crick en 1970 asume que existe unidireccionalidad en la expresión de la información contenida en los genes, es decir, el ADN es transcrito a ARN mensajero (ARNm) (transcripción) y que éste es traducido a proteína (traducción), elemento que finalmente realiza la acción celular. El

dogma también postula que sólo el ADN puede duplicarse y, por tanto transmitir la información genética a la descendencia (Crick, 1970).

Por tanto el estudio de la expresión de un gen se realiza a partir de la cuantificación del número de copias de ARNm presentes en un momento concreto. Esta idea, es válida si seguimos el dogma propuesto por F. Crick, sin embargo, no tiene en cuenta muchas otras variables biológicas que hoy en día sabemos presentes y que influyen tanto en el proceso de transcripción, como la presencia del ARN de interferencia, como posterior a la traducción, con modificaciones estructurales de las proteínas llevadas a cabo en organelas como el órgano de Golgi y que acaban induciendo cambios en la función de la proteína (D.L. Nelson, 2014).

Si bien está extendido el concepto de genoma humano, no cabe hablar de transcriptoma humano, ya que dentro de un mismo individuo cada tejido va a tener un perfil de expresión característico que incluso puede cambiar en virtud del momento y de la situación funcional.

Las técnicas que disponemos para el estudio las podemos agrupar en dos tipos.

- Técnicas basadas en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR).
- Técnicas de arrays masivos basados en hibridación en placa (microarrays).

En líneas generales se asume que el estudio basado en arrays es válido para análisis de la situación transcripcional completa de una célula o tejido en un momento concreto por su capacidad de analizar la expresión de cientos o incluso miles de genes, de tal manera que con las técnicas actuales se ha introducido el concepto de “Gene Expression Profile” (GEP), mientras que las técnicas de cuantificación por qPCR, permiten estudiar de manera individualizada la expresión de un gen concreto, por lo que se recomiendan como válidas para la confirmación de los hallazgos obtenidos previamente por GEP.

Es importante también remarcar otras diferencias prácticas. En la actualidad los estudios de GEP están basados en plataformas comerciales lo que ha permitido disponer de técnicas estandarizadas, posibilitando trabajar con valores reproducibles lo que facilita contrastar y comparar resultados entre distintos laboratorios e incluso entre distintas plataformas comerciales (Bacher, Kohlmann, & Haferlach, 2009). Sin embargo en la tecnología de qPCR la definición de un valor estándar de niveles de expresión es más compleja y requiere de esfuerzos de coordinación entre los laboratorios implicados como por ejemplo ha sido el trabajo cooperativo internacional por desarrollar un modelo de cuantificación de los transcritos de BCR-ABL para el diagnóstico y seguimiento de la Leucemia mieloide crónica (Müller et al., 2007).

### **2.3.2 Perfiles de expresión: Gene Expression Profile (GEP) en LMA**

Los primeros trabajos en los que se demostró la potencial utilidad de GEP en pacientes con neoplasias, y en concreto en leucemias agudas fue publicado en 1999 por Golub et al quienes con un set inicial de 38 muestras de pacientes con LMA (11) y LLA (27) tras aplicar un array con más de 6800 genes fueron capaces de clasificar correctamente las 38 muestras como LLA y LMA usando sólo 50 genes. En sus conclusiones estos autores postulan por primera vez “es posible clasificar un cáncer basándonos exclusivamente en su perfil de expresión” (T. R. Golub, M. Gaasenbeek, J. R. Downing, & Lander, 1999).

En años sucesivos han ido saliendo numerosas publicaciones en los que se profundiza en la utilidad de los GEP en LMA, pero a modo de resumen esta tecnología ha conseguido dos grandes objetivos (Bacher et al., 2009):

#### **a) Clasificación morfológica**

Desde el estudio inicial de Golub, los trabajos publicados con las distintas plataformas disponibles en el mercado han ido mejorando su capacidad de demostrar correspondencia con los subtipos morfológicos y genéticos de LMA.

El mejor ejemplo de la capacidad diagnóstica de estas técnicas fue diseñado por un grupo cooperativo internacional Microarray Innovations in Leukemia (MILE) donde 11 laboratorios de diferentes países analizaron más de 3000 muestras de pacientes con distintos tipos de leucemias, alcanzando un elevado grado de concordancia para el grupo morfológico de las Leucemias Agudas (sensibilidad del 95,6% y una especificidad del 99,8 %), por lo que se concluyen que “los perfiles de expresión génica (GEP) son una tecnología robusta para el diagnóstico de neoplasias malignas hematológicas” (T. Haferlach et al., 2010).

Esta fiabilidad a la hora de clasificar correctamente las LMA según su grupo morfológico, también se ha conseguido para las algunas de las principales alteraciones citogenéticas recurrentes en la LMA, pero casi exclusivamente referidos a los cariotipos de buen pronóstico tipo CBF, t(15;17) y mutaciones de CEBPA, No obstante, es especialmente poco fiable para FLT3, RAS, y alteraciones citogenéticas recurrentes como las alteraciones del 3q, -5, -7 y cariotipos complejos (Verhaak et al., 2009).

#### **b) Clasificación pronóstica.**

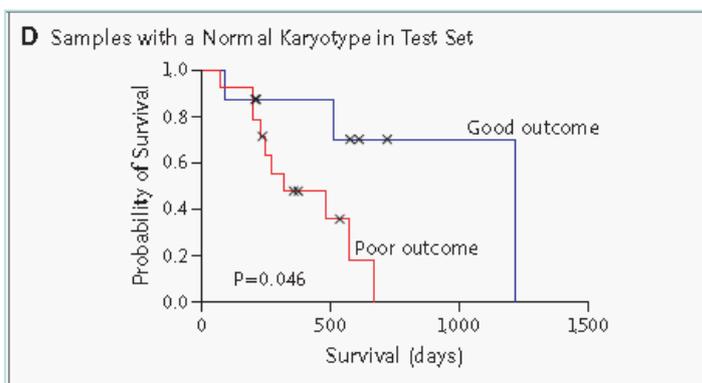
En el año 2004 el New England Journal of Medicine publicó simultáneamente dos trabajos basados en estudio de GEP en pacientes con LMA de similar metodología y conclusiones.

Los estudios fueron llevados a cabo por el grupo HOVON encabezado por Bob Löwenberg y Peter Valk (Valk et al., 2004) y por el grupo alemán de Ulm ALMSG, dirigido por Lars Bullinger, y Konstanze Dohner (Lars Bullinger & Robert Tibshirani, 2004).

Los autores holandeses observaron que los 16 cluster en los que agrupan a los pacientes según su GEP, mostraban diferentes probabilidades de supervivencia, hecho que se fundamentaba en que los cluster venían “dirigidos” por la presencia de alteraciones citogenéticas recurrentes como las CBF, por mutaciones en CEBPA o por la

sobreexpresión del gen *EVI1*, por lo que los cluster asociados a tales eventos mantenían esa significación.

Los autores alemanes también consiguieron identificar los pacientes asociados a alteraciones genéticas de buen pronóstico, pero observaron que dentro del grupo con cariotipo normal encontraron dos clúster con diferente probabilidad de supervivencia, concluyendo que el estudio mediante GEP en los pacientes con LMA y citogenética normal, mejora la información pronóstica de los estudios moleculares (Lars Bullinger & Robert Tibshirani, 2004).



**Figura 2.29 Probabilidad de supervivencia para los pacientes con cariotipo normal según su perfil de expresión definido por GEP en estudio del grupo de Ulm. Cohorte de validación (Lars Bullinger & Robert Tibshirani, 2004)**

Tras la aparición de estos dos trabajos, han seguido desarrollándose investigaciones para aclarar la utilidad de esta herramienta en el manejo clínico de la LMA.

El trabajo más ambicioso ha sido publicado recientemente, en el que se comparaban resultados de distintos laboratorios y plataformas comerciales en pacientes tratados con protocolos intensivos de distintos países, para conseguir una adecuada validación cruzada.

Finalmente, se concluyó que con un array de sólo 24 genes esta tecnología es superior a la clasificación propuesta por al European LeukemiaNET y permite asignar con mayor fiabilidad a los pacientes a la terapia post-remisión más adecuada (Li et al., 2013).

En definitiva, los estudios basados en los arrays masivos de expresión han demostrado su utilidad como clasificadores, tanto de los distintos grupos morfológicos como de los principales hallazgos citogenéticos y moleculares de buen pronóstico.

Además, parecen aportar una información pronóstica, en especial en el grupo de pacientes con cariotipo normal, que en opinión de algunos autores pueden ayudar en la “difícil selección de pacientes con LMA en primera remisión completa que deben recibir Alo-TPH” (Bacher et al., 2009). Sin embargo, en el momento actual todavía no están incluidos en la práctica clínica asistencial, ya que requieren establecer una validación prospectiva en una cohorte independiente para poder alcanzar la fase definitiva de desarrollo comercial e incorporarse a las guías.

### **2.3.3 Sobreexpresión de genes en LMA**

Como se explicó previamente, además de las técnicas de arrays masivos, podemos analizar la expresión de genes de manera individualizada mediante el estudio por técnicas de PCR cuantitativa del número de copias de ARNm del gen a estudio normalizado frente a un gen control y comparada con una población de referencia (Prelich, 2012).

En pacientes con LMA se han identificado varios genes cuya expresión puede implicar cambios en el pronóstico de la LMA, y por tanto en el manejo clínico de los pacientes. Entre estos caben destacar los siguientes: *EVI1*, *ERG*, *PRAME*, *WT1*, *MN1* y *BAALC*.

A continuación se citan algunos de estos genes con referencia a los trabajos y autores más destacados. En los apartados siguientes de esta revisión se describirán con más detalle y profundidad los resultados y evidencia disponibles para los genes *MN1* y *BAALC*.

#### a) Sobreexpresión de *EVI1*.

El protooncogén *EVI1* se encuentra localizado en el cromosoma 3q26 y está desregulado en prácticamente todas las LMA con *inv(3)(q21q26.2)* o presencia de la *t(3,3)(q21;q26.2)*. Presenta varias transcritos alternativos de los cuales principalmente

se ha validado en diversos trabajos el impacto pronóstico del EVI1, mientras que el MSD-EVI1 parece perder su significación pronóstica.

La frecuencia global de sobreexpresión se sitúa en el 8% de los pacientes con LMA *de novo*, independientemente del cariotipo. Los trabajos sobre su papel en LMA han sido iniciados por el grupo HOVON, mostrando una peor SLP y global estadísticamente significativa en estudios basados en sus cohortes históricas de más de 500 pacientes y han sido posteriormente confirmados en varias series de otros grupos analizados de manera retrospectiva.

Además trabajos basados en GEP, han identificados cluster específicos en los que la presencia de la sobreexpresión de EVI1 es el principal evento molecular, de tal manera que varios autores recomiendan su inclusión en las guías clínicas asistenciales para orientar el tratamiento post-remisión de los pacientes. (David Grimwade & Hills, 2009; Gröschel S, 2010; T. H. Guido Marcucci, Hartmut Döhner, 2011; Lugthart S, 2008).

#### b) Sobreexpresión de *ERG*

El gen *Erg* pertenece a la familia de factores de transcripción ETS con actividad reconocida en los procesos celulares de proliferación, diferenciación y apoptosis.

Su papel pronóstico ha sido estudiado por autores del grupo cooperativo CALGB quienes ya en 2005 defendieron su papel en los pacientes con LMA y cariotipo normal, y lo corroboraron mediante técnicas de cuantificación por PCR en 2007 en una cohorte independiente. Se observó peor probabilidad de SLP y global para aquellos pacientes con niveles de expresión por encima del percentil 75 de la serie (Marcucci G, 2007). En 2009 autores alemanes del grupo AMLCG, corroboraron estos hallazgos mediante técnicas de arrays de oligonucleótidos (T. H. Guido Marcucci, Hartmut Döhner, 2011). No obstante, resultados publicados por el grupo de Salamanca no consiguieron validar estos resultados (Santamaria et al., 2009).

#### c) Sobreexpresión *WT1*

El gen WT1 o Tumor de Wilm's, se encuentra localizado en el cromosoma 11p13 y codifica para un factor de transcripción en dedos de Zinc conocido por jugar un papel clave en el control de la apoptosis a nivel celular. Es uno de los genes encontrados como frecuentemente mutados en el estudio TCGA para la LMA, (frecuencia aproximada del 5%), agrupado junto a otros genes supresores tumorales como *TP53* (Cancer Genome Atlas Research, 2013), previamente se habían publicado resultados de importancia pronóstica en relación a su sobreexpresión.

Los primeros trabajos en este campo corresponden a autores alemanes, quienes en 1997 demostraron que elevados niveles de expresión de WT1 al diagnóstico en una serie que incluía pacientes tanto con LLA como LMA, mostraban peor SLP y SG. Ya en este trabajo, los autores comprobaron que el nivel de expresión de WT1 era un marcador potencialmente fiable y estable para predecir la posibilidad de recaída, sugiriendo un papel como marcador de enfermedad mínima residual (Bergmann et al., 1997). Similares hallazgos han sido reportados por autores británicos (Garg, Moore, Tobal, & Yin, 2003) españoles (Barragán et al., 2004) o chinos (Lyu et al., 2014).

En la actualidad, es un tema de investigación su utilidad como potencial marcador de seguimiento de enfermedad mínima residual y predictor de recaída, con trabajos recientes que avalan su utilidad (Lambert et al., 2014).

#### d) Sobreexpresión *PRAME*

El gen *PRAME* fue descrito por primera vez en el contexto de pacientes con melanoma en el año 1997. Se encuentra localizado en la región 22q11 y codifica para una proteína que participa en el reconocimiento y presentación de antígenos a los linfocitos citotóxicos. Varios grupos han demostrado niveles elevados en células leucémicas e incluso algunos autores han observado menores probabilidades de SLP y SG para aquellos pacientes con niveles de expresión más elevados (Paydas et al., 2005), si bien otros autores como el trabajo anteriormente referido del grupo de Salamanca no reprodujeron esos resultados (Santamaria et al., 2009).

En definitiva, a pesar de que la evidencia disponible se sostiene sobre trabajos de base retrospectiva, cada vez más autores reclaman que estos marcadores de expresión deben ser incluidos en la batería de pruebas diagnósticas a realizar en los pacientes con LMA, aunque continua siendo un tema de debate abierto (Dohner et al., 2010; David Grimwade & Hills, 2009; T. H. Guido Marcucci, Hartmut Döhner, 2011; Mrozek, Marcucci, Paschka, Whitman, & Bloomfield, 2007).

#### **2.3.4 MN1**

El gen *MN1* se encuentra situado en el cromosoma 22 en la banda 22q12, y codifica una proteína nuclear de 136 kDa, que se encuentra altamente conservada entre vertebrados. Su nombre “meningioma1” hace referencia a que fue identificado por primera vez en un paciente con meningioma portador de la translocación t(4;22)(p16;q11) (Heuser et al., 2006).

Su función exacta continua siendo desconocida, y se ha postulado su papel con los receptores nucleares ligados al ácido retinoico (RAR-RXR) por presentar una secuencia de nucleótidos de la que se deduce una similitud estructural (Grosveld, 2007).

Su implicación en la hematopoyesis se ha definido a través de dos tipos de evidencias.

En primer lugar, la vía de los receptores del ácido retinoico es una de las principales vías fisiológicas encargadas del control de la proliferación y maduración celular, con funciones bien establecidas en el desarrollo embrionario en especial de las estructuras derivadas del tubo neural.

Los receptores del ácido retinoico (RAR) y receptores retinoides X (RXR), son factores de transcripción nucleares con capacidad de reconocer al ácido retinoico, que a su vez es metabolizado a partir de carotenoides y retinoides, y unirse a regiones concretas del ADN (Das et al., 2014) ejerciendo una función activadora o represora de la transcripción según las interacciones con coactivadores y correpresores. En este grupo de co-metabolitos se incluye a *MN1*, dado que se ha descrito su interacción con coactivadores de los receptores RAR/RXR como P300 y RAC3 (van Wely et al., 2003),

siendo esta la vía por lo cual regularía la expresión de genes claves en la hematopoyesis.

Y en segundo lugar, se ha documentado niveles de expresión de *MN1* elevados en células madre de la hematopoyesis en estadios iniciales, mientras que en estados más avanzados de la hematopoyesis ni en los elementos presentes en sangre periférica es prácticamente ausente (Heuser et al., 2006), lo cual sugiere un papel clave en mantener las capacidades funcionales de las células stem.

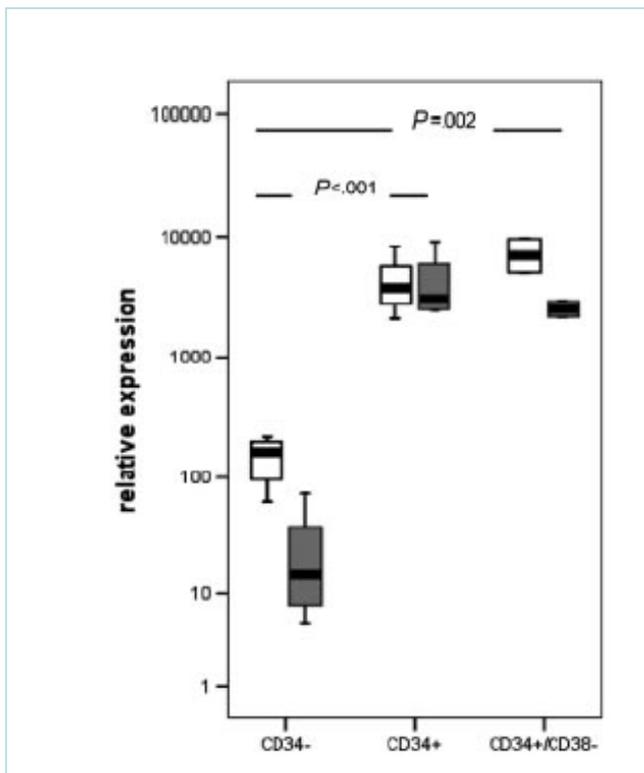


Figura 2.30 Niveles de expresión de CD34 (gris) y MN1 en muestras de donantes sanos. Se observa diferencias significativas según sean la expresión de CD34. Gráfica extraída del trabajo original (Heuser et al., 2006)

En lo referente a que genes son modulados por la acción de MN1 los resultados no son concluyentes. Magda A.Meester-Smoor et al demostraron en 2008, que *MN1* puede tener una acción dual, potenciando e inhibiendo la expresión de genes claves en la hematopoyesis entre los que encontraron un marcado aumento de la expresión de *BMI1*, *SPAG6*, *DNAJC1* y *COMMD3* (Magda A. Meester-Smoor et al., 2008). Por su parte Liu et al mediante técnicas de arrays de, observaron aumento de expresión de genes como *FLT3* y *CD34*, postulándolos como posibles dianas “downstream” de MN1 (Liu et al., 2010).

Por último en modelos murinos, Suzan Imren et al, demostraron que inducir la sobreexpresión de *MN1* en células hematopoyéticas CD34+ es capaz de promover las capacidades de auto renovación e inhibir la diferenciación al mantenerlas en cultivos *in vitro* (Imren et al., 2014) lo cual constituye una prueba de que participa en la maquinaria genética necesaria para mantener el fenotipo stem.

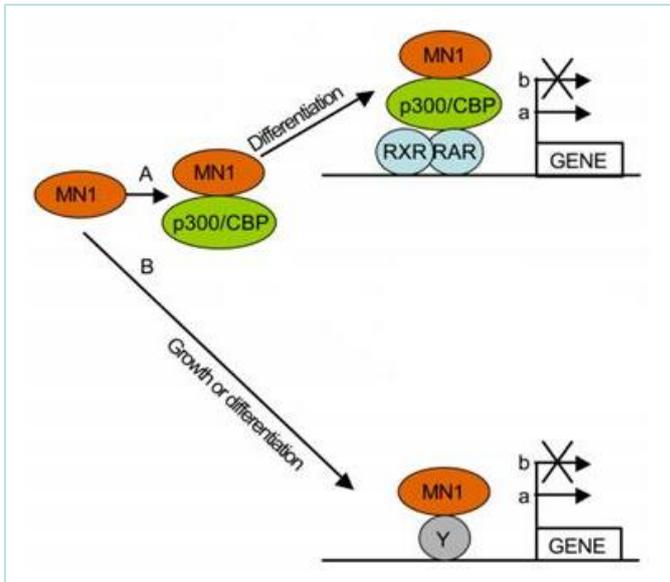


Figura 2.31 Esquema del mecanismo de acción de MN1. A) unido al cofactor p300 se une a receptores nucleares RAR/RXR sobre los que inducirá una acción positiva o negativa de la transcripción. B) Unión directa sobre factores de transcripción aún no identificados y modulación de la expresión. Adaptado de G. Grosveld et al 2007.

Su papel en la LMA se puso de relieve por primera vez en relación a la descripción de la translocación t(12;22)(p13;q11) cuyo resultado es la proteína de fusión MN1-TEL, a partir de lo cual se ha estudiado en distintos modelos el mecanismo a partir del cual interviene *MN1* en la leucemogénesis.

En primer lugar a partir del estudio de las consecuencias de la **proteína de fusión MN1-TEL** resultante de la t(12;22)(p13;q11). Trabajos de ingeniería genética en modelos murinos han permitido la inserción de la proteína quimérica para poder estudiar sus consecuencias desde el desarrollo embriológico. Así Hiroyuki Kawagoe y Gerard C. Grosveld demostraron que MN1-TEL puede ser considerado como un oncogén sobre la hematopoyesis al demostrar que esta proteína de fusión era capaz de generar fenotipos de expansión mieloide y linfoide a partir de progenitores, si bien por sí sola no era capaz de generar un cuadro de leucemia aguda, siendo necesario el desarrollo de mutaciones cooperantes (Kawagoe & Grosveld, 2005b).

Estos mismos autores crearon un modelo de leucemogénesis secuencial a partir de *MN1* mediante la asociación de la proteína MN1-TEL con la sobreexpresión de *HOXA9* que fue capaz de generar LMA en animales (Kawagoe & Grosveld, 2005a).

De igual manera se ha demostrado que la **sobreexpresión de MN1** puede actuar funcionalmente como un oncogén para la hematopoyesis.

Michael Heuser et al demostraron que la inserción mediante retrovirus del gen *MN1* en modelos animales, era capaz de inducir un fenotipo de LMA con una latencia atenuada, y que lo hace induciendo dos tipos de cambios en las células leucémicas, en primer lugar promoviendo la capacidad de auto renovación y proliferación y bloqueando la diferenciación. Esta doble acción justifica, según estos autores que se pueda generar un modelo de LMA animal con un solo hit genético. De hecho en sus conclusiones, se refieren a *MN1* como uno de los más poderosos oncogenes hematológicos descritos hasta la fecha (Heuser et al., 2007).

Otros autores también han demostrado el efecto leucemógeno de la sobreexpresión de *MN1* pero en mecanismo de doble-hit. Por ejemplo, Suzan Imren et al demostraron que el trasplante de células CD34+ con inserción por retrovirus de *MN1+*, desarrollaba en los animales un fenotipo transitorio similar a un sdr mieloproliferativo (Imren et al., 2014), pero cuando asociaban además la expresión de un gen HOX, en concreto *NUP98HOXD13*, la transferencia de estas células generaba un fenotipo de LMA.

Hallazgos similares son los aportados por Liu et al, que consiguen desarrollar el fenotipo de LMA con la asociación de la sobreexpresión de *MN1* y el transcrito MLL-ENL (Liu et al., 2010). O por C. Carrella et al que asociando a la sobreexpresión de *MN1* el gen quimérico *Cbfb-SMMHC*, generó un modelo de LMA de desarrollo rápido y con fenotipo similar al característico de la LMA CBF con inv16 (Carella et al., 2007).

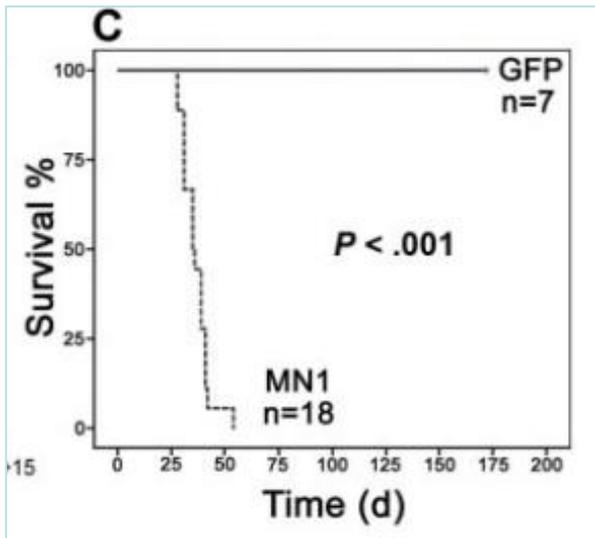


Figura 2.32 Ejemplo de experimento de en modelos animales con transfeccion por retrovirus del gen MN1 comparada con controles sanos (GFP), tiempo hasta muerte por desarrollo de LMA. (Heuser et al., 2007)

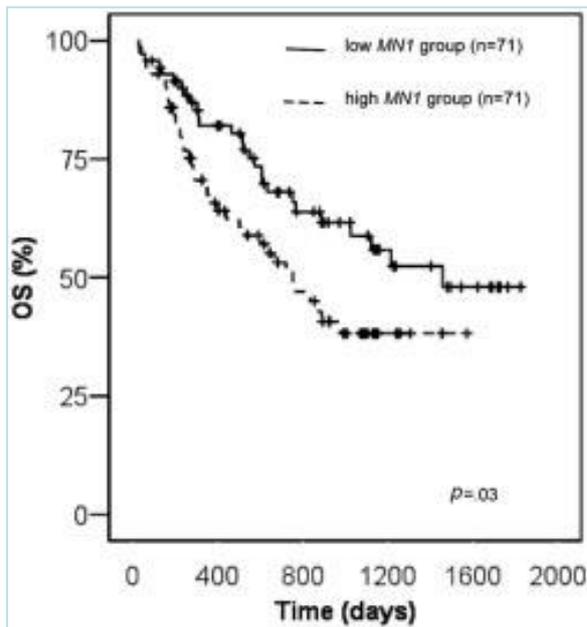
Además de esta evidencia obtenida de modelos *in vitro* y animales, se ha estudiado el impacto **pronóstico que la sobreexpresión de MN1**, definida a partir del número de copias de ARNm, tiene en grupos de pacientes afectados de LMA uniformemente tratadas.

Los trabajos iniciales en este sentido corresponden a Michael Heuser et al del grupo cooperativo alemán AML-SHG en el año 2006 y fueron seguidos por trabajos del CALGB, Christian Langer et al en el año 2009, a los que se han ido sumando distintas series de otros grupos cooperativos y estudios unicéntricos.

M .Heuser estudió una cohorte de 142 pacientes jóvenes con cariotipo normal, en el que tras análisis de la expresión de ARNm de *MN1* mediante técnicas de qPCR, definieron el criterio de sobreexpresión del gen a partir del valor de la mediana poblacional, obteniendo una aproximación dicotómica de esta serie.

Los resultados mostraron una menor tasa de remisión completa tras el ciclo de inducción (87,3% vs 71,8%  $p=0,02$ ), mayor tasa de recaída (56.1% versus 36.5%,  $P=0.03$ ) y menor supervivencia global (38.1% versus 58.8% a 3 los años,  $P=0.03$ ) para el grupo definido como sobreexpresión de MN1.

Además, en lo referente a las características biológicas de la LMA, no encontraron diferencias en el número de leucocitos, edad, distribución por sexos, subtipos morfológicos o número de blastos al diagnóstico. Sí encontraron asociación significativa con la presencia de NPM1 germinal y con alta expresión de CD34+ por los blastos leucémicos (Heuser et al., 2006).



**Figura 2.33** Probabilidad de supervivencia según el nivel de expresión de MN1 en la serie original estudiada por M. Heuser. Obsérvese la distribución dicotómica de la serie. (Heuser et al., 2006).

A continuación, los autores del grupo CALGB reprodujeron estos resultados en una serie de 119 pacientes con LMA con cariotipo normal, igualmente de manera retrospectiva, en una cohorte con tratamiento homogéneo (Langer et al., 2009).

Si bien los resultados en términos de tasa de remisión completa, SLP y SG son reproducibles a los del trabajo original, es de interés remarcar ciertas diferencias metodológicas.

En primer lugar, estos autores consideran los niveles de expresión como una variable cuantitativa, no cualitativa y reproducen los resultados a partir de aquellos por debajo del percentil 25 de la variable (SG a los 5 años del 80% frente al 40%).

Y en segundo lugar tuvieron la posibilidad de profundizar en los hallazgos biológicos y las asociaciones de MN1 mediante la realización de arrays de expresión, encontrando una fuerte asociación entre los niveles elevados de *MN1* y *BAALC*, y además confirmaron asociación con el genotipo *NPM1* germinal.

Por último, el impacto pronóstico en este trabajo se mantuvo tras hacer análisis multivariable, conservando la significación tanto para tasa de RC, SLP y SG.

En los años siguientes han continuado publicándose trabajos que exploran el papel de MN1. En general, estos trabajos consisten en análisis retrospectivos de series de pacientes homogéneamente tratados en los que los autores estudian MN1 en el contexto de análisis de múltiples variables, con la finalidad de determinar, primero el impacto individual de cada una de ellas en la SG y SLP, y a partir de ahí construir modelos predictivos para optimizar la estratificación pronóstica de los pacientes en especial del grupo de riesgo intermedio.

En el año 2009, autores del grupo de Salamanca encabezados por Jesús San Miguel y Marcos González, proponen un modelo de estratificación para LMA de riesgo citogenético intermedio, tras estudiar marcadores que incluían la sobreexpresión de los genes *ERG*, *EVI1*, *MLL-PTD*, *MN1*, *PRAME*, *RHAMM*, y *WT1*, en una cohorte de 121 pacientes tratados de acuerdo al protocolo PETHEMA LMA 99 (Santamaria et al., 2009). En el análisis bivalente, MN1 no demostró significación estadística ni para SLP ni SG, por lo que no fue incluido en el modelo predictivo propuesto en el que si se incluyeron *ERG*, *EVI1* y *PRAME* (Santamaria et al., 2009).

El grupo HOVON en el año 2011, a partir del estudio de las muestras de 439 pacientes tratados conforme a sus protocolos desde 1986 hasta 2006, e incluyendo cualquier tipo de citogenética construyeron un modelo pronóstico a partir de los niveles de expresión de los genes *EVI1*, *WT1*, *BCL2*, *ABCB1*, *BAALC*, *FLT3*, *CD34*, *INDO*, *ERG* y *MN1*, y las mutaciones en *FLT3*, *NPM1*, *N-RAS*, *K-RAS*, *IDH1*, *IDH2*, *CEBPA*.

En el análisis bivalente, la sobreexpresión de *MN1* mostró significación estadística para peor SG y SLP, en especial para aquellos pacientes con cariotipos de riesgo intermedio. Sin embargo, tras el ajuste estadístico multivariante *MN1* perdió la significación estadística y no fue incorporado al modelo predictivo en el que si se incluyeron niveles de expresión de CD34 y mutaciones de IDH2 y CEBPA (Rockova et al., 2011).

Similar aproximación realizaron los grupos AML SHG y HOVON-SAKK, para pacientes con LMA de riesgo intermedio en los que analizaron las mutaciones *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *MLL*, *NRAS*, *IDH1/2*, y *WT1*, junto con los niveles de expresión de *BAALC*, *ERG*, *EVI1*, *ID1*, *MN1*, *PRAME* y *WT1*, medidos a por qPCR y definidos a partir del valor de la mediana poblacional. En este estudio, la sobreexpresión de *MN1* sí demostró un impacto en la SG por lo que se incluyó en el score predictivo (Damm et al., 2011).

Haferlach et al estudiaron la sobreexpresión de *MN1*, *BAALC*, *CDKN1B*, y *ERG* con independencia del grupo citogenético. Se definió sobreexpresión a partir del percentil 50 del valor de la serie, con una distribución dicotómica. El análisis para el gen *MN1*, demostró impacto estadísticamente significativo tanto para SLP como SG, que se conservó al completar el estudio multivariante por lo que estos autores lo incluyen en su modelo predictivo (C. Haferlach et al., 2012).

Para finalizar la revisión sobre el impacto pronóstico, recientemente se han publicado tres nuevos trabajos, basados en tecnología de qPCR y asignación dicotómica a partir del valor de la mediana de la población de pacientes con LMA a estudio. Autores del CALGB, demostraron que en pacientes mayores de 60 años, bajos niveles de expresión de *MN1* se asocia mayor probabilidad de respuesta y por tanto mejor probabilidad de supervivencia (Schwind et al., 2011), autores chinos reproducen el impacto pronóstico en pacientes jóvenes tanto en tasa de RC, de SG y de recaída, (Xiang et al., 2013), y por últimos autores egipcios reprodujeron resultados pronósticos con la novedad de definir un punto de corte a partir de técnicas de qPCR (Aref, Ibrahim, Morkes, Azmy, & Ebrahim, 2013).

En último lugar, tras revisar la evidencia de su papel pronóstico en pacientes con LMA, a continuación resumiremos su posible papel como **marcador biológico para selección tratamiento**.

Ya se ha explicado con anterioridad como MN1 actúa a través de la vía de los receptores nucleares RAR/RXR modulando su actividad al actuar como coactivador/correspresor (van Wely et al., 2003), siendo esta la diana molecular de acción del Ácido al-trans-retinoico (ATRA) de uso clave en el tratamiento de la leucemia aguda promielocítica t(15;17) PML-RAR $\alpha$  (Miguel A. Sanz et al., 2004).

En los últimos años, varios grupos cooperativos han testado la posibilidad de incorporar el ATRA al tratamiento de las LMA sin presencia de la t(15;17) PML-RAR $\alpha$ . Si bien los resultados clínicos publicados hasta la fecha no avalan su uso, análisis a posteriori en los que se han ido incluyendo nuevas variables biológicas, como MN1 han aportado información que puede avalar su uso en subgrupos de pacientes.

En 2007 M. Heuser et al analizaron retrospectivamente una cohorte de 83 pacientes con LMA y mayores de 60 años tratados con quimioterapia intensiva y randomizados a recibir ATRA como tratamiento asociado. Si bien no encontraron diferencias en probabilidad de supervivencia ni de remisión completa según los niveles de expresión de MN1, cuando se analizaba a los pacientes con bajo nivel y que recibieron tratamiento con ATRA si presentaban un aumento significativo en la probabilidad tanto de SLP como de SG frente a los otros grupos de pacientes (Heuser et al., 2007).

Tras la publicación de este trabajo, el grupo británico revisó su experiencia en un grupo de pacientes de similares características (n=196) pero menores de 60 años y con un diseño de ensayo clínico similar con randomización a recibir ATRA o no. En su publicación, aunque no encontraron impacto pronóstico para la sobreexpresión de MN1, ni efecto del tratamiento con ATRA en términos de SG o tasa de RC, si encontraron una ventaja estadísticamente significativa en términos de SLP, justo para aquellos pacientes con bajos niveles de MN1 y asignados a recibir tratamiento con ATRA (Carol Guy, 2008).

En definitiva, estas observaciones obtenidas a partir de dos ensayos clínicos sólidamente diseñados de dos grupos cooperativos independientes, y congruentes con los hallazgos biológicos obtenidos a partir de la experiencia en modelos animales, podrían sugerir la potencial utilidad del ATRA en pacientes seleccionados a partir de sus bajos niveles de expresión de MN1, por lo que este marcador podría no solo jugar un papel como factor pronóstico sino también como biomarcador capaz de seleccionar tratamiento, si bien esto precisa de validación en estudios prospectivos.

Tabla resumen con trabajos publicados sobre la sobreexpresión de MN1 en LMA

	N	Riesgo CG	Impacto RC	Impacto SLP	Impacto SG	Método laboratorio	Definición sobreexpresión	Cut-off
Heuser (2006)	142	Intermedio	SI	SI	SI	qPCR	Mediana (cualitativo)	NO
Guy (2008)	196	Todas	NO	SI +	NO	qPCR	Mediana (cualitativo)	NO
Langer (2009)	119	Intermedio	SI	SI	SI	qPCR	Cuantitativo	NO
Santamaría (2009)	121	Intermedio	NR	NO	NO	qPCR	Mediana (cualitativo)	NO
Rockova (2011)	439	Intermedio	NR	SI *	SI*	Affymetrix GeneChips	Cuantitativo (-2log)	SI
Damm (2011)	568	Intermedio	NR	NR	SI	qPCR/ Affymetrix GeneChips	Mediana (cualitativo)	NO
Schwind (2011)	140	Intermedio	SI	SI	SI	qPCR	Mediana (cualitativo)	NO
Haferlach (2012)	286	Todas	NR	SI	SI	Affymetrix GeneChips	Mediana (cualitativo)	NO
Aref (2013)	100	Intermedio	SI	SI	SI	qPCR	Mediana (cualitativo)	SI
Xiang (2013)	158		SI	SI	SI	qPCR	Mediana (cualitativo)	SI

**Leyenda**

+ impacto estadístico sólo para el subgrupo de pacientes que reciben ATRA

\* impacto estadístico sólo en análisis bivalente. No existe significación tras ajuste por otros factores de riesgo

RC: remisión completa

SLP: Supervivencia libre de progresión

SG: Supervivencia global

NR: No comunicado

**Tabla 2.4** Tabla resumen con los principales trabajos publicados sobre el papel de la sobreexpresión de MN1 en LMA

### **2.3.5 BAALC**

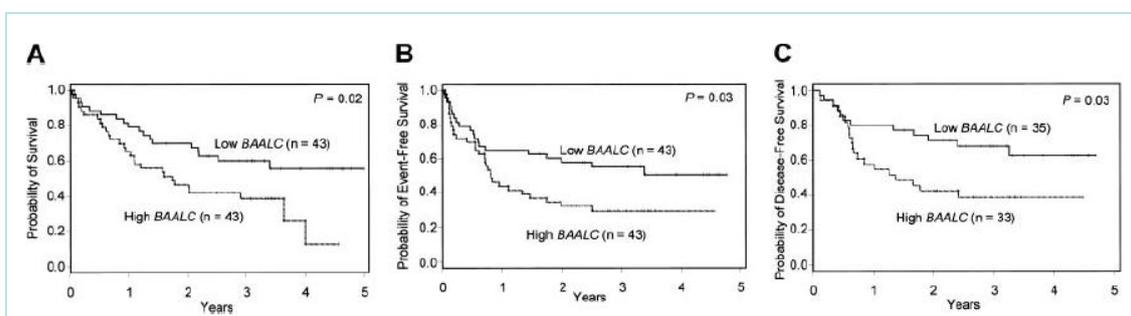
El gen “brain and acute leukemia, cytoplasmic”, *BAALC* se encuentra localizado en el cromosoma 8q22.3 y codifica para una proteína con varios transcritos alternativos, de localización citoplasmática y funciones no claramente conocidas pero relacionadas con el citoesqueleto y mecanismos de adhesión celular. Es un gen altamente conservado entre mamíferos, que no se encuentran en vertebrados inferiores. Su función no está claramente establecido, pero los trabajos iniciales realizados por Tanner et al en 2001 pusieron de relieve su papel en tejidos derivados del neuroectodermo en especial en el sistema nervioso central (SNC), observando aumento de expresión del gen *BAALC* en células del SNC, pero no en otros tejidos derivados del neuroectodermo como glándula suprarrenal. Además demostraron su sobreexpresión fisiológica en progenitores de la hematopoyesis al encontrarla en células CD34+ de médula ósea, pero no en estadios más avanzados ni en poblaciones de leucocitos de sangre periférica, por lo que se ha concluido que en condiciones fisiológicas es un gen clave en mantener la capacidad de proliferar y frenar la diferenciación de las células precursoras de los tejidos cerebrales y de la hematopoyesis (Tanner et al., 2001).

En el contexto de pacientes con LMA, inicialmente se asoció su sobreexpresión con pacientes con trisomía del cromosoma 8, pero en el año 2003, Baldus et al publicaron el primer trabajo de pacientes con LMA y cariotipo normal en el que la sobreexpresión de *BAALC* se asoció a menor probabilidad de SG y menor SLP. De tal manera que concluyeron por primera vez, que la sobreexpresión de *BAALC* predice un pronóstico adverso y puede ser un importante factor de riesgo en el grupo de LMA con cariotipo normal (Baldus et al., 2003).

Para ello analizaron las muestras de 86 pacientes con LMA y cariotipo normal, y estudiaron la expresión de *BAALC* mediante número de copias de ARNm. A continuación definieron como sobreexpresión aquellos situados por encima del valor

de la mediana de la serie, de tal manera que la cohorte quedó dividida en dos grupo iguales.

Posteriormente, autores suizos también sobre una serie homogénea (n=67) de un mismo centro estudiaron el impacto de la sobreexpresión de *BAALC*. Para ello, midieron mediante qPCR los niveles de expresión del gen en una cohorte de donantes sanos en muestras de sangre periférica y médula ósea, a partir de los cuales obtuvieron un valor medio, y definieron como sobreexpresión aquellos valores de ARNm superiores a la mediana de los controles sanos (0,09 en serie).



**Figura 2.34** Graficas del trabajo original de Claudia Baldus en el que se aprecian las diferencias en probabilidad de supervivencia global, libre de evento y de recaída según niveles de expresión de *BAALC* (Baldus et al., 2003)

A pesar de esta diferencia en la metodología seguida para definir sobreexpresión, sus resultados fueron similares a los descritos por C. Baldus, con impacto estadísticamente significativo en la probabilidad de SG, probabilidad de recaída y de SLP para el grupo caracterizado como de alta expresión (Bienz et al., 2005).

En el año 2006, nuevamente Claudia Baldus et al, ampliaron su serie hasta un total de 307 pacientes con LMA y cariotipo normal, en lo que es hasta la fecha la segunda serie más grande publicada y manteniendo su concepción de la sobreexpresión a partir de la mediana del valor de la población de pacientes enfermos.

En esta cohorte ampliada de pacientes, consiguieron revalidar sus hallazgos iniciales en cuanto a SG y probabilidad de recaída, y documentaron por primera vez que *BAALC* se asoció a menor probabilidad de alcanzar la RC con la quimioterapia de inducción (73 %

para el grupo de baja expresión frente a 62 % con una  $p=0,038$ ). Concluyeron que BAALC en conjunto con las mutaciones de FLT3 permitían identificar pacientes de alto riesgo dentro del subgrupo de riesgo intermedio, siendo uno de los factores biológicos más asociados a enfermedad resistente (Baldus et al., 2006).

En los años posteriores, se han seguido publicando trabajos con similares metodologías para intentar aclarar el impacto que BAALC pueda tener sobre los pacientes afectados de LMA, y que han sido recientemente revisados en un metaanálisis publicado por Shi-Ji Xiao.

Del total de 362 estudios encontrados inicialmente en la búsqueda bibliográfica se consideraron válidos para el análisis 15 trabajos con información y metodología correctas. Sin embargo, a pesar de esta selección encontraron varios sesgos, lo que conlleva a un índice de heterogeneidad para el impacto en SG elevado ( $I^2=68\%$ ). Las razones atribuidas por los revisores, son principalmente las siguientes:

- Los trabajos revisados eran todos de diseño retrospectivo.
- No existe una metodología común para definir la sobreexpresión del gen. Si bien 13 usan la misma técnica (qPCR) y sólo 2 microarrays, no existe un valor de corte universal, de tal manera que hasta en 10 trabajos se usa un valor a partir de la propia mediana de la población a estudio, lo cual impide hacer comparaciones cruzadas.
- Grupos de LMA heterogéneos, ya que hasta 5 de los trabajos, no seleccionaban a los pacientes a estudio por citogenética.

Sin embargo a pesar de estas limitaciones metodológicas, los resultados del metaanálisis son congruentes con la bibliografía y demuestran un impacto pronóstico adverso para los pacientes con sobreexpresión. Tanto respecto a la probabilidad de alcanzar la remisión completa (Odds Ratio de 2,28 con IC 95% 1,55-2,45), como menor supervivencia global (HR de 1,95, IC 95% 1,55-2,45) para el global de los 15 estudios. Además, acotado para los pacientes con cariotipo normal mantuvo su significación estadística HR 1,93 (IC 95% 1,39-2,69).

En cuanto a las características biológicas, se observó una tendencia para la asociación de la sobreexpresión del gen con los subtipos morfológicos de la FAB LMA M0, LMA M1 y LMA M2.

No se encontró relación con el número de leucocitos al diagnóstico, así como tampoco con sexo, edad, porcentaje de blastos en sangre periférica o en médula ósea, ni cifra de plaquetas, pero si asociación con presencia de *NPM1* germinal.

En definitiva y en opinión de los autores del meta-análisis, “la sobreexpresión de BAALC sirve como un marcador de mal pronóstico independiente en LMA, y que por ello podría ser aplicado en la evaluación pronóstica clínica y guiar el tratamiento de los pacientes con LMA” (Xiao, Shen, Huang, & Fu, 2015).

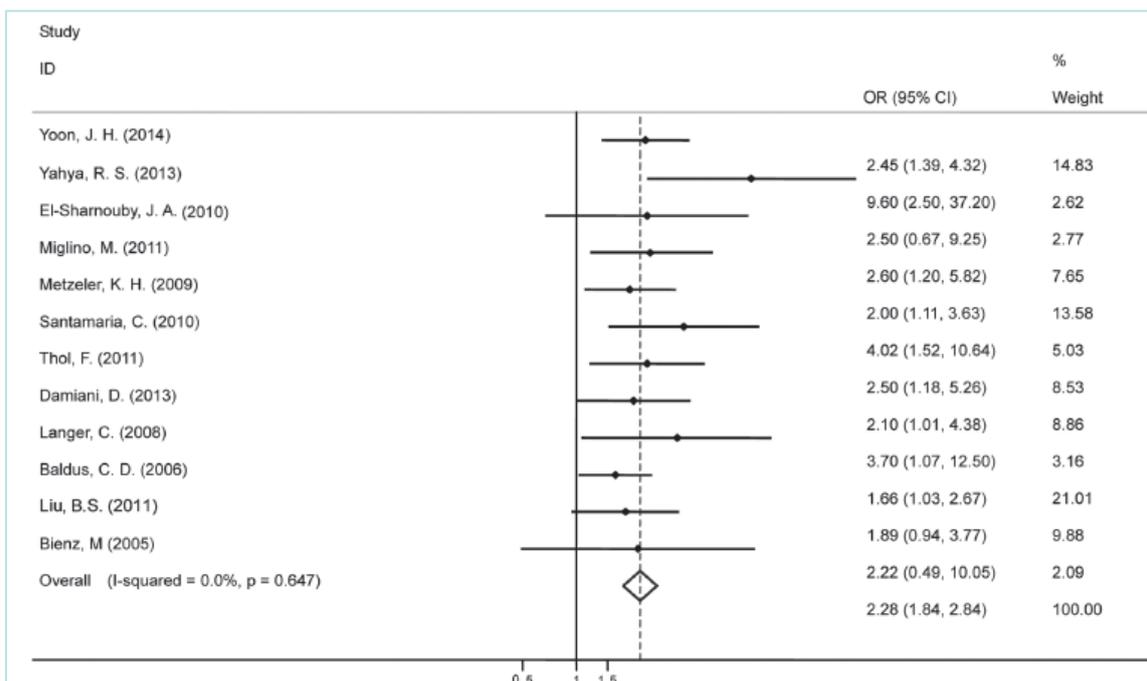


Figura 2.35 Forest plot para la probabilidad de alcanzar remisión completa (Xiao et al., 2015)

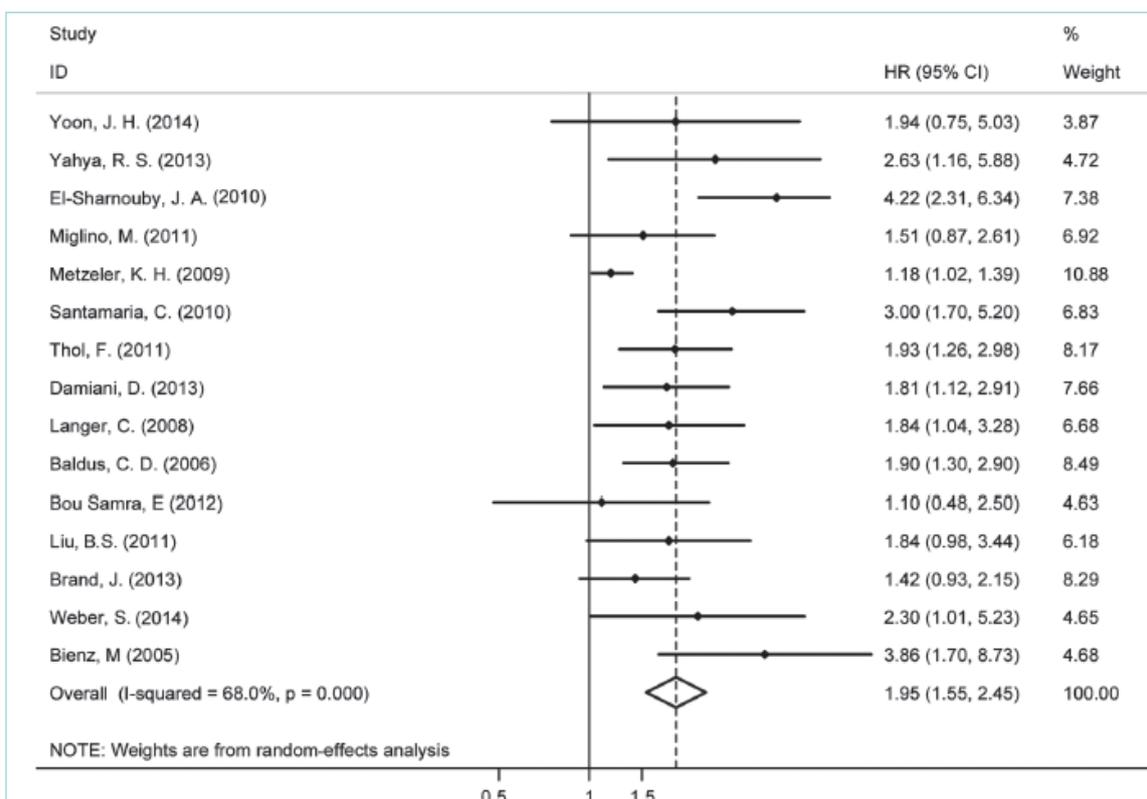


Figura 2.36 Forest plot para la probabilidad de supervivencia global (Xiao, Shen, Huang, & Fu, 2015)

Sin embargo a pesar de esta creciente evidencia a favor de su rol como marcador pronóstico, poco se ha avanzado hacer de cuál es su papel en la leucemogénesis.

Algunos de los hallazgos más relevantes pertenezcan a Heuser et al quienes han postulado que la sobreexpresión de *BAALC* actuaría como agente en el bloqueo madurativo en el proceso de diferenciación de las células mieloides mediante su interacción con el paquete de genes *HOXA* y en concreto *HOXA9* (Heuser et al., 2012). O los trabajos de Christina Langer et al que mediante técnicas de GEP, demostraron que aquellos pacientes con sobreexpresión de *BAALC*, tenían una firma característica en la que se observaba aumento de la expresión de genes asociados a fenotipos de resistencia a drogas (como *MDR1*) y de marcadores propios de célula stems (*CD34*, *KIT*) (Langer et al., 2008).

Sin embargo, estos hallazgos dan solo una idea del amplio abanico de posibilidades por las que *BAALC* puede interactuar en el proceso de leucemogénesis, siendo necesario más investigaciones para cerrar una cuestión todavía abierta.



### **3.- Fundamento del presente trabajo. Utilidad de la sobreexpresión de genes *MN1* y *BAALC* en el manejo de los pacientes con LMA**

Tras más de diez años transcurridos desde la publicación de los primeros resultados de expresión de los genes *MN1* y *BAALC* (Baldus et al., 2003; Heuser et al., 2006) por cuantificación de ARNm en pacientes con LMA, estas determinaciones todavía siguen fuera de la práctica clínica asistencial, permanecen sin ser recomendadas por los distintos grupos cooperativos como necesarias para el abordaje de la LMA, ni por las recomendaciones de expertos de la European LeukemiaNET (Dohner et al., 2010; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010) .

Todo ello a pesar de la evidencia creciente a favor del papel que los cambios de expresión de genes pueden tener en el proceso de leucemogénesis y que podemos resumir en los cinco puntos siguientes.

a) Papel en la hematopoyesis: Tanto *MN1* como *BAALC*, se encuentran sobreexpresadas en las células stem de la hematopoyesis en condiciones normales (Heuser et al., 2006; Tanner et al., 2001).

b) Papel en la Leucemogénesis: Si bien existen más puntos por dilucidar en relación a *BAALC*, en la actualidad existen modelos animales de leucemogénesis a partir de *MN1* lo que constituye una prueba de concepto de su potencial papel como oncogén de la hematopoyesis (Heuser et al., 2012; Imren et al., 2014).

c) Papel en el pronóstico de los pacientes con LMA. Como se ha descrito en las páginas previas, existe abundante literatura, incluyendo un metaanálisis de publicación reciente para *BAALC* en que se aprecia el impacto pronóstico, en especial en términos de SLP y SG de los pacientes asociado a mayores niveles de expresión (Langer et al., 2009; Xiang et al., 2013; Xiao et al., 2015).

d) Plausibilidad biológica: Los estudios de secuenciación masiva de pacientes con LMA, han puesto de manifiesto que las mutaciones en la maquinaria enzimática que regula la expresión génica son un evento extraordinariamente frecuente (Cancer Genome Atlas Research, 2013). Las consecuencias funcionales de estas mutaciones, implican a su vez cambios en las expresiones de genes que juegan papeles claves en las hematopoyesis y que contribuyen al proceso de leucemogénesis (Chen et al., 2010).

e) Potencial papel como marcadores de Enfermedad mínima residual: Existe publicaciones que de manera retrospectiva ha definido puntos de corte con capacidad de anticipar la recaída para los pacientes con sobreexpresión de *BAALC*, *WT1* y *PRAME* (Lapillonne et al., 2006; Weber et al., 2014).

Sin embargo, existe una serie de factores, que pueden explicar el por qué estas determinaciones continúan fuera de la práctica asistencial:

a) Problemas de estandarización.

Si bien la tecnología de cuantificación por PCR de ARNm está ampliamente extendida y validada, la definición de sobreexpresión para cada gen se realiza de manera independiente por cada grupo de trabajo, por lo que los resultados y las mediciones no son extrapolables.

b) Definición de sobreexpresión.

En ese sentido, es importante remarcar, que en muchos trabajos la definición de sobreexpresión se hace en base a un criterio puramente poblacional, de tal manera que se definen como portador de sobreexpresión del gen a los que se encuentran por encima del valor del percentil 50 del conjunto de la serie. Esto implica que cuando enfocamos la necesidad de tomar decisiones en un paciente requerimos del estudio previo de una población de pacientes con LMA para poder definir el patrón de expresión y asignar al nuevo paciente a un grupo de riesgo (Xiao et al., 2015).

c) Tipo de investigación.

Hasta el momento, todos los trabajos publicados con sobreexpresión de genes son retrospectivos, no existiendo datos de estudios prospectivos, ni muchos menos, protocolos asistenciales en los que se incluyan dentro del algoritmo terapéutico.

Por todo ello, se propone el presente trabajo, en el que a partir de una serie de 119 pacientes afectos de LMA, tratados homogéneamente con quimioterapia de inducción basada en la combinación de antraciclínicos y citarabina, se pretende estudiar el papel de la expresión de los genes *MN1* y *BAALC*, en la probabilidad de alcanzar remisión completa, y secundariamente en SLP y SG.

Dado que se trata de una serie retrospectiva, como novedad se investigarán dos valores para definir la sobreexpresión del gen:

- A partir del percentil 50 de la población estudiada como ha sido descrito previamente en la literatura como método estándar.

- A partir de 2,5 desviaciones estándar de la media observada en una población de donantes sanos.

Además se explorará la relación existente entre la respuesta morfológica tras la quimioterapia de inducción y la expresión de ambos genes en el momento de estudio de la respuesta alcanzada y el papel de este nivel de expresión son la SLP y SG y por último, se estudiará el perfil de expresión de los genes *MN1* y *BAALC* en el momento de la recaída, como análisis exploratorio de su potencial papel como marcadores de enfermedad mínima residual, si se confirman como valores estables tanto al diagnóstico como en la recaída.



## 4.- Objetivos

### 4.1 *Objetivo principal:*

Estudiar el Impacto de la sobreexpresión de los genes *MN1* y *BAALC* al diagnóstico sobre la probabilidad de alcanzar la remisión completa morfológica con el primer ciclo de quimioterapia en una serie de pacientes con LMA homogéneamente tratados.

### 4.2 *Objetivos secundarios:*

1.- Comparación de dos métodos de análisis para definir sobreexpresión de los genes estudiados: 1) Desde criterios poblacionales, a partir del percentil 50 de la población estudiada, y 2) Estableciendo como punto de corte + 2,5 desviaciones estándar del valor medio de expresión en un grupo control de pacientes sanos.

2.- Impacto de la sobreexpresión de los genes *MN1* y *BAALC*, al diagnóstico en la supervivencia libre de progresión y supervivencia global.

3.- Asociación entre la sobreexpresión de los genes *MN1* y *BAALC*, tras el primer ciclo de quimioterapia con la respuesta morfológica alcanzada y con supervivencia global y libre de progresión

4.- Asociación entre el perfil de expresión de los genes *MN1* y *BAALC*, al diagnóstico con el existente en el momento de la recaída morfológica.

5.- Comparación de los niveles de expresión de *MN1* y *BAALC* al diagnóstico con los detectados en la evaluación postquimioterapia de inducción y en el momento de la recaída.



## **5.- Material y métodos**

### ***5.1 Planteamiento metodológico y población a estudio***

Se realizó un estudio de tipo retrospectivo transversal sobre una cohorte de 119 pacientes con diagnóstico confirmado de Leucemia Mieloblástica Aguda y tratados con al menos un ciclo de quimioterapia de inducción basado en la combinación entre citarabina en perfusión continua y un antraciclínico. Se incluyeron pacientes tratados en el servicio de Hematología del Hospital Dr. Negrín entre el 1 de enero de 2004 y el 31 de diciembre de 2014, y tratados en el servicio de Hematología del Hospital Insular entre el 1 de enero de 2009 y 31 de diciembre de 2013. Se debía disponer de una muestra válida para análisis de la respuesta morfológica alcanzada tras el primer ciclo de quimioterapia.

No se incluyeron en esta tesis los pacientes con diagnóstico de leucemia promielocítica (LPA) ni aquellos que cumplían alguno de los siguientes criterios:

- Paciente con diagnóstico de LMA y que habiendo recibido quimioterapia de tipo intensivo, no existiese reevaluación de la respuesta obtenida.
- Paciente con diagnóstico de LMA y que habiendo recibido quimioterapia de tipo intensivo, fuera exitus sin poder documentarse la respuesta obtenida al tratamiento quimioterápico.
- Pacientes afectos de sarcoma mieloide sin presencia de enfermedad en médula ósea.

El punto de fin de seguimiento se estableció en mayo de 2015. El trabajo ha sido de tipo observacional, no intervencionista.

### ***5.2 Procedimientos técnicos***

#### **5.2.1 Diagnóstico de LMA**

El diagnóstico de LMA se estableció en base a los criterios definidos por la OMS en sus manuales de referencia para el diagnóstico de las hemopatías malignas en su edición 2001 (Vardiman, Harris, & Brunning, 2002) y 2008 (Arber et al., 2008).

Para establecer el diagnóstico se estudiaron muestras de aspirado de médula ósea, mediante tinción de May-Grünwald Giemsa y se siguieron los criterios morfológicos habituales, mediante recuento en medulograma de 500 células, que requieren un porcentaje de blastos superior al 20%. Los criterios seguidos para la correcta clasificación morfológica se complementaron con los criterios FAB (Bennett et al., 1976). Solamente en los casos en los que no se pudo disponer de muestra de médula ósea se consideró el estudio en sangre periférica como válido, con presencia de más de un 20% de blastos sobre un recuento de 200 células (Dohner et al., 2010). Las técnicas de citoquímica se realizaron a criterio de los hematólogos expertos en citología que valoraron las muestras.

La codificación de las LMA se realizó según la clasificación de la OMS del año 2008 (S.H. Swerdlow, 2008), de tal manera que se definieron los subtipos de LMA en base a los hallazgos morfológicos de manera inicial y sólo tras los hallazgos de la citogenética se incluyeron en el grupo oportuno.

Además, se reconocieron dos entidades ya definidas por la OMS, como son las LMA con displasia multilínea, en la que además de por los hallazgos morfológicos se incluyen los pacientes con historia previa de enfermedades del compartimento de las células stem (SMD o SMD/NMPC), y las LMA secundarias a tratamiento quimio o radioterápico, de tal manera que la clasificación por grupos morfológicos quedó de la siguiente manera tal y como se indica en la tabla 5-1.

<b>Grupo morfológico</b>	<b>TIPO FAB</b>	<b>DIFERENCIACIÓN PREDOMINANTE</b>
<i>LMA mínimamente diferenciada</i>	M0	Serie granulocítica.
<i>LMA sin maduración</i>	M1	Serie granulocítica.
<i>LMA con maduración</i>	M2	Serie granulocítica.
<i>LMA Mielomonocítica</i>	M4	Serie granulocítica y monocítica.
<i>LMA Monoblástica/Monocítica</i>	M5	Serie monocítica.
<i>Leucemia eritroide aguda</i>	M6	Serie eritroide y granulocítica.
<i>LMA Megacarioblástica</i>	M7	Serie megacariocítica.
<i>LMA Basofílica aguda</i>		Serie granulocítica.
<i>Panmielosis aguda con fibrosis</i>		
<i>Con displasia multilínea</i>		Cualquiera

<i>Secundaria a terapia</i>		Cualquiera
-----------------------------	--	------------

**Tabla 5.1 Clasificación morfológica según criterios OMS, independiente de la citogenética y molecular**

### 5.2.2 Análisis citogenético y FISH.

Citogenética: Se basó en el análisis de 2 ml de muestra de médula ósea en Heparina de Litio para estudio citogenético.

Las muestras del hospital Dr. Negrín entre los años 2004 y 2010 se remitieron al Laboratorio externo Balagué Center, y a partir de Julio 2010 y hasta la fecha de fin del presente estudio a Reference Laboratory. Las muestras del Hospital Insular de Gran Canaria se enviaron para estudio al laboratorio externo Reference Laboratory.

Ambos centros cuentan con criterios de trabajo validados por auditorías externas y con certificados de gestión de calidad expedidos por AENOR conformes a las normativas ISO 9001 (desde el año 2000 para Balague Center y desde 1998 para Reference Laboratory).

De manera estándar se consideraron para el análisis 20 metafases. Cuando no se obtuvieron metafases, se investigó la presencia de alteraciones específicas mediante FISH según el criterio del citólogo responsable de estudio de la muestra y en función de los hallazgos morfológicos y clínicos del caso.

FISH: El estudio FISH de las muestras del Hospital Insular se ha realizado en laboratorio externo Reference Laboratory, mientras que para las muestras del Hospital Dr. Negrín hasta el año 2010 se usó estudiaron en el laboratorio Balagué Center. Desde esa fecha hasta 2014 en la sección de biología Molecular y FISH del laboratorio de Hematología del Hospital Dr. Negrín partiendo de 2 ml de muestra de médula ósea en EDTA.

### 5.2.3 Estudio de citometría.

En el momento del diagnóstico se obtuvieron 2 ml de médula ósea conservada en EDTA para el estudio expresión antigénica mediante citometría de flujo.

Aunque desde el año 2012 se disponen de las combinaciones de anticuerpos definidas por consenso y validadas prospectivamente creadas por el grupo Euroflow (van Dongen et al., 2012), las combinaciones de anticuerpos usadas en este estudio generalmente se basaron en las recomendaciones del grupo EGIL (Bene et al., 1995).

## **5.2.4 Estudios moleculares.**

### **5.2.4.1 Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de ADNc.**

En el momento del diagnóstico se remitieron muestras de 2 ml de médula ósea en EDTA al laboratorio de Biología Molecular y FISH del Servicio de Hematología del Hospital Dr. Negrín. El protocolo habitual de trabajo fue el siguiente.

#### a) Extracción de ADN

Se utilizaron dos métodos de extracción de ADN para el estudio de mutaciones.

- Método de Salting-Out: Previa lisis celular y digestión de proteínas por una proteasa, se precipitan las proteínas y detritus en un medio hipertónico, que crea un gradiente de densidad tal que, por la acción de la fuerza centrífuga el ADN se separa del resto de moléculas presentes en el medio, quedando éste contenido en el sobrenadante. A continuación gracias a la acción del isopropanol precipitamos el ADN creando enlaces entre las distintas cadenas, hasta conseguir la formación de una malla ADN que podremos aislar del medio

- Automatizado en un Magna Pure Compact (Roche).

b) Extracción ARN: en nuestro laboratorio este procedimiento se realizó bien con el kit QIAamp ARN Blood Mini (Qiagen) o de manera automatizada en el equipo QIACUBE (Qiagen).

c) Obtención ADN complementario (ADNc): Consiste en la fabricación de una molécula de ADN utilizando como molde el ARN extraído de la muestra problema. En nuestro laboratorio se realizó mediante la acción de la Transcriptasa inversa M-MULV (durante el periodo del estudio se han usado distintas casas comerciales como suministradoras de MULV) con su buffer correspondiente, deoxinucleotidos, inhibidor de RNAsa y hexámeros rándom.

Todas las muestras incluidas en este estudio se trabajaron según este esquema en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Hospital Dr. Negrín, quién cuenta con la acreditación AENOR ISO 9001 desde el año 2010.

#### **5.2.4.2 Mutaciones NPM1 y FLT3.**

En las muestras con cariotipo normal o de riesgo intermedio se determinó la presencia de mutaciones en NPM1 y FLT3 siguiendo las recomendaciones actuales (Dohner et al., 2010).

En nuestro laboratorio el abordaje inicial para la identificación de estas mutaciones se hizo utilizando la High Resolution Melting (HRM) como técnica de cribado empleando para ello el kit Light Cyler High Resolution Melting Master (Roche).

Esta tecnología se basa en la detección de heterodúplex. Las muestras, previamente amplificada por PCR en presencia de un agente intercalante de ADN emisor de fluorescencia, son sometidas a una desnaturalización y rápido enfriamiento, lo que favorece la formación de heterodúplex en caso de existir alguna alteración en una de las secuencias. A continuación se comparan los cambios en la temperatura de fusión de un “wildtype”, de un control positivo y de las muestras en estudio, pudiéndose agrupar según su patrón de fusión. La plataforma empleada para realizarlo es el sistema LightCycler 480 (Roche). El análisis de las curvas de fusión se realizó según el Software Gene Scanning provisto con el aparato LC480 (Roche). La confirmación de la presencia de la mutación se llevó a cabo mediante secuenciación Sanger en un ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Cuando procedió, se llevó a cabo seguimiento de la mutación de NPM1 mediante PCR cuantitativa (qPCR), empleando curvas de calibración específicas para obtener la cuantificación absoluta del transcrito mutado siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (Schnittger et al., 2005). Para FLT3, en concreto FLT3-ITD el producto de amplificación obtenido tras realizar una PCR específica se sometió a electroforesis

capilar en un ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para confirmación y cuantificación relativa del alelo mutado (Sheikhha, Awan, Tobal, & Liu Yin, 2003).

### 5.2.4.3 Estudio de sobreexpresión de los genes MN1 y BAALC

Para el estudio de los niveles de expresión de los genes sometidos a investigación en este trabajo, se cuantificó el ARNm de cada gen, tras obtener el ADNc a partir de muestras de médula ósea de los pacientes.

La técnica usada consistió en cuantificación relativa mediante PCR cuantitativa a tiempo real en un Light Cycler 480 (Roche) en presencia SYBR Green como agente intercalante fluorescente, empleando para ello el kit Perfecta SYBR Green FastMix (Quanta Bioscience). Como gen control (housekeeping) se utilizó ABL tal y como recomienda la bibliografía (Weisser, Haferlach, Schoch, Hiddemann, & Schnittger, 2004). La cuantificación relativa se llevó a cabo mediante el Light Cycler 480 Software (Roche).

#### a) sobreexpresión de BAALC

La técnica general seguida es la descrita por C. Baldus (Baldus et al., 2003), pero tal y como se ha indicado en vez de emplear GPI como gen control, nosotros utilizamos ABL. tal y como recomienda la bibliografía (Weisser et al., 2004)

Los cebadores específicos son los publicados por C. Baldus y se describen a continuación:

<b>BAALC</b>	F	GCCCTCTGACCCAGAAACAG	R	CTTTTGCAGGCATTCTCTTAGCA
<b>ABL</b>	F	TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGT	R	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA

Por último, como control interno positivo, usamos línea celular KG1 y negativo, agua destilada. Una vez obtenido el resultado se calculó el ratio normalizado del gen BAALC/gen ABL

#### b) sobreexpresión de MN1.

En este caso seguimos, la metodología usada por C Heuser(Heuser et al., 2006). Los cebadores usados fueron los siguientes:

<b>MN1</b>	F	GACGACGACAAGACGTTGG	R	GACAGACAGGCACTGCAAG
<b>ABL</b>	F	TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGT	R	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA

Una vez obtenido el resultado se calculó el ratio normalizado del gen MN1/gen ABL

### ***5.3 Definiciones y variables a estudio.***

#### **5.3.1 Clasificación LMA**

Se siguieron las recomendaciones OMS 2008 (Arber et al., 2008) clasificando a los pacientes en función de los hallazgos citogenéticos. Si presentaban cariotipo normal o en ausencia de crecimiento del cultivo, según hallazgos de FISH o biología molecular, y solo cuando estos parámetros fueron normales, en base a los criterios morfológicos

#### **5.3.2 Clasificación por tratamiento**

Como criterio de inclusión se expuso que los pacientes hubieran recibido quimioterapia de inducción con la combinación de un antraciclínico y citarabina. Después de la inducción en función del tratamiento recibido los pacientes fueron clasificados en cuatro categorías para facilitar el estudio estadístico.

a) En primer lugar se consideraron todas las modalidades de ALo-TPH como equivalentes pues existe suficiente evidencia que apoya que tienen similar poder anti leucémico (Stanghellini, 2013).

b) También fueron considerados como equivalentes, en base a lo descrito en la bibliografía, los regímenes basados en citarabina a altas dosis o trasplante autólogo. (Löwenberg et al., 2011; Ohtake et al., 2011; Vellenga et al., 2011).

c) Pacientes no tratados de forma intensiva después de la inducción y que recibieron tratamiento con fármacos hipometilantes.

d) Paciente que no reciben un tratamiento completo de intensificación, bien por quimiorrefractoriedad primaria, recaídas precoces, o por complicaciones.

#### **5.3.3 Sobreexpresión de los genes a estudio MN1 y BAALC**

El método seguido para definir la sobreexpresión de los genes sometidos a investigación fue similar a lo descrito previamente en la bibliografía.

En primer lugar, el valor estándar que se asume como referencia consistió en definir sobreexpresión en aquellos pacientes que tienen niveles de expresión del gen más allá

del percentil 50 o mediana de la serie completa de pacientes afectados de LMA. Esta definición es la descrita por Heuser en su trabajo original acerca del papel pronóstico de MN1 en paciente con LMA (Heuser et al., 2006) y es el método más usado en relación a la sobreexpresión de BAALC según lo descrito por Xiao en su metaanálisis recientemente publicado sobre la utilidad como BAALC como marcador pronóstico (Xiao et al., 2015).

En segundo lugar se somete a contraste una definición determinada de manera independiente a la población enferma. Para ello se han medido los niveles de expresión de ambos genes en 20 donantes sanos.

Las muestras de donantes se obtuvieron mediante el procedimiento estándar habitual, con aspirado de médula ósea. Todas las muestras fueron revisadas por hematólogos expertos en citología que confirmaron la ausencia de hallazgos compatibles con una hemopatía maligna.

Una vez obtenida la media de estos 20 controles, se definió sobreexpresión al valor situado más allá de 2,5 Desviaciones estándar (2,5 DS) de la media que correspondió con un valor de 0,14 para MN1 y 0,3 para BAALC.

El uso de valores más allá de 2,5 DS de la media de una población es habitual para definir a los extremos de la población, ya que hace referencia al 2,5% con mayores niveles. Es una metodología de amplio uso en biología y existe referentes bibliográfico en el campo de la sobreexpresión de genes en LMA como por ejemplo para el gen WT1 (Lapillonne et al., 2006).

Esta definición es la que se someterá a contraste y comparación con el estándar descrito en la bibliografía.

### 5.3.4 Definición de las respuestas obtenidas.

Los criterios para definir el estado de remisión completa están fijados en base a lo descrito por B. Cheson (Cheson et al., 2003) y que han sido validados y auspiciados más recientemente por el grupo de expertos de European Leukemia NET (Dohner et al., 2010)

#### a) Remisión Completa

Presencia de menos de un 5% de blastos en médula ósea, ausencia de blastos con bastones de Auer, ausencia de enfermedad extramedular, todo ello con cifra de neutrófilos  $>1000/\mu\text{L}$ , recuento de plaquetas superior a  $100.000/\mu\text{L}$  e independencia de soporte transfusional

#### b) Remisión completa con recuperación periférica incompleta

Todos los criterios descritos para la Remisión completa pero con cifras de neutrófilos inferior a  $1000/\mu\text{L}$  o trombocitopenia con cifras inferiores a  $100.000/\mu\text{L}$

#### c) Estado libre de enfermedad leucémica

Presencia de menos de un 5% de blastos en médula ósea, ausencia de blastos con bastones de Auer, ausencia de enfermedad extramedular, sin valorar la situación en sangre periférica.

Actualmente se considera como bien establecido el papel pronóstico que tiene la respuesta a la quimioterapia de inducción. Sin embargo, la bibliografía es unánime en considerar como factor la situación de persistencia de enfermedad, por lo que en el presente trabajo se consideran estos tres tipos de respuesta como equivalentes entre sí y fueron definidas como remisión completa tras la quimioterapia de inducción (Dohner et al., 2010; Schlenk, 2014).

#### d) Fallo inducción/ Resistencia a la inducción:

Describe una situación de ausencia de remisión completa o remisión completa con recuperación periférica incompleta. Por lo tanto, se consideran aquellos con más de 5% de blastos en la médula ósea, persistencia de blastos con bastones de Auer o persistencia de la enfermedad extramedular y con una supervivencia mínima de al menos 7 días tras finalizar la quimioterapia.

En la literatura médica se incluye una categoría no reconocida en nuestro trabajo que es la situación de Respuesta parcial definida por la presencia de un recuento en el aspirado de médula ósea de la reevaluación de blastos entre el 5 y el 25 % o un descenso del 50% comparado con la cifra inicial de blastos.

Sin embargo, esta definición se considera relevante sólo en el contexto de ensayos clínicos fase 1-2, por lo que para nuestro trabajo se siguió la recomendación del grupo PETHEMA (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010), quienes recomiendan repetir medulograma en el plazo de una semana aproximadamente para discernir si nos encontramos en una situación de recuperación o de persistencia de enfermedad, siendo este segundo aspirado el fue considerado para definir al respuesta obtenida.

e) Recaída.

Reaparición de más de un 5% de blastos en médula ósea o en sangre periférica en paciente que previamente ha alcanzado una respuesta de remisión completa o remisión completa sin recuperación periférica. En nuestro trabajo no se requirió que esta remisión completa estuviera mantenida en el tiempo.

### **5.3.5 Definición de tiempos de supervivencia.**

a) Supervivencia global.

Tiempo entre el momento del diagnóstico y el último seguimiento del paciente. En este último seguimiento se codificó la situación del paciente en relación a su enfermedad, en forma de tres posibles situaciones:

- Exitus: En nuestra serie se consideran todas las causas de exitus, no solo las relativas a la leucemia, si bien, dado que como criterio de inclusión se consideraron aquellos pacientes que habían alcanzado alguna respuesta a la quimioterapia de inducción, quedan excluidos los exitus en la inducción por complicaciones.

- Remisión completa. Dentro de los dos primeros años de seguimiento, se codificó como último seguimiento la fecha del último aspirado de control. En pacientes

con supervivencia superior a los dos años, se incluyó la fecha de última visita en consulta de Hematología

- Persistencia de la enfermedad. Paciente que la última visita realizada existen datos objetivos de persistencia o reaparición de la LMA.

b) Supervivencia libre de progresión.

Tiempo transcurrido entre el momento de alcanzar la primera remisión completa y la recaída. Se aplican los mismos matices definidos que para la supervivencia global.

#### ***5.4 Método de recogida y explotación de datos.***

La recogida de datos se realizó mediante revisión de historias clínicas informatizadas con consulta de datos analíticos en bases informáticas. Los datos de todos los casos y sus respectivas variables se recopilaron en una hoja de cálculo.

Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado que permitió el uso de esta información para su investigación.

La descripción de las variables se realizó con medidas de tendencia central y dispersión en las cuantitativas y con proporciones en las categóricas. Además en aquellos casos representativos se mostró histograma (con curva de normalidad) y gráficos de caja y bigotes.

La normalidad de las variables cuantitativas se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (con corrección de Lilliefors) de manera global y categorizada cuando procedió.

La supervivencia se estudió mediante Kaplan-Meier y curvas de supervivencia.

Para valorar la sensibilidad y especificidad de una variable cuantitativa según puntos de corte se emplearon curvas ROC con su área bajo la curva (AUC).

Las pruebas empleadas para el análisis bivalente fueron las siguientes:

- Correlación entre variables cuantitativas: test de Pearson o Spearman según cumplieran o no normalidad.

- Asociación entre variables cuantitativas y categóricas: test de Levene para comparar varianzas, ANOVA (con test post-hoc de Bon Ferroni), test de t-Student, U de Mann-Whitney y U de Wilcoxon para datos apareados.

- Asociación entre variables categóricas: test de Chi cuadrado, asociación Lineal por Lineal (LxL) y test exacto de Fisher. Como medida de asociación se empleó el Riesgo Relativo.

- Análisis de supervivencia: prueba de log-rank y regresión de Cox. Como medida de asociación se empleó Hazard Ratio.

- Asociación entre variables categóricas con datos apareados, prueba de MacNemar.

Las pruebas empleadas para el análisis multivariantes fueron las siguientes:

- Regresión logística binaria para variable dependiente dicotómica.

- Regresión de Cox para supervivencia.

En todos los casos se utilizó un límite de significación menor de 0,05, considerándose cuasi significativo entre 0,10 y 0,05.

El software empleado fue Excel 2003 para la recogida de datos y SPSS para Windows versión 15.0 para el análisis estadístico.

## 6.- Resultados.

### 6.1 Análisis descriptivo de la serie. Características demográficas, biológicas y terapéuticas.

Se incluyeron un total de 119 pacientes que cumplían los criterios de inclusión.

La distribución por sexos reflejó un predominio de varones sobre mujeres (58,8% frente a 41,2%).

La edad media de diagnóstico de la LMA fue de 53,7 años con un IC al 95% 50,8 -56,5, siguiendo una distribución no normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov p 0,004). Por lo que usamos la mediana como estadístico de tendencia central con un valor de 56 años (rango 15-79 años) que define un recorrido de la variable de 64 años y un rango intercuartílico de 23 años. En el histograma de frecuencia con curva de normalidad, se aprecia una curva bimodal tomando como referencia la edad de 60 años.

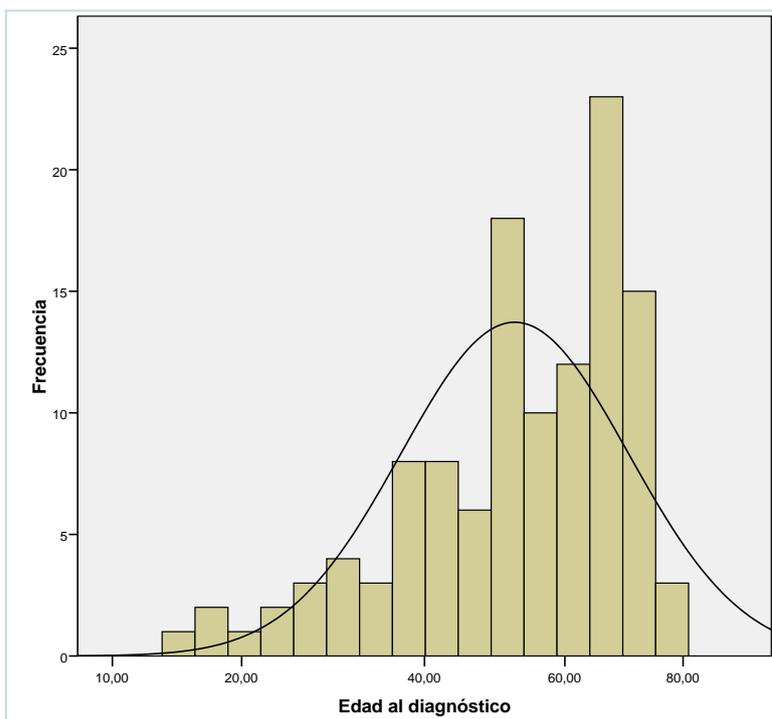


Figura 6.1 Distribución de frecuencias de los pacientes según edad al diagnóstico

El estado general de los pacientes definido mediante valoración por la escala funcional ECOG reveló la distribución indicada en la Tabla 6.1

**Tabla 6.1 Distribución de pacientes de acuerdo a la escala ECOG**

		Frecuencia	Porcentaje
Valor Escala	0	11	9,2
	1	59	49,6
	2	42	35,3
	3	7	5,9
	Total	119	100,0

Las características de las variables biológicas cuantitativas en nuestra serie como leucocitos, hemoglobina, blastos en médula ósea, en sangre periférica, plaquetas y creatinina, se muestran en la Tabla 6.2

**Tabla 6.2 Resumen de los descriptivos de tendencia central de Leucocitos, Hemoglobina, plaquetas y blastos al momento del diagnóstico**

	Media	IC 95%	Mediana	Amplitud	recorrido
<b>Leucocitos</b>	36874,45	25264,92 – 48483,97	7600	40100	900-314000
<b>Hemoglobina*</b>	9	8,66 – 9,35	8,9	2,3	4,5-14,4
<b>Plaquetas</b>	75594,92	61673,34- 89516,49	52100	79225	2200-530000
<b>Blastos SP</b>	35,62	29,53-41,71	27	60	0-96
<b>Blastos MO</b>	55,98	51,37-60,59	53,5	45	2-99
<b>Creatinina</b>	0,91	0,86 -0,97.	0,8	0,3	0,5-2,4

\* Variable con distribución normal

La distribución de las LMA por grupos morfológicos fue la siguiente (Tabla 6.3):

**Tabla 6.3 Distribución por grupos morfológicos según criterios OMS**

Tipo Morfológico	Frecuencia	Porcentaje
LAM indiferenciada	9	7,6
LAM sin maduración	16	13,4
LAM con maduración	19	16,0
LAM Mielomonocítica	25	21,0
LAM Monoblástica	13	10,9
Eritroleucemia	6	5,0
LAM con displasia multilínea	19	16,0

LAM relacionada con terapia	12	10,1
Total	119	100,0

En la tabla 6.4 se muestran los resultados obtenidos en el estudio citogenético al momento del diagnóstico de la LMA y su frecuencia en la cohorte de pacientes.

<b>Tabla 6.4 Frecuencia de los hallazgos observados en el estudio de cariotipo al diagnóstico</b>					
<b>Cariotipo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Cariotipo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Normal	69	57,98	t (6;9)	1	0,84
t (8;21)	8	6,72	t (3;4)	1	0,84
Inv16	2	1,68	t (15;21)	1	0,84
+8	8	6,72	48 XY	1	0,84
Complejo (≥ alt)	13	10,92	add 15 (q26)	1	0,84
-7	3	2,52	add 14	1	0,84
Del 5q	2	1,68	+11	1	0,84
Hiperdiploide	2	1,68	+21	1	0,84
t (3;17)	1	0,84	No creció	3	2,52

La presencia de mutaciones en NPM1 y FLT3 se estudió en los pacientes con cariotipo normal y también en los de cariotipo sin crecimiento. La incidencia se muestra en la Tabla 6.5.

<b>Tabla 6.5</b>	<b>Mutación NPM1</b>		<b>Mutación FLT3</b>	
	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Mutado	27	37,0	23	31,5
No mutado	45	63,0	49	68,5
Total	72	100,0	72	100,0

La frecuencia de los grupos de riesgo citogenético según clasificación recomendada por PETHEMA (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010) y por European Leukemia NET en el año 2010 (Dohner et al., 2010) se indican en las Tabla 6.6 y 6.7.

**Tabla 6.6 Grupos de riesgo según citogenética al diagnóstico**

	Frecuencia	Porcentaje
Grupo de buen pronóstico	10	8,4
Riesgo Intermedio	90	75,6
Pronóstico Adverso	19	16,0
Total	119	100,0

**Tabla 6.7 Riesgo biológico según clasificación ELN 2010**

		Frecuencia	Porcentaje
Grupos de riesgo	Bueno	28	23,5
	Intermedio	72	60,5
	Intermedio 1	53	44,5
	Intermedio 2	19	16,0
	Adverso	19	16,0
Total		119	100,0

Las características de expresión de antígenos celulares al diagnóstico se resumen en la Tabla 6.8

**Tabla 6.8 Características de inmunofenotipo**

Antígeno	POSITIVO		NEGATIVO		NO DISPONIBLE/NO DATOS	
	N	%	N	%	N	%
<b>CD34</b>	71	59,5	27	22,7	21	17,6
<b>CD117</b>	83	69,7	10	8,4	26	21,8
<b>DR</b>	84	70,6	12	10,1	23	19,3

Los 119 pacientes (100%) recibieron quimioterapia de inducción mediante dos esquemas "7+3" y "5+2". Las frecuencias observadas fueron las siguientes para ambos tratamientos (Tabla 6.9).

**Tabla 6.9 Tipo Quimioterapia inducción**

Esquema inducción	Frecuencia	Porcentaje
7+3	107	89,9
5+2	12	10,1
Total	119	100,0

Tal y como se muestra en la figura 6.2, la edad media de los pacientes fue significativamente diferente según el tipo de quimioterapia de inducción recibida. Siendo de 51,66 años (IC 95%, 48,79 – 54,52) en los pacientes tratados con el esquema 7+3 y de 72,08 años (IC 95% 69,08-75,08) en los que recibieron el protocolo 5+2 ( $p < 0,001$ ).

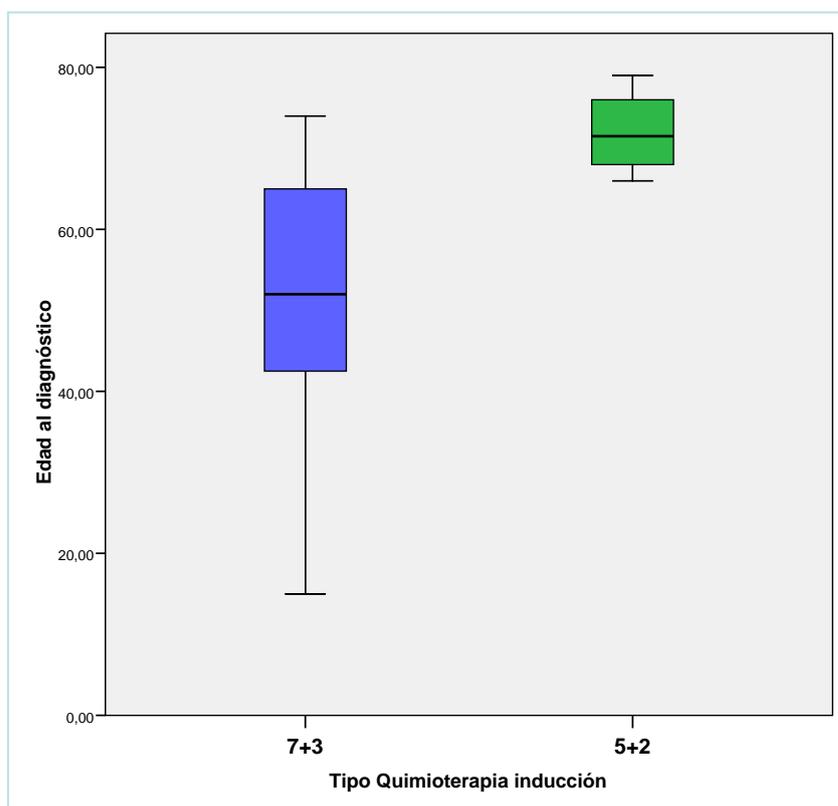


Figura 6.2 Comparación entre edades medias al momento del diagnóstico según el tipo de quimioterapia recibida.

En cuanto al tratamiento de intensificación, en la serie se observaron cuatro posibilidades. Las frecuencias observadas para estas opciones son las siguientes (Tabla 6.10).

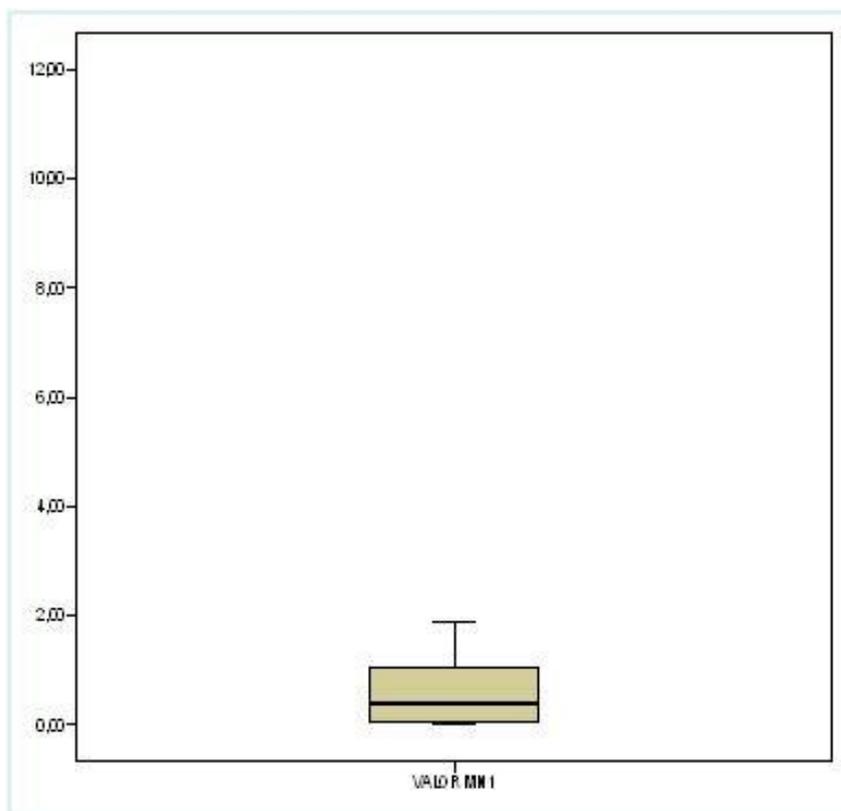
Tabla 6.10 Tipo de tratamiento post-inducción o de intensificación.

	Frecuencia	Porcentaje
TPH Alogénico	38	31,9
Quimioterapia o TPH Autólogo	38	31,9
Hipometilantes (Azacitidina)	4	3,4
No recibe	39	32,8
Total	119	100,0

## 6.2 Características de las variables a estudio

### 6.2.1 Características descriptivas y analíticas de la variable expresión MN1 en relación al resto de variables.

El nivel de expresión de MN1 se obtuvo en un total de 113 casos (95%) del total de la serie con 6 casos perdidos. El recorrido de la variable discurre entre 0,00 y 36,11, sin seguir una distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,001$ ). La media observada fue de 1,89 con IC al 95% entre 0,94-2,84. La mediana fue de 0,41 con un rango intercuartílico de 0,99. El histograma con la distribución de la variable se muestra a continuación (Figura 6.3).



**Figura 6.3** Gráfico de cajas y bigotes para la distribución de la variable MN1 de manera cuantitativa

Como se describe en la bibliografía, se define sobreexpresión mediante estudio de la población enferma a partir del Percentil 50 o mediana, es decir,  $>0,41$  en nuestra cohorte. En el presente trabajo planteamos un criterio alternativo, que es considerar sobreexpresión a partir de 2,5 DS de una población control, es decir,  $>0,14$  (ver apartado 5.5.2 de Material y Métodos)

La frecuencia de pacientes definidos como sobreexpresión mediante P50 fue la siguiente (Tabla 6.11):

	Frecuencia	Porcentaje
Sobreexpresión Positiva	58	51,3
Sobreexpresión Negativo	55	48,7
Total	113	100,0

Mientras que la distribución según nuestro método (>2,5DS) se indica a continuación (Tabla 6.12):

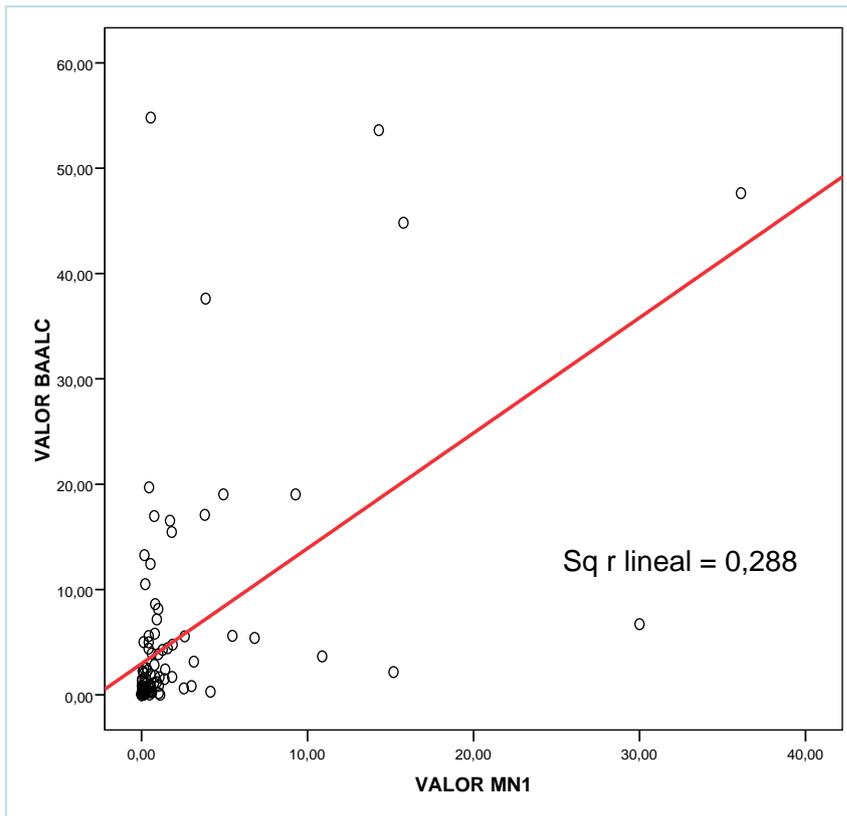
	Frecuencia	Porcentaje
Sobreexpresión Positiva	77	68,1
Sobreexpresión Negativo	36	31,9
Total	113	100,0

El estudio analítico de la asociación de la expresión de MN1 con otras variables biológicas se hizo teniendo en cuenta sólo aquellos pacientes para los que se tenía valor de MN1 excluyéndose los 6 casos con valores perdidos.

En primer lugar se analizaron las asociaciones con otras variables cuantitativas y considerando a MN1 como una variable cuantitativa.

No se observó correlación entre MN1 con cifra de leucocitos ( $p > 0,5$ ), hemoglobina ( $p > 0,05$ ), plaquetas ( $p > 0,5$ ), blastos en sangre periférica ( $p > 0,1$ ), blastos en médula ósea ( $p > 0,05$ ) ni edad ( $p > 0,1$ ).

El estudio de la asociación y correlación entre las variables principales del estudio, MN1 y BAALC, como variables cuantitativas reveló una correlación  $r^2$  lineal de 0,28, mientras que el índice de correlación de Spearman resultó de 0,7 ( $p < 0,001$ ).



**Figura 6.4** Correlación estadística entre MN1 y BAALC como variables cuantitativas

A continuación se estudió la asociación de la sobreexpresión de MN1 como variable cualitativa por los dos métodos investigados con las distintas variables biológicas descritas en la bibliografía.

**Tabla 6.13** Asociación de sobreexpresión de MN1 si > P50 de la serie de pacientes con otros marcadores moleculares y citogenéticos

	p	RR	IC 95	estadístico	Índice Correlación
<b>NPM1 no mutado</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,707	1,328-2,194	$\chi^2$	
<b>FLT3 mutado</b>	>0,05	0,411	0,165-1,022	$\chi^2$	
<b>Expresión CD34</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,006	1,418-2,839	$\chi^2$	
<b>Expresión CD117</b>	0,073	1,162	0,995-1,356	Fisher	
<b>Expresión DR</b>	0,022	1,196	1,020-1,401	$\chi^2$	
<b>Riesgo Citogenético Global</b>	0,414			LxL	
<b>BAALC &gt;P50</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,929	1,782-4,813	$\chi^2$	
<b>BAALC &gt;2,5SDS</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,898	1,415-2,545	$\chi^2$	
<b>Correlación cuantitativa MN1 y BAALC</b>	<b>&lt;0,001</b>			Spearman	0,695

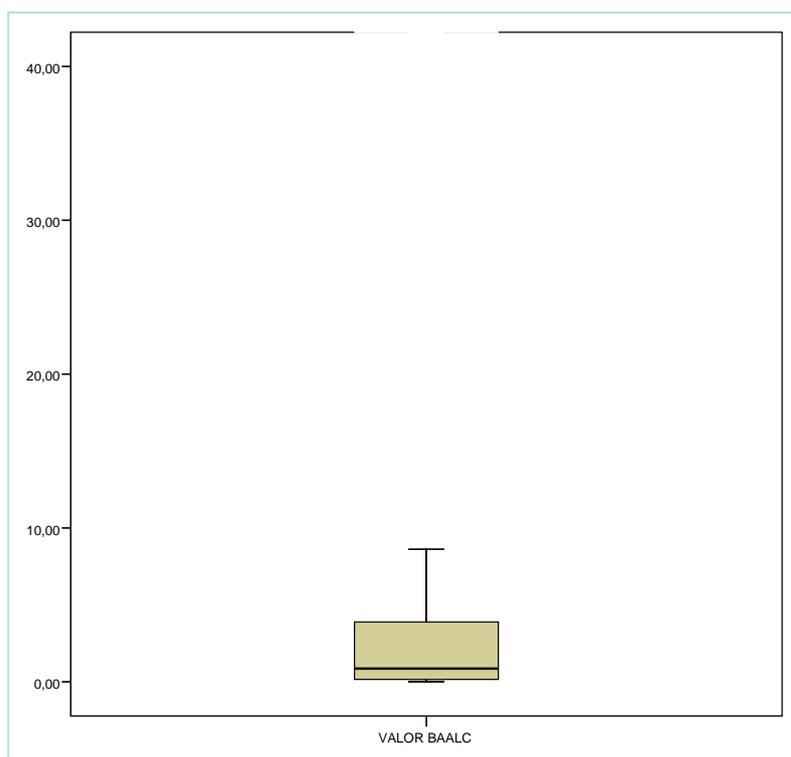
En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la asociación de la variable MN1 definida como sobreexpresión a partir de >2,5 DS

	p	RR	IC 95	estadístico
<b>NPM1 no mutado</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,987	1,366-2,889	$\chi^2$
<b>FLT3 mutado</b>	>0,5	0,833	0,437-1,786	$\chi^2$
<b>Expresión CD34</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,863	1,534-5,346	$\chi^2$
<b>Expresión CD117</b>	0,040	1,216	0,961-1,537	Fisher
<b>Expresión DR</b>	0,033	1,233	0,994-1,530	Fisher
<b>Riesgo Citogenético Global</b>	0,193			LxL
<b>BAALC &gt;P50</b>	<b>&lt;0,001</b>	4,503	1,972-10,282	$\chi^2$
<b>BAALC &gt;2,5DS</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,720	1,661-4,454	$\chi^2$

### **6.2.2 Características descriptivas y analíticas de la variable expresión BAALC en relación al resto de variables.**

El nivel de expresión de BAALC se obtuvo para un total de 108 casos (90,8%) del total de la serie con 11 casos perdidos. El recorrido de la variable discurre entre 0,00 y 54,80, sin seguir una distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov  $p < 0,001$ ). La media observada fue de 5,11 con IC al 95% entre 3,08-7,13, y la mediana fue de 0,96 con un rango intercuartílico de 4,52.

A continuación se muestra histograma con la distribución de la variable (Figura 6.5).



**Figura 6.5 Gráfico de cajas y bigotes de BAALC como variable cuantitativa**

En base a esto, se definió como valor de sobreexpresión el situado más allá de la mediana de la población enferma, en nuestra serie  $>0,96$ . Mientras que el valor definido como sobreexpresión  $>2,5$  DS de la media un grupo de control, se correspondió con  $>0,3$ . A continuación se muestra la frecuencia de distribución de sobreexpresión según ambos criterios (Tabla 6.15 y 6.16)

**Tabla 6.15 Sobreexpresión BAALC  $>$  P50 población enferma**

	Frecuencia	Porcentaje
Sobreexpresión Positiva	54	50,0
Sobreexpresión Negativa	54	50,0
Total	108	100,0

**Tabla 6.16 Sobreexpresión BAALC  $>$  2,5 DS población control**

	Frecuencia	Porcentaje
Sobreexpresión Positiva	76	70,4
Sobreexpresión Negativa	32	29,6
Total	108	100,0

El análisis de asociación de la expresión de BAALC con otras variables biológicas se hizo teniendo en cuenta sólo aquellos pacientes para los que se disponía del valor de BAALC excluyéndose los 11 casos con valores perdidos.

Como variable cuantitativa no mostró correlación con Leucocitos ( $p>0,1$ ), hemoglobina ( $p>0,5$ ), plaquetas ( $p>0,5$ ), blastos sangre periférica ( $p>0,5$ ), blastos médula ósea ( $p>0,1$ ), ni edad ( $p>0,5$ ).

A continuación las asociaciones de BAALC como variable cualitativa a partir de los dos criterios de sobreexpresión estudiados (Tabla 6.17).

<b>Tabla 6.17 Asociación de sobreexpresión de BAALC si &gt; P50 de la serie de pacientes con otros marcadores moleculares y citogenéticos</b>				
	p	RR	IC 95	estadístico
<b>NPM1 no mutado</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,759	1,362-2,272	$\chi^2$
<b>FLT3 No mutado</b>	<b>&gt;0,1</b>	1,184	0,960-1,461	$\chi^2$
<b>Expresión CD34</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,847	1,322-2,582	$\chi^2$
<b>Expresión CD117</b>	<b>&gt;0,1</b>	1,134	0,961-1,340	Fisher
<b>Expresión DR</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,367	1,135-1,645	$\chi^2$
<b>Riesgo Citogenético Global</b>	<b>0,014</b>			LxL
<b>Riesgo Citogenética Bueno</b>	<b>&lt;0,05</b>	0,833	0,740-0,939	Fisher
<b>Riesgo Citogenético Intermedio</b>	<b>&gt;0,1</b>	0,867	0,707- 1,063	$\chi^2$
<b>Riesgo Citogenético Adverso</b>	<b>&gt;0,5</b>	0,667	0,255- 1,744	$\chi^2$
<b>MN1 &gt;P50</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,733	1,733-4,311	$\chi^2$
<b>MN&gt;2,5DS</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,960	1,453-2,645	$\chi^2$

Para profundizar en el análisis de la asociación con riesgo citogenético en la tabla 6.18 se muestra la distribución de los casos de sobreexpresión BAALC>P50 por grupos de riesgo citogenético.

		Riesgo CG codificado			Total
		Bueno	Intermedio	Adverso	
Sobreexpresión BAALC>P50	Positiva	9	55	12	76
	Negativa	0	29	3	32
Total		9	84	15	108

En la tabla 6.19 se muestran las asociaciones obtenidas con la definición de sobreexpresión a partir de BAALC >2,5 DS de la población control.

	p	RR	IC 95	estadístico
<b>NPM1 no mutado</b>	<b>&lt;0,001</b>	2,386	1,515-3,757	$\chi^2$
<b>FLT3 mutado</b>	>0,5	0,895	0,430-1,860	$\chi^2$
<b>Expresión CD34</b>	<b>&lt;0,001</b>	4,348	1,801-10,496	$\chi^2$
<b>Expresión CD117</b>	>0,05	1,212	0,923-1,590	Fisher
<b>Expresión DR</b>	<b>&lt;0,001</b>	1,464	1081-1,982	Fisher
<b>Riesgo Citogenético Global</b>	>0,5			LxL
<b>MN1 &gt;P50</b>	<b>&lt;0,001</b>	4,295	1,891-9,755	$\chi^2$
<b>MN1&gt;2,5DS</b>	<b>&lt;0,001</b>	3,041	1,734-5,332	$\chi^2$

### ***6.3 Análisis bivariante y mutivariante de la probabilidad de fracaso a la quimioterapia de inducción, de supervivencia global y libre de progresión.***

#### **6.3.1 Análisis respecto a la remisión completa y persistencia**

La frecuencia global de remisión completa (RC) en la serie tras el primer ciclo de quimioterapia fue de 55,5 % y la de persistencia de 44,5%. La tasa global de remisión completa con sucesivos ciclos de quimioterapia fue de 77%.

El estudio del impacto de las variables cuantitativas se muestra a continuación en la Tabla 6.20.

<b>Tabla 6.20</b>	<b>Asociación de variables cuantitativas con la condición de RC y persistencia</b>					
<b>Variable a estudio</b>	Pruebas no paramétricas			Pruebas paramétricas		
	U de Mann-Whitney			T de Student		
	P valor	Rango promedio para RC	Rango promedio para persistencia	P valor	Media para RC	Media para Persistencia
<b>Edad al diagnóstico</b>	<b>&lt;0,001</b>	49,7	72,8	<b>&lt;0,001</b>	49,70	58,72
<b>Leucocitos</b>	0,5	61,95	57,57	>0,5	35366	38085
<b>Hemoglobina *</b>		No procede	No procede	>0,5	8,95	9,08
<b>Plaquetas</b>	>0,2	56,55	63,25	0,082	63957	90365
<b>Blastos SP</b>	>0,5	53,89	55,29	>0,5	34,25	37,40
<b>Blastos MO</b>	>0,5	59,30	55,20	>0,5	57,34	54,24
<b>MN1</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>46,95</b>	<b>70,12</b>	<b>0,163</b>	<b>1,3</b>	<b>2,65</b>
<b>BAALC</b>	<b>0,023</b>	<b>48,5</b>	<b>62,29</b>	0,152	3,74	6,87

**\*: variable de distribución normal**

Tal y como se muestra en la tabla anterior, edad más avanzada al diagnóstico y mayor expresión de MN1 y BAALC se asociaron a persistencia de la enfermedad de manera significativa.

En la tabla 6.21 se indican los resultados para las distintas variables cualitativas analizadas. La RC fue más frecuente en pacientes con NPM1 mutado y con quimioterapia 7+3, así mismo, el riesgo citogenético determinó RC o persistencia.

<b>Tabla 6.21</b>	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para las distintas variables cualitativas</b>			
<b>Variable a estudio</b>	RC	Persistencia	P valor	estadístico
<b>NPM1 mutado</b>	75,9%	24,1%	<b>0,011</b>	$\chi^2$
<b>FLT3 mutado</b>	55,6%	44,4%	>0,5	$\chi^2$

<b>Expresión CD34</b>	47,9%	52,1%	>0,5	$\chi^2$
<b>Expresión CD117</b>	54,2%	45,8%	>0,5	$\chi^2$
<b>Expresión DR</b>	57,1%	42,9%	>0,5	$\chi^2$
<b>CG buen pronóstico</b>	80%	20%	<b>0,024</b>	LxL
<b>CG riesgo intermedio</b>	56,7%	43,3%		
<b>CG pronóstico Adverso</b>	36,8%	63,2%		
<b>Quimioterapia 7+3</b>	58,9%	41,1%	<b>0,025</b>	$\chi^2$
<b>Quimioterapia 5+2</b>	25%	75%	<b>0,025</b>	$\chi^2$

Para analizar el impacto de los grupos de riesgo citogenético se realizó regresión logística binaria, y considerándose como factor de riesgo para la condición persistencia de enfermedad y con el grupo de buen pronóstico como referencia con un Exp(B) de 6,857 (IC 95% 1,124-41,82)  $p=0,037$  para adverso y con  $p>0,1$  con Exp(B) 3,06 (IC 95% 0,61-15,22) para el intermedio.

En la tabla 6.22 se muestra la asociación de las principales variables categóricas estudiadas con la remisión o persistencia, así como el valor de los riesgos relativos encontrados.

<b>Tabla 6.22</b>	<b>Asociación de variables cualitativas con la condición de PERSISTENCIA a la quimioterapia de Inducción</b>			
<b>Variable</b>	P valor	RR	IC	Estadístico
<b>NPM1 mutado</b>	<b>0,011</b>	<b>0,472</b>	<b>0,240-0,929</b>	$\chi^2$
<b>FLT3 mutado</b>	>0,5	0,997	0,618-1,611	$\chi^2$
<b>Expresión CD34</b>	>0,5	1,563	0,877-2,787	$\chi^2$
<b>Expresión CD117</b>	0,99	1,145	0,517-2533	Fisher
<b>Expresión DR</b>	>0,5	1,286	0,557-2,970	$\chi^2$
<b>Quimioterapia 5+2 frente 7+3</b>	<b>0,025</b>	<b>1,824</b>	<b>1,225-2,714</b>	$\chi^2$
<b>Quimioterapia 7+3 frente a 5+2</b>	<b>0,025</b>	<b>0,548</b>	<b>0,368-0,816</b>	$\chi^2$

<b>Asociación de variables cualitativas con la condición de REMISION COMPLETA a la quimioterapia de Inducción</b>				
<b>Variable</b>	<b>P valor</b>	<b>RR</b>	<b>IC</b>	<b>Estadístico</b>
<b>NPM1 mutado</b>	<b>0,011</b>	<b>1,552</b>	<b>1,156-2,083</b>	$\chi^2$
<b>FLT3 mutado</b>	>0,5	1,002	0,683-1,471	$\chi^2$
<b>Expresión CD34</b>	>0,5	0,718	0,877-2,787	$\chi^2$
<b>Expresión CD117</b>	0,99	0,904	0,525-1,556	Fisher
<b>Expresión DR</b>	>0,5	0,857	0,552-1,332	$\chi^2$
<b>Quimioterapia 5+2 frente 7+3</b>	<b>0,025</b>	<b>0,425</b>	<b>0,157-1,146</b>	$\chi^2$
<b>Quimioterapia 7+3 frente a 5+2</b>	<b>0,025</b>	<b>2,355</b>	<b>0,873-6,355</b>	$\chi^2$

### 6.3.1.1 Influencia de MN1 y BAALC sobre la RC y persistencia

El análisis del impacto de las variables principales del estudio MN1 y BAALC sobre la persistencia se llevó a cabo considerando las variables como cuantitativas (resultados ya mostrados en Tabla 6.20), y también como categóricas según los dos puntos de corte correspondientes a los dos criterios establecidos.

A continuación se muestran los resultados para la variable MN1, para el cual solo se consideraron los casos con valor de MN1, excluyéndose 6 casos perdidos.

Además de los resultados mostrados en la tabla 6.20 como variable cuantitativa con distribución no normal, se procedió realizar estudio mediante curvas ROC, para identificar la asociación entre MN1 y la condición de persistencia

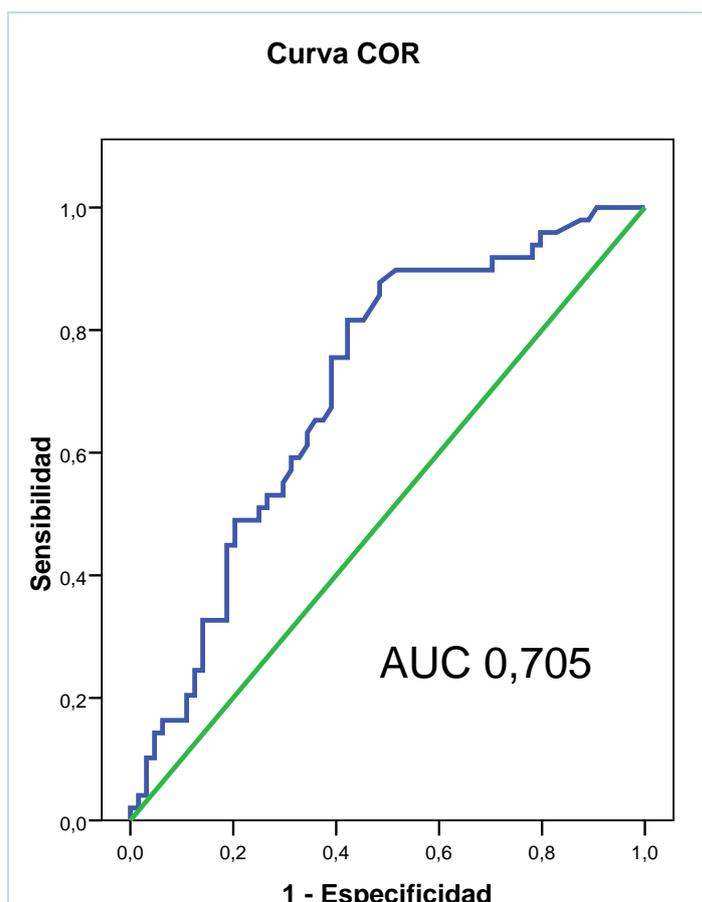


Figura 6.6 Curvas ROC de la variable MN1 para la condición de persistencia de enfermedad

A continuación, en la Tabla 6.23 se muestra el estudio de sensibilidad y especificidad de los valores de MN1 respecto a la persistencia de enfermedad tras la quimioterapia de inducción.

Tabla 6.23	Correspondencia entre valores de MN1 y sensibilidad y especificidad para hallazgo de persistencia a la quimioterapia de inducción				
Valor MN1	Sensibilidad	Especificidad	Valor MN1	Sensibilidad	Especificidad
<b>0,000225</b>	100%	2%	<b>0,415</b>	<b>65%</b>	<b>63%</b>
<b>0,00515</b>	100%	5%	0,425	65%	64%
<b>0,0068</b>	100%	6%	0,445	61%	66%
<b>0,008</b>	100%	8%	0,465	59%	67%
<b>0,01</b>	100%	9%	0,51	57%	69%
<b>0,0115</b>	98%	11%	0,535	55%	70%
<b>0,013</b>	98%	13%	0,56	53%	73%
<b>0,016</b>	96%	19%	0,625	51%	75%
<b>0,0175</b>	96%	20%	0,69	49%	75%
<b>0,0195</b>	94%	20%	0,78	49%	80%
<b>0,0215</b>	94%	22%	0,795	47%	80%
<b>0,0225</b>	92%	22%	0,81	45%	80%

0,0235	92%	23%	0,96	41%	81%
0,032	92%	28%	1,005	39%	81%
0,0385	92%	30%	1,06	33%	81%
0,045	90%	30%	1,325	33%	86%
0,075	90%	38%	1,4	31%	86%
0,11	90%	45%	1,635	27%	86%
0,125	90%	47%	1,705	24%	86%
0,135	90%	48%	1,83	22%	88%
<b>0,145</b>	<b>88%</b>	<b>52%</b>	2,21	20%	89%
0,16	86%	52%	2,575	18%	89%
0,175	82%	55%	3,08	16%	91%
0,19	82%	56%	3,835	16%	94%
0,21	82%	58%	4,54	14%	95%
0,23	76%	58%	5,2	12%	95%
0,25	76%	59%	8,045	10%	97%
0,27	76%	61%	10,08	8%	97%
0,3	71%	61%	12,585	6%	97%
0,34	69%	61%	14,735	4%	97%
0,385	67%	61%	15,48	4%	98%
			22,89	2%	98%
En rojo, los valores de corte para MN>2,5 DS (>0,14) y para MN1>P50 (>0,41)			37,11	0%	100%

Tal y como se observa en la tabla anterior, la sensibilidad para el punto de corte de >2.5DS fue de 88% y considerando el punto >P50 de 65% y la especificidad fue del 52% frente al 63% respectivamente.

Se repitió la misma aproximación pero excluyendo del análisis los pacientes que han recibido quimioterapia con el esquema “5+2”, obteniéndose una AUC de 0,712

En la tabla siguiente (tabla 6.24) se muestran los resultados de asociación con persistencia de enfermedad para la variable categórica MN1, según grupos de riesgo citogenético y según tratamiento de inducción recibido.

<b>Tabla 6.24 Tablas de contingencia para MN1. Todos los grupos citogenéticos y todos los tratamientos</b>				
<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;P50</b>				
<b>Variable a estudio</b>	<b>Persistencia</b>	<b>RC</b>	<b>P valor</b>	<b>estadístico</b>
<b>Positivo</b>	56,9% (33/58)	43,1%(25/58)	0,003	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	29,1% (16/55)	70,9% (39/55)		
<b>RR para persistencia</b>	1,956 (IC95% 1,223-3,128)			
<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;2,5 DS</b>				
<b>Positivo</b>	57,1% (44/77)	42,9% (33/77)	<0,001	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	13,9% (5/36)	86,1% (31/36)		
<b>RR para persistencia</b>	4,114 (IC95% 1,783-9,493)			

<b>Tabla 6.25 Tablas de contingencia para MN1. Todos los grupos citogenéticos y sólo 7+3</b>				
<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;P50 excluidos pacientes con quimioterapia tipo "5+2"</b>				
<b>Variable a estudio</b>	<b>Persistencia</b>	<b>RC</b>	<b>P valor</b>	<b>estadístico</b>
<b>Positivo</b>	54,9% (28/51)	45,1%(23/51)	0,005	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	27,8% (15/54)	72,2% (39/54)		
<b>RR para persistencia</b>	1,976 (IC95% 1,203-3,248)			
<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;2,5 DS excluidos pacientes con quimioterapia tipo "5+2"</b>				
<b>Positivo</b>	55,7% (39/70)	44,3% (31/70)	<0,001	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	11,4% (4/35)	88,6% (31/35)		
<b>RR para persistencia</b>	4,875 (IC95% 1,894-12,550)			

Seguidamente se muestran las tablas de contingencia y riesgo relativos y la distribución de frecuencias para persistencia de los dos puntos de corte de MN1, considerando, sólo el subgrupo de pacientes con cariotipo de riesgo intermedio.

<b>Tabla 6.26 Tablas de contingencia para MN1. CG de riesgo intermedio</b>				
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;P50</b>			
<b>Variable a estudio</b>	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	58,5% (24/41)	41,5% (17/41)	0,004	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	28,3% (13/46)	71,7% (33/46)		
<b>RR para persistencia</b>	2,071 (IC95% 1,222-3,511)			
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;2,5 DS</b>			
<b>Positivo</b>	60,7% (34/56)	39,3% (22/56)	<0,001	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	9,7% (3/31)	90,3% (28/31)		
<b>RR para persistencia</b>	6,274 (IC95% 2,097-18,770)			

A continuación, excluyendo pacientes con tratamiento de inducción tipo 5+2

<b>Tabla 6.27 Tablas de contingencia para MN1. CG de riesgo intermedio y solo 7+3</b>				
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;P50</b>			
<b>Variable a estudio</b>	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	60,5% (23/38)	39,5% (15/38)	0,002	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	26,7% (12/45)	73,3% (33/45)		
<b>RR para persistencia</b>	2,270 (IC95% 1,312-3,928)			
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;2,5 DS</b>			
<b>Positivo</b>	62,3% (33/53)	37,7% (20/53)	<0,001	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	6,7% (2/30)	93,3% (28/30)		
<b>RR para persistencia</b>	9,340 (IC95% 2,409-36,215)			

Seguidamente en las tablas 6.28 y 6.29 los resultados para pacientes con cariotipo normal.

<b>Tabla 6.28 Tablas de contingencia para MN1. CG normal y todos los tratamientos</b>				
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;P50</b>			
<b>Variable a estudio</b>	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	54,8% (17/ 31)	45,2% (14/31)	0,010	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	25% (10/40)	75% (30/40)		
<b>RR para persistencia</b>	2,194 (IC95% 1,175-4,097)			
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;2,5 DS</b>			
<b>Positivo</b>	58,1% (25/43)	41,9% (18/43)	<0,001	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	7,1% (2/28)	92,9% (26/28)		
<b>RR para persistencia</b>	8,140 (IC95% 2,090-31,699)			

<b>Tabla 6.29 Tablas de contingencia para MN1. CG normal y solo tratamiento 7+3</b>				
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;P50 excluidos quimioterapia tipo 5+2</b>			
<b>Variable a estudio</b>	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	57,1% (16/ 28)	42,9% (12/28)	0,007	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	25% (10/40)	75% (30/40)		
<b>RR para persistencia</b>	2,286 (IC95% 1,223-4,272)			
	<b>Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN1 si &gt;2,5 DS excluidos quimioterapia tipo 5+2</b>			
<b>Positivo</b>	60% (24/40)	40% (16/40)	<0,001	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	7,1% (2/26)	92,9% (24/26)		
<b>RR para persistencia</b>	8,400 (IC95% 2,158-32,703)			

Estos resultados muestran que, considerando ambos puntos de corte en los distintos subgrupos, existe una asociación significativa entre ausencia de sobreexpresión de MN1 y RC, que se traduce en mayor riesgo relativo (RR) para persistencia.

La misma metodología se siguió para la variable a estudio BAALC. De igual manera al procedimiento seguido con MN1, se han excluido del análisis los pacientes sin valores de BAALC. El número total de casos para estudio fue de 108.

En primer lugar los resultados de su análisis como variable cuantitativa, por test paramétricos y no paramétricos, se muestran en la tabla 6.20

Estudio mediante curvas ROC de la asociación con persistencia de enfermedad

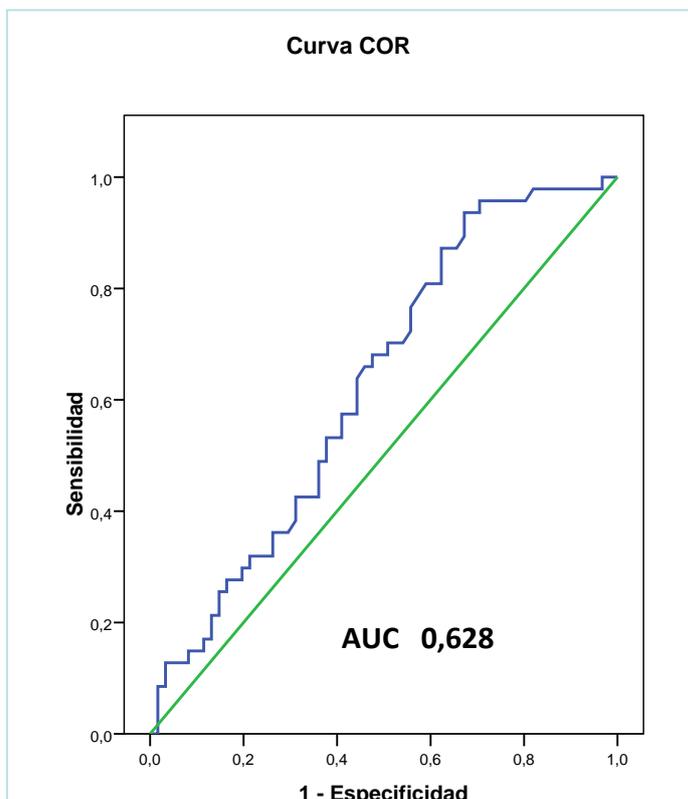


Figura 6.7 Curvas ROC para la variable BAALC para la situación de persistencia de enfermedad

La sensibilidad y especificidad de la variable respecto a la persistencia de enfermedad se muestra en la tabla adjunta

Tabla 6.30 Valor Sensibilidad y especificidad BAALC para persistencia					
Valor BAALC	Sensibilidad	Especificidad	Valor BAALC	Sensibilidad	Especificidad
0,0000135	100%	2%	1,27	53%	59%
0,0043	98%	5%	1,475	53%	62%
0,01145	98%	8%	1,55	51%	62%
0,015	98%	11%	1,635	49%	62%
0,0215	98%	15%	1,745	47%	64%
0,032	98%	18%	1,865	45%	64%
0,037	96%	21%	2,106	43%	66%
0,048	96%	23%	2,285	43%	69%
0,063	96%	26%	2,365	40%	69%
0,0995	96%	30%	2,475	38%	69%
0,105	94%	30%	2,69	36%	70%
0,14	91%	33%	3,755	34%	74%
0,155	89%	33%	3,89	32%	74%
0,18	87%	34%	4,41	32%	79%
0,23	87%	38%	4,6	30%	79%
0,255	83%	38%	5	28%	80%
0,29	81%	41%	5,205	28%	82%
0,305	79%	43%	5,575	26%	84%
0,32	77%	44%	5,705	23%	85%
0,4	74%	44%	6,26	21%	85%
0,495	72%	44%	7,655	19%	87%
0,53	70%	46%	8,38	17%	87%
0,56	70%	48%	9,56	17%	89%
0,595	70%	49%	11,47	15%	89%
0,635	68%	49%	14,36	15%	92%
0,675	68%	51%	15,995	13%	92%
0,715	68%	52%	16,75	13%	93%
0,79	66%	52%	17,03	13%	95%
0,845	66%	54%	18,06	13%	97%
0,855	64%	56%	19,035	11%	97%
0,87	60%	56%	28,66	9%	98%
0,965	57%	56%	41,22	6%	98%
1,085	57%	57%	46,225	4%	98%
1,195	55%	59%	50,62	1%	99%
1,27	53%	59%	54,205	0%	100%
En rojo, los valores de corte para BAALC>2,5 DS (>0,3) y para BAALC>P50 (>0,96)			55,8	0%	100%

Tal y como se observa en la tabla, la sensibilidad para el punto de corte de >2.5DS fue de 79% y de 57% considerando punto >P50 y la especificidad fue del 43% frente al 56%

respectivamente. Cuando Se excluyeron los casos con quimioterapia tipo 5+2 y se realizó el estudio de curvas ROC, con un total de 100 casos válidos para análisis, con un AUC de 0,643

En cuanto al estudio como variable categórica, el análisis se realizó según los hallazgos citogenéticos y la quimioterapia de inducción. Primero con todos los pacientes por CG y tratamiento (n=108) y luego excluidos los que reciben “5+2” (n=100)

**Tabla 6.31** Tabla de contingencia para Sobreexpresión de BAALC incluyendo todos los cariotipos.

Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >P50				
Variable a estudio	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	50% (27/54)	50% (27/54)	0,174	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	37% (20/54)	63% (34/54)		
<b>RR para persistencia</b>	1,350 (IC95% 0,871-2,093)			
Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >2,5 DS				
Variable a estudio	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	50% (38/76)	50% (38/76)	0,036	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	28,1% (9/32)	71,9% (23/32)		
<b>RR para persistencia</b>	1,778(IC95% 0,978-3,232)			

**Tabla 6.32** Tabla de contingencia para Sobreexpresión de BAALC incluyendo todos los cariotipos y sólo paciente con quimioterapia tipo 7+3

Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >P50				
Variable a estudio	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	47,9% (23/48)	52,1% (25/48)	0,117	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	34,6% (18/52)	65,4% (34/52)		
<b>RR para persistencia</b>	1,384 (IC95% 0,860-2,228)			

	Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >2,5 DS			
<b>Positivo</b>	47,8% (33/69)	52,2% (36/69)	0,038	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	25,8% (8/31)	74,2% (23/31)		
<b>RR para persistencia</b>	1,853 (IC95% 0,972-3,535)			

A continuación los hallazgos con la misma aproximación solo para pacientes con cariotipo de riesgo intermedio para n =84

**Tabla 6.33** Tabla de contingencia para Sobreexpresión de BAALC incluyendo cariotipos de riesgo intermedio y todos las quimioterapias

	Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >P50			
<b>Variable a estudio</b>	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	56,4% (22/39)	43,6%(17/39)	0,019	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	31,1% (14/45)	68,9% (31/45)		
<b>RR para persistencia</b>	1,813 (IC95% 1,083-3,034)			

	Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >2,5			
<b>Positivo</b>	51,8 (28/55)	48,2% (27/55)	0,040	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	27,6% (8/29)	72,4% (21/29)		
<b>RR para persistencia</b>	1,877 (IC95% 0,988-3,566)			

Misma aproximación excluyendo los pacientes que recibieron quimioterapia tipo 5+2 para un total de 80 pacientes validos par el estudio.

**Tabla 6.34** Tabla de contingencia para Sobreexpresión de BAALC para CG de riesgo intermedio excluidos pacientes con quimioterapia 5+2

Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >P50				
Variable a estudio	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	58,3% (21/36)	41,7% (15/36)	0,010	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	29,5% (13/44)	70,5% (31/44)		
<b>RR para persistencia</b>	1,974 (IC95% 1,158-3,365)			
Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >2,5 DS				
Variable a estudio	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	51,9% (27/52)	48,1% (25/52)	0,020	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	25% (7/28)	75% (21/28)		
<b>RR para persistencia</b>	2,077 IC95% 1,039-4,152)			

Por último, los resultados estudiando solo pacientes con CG normal para n=69 incluyendo todas las quimioterapias (Tabla 6.35) y 66 pacientes cuando solo se consideran los tratados con 7+3 (tabla 6.36)

**Tabla 6.35** Tabla de contingencia para Sobreexpresión de BAALC para CG normal incluidas todos los tipos de quimioterapia

Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >P50				
Variable a estudio	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	54,8% (17/31)	45,2% (14/31)	0,016	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	26,3% (10/38)	73,7% (28/38)		
<b>RR para persistencia</b>	2,084 (IC95% 1,120-3,876)			
Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >2,5 DS excluidos pacientes con quimioterapia tipo "5+2"				
Variable a estudio	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	46,7% (21/45)	53,3% (23/45)	0,079	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	25% (6/24)	75% (18/24)		
<b>RR para persistencia</b>	1,867 IC95% 0,873-3,992)			

Y por último, resultados excluidos pacientes con quimioterapia tipo 5+2

<b>Tabla 6.36 Tabla de contingencia para Sobreexpresión de BAALC para CG normal excluidos pacientes con quimioterapia 5+2</b>				
	Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >P50 excluidos pacientes con quimioterapia tipo "5+2"			
<b>Variable a estudio</b>	Persistencia	RC	P valor	estadístico
<b>Positivo</b>	57,1% (16/28)	42,9% (12/28)	0,011	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	26,3% (10/38)	73,7% (28/38)		
<b>RR para persistencia</b>	2,171 (IC95% 1,167-4,042)			
	Frecuencia de remisión completa y persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC si >2,5 DS excluidos pacientes con quimioterapia tipo "5+2"			
<b>Positivo</b>	47,6% (22/42)	52,4% (22/42)	0,070	$\chi^2$
<b>Negativo</b>	25% (6/24)	75% (18/24)		
<b>RR para persistencia</b>	1,905 IC95% 0,889-4,081)			

### 6.3.1.2 Modelos multivariantes respecto a la influencia de las variables categóricas en la persistencia tras inducción.

Se construyeron varios modelos multivariante para estudiar cómo se relacionan entre sí las distintas variables con impacto significativo sobre la persistencia en el estudio bivalente, tomando como punto de partida las variables MN1 y BAALC.

Modelos construidos para la variable MN1 >P50 para persistencia tras quimioterapia de inducción.

<b>Tabla 6.37a</b>		<b>Modelo multivariante nº1 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN 1 positivo si &gt;P50</b>			
<b>Variables incluidas</b>		<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>RR bivalente</b>
<b>MN1 P50</b>		0,134	3,271	1,408-7,594	1,976
<b>Edad</b>		0,050			
<b>Riesgo CG</b>					
	Bueno frente adverso	0,051	0,134	0,018-1,011	0,146
	Bueno frente Intermedio	0,183	0,442	0,133-1,470	0,326 *
<b>R2: 0,216</b>					
<b>*: no significativo</b>					

<b>Tabla 6.37b</b>		<b>Modelo multivariante nº2 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN 1 positivo si &gt;P50</b>			
<b>Variables incluidas</b>		<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>RR bivalente</b>
<b>MN1 P50</b>		0,134	2,080	0,799-5,418	1,976
<b>Edad</b>		0,029			
<b>Riesgo CG</b>					
	Bueno frente adverso	0,076	0,155	0,020-1,212	0,146
	Bueno frente Intermedio	0,298	0,523	0,155-1,773	0,326 *
<b>BAALC 2,5 DS</b>		0,1	2,439	0,842-7,064	1,718
<b>R2: 0,216</b>					
<b>*: no significativo</b>					

<b>Tabla 6.37c</b>		<b>Modelo multivariante nº3 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN 1 positivo si &gt;P50</b>			
<b>Variables incluidas</b>		<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>RR bivalente</b>
<b>MN1 P50</b>		0,143	2,047	0,786-5,333	1,976
<b>Edad</b>		0,05			
<b>Riesgo CG</b>					
	Bueno frente	0,075	0,151	0,019-1,212	0,146

	adverso				
	Bueno frente Intermedio	0,347	0,550	0,159-1,909	0,326 *
<b>Quimioterapia Inducción 7+3 vs 5+2</b>		>0,5	1,677	0,253-11,130	1,824
<b>BAALC 2,5 DS</b>		>0,1	2,389	0,824-6,927	1,718
<b>R2: 0,219</b>					
<b>*: no significativo</b>					

A continuación se muestran los resultados de los modelos de análisis multivariante tomando como referencia la expresión de MN1 a partir de > 2,5 DS.

<b>Tabla 6.38a</b>	<b>Modelo multivariante nº1 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN 1 positivo si &gt;2,5 DS</b>			
<b>Variables incluidas</b>	P valor	OR	IC 95%	RR bivalente
<b>MN1&gt;2,5DS</b>	< 0,001	10,364	3,438-31,244	1,976
<b>Edad</b>	0,029	1,035	1,004-1,068	
<b>Riesgo CG</b>				
Bueno frente adverso	0,027	0,098	0,012-0,769	0,146
Bueno frente Intermedio	0,142	0,374	0,101-1,392	0,326 *
<b>R2: 0,352</b>				
<b>*: no significativo</b>				

<b>Tabla 6.38b</b>	<b>Modelo multivariante nº2 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN 1 positivo si &gt;2,5 DS</b>			
<b>Variables incluidas</b>	P valor	OR	IC 95%	RR bivalente
<b>MN1&gt;2,5DS</b>	0,001	9,217	2,469-34,401	4,114
<b>Edad</b>	0,036	1,034	1,002-1,067	
<b>Riesgo CG</b>				

	Bueno frente adverso	0,045	0,118	0,015-0,952	0,146
	Bueno frente Intermedio	0,189	0,410	0,108-1,553	0,326 *
<b>BAALC 2,5 DS</b>		>0,5	1,087	0,318-3,710	1,718
<b>R2: 0,326</b>					
<b>*: no significativo</b>					

<b>Tabla 6.38c</b>		<b>Modelo multivariante nº3 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable MN 1 positivo si &gt;2,5 DS</b>			
<b>Variables incluidas</b>		<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>RR bivalente</b>
<b>MN1&gt;2,5DS</b>		0,001	9,221	2,468-34,754	4,114
<b>Edad</b>		0,081	1,030	0,996-1,065	
<b>Riesgo CG</b>					
	Bueno frente adverso	0,044	0,112	0,013-0,943	0,146
	Bueno frente Intermedio	0,228	0,443	0,111-1,691	0,326 *
<b>Quimioterapia Inducción 7+3 vs 5+2</b>		>0,5	1,880	0,257-13,120	1,824
<b>BAALC 2,5 DS</b>		>0,5	1,050	0,306-3,595	1,718
<b>R2: 0,330</b>					
<b>*: no significativo</b>					

Como se observa en las tablas de los modelos multivariante y considerando >P50, sólo mantiene significación la edad al diagnóstico y riesgo citogenético bueno frente a adverso. Mientras que considerando >2,5DS mostraron asociación significativa, edad al diagnóstico, sobreexpresión de MN1 y riesgo citogenético bueno frente a adverso.

Para ambas definiciones de sobreexpresión de de MN1 se exploraron otras variables como leucocitos al diagnóstico, mutación de NPM1 o mutación de FLT3, pero no se

encontró impacto en los modelos ni consiguieron OR estadísticamente significativos. (Datos no presentados).

A continuación se muestran los distintos modelos construidos en base a las definiciones de sobreexpresión de BAALC. En primer lugar los desarrollados para BAALC si >P50 de la población enferma

<b>Tabla 6.39a</b>		<b>Modelo multivariante nº1 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC positivo si &gt;P50</b>			
<b>Variables incluidas</b>		<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>RR bivariante</b>
<b>BAALC &gt; P50</b>		0,1	2,001	0,867-4,620	1,350*
<b>Edad</b>		0,039	1,031	1,002-1,061	
<b>Riesgo CG</b>					
	Bueno frente adverso	0,088	0,169	0,022-1,305	0,146
	Bueno frente Intermedio	0,178	0,444	0,137-1,447	0,326 *
<b>R2: 0,138</b>					
<b>*: no significativo</b>					

<b>Tabla 6.39b</b>		<b>Modelo multivariante nº2 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC positivo si &gt;P50</b>			
<b>Variables incluidas</b>		<b>P valor</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>RR bivariante</b>
<b>BAALC &gt; P50</b>		>0,5	1,084	0,441-2,661	1,350*
<b>Edad</b>		0,013	1,036	1,008-1,065	
<b>NPM1 mutado</b>		0,048	0,331	0,111-0,990	0,472
<b>R2: 0,146</b>					
<b>*: no significativo</b>					

A continuación los modelos multivariantes creados a partir de BAALC mayor 2,5 DS

Tabla 6.40a	Modelo multivariante nº1 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC positivo >2,5DS			
Variabes incluidas	P valor	OR	IC 95%	RR bivariante
BAALC>2,5DS	0,013	3,276	1,285-8,350	1,718
Edad	0,005	1,042	1,012-1,072	
R2: 0,156				
*: no significativo				

Tabla 6.40b	Modelo multivariante nº2 para persistencia de enfermedad a la quimioterapia de Inducción para la variable BAALC positivo >2,5DS			
Variabes incluidas	P valor	OR	IC 95%	RR bivariante
BAALC>2,5DS	>0,5	1,080	0,320-3,647	1,350*
Edad	0,015	1,038	1,007-1,069	
MN1> 2,5DS	0,002	7,648	2,086-28,041	4,114
R2: 0,276				
*: no significativo				

De acuerdo con estos modelos, la edad al diagnóstico mantuvo su significación en todos ellos y únicamente fue significativo BAALC >2,5 en el modelo de la Tabla 6.46a (con la variable edad) y al introducir MN1>2.5DS, el BAALC pierde significación.

### 6.3.2 Estudio de supervivencia global de la serie.

Para el total de la serie de 119 pacientes, se produjeron 73 exitus. La media de seguimiento de la serie fue de 24,51 meses (IC95% 19,98- 29,04), mediana de 16 meses, con rango que discurre entre 0 y 116 meses, para un rango intercuartílico de 29 meses.

Mediante estudio con curvas de Kaplan Meier, se obtuvieron los siguientes resultados para la media y mediana de supervivencia de la serie.

- Media de 42 meses con IC al 95% 33,33- 51,08
- Mediana de 22 meses con IC al 95% entre 14,51- 29,48

Con el siguiente gráfico de probabilidad de supervivencia.

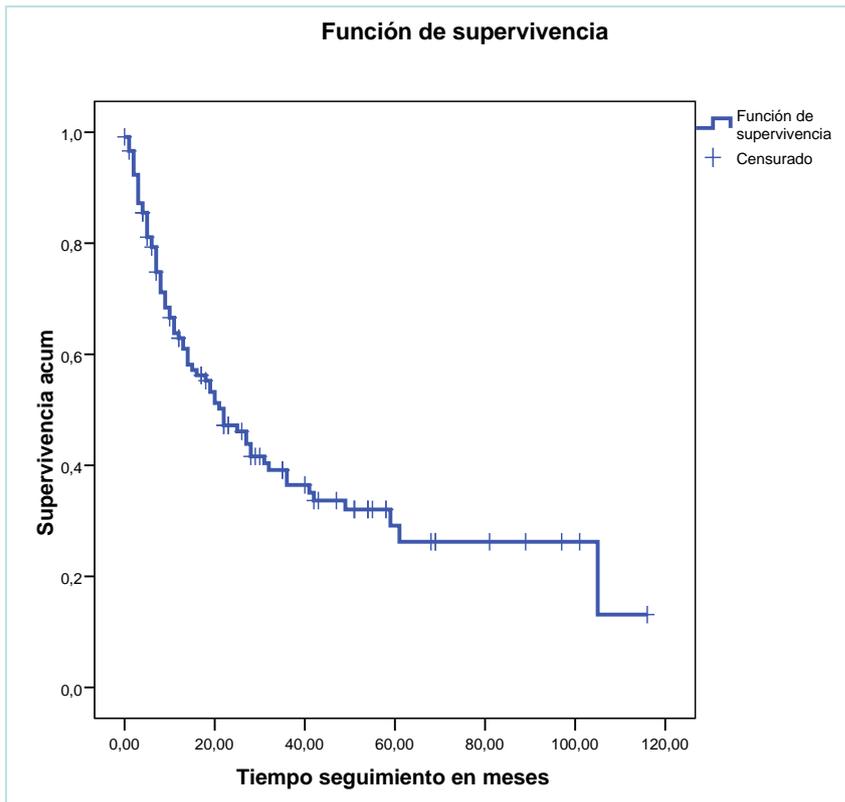


Figura 6.8 Curva de supervivencia global de la serie de 119 pacientes

Se estudió el impacto de variables en la probabilidad de supervivencia. La influencia de la edad categorizada en tres grupos se muestra a continuación (Fig 6.9 y Tabla 6.41).

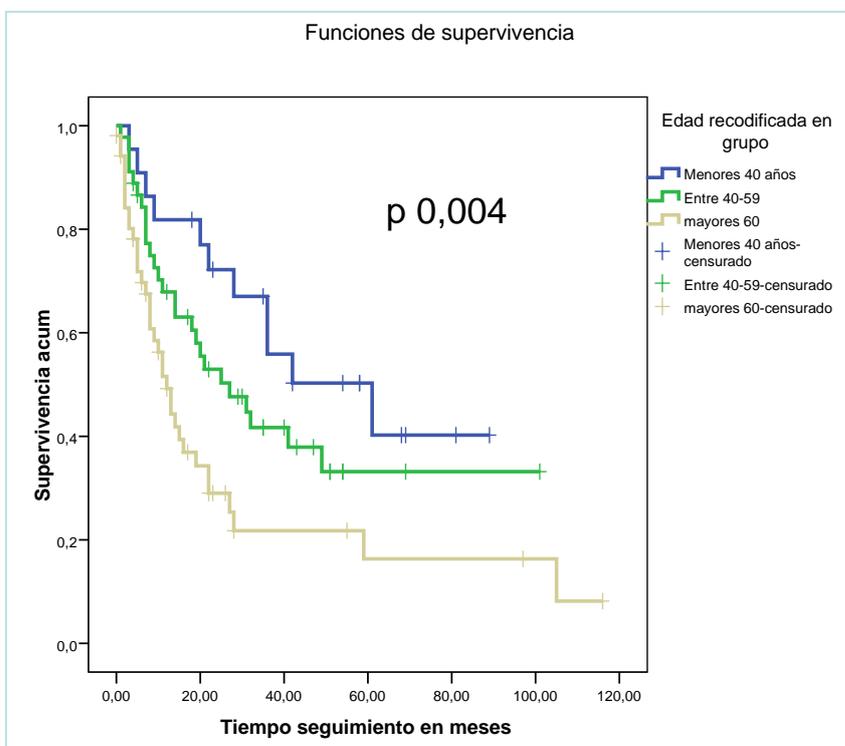
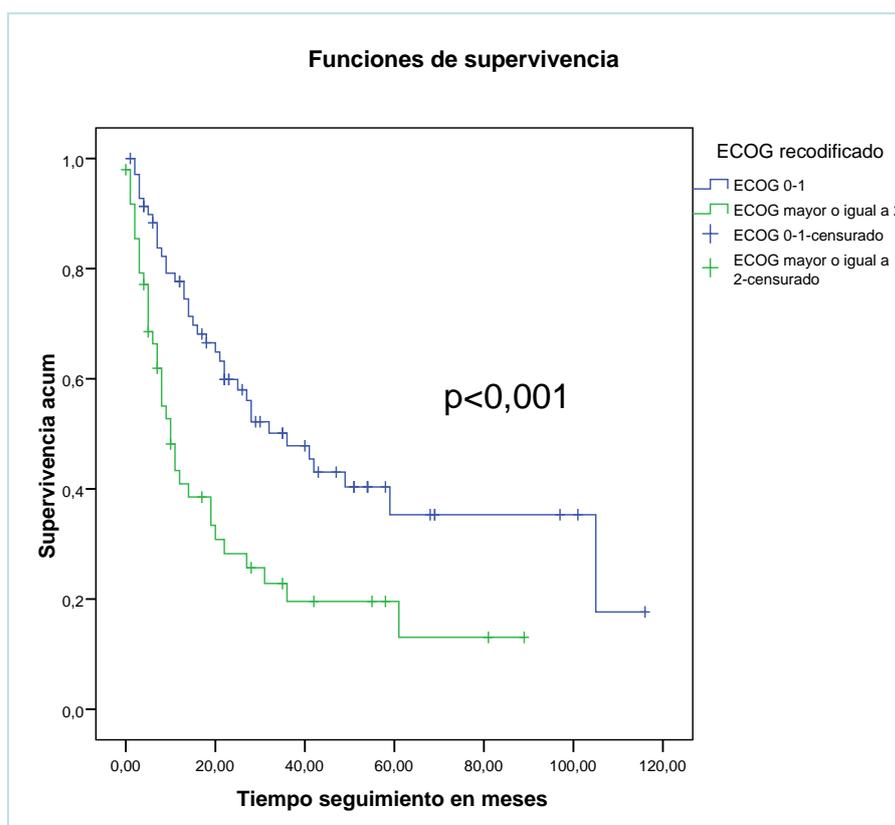


Figura 6.9 Curva de supervivencia según grupos de edad

El impacto del estado general del paciente definido por la escala ECOG categorizada en dos grupos, menor de 2 y mayor o igual a 2 se indica en la Fig. 6.10 y Tabla 6.41.



**Figura 6.10** Curva de supervivencia global según escala ECOG

Variable	Impacto en supervivencia global de la serie de las variables Edad y estado general estratificadas					
	Mediana (meses)	IC 95%	P (log Rank)	HR	IC 95%	p
<b>Menor 40 años</b>	61	20,91-101,08	0,004	ref.		
<b>Edad 40-59</b>	27	11,41-42,59	0,004	1,586	0,781-3,222	0,202
<b>Mayores 60</b>	12	8,73-29,48	0,004	2,785	1,399-5,543	0,004
<b>ECOG &lt;2</b>	36	21,08-50,91	<0,001	ref.		
<b>ECOG ≥2</b>	10	6,27-13,72	<0,001	2,237	1,404-3,565	0,001

Respecto a las variables dependientes del tratamiento, se analizó la respuesta obtenida al primer ciclo de quimioterapia de tipo 7+3 (Fig. 6.11, Tabla 6.42). Se excluyeron para el análisis los pacientes que recibieron quimioterapia tipo 5+2 por tener una tasa de persistencia significativamente superior.

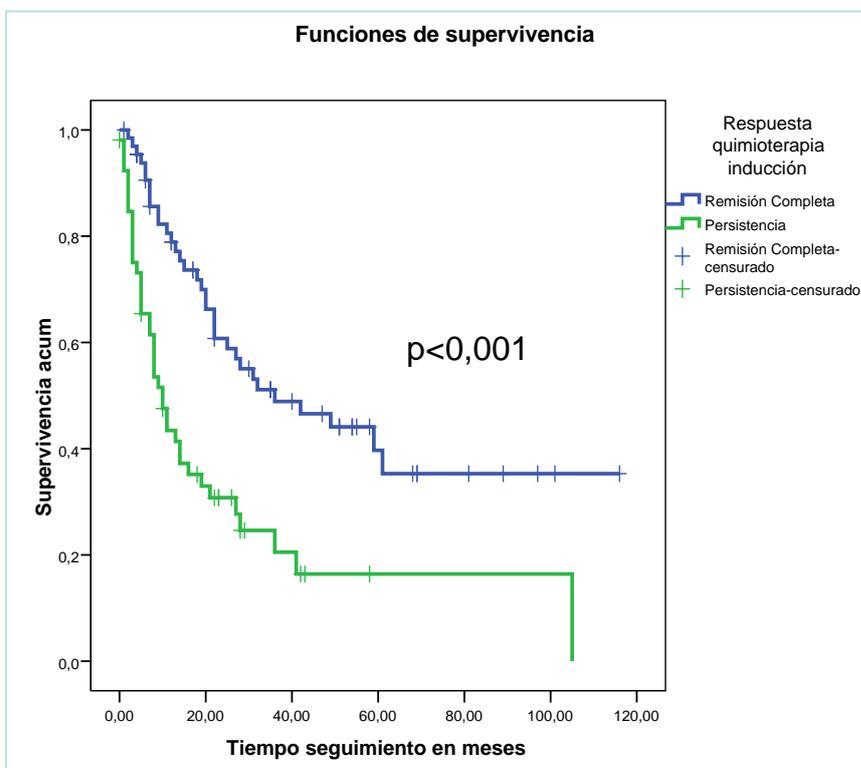
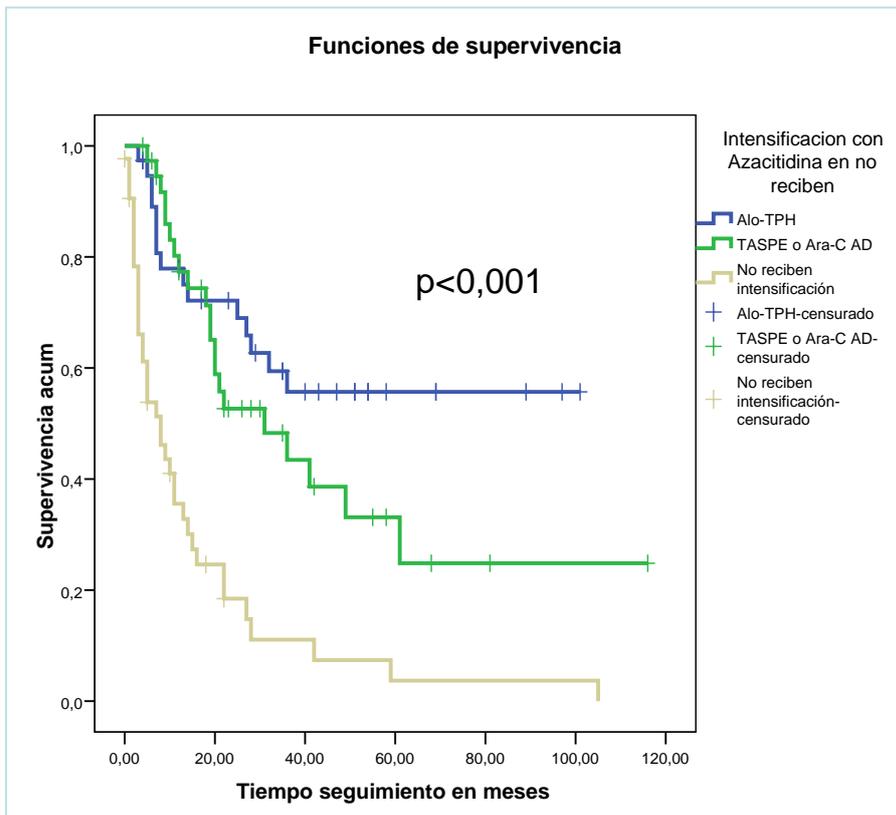


Figura 6.11 Curva de supervivencia global según respuesta obtenida al primer ciclo de inducción

Según el tratamiento recibido en la intensificación, se consideraron como equivalentes quimioterapia a altas dosis y trasplante autólogo. En el grupo de pacientes que no recibió intensificación se incluyeron 4 pacientes que recibieron azacitidina posterior a la inducción (Tabla 6.42, Figura 6.13).

Tabla 6.42	Impacto en supervivencia global de las variables dependientes del tratamiento					
Variable	Mediana (meses)	IC 95%	P (log Rank)	HR	IC 95%	p
RC al primer 7+3*	36	11,39-60,61	0,001	ref.		
Persistencia al primer 7+3*	11	4,91-17,09	0,001	2,316	1,389-3,861	0,001
* se han excluido pacientes con quimioterapia de inducción 5+2						
Alo TPH	NR	NR	<0,001	ref.		

TAPH o Ara-C AD	31	9,56-52,43	<0,001	1,553	0,798-3,020	0,195
No reciben	8	3,63-12,36	<0,001	4,974	2,688-9,204	<0,001
NR: no ha alcanzado la mediana de seguimiento						



**Figura 6.12 Supervivencia global según tratamiento de intensificación**

A continuación se muestra el impacto en la probabilidad de supervivencia de distintas variables biológicas. En la Figura 6.13 se describe la supervivencia en función del riesgo citogenético, y en la 6.14 en función de la clasificación propuesta por la European Leukemia Net en 2010. Se consideraron todos los pacientes de riesgo intermedio como un único grupo.

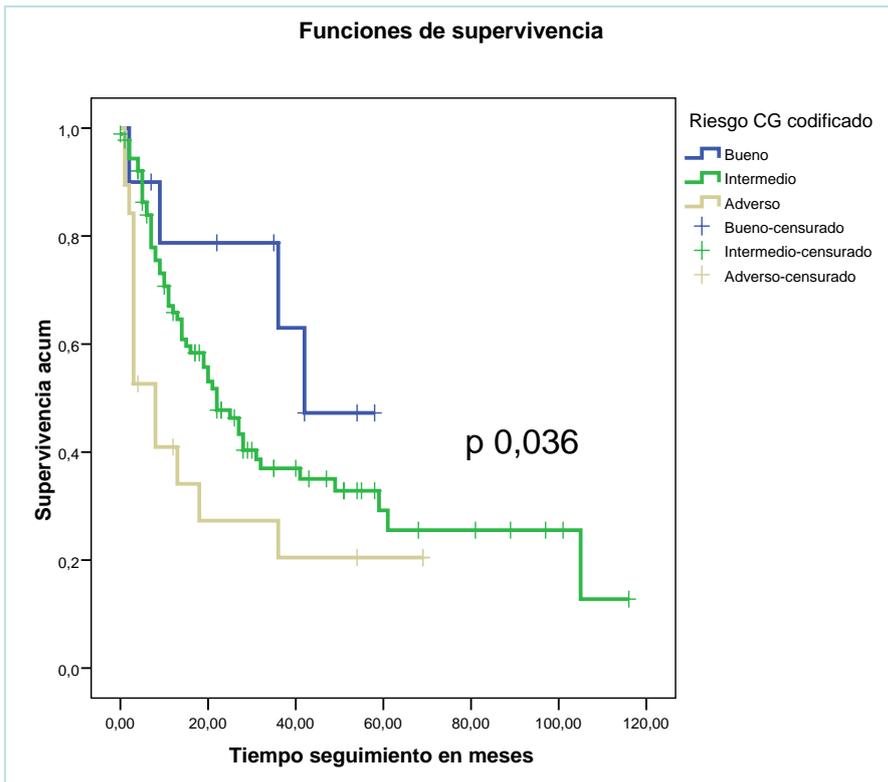


Figura 6.13 Supervivencia global según citogenética al diagnóstico

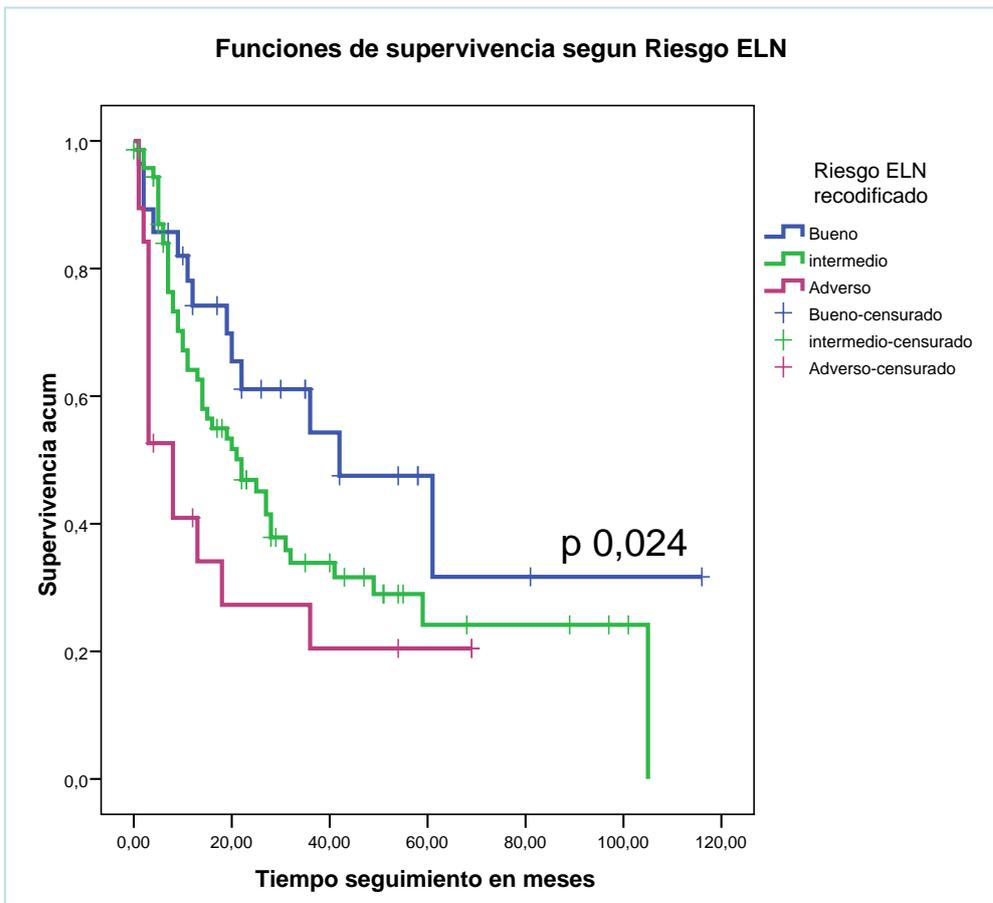


Figura 6.14 Supervivencia global según tratamiento de intensificación

Supervivencias medianas para los tres grupos según ELN fueron las siguientes:

Buen Pronóstico	42 meses con IC al 95% entre 12,44 y 71,55
Intermedio	22 meses con IC al 95% entre 12,29 y 31,70
Adverso	8 meses con IC al 95% entre 4,87 y 11,13

En la tabla siguiente se resumen nuestros resultados respecto a las principales variables con impacto en la supervivencia, descritas en la bibliografía.

<b>Tabla 6.43 Impacto en supervivencia global de la serie de las variables biológicas</b>						
<b>Variable</b>	<b>Mediana (meses)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P (log Rank)</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>WBC &lt;20000</b>	22	12,93-31,06	>0,5	0,851	0,487-1,486	>0,5
<b>WBC 20000- 50000</b>	20	0-41,14	>0,5	0,917	0,408-2,058	>0,5
<b>WBC&gt;50000</b>	19	3,53-34,47	>0,5	ref.		
<b>CG buen pronóstico</b>	42	27,46-54,34	0,036	ref.		
<b>Riesgo intermedio</b>	22	14,95- 29,05	0,036	1,868	0,675-5,173	0,229
<b>Riesgo Adverso</b>	8	4,87-11,12	0,036	3,436	1,125-10,494	0,030
<b>NPM1 mutado*</b>	22	17,48-26,51	>0,5	ref.		
<b>NPM1 germinal*</b>	28	11,32-44,68	>0,5	0,964	0,514-1,809	>0,5
<b>FLT3 mutado*</b>	11	3,53-18,47	0,123	1,636	,0867-3,014	0,131
<b>FLT3 germinal*</b>	28	3,68-52,31	0,123	ref.		
<b>CD34 pos</b>	20	6,53-33,46	0,264	0,740	0,431-1,268	0,273
<b>CD34 neg</b>	20	11,39-28,61	0,264	ref.		
<b>WBC: recuento de leucocitos al diagnóstico</b>						
<b>NR: no ha alcanzado la mediana de seguimiento</b>						
<b>Ref.: variable de referencia</b>						
<b>*: solo en pacientes con cariotipo normal</b>						

### 6.3.2.1 Impacto de las variables MN1 y BAALC en la supervivencia global

El análisis se realizó con los dos puntos de corte para cada variable y según grupos de riesgo citogenético tal y como se describe a continuación: en la serie global de pacientes, en los que presentaban citogenética de riesgo intermedio y por último en aquellos con cariotipo normal (Tablas 6.44-6.46 y figura 6.15).

<b>Tabla 6.44 Impacto en supervivencia global de la serie de las variables MN1 y BAALC en la serie completa de pacientes</b>						
<b>Variable</b>	<b>Mediana (meses)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P (log Rank)</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>MN1 &gt;P50 positivo</b>	14	2,39-25,60	0,196	ref.		
<b>MN1 &gt;P50 negativo</b>	27	15,56-38,43	0,196	0,734	0,455-1,183	0,204
<b>MN1&gt;2,5DS positivo</b>	19	4,79-33,20	>0,5	ref.		
<b>MN1&gt;2,5DS negativo</b>	27	19,40-34,59	>0,5	0,848	0,505-1,424	>0,5
<b>BAALC&gt;P50 positivo</b>	22	4,75-38,25	0,439	ref.		
<b>BAALC&gt;P50 negativo</b>	27	17,99-36	0,439	0,841	0,512-1,383	0,496
<b>BAALC&gt;2,5DS positivo</b>	22	9,20-34,79	0,427	ref.		
<b>BAALC&gt;2,5DS negativo</b>	27	17,80-36,20	0,427	0,8	0,459-1,397	0,433
<b>Ref.: variable de referencia</b>						

A continuación (Tabla 6.45) los resultados para pacientes con cariotipo clasificado como de riesgo intermedio para un total de 90 pacientes válidos para estudio.

<b>Tabla 6.45 Impacto en supervivencia global de la serie de las variables MN1 y BAALC en pacientes con cariotipo de riesgo intermedio</b>						
<b>Variable</b>	Mediana (meses)	IC 95%	P (log Rank)	HR	IC 95%	p
<b>MN1 &gt;P50 positivo</b>	21	6,80-35,19	0,422	1,248	0,721-1,259	0,429
<b>MN1 &gt;P50 negativo</b>	27	18,74-35,25	0,422	ref.		
<b>MN1&gt;2,5DS positivo</b>	21	3,94-38,05	>0,5	1,093	0,618-1,934	>0,5
<b>MN1&gt;2,5DS negativo</b>	27	20,08-33,91	>0,5	ref.		
<b>BAALC&gt;P50 positivo</b>	22	13,13-30,86	0,173	1,467	0,836-2,573	0,181
<b>BAALC&gt;P50 negativo</b>	27	23,09-30,90	0,173	ref.		
<b>BAALC&gt;2,5DS positivo</b>	22	14,42-29,58	0,360	1,315	0,725-2,384	0,368
<b>BAALC&gt;2,5DS negativo</b>	27	22,48-31,52	0,360	ref.		
<b>Ref.: variable de referencia</b>						

Y por último los resultados para los pacientes con cariotipo normal

<b>Tabla 6.46 Impacto en supervivencia global de la serie de las variables MN1 y BAALC en pacientes con cariotipo normal</b>						
<b>Variable</b>	<b>Mediana (meses)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P (log Rank)</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>MN1 &gt;P50 positivo</b>	21	8,25-33,75	0,422	1,386	0,747-2,572	0,301
<b>MN1 &gt;P50 negativo</b>	28	5,10-50,89	0,422	ref.		
<b>MN1&gt;2,5DS positivo</b>	22	0-49,36	>0,5	1,082	0,573-2,044	>0,5
<b>MN1&gt;2,5DS negativo</b>	25	15,68-34,13	>0,5	ref.		
<b>BAALC&gt;P50 positivo</b>	21	13,02-28,97	0,064	1,792	0,950-3,379	0,072
<b>BAALC&gt;P50 negativo</b>	49	NR	0,064	ref.		
<b>BAALC&gt;2,5DS positivo</b>	22	13-30,99	0,150	1,651	0,821-3,323	0,160
<b>BAALC&gt;2,5DS negativo</b>	49	9-88,99	0,150	ref.		
<b>Ref.: variable de referencia.</b>						
<b>NR: No alcanzada</b>						

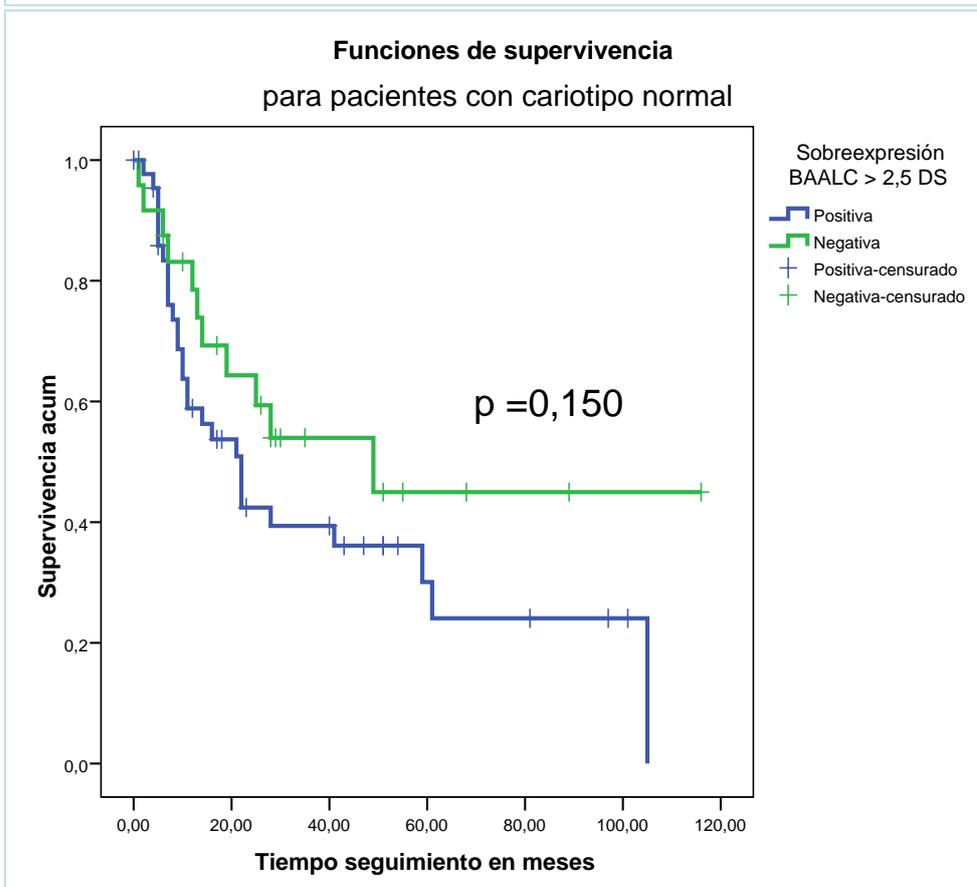
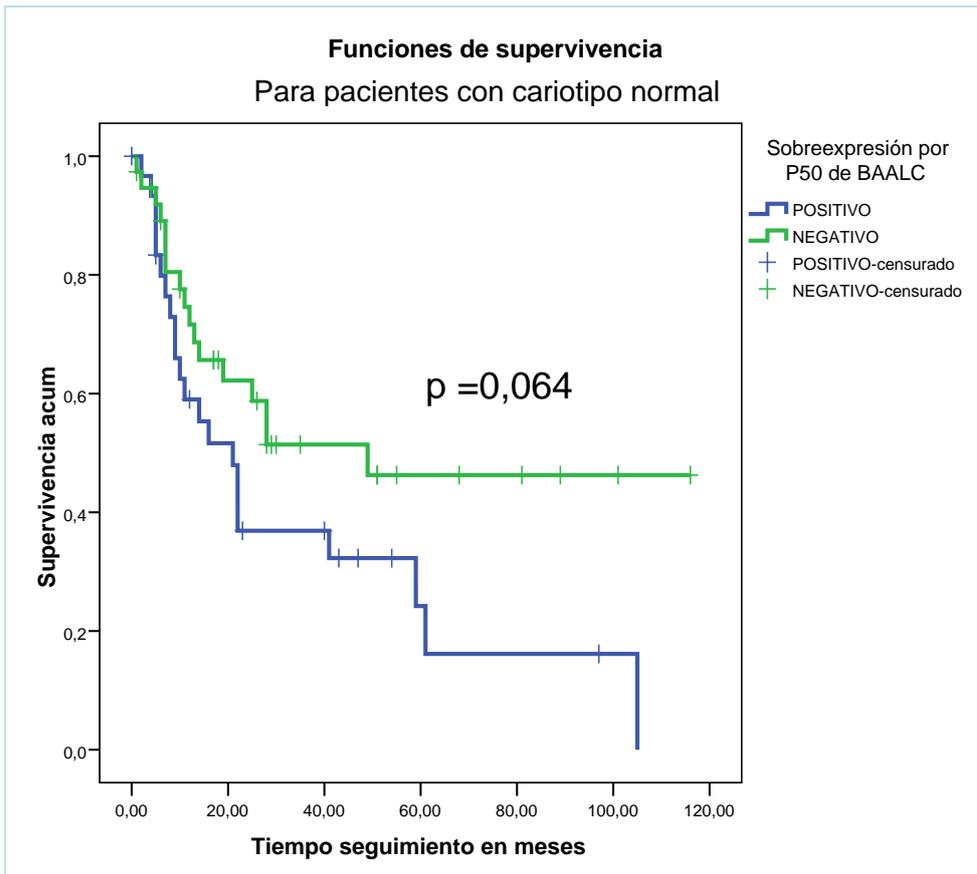


Figura 6.15 Curvas de supervivencia para sobreexpresión BAALC y CG normal

### 6.3.3 Estudio de supervivencia libre de progresión.

Se estudió el tiempo hasta recaída o progresión en aquellos pacientes que alcanzaron remisión completa morfológica. El total de pacientes que alcanzaron remisión completa con uno o sucesivos ciclos de quimioterapia fue de 92 (77,3%) y el número de recaídas observadas en este grupo fue de 43 (el 53% de los que alcanzaron RC).

La mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 19 meses, con un 68% libre de progresión a los 12 meses, 45% a los 24 meses y 41% a los 48 meses.

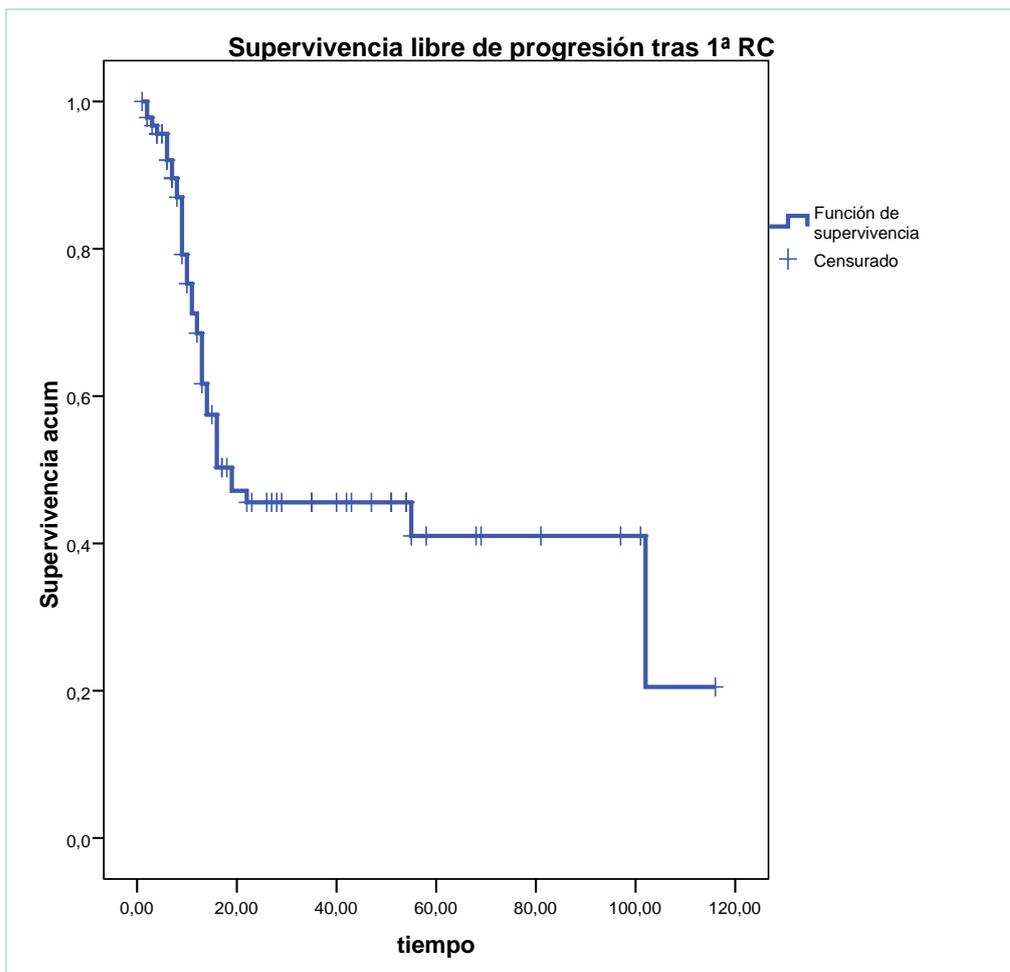


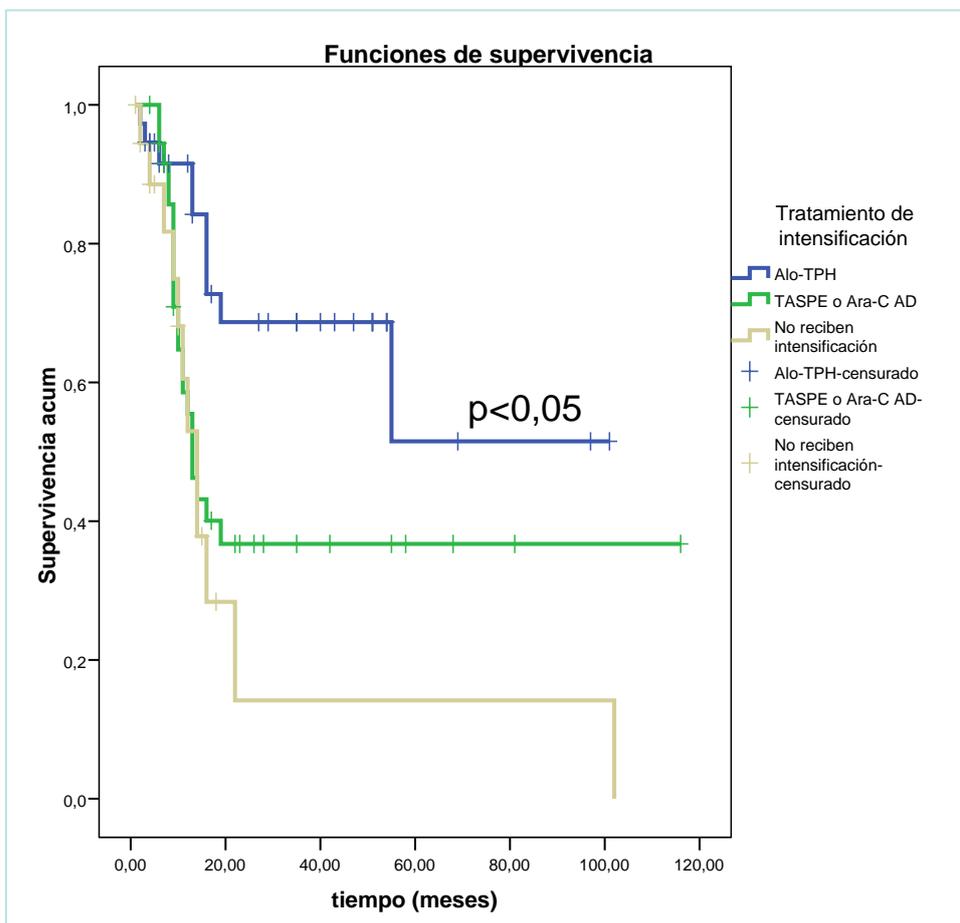
Figura 6.16 Supervivencia libre de progresión tras alcanzar primera remisión

Seguidamente, se muestran los resultados del análisis según el tipo de tratamiento recibido, trasplante alogénico o quimioterapia (incluido el trasplante autólogo), una vez alcanzada la remisión completa (Tabla 6.47-48 54 y Figura 6.17).

	ALO-TPH	TAPH o Ara C AD
SLP 12 meses	84,1%	70%
SLP 24 meses	68,7%	40,1%
SLP 48 meses	51,5%	36,7%

SLP: Supervivencia libre de progresión

	Mediana	IC	p	HR	IC al 95%	p
Alo-TPH	NR	0-47,58	<0,05	Ref.		
TAPH o Ara-C AD	13 meses	10,24-15,75	<0,05	2,420	1,134-5,161	0,022



**Figura 6.17 Supervivencia libre de progresión según intensificación recibida**

Respecto al cariotipo al diagnóstico las diferencias no fueron significativas ( $p > 0,3$ ).

### 6.3.3.1 Influencia en la supervivencia libre de progresión de las variables MN1 y BAALC

El impacto de MN1 y BAALC al momento del diagnóstico se muestran en la Tabla 6.55.

<b>Tabla 6.49</b>		<b>Supervivencia libre de recaída riesgo de recaída tras primera RC según nivel de expresión de MN1 y BAALC diagnóstico. Serie total de pacientes</b>					
	<b>Mediana</b>	<b>IC al 95%</b>	<b>p</b>		<b>HR</b>	<b>IC al 95%</b>	<b>p</b>
MN1>P50 Positivo	22	0-64,035	>0,5		1,050	0,569-1,937	>0,5
MN1>P50 Negativo	16	10,986-21,014	>0,5		ref.		
MN1> 2,5 DS Positivo	22	0-55,732	>0,5		0,939	0,504-1,749	>0,5
MN1> 2,5 DS Negativo	16	11,079-20,921	>0,5		Ref.		
BAALC >P50 Positivo	16	4,644-27,356	0,366		1,323	0,709-2,469	0,379
BAALC >P50 Negativo	19	NR	0,366		ref.		
BAALC >2,5 DS Positivo	16	5,558-26,442	0,274		1,458	0,727-2,922	0,288
BAALC >2,5 DS Negativo	19	NR	0,274		ref.		
NR: no alcanzada Mediana en meses							

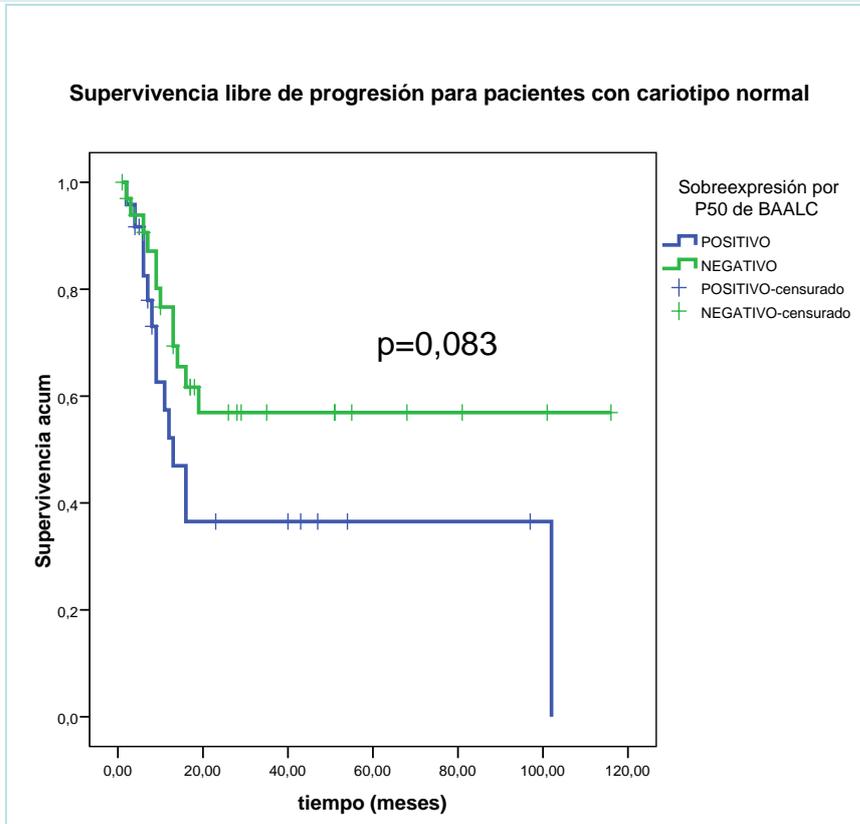
Se siguió la misma aproximación sólo en pacientes con cariotipo de riesgo intermedio que alcanzaron remisión completa, siendo 75 el total de casos válidos.

<b>Tabla 6.50</b>		<b>Supervivencia libre de recaída y riesgo de recaída tras primera RC según nivel de expresión de MN1 y BAALC diagnóstico. Pacientes con CG de riesgo intermedio</b>					
	<b>Mediana</b>	<b>IC al 95%</b>	<b>p</b>		<b>HR</b>	<b>IC al 95%</b>	<b>p</b>
MN1>P50 Positivo	22	0-67,250	>0,5		1,035	0,529-2,027	>0,5
MN1>P50 Negativo	16	11,029-20,971	>0,5		ref.		
MN1> 2,5 DS Positivo	22	0-67,732	>0,5		0,923	0,474-1,797	>0,5
MN1> 2,5 DS Negativo	16	11,029-20,971	>0,5		Ref.		
BAALC >P50 Positivo	16	11,303-20,697	0,143		1,631	0,831-3,202	0,155
BAALC >P50 Negativo	NR	NR	0,143		ref.		
BAALC >2,5 DS Positivo	16	4,488-27,211	0,224		1,543	0,751-3,170	0,237
BAALC >2,5 DS Negativo	19	NR	0,224		ref.		
NR: no alcanzada Mediana en meses							

Por último solo para pacientes con cariotipo normal que alcanzaron remisión completa, para un total de 62 casos válidos para el análisis.

<b>Tabla 6.51</b>		<b>Supervivencia libre de recaída y riesgo de recaída tras primera RC según nivel de expresión de MN1 y BAALC diagnóstico. Pacientes con cariotipo normal</b>					
	<b>Mediana</b>	<b>IC al 95%</b>	<b>p</b>		<b>HR</b>	<b>IC al 95%</b>	<b>p</b>
MN1>P50 Positivo	102	NR	>0,5		1,025	0,472-2,228	>0,5
MN1>P50 Negativo	19	12,346-25,654	>0,5		ref.		
MN1> 2,5 DS Positivo	102	4,719-199,282	>0,5		0,824	0,387-1,755	>0,5
MN1> 2,5 DS Negativo	16	9,367-22,633	>0,5		Ref.		
BAALC >P50 Positivo	13	7,761-18,239	0,083		1,935	0,892-4,197	0,095
BAALC >P50 Negativo	NR	NR	0,083		ref.		

BAALC >2,5 DS Positivo	16	9,109-22,891	0,171	1,759	0,763-4,053	0,185
BAALC >2,5 DS Negativo	NR	NR	0,171	ref.		
NR: no alcanzada.		Mediana en meses				



**Figura 6.18 SLP para paciente con cariotipo normal según sobreexpresión BAALC >P50**

En base a estos resultados sólo la sobreexpresión de BAALC >50 en el subgrupo de pacientes con cariotipo normal se asoció marginalmente a peor supervivencia libre de progresión.

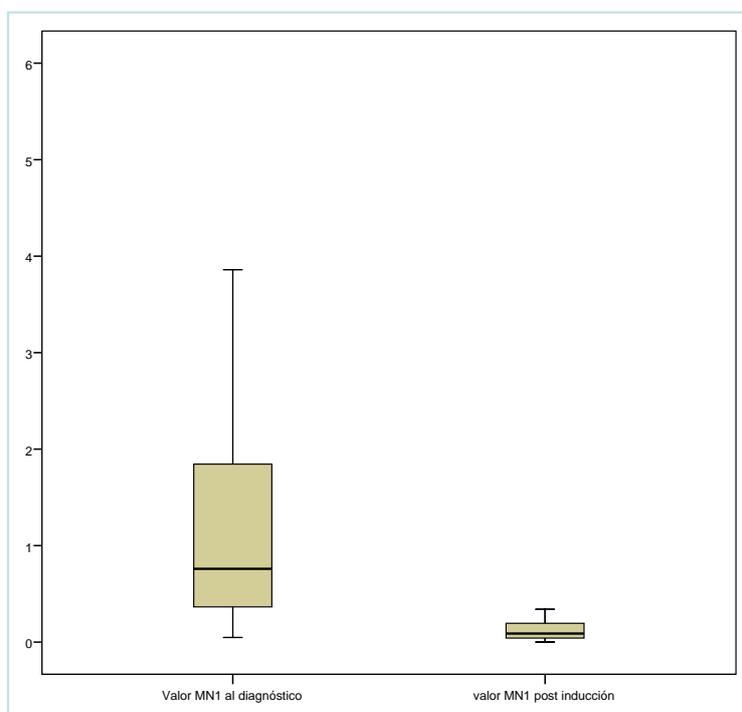
#### ***6.4 Estudio de los niveles de expresión de MN1 y BAALC medidos tras primer ciclo de quimioterapia. Frecuencia de RC e impacto pronóstico.***

Se procedió a estudiar el perfil de expresión en el momento de la evaluación de la respuesta a la inducción en las muestras de aspirado de médula ósea.

Se obtuvieron resultados de expresión de MN1 para 48 pacientes y de BAALC para 47, todos ellos con niveles de expresión estudiados en el momento del diagnóstico.

A continuación se muestran los niveles de expresión de MN1 con sus valores de tendencia central y con referencia a los obtenidos en el momento del diagnóstico de los mismos pacientes.

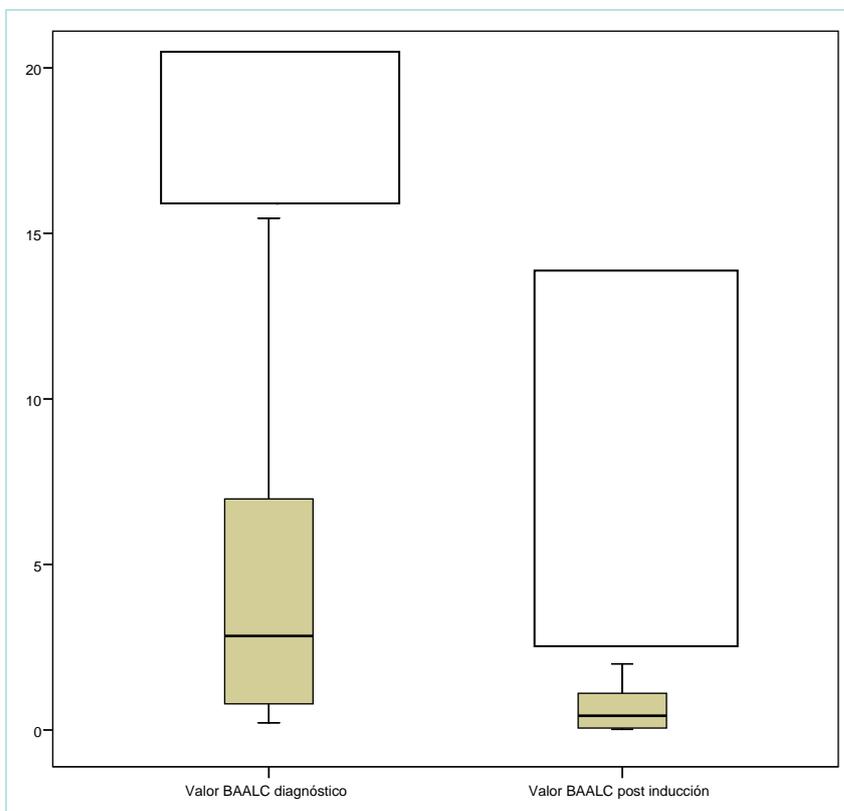
<b>Tabla 6.52</b>		<b>Estadísticos descriptivos para la variable MN1 al diagnóstico y MN1 post inducción</b>	
Valor MN1 al diagnóstico	Media		1,7344
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,9014
		Límite superior	2,5675
	Mediana		,6300
	Rango		15,77
	Amplitud intercuartil		1,62
Valor MN1 post Inducción	Media		,25495
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite superior	,13423
		Límite inferior	,37567
	Mediana		,08400
	Rango		1,960
	Amplitud intercuartil		,160
Comparación de los rangos de las medias según test de Wilcoxon			p <0,001
Los valores de MN1 al diagnóstico solo se han tenido en cuenta los de los 48 pacientes incluidos para estudio de niveles de expresión postinducción			



**Figura 6.19** Comparación con gráfico de cajas del recorrido de la variable MN1 al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción

De igual manera se muestran los resultados para la variable BAALC en tabla 6.53 y figura 6.20

<b>Tabla 6.53</b>	<b>Estadísticos descriptivos para la variable BAALC al diagnóstico y BAALC post inducción</b>		
Valor BAALC al diagnóstico	Media		7,5358
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	4,1007
		Límite superior	10,9708
	Mediana		2,8400
	Rango		54,58
	Amplitud intercuartil		7,41
Valor BAALC post inducción	Media		1,18794
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,52743
		Límite superior	1,84844
	Mediana		,43000
	Rango		11,993
	Amplitud intercuartil		1,160
Comparación de los rangos de las medias según test de Wilcoxon			p<0,001
Los valores de BAALC al diagnóstico solo se han tenido en cuenta los de los 47 pacientes incluidos para estudio de niveles de expresión postinducción			



**Figura 6.20** Comparación con gráfico de cajas del recorrido de la variable BAALC al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción

### 6.4.1 Asociación del nivel de expresión de MN1 y BAALC tras el primer ciclo de quimioterapia con la respuesta morfológica.

La asociación entre los dos puntos de corte de MN1 tras el primer ciclo de quimioterapia y la respuesta morfológica se muestra a continuación:

Variable	Persistencia	Remisión completa	RR	IC al 95	p
<b>MN1&gt;2,5DS positivo</b>	77,8%	22,2%	2,593	1,423-4,723	0,001
<b>MN1&gt;2,5DS negativo</b>	30%	70%	0,317	0,130-0,777	
<b>MN1&gt;P50 positivo</b>	100%	0%	2,667	1,787-3,979	0,001
<b>MN1&gt;P50 negativo</b>	37,5%	62,5%			

Igualmente se indica la asociación de la variable BAALC tras el primer ciclo de quimioterapia con la respuesta morfológica alcanzada.

Variable	Persistencia	Remisión completa	RR	IC al 95	p
<b>BAALC&gt;2,5DS positivo</b>	50%	50%	1,583	0,742-3,380	0,210
<b>BAALC&gt;2,5DS negativo</b>	31,6%	68,4%	0,731	0,452-1,181	
<b>BAALC&gt;P50 positivo</b>	61,5%	38,5%	2,667	1,787-3,979	0,104
<b>BAALC&gt;P50 negativo</b>	35,3%	64,7%	0,594	0,286-1,236	

### 6.4.2 Impacto pronóstico de los niveles de expresión de MN1 y BAALC medidos tras primer ciclo de inducción en la supervivencia global

Para estudiar si existía asociación entre los niveles de expresión de los genes MN1 y BAALC tras la quimioterapia de inducción se estudió en primer lugar el impacto en la SG considerando las variables MN1 y BAALC de manera categórica (Tablas 6.56 y 6.57).

También se estudió el impacto del grupo de pacientes que alcanzaron una situación de “dobles negativos”, es decir que perdieron la sobreexpresión de ambos genes, y de igual manera para aquellos que definidos como “dobles positivos”, mantuvieron la sobreexpresión de los dos genes tras la quimioterapia de inducción.

Estos grupos de pacientes de dobles negativos y dobles positivos, se crearon de manera duplicada a partir de las dos definiciones de cada variable.

Por últimos, se estudió el impacto del descenso de la sobreexpresión de manera cuantitativa para cada paciente. Para ello se fijaron dos puntos de corte, en los que se apreciaba un descenso del nivel de expresión del gen antes y después de la quimioterapia > al 90% y otro a partir del 95%.

<b>Tabla 6.56 Supervivencia según los niveles de expresión de MN1 tras la inducción</b>							
Variables	Mediana	IC 95%	P valor		HR	IC	p
<b>MN1 &gt;2,5DS</b> <b>Positivo</b>	14	0-451,113	,258		1,557	0,710-3,419	0,269
<b>MN1 &gt;2,5DS</b> <b>Negativo</b>	NR	NR			ref.		
<b>MN1&gt;P50</b> <b>Positivo</b>	11	0,471-21,529	0,270		1,725	0,635-4,687	0,285
<b>MN1&gt;P50</b> <b>Negativo</b>	36	14,830-57,170			ref.		
NR: No alcanzada							
Ref.: Variable de referencia							

<b>Tabla 6.57 Supervivencia según los niveles de expresión de BAALC tras la inducción</b>							
Variables	Mediana	IC 95%	P valor		HR	IC	p
<b>BAALC&gt;2,5DS</b> <b>Positivo</b>	14	2,887-25,113	,231		1,637	0,716-3,741	0,243
<b>BAALC&gt;2,5DS</b> <b>Negativo</b>	32	NR			ref.		
<b>BAALC&gt;P50</b> <b>Positivo</b>	14	5,904-22,096	0,449		1,374	0,592-3,187	0,459
<b>BAALC&gt;P50</b> <b>Negativo</b>	28	3,812-52,188			ref.		
NR: No alcanzada							
Ref.: Variable de referencia							

Tabla 6.58		Supervivencia según los niveles de expresión combinadas de las variables MN1 y BAALC tras la inducción				
Variables	Mediana	IC 95%	P valor	HR	IC	p
Dobles Positivos por P50 →SI	5	0-15,802	0,053	2,555	0,931-7,014	0,069
Dobles Positivos por P50 →NO	32	6,971-57,029		ref.		
Dobles Positivos por >2,5 DS→ SI	11	0,431-21,569	0,193	1,715	0,742-3,967	0,207
Dobles Positivos por >2,5 DS→ NO	32	NR		ref.		
Dobles Negativos por P50→ SI	22	0-53,818	>0,5	0,792	0,325-1,931	>0,5
Dobles Negativos por P50→ NO	14	0-36,004		ref.		
Dobles Negativos por >2,5DS→SI	NR	NR	0,319	0,626	0,245-1,610	0,333
Dobles Negativos por >2,5DS→NO	19	2,610-35,390		ref.		
NR: No alcanzada						
Ref.: Variable de referencia						
Mediana en meses						

De todas las variables, sólo los dobles positivos con el punto de corte >P50 tras la inducción se asociaron con peor supervivencia bordeando la significación estadística.

A continuación se muestran las curvas de supervivencia para los hallazgos más destacados de esta aproximación

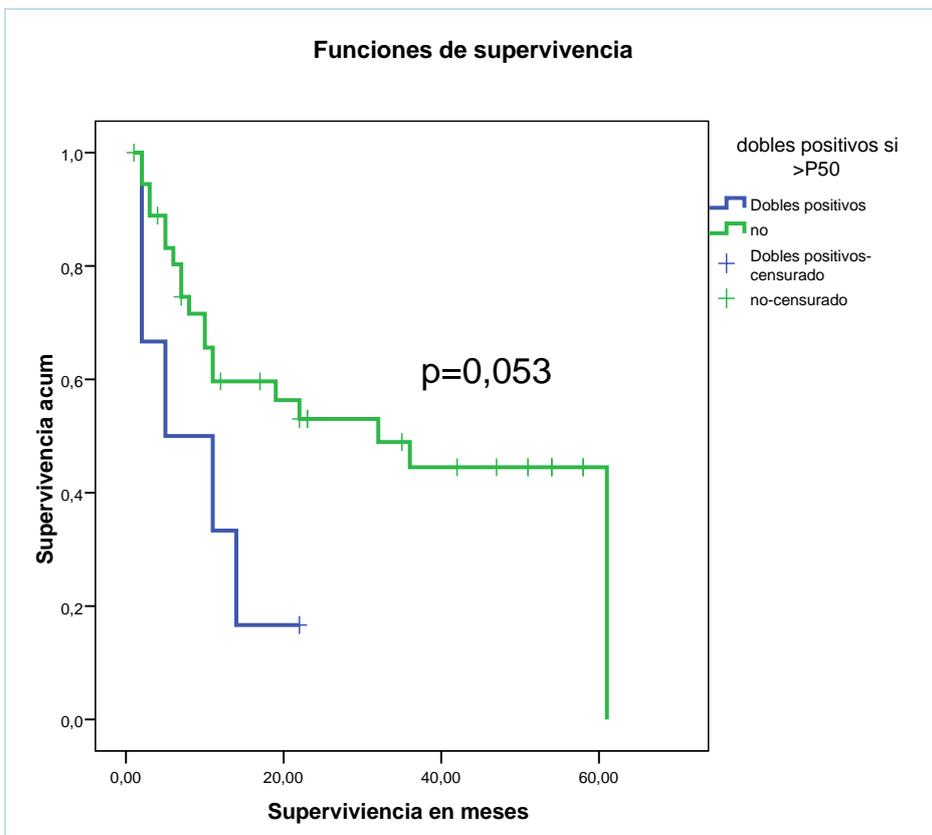
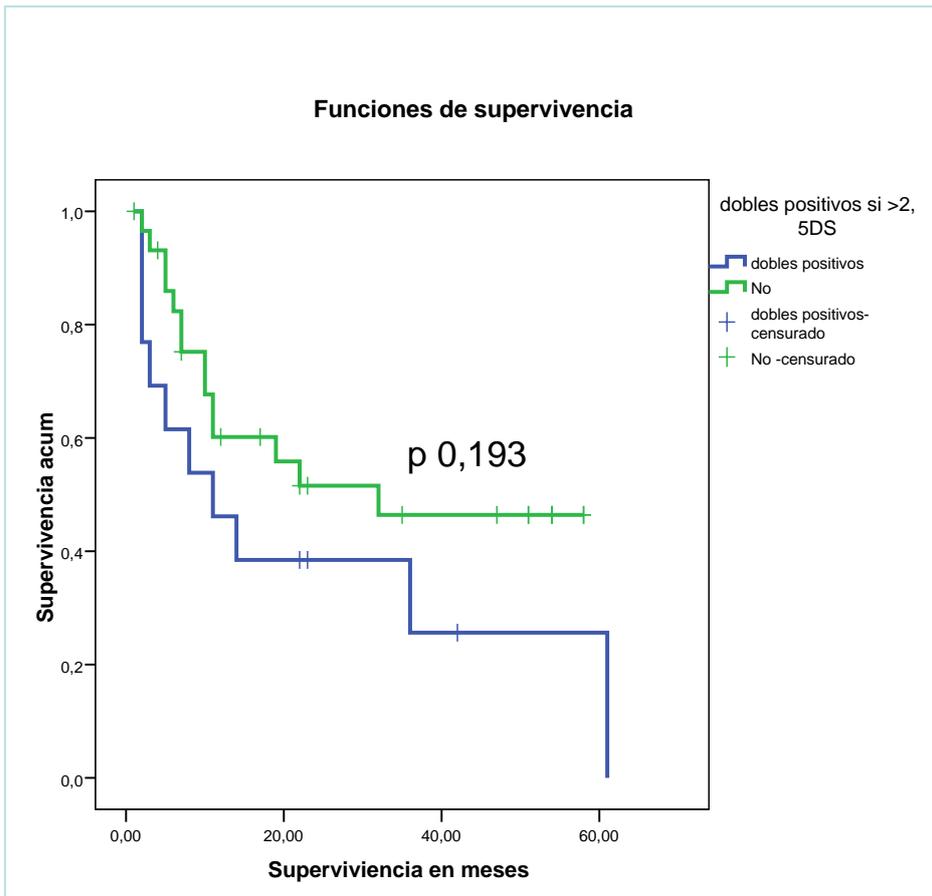


Figura 6.21 Curvas de supervivencia si persistencia de dobles positivos por ambos puntos de corte

Por último, se estudió el impacto en la SG del descenso de la sobreexpresión antes y después de la quimioterapia de manera cuantitativa. Para ello se fijaron dos puntos de corte: descensos del nivel de expresión del gen mayores al 90% y descensos mayores al 95%.

Tabla 6.59 Supervivencia según los descensos de los niveles de expresión de las variables MN1 y BAALC tras la inducción						
Variables	Mediana	IC 95%	P valor	HR	IC	p
Descenso de MN1 >90%	22	0-55,142	>0,5	1,027	0,459-2,297	>0,5
Descenso de MN1 <90%	32	6,986-57,014		ref.		
Descenso de MN1 >95%	29	2,269-119,731	>0,5	0,833	0,345-2,011	>0,5
Descenso de MN1 <95%	11	0-42,734		ref.		
Descenso de BAALC >90%	NR	NR	<b>0,063</b>	ref.		>0,073
Descenso de BAALC <90%	11	3,671-18,329		2,093	0,932-4,698	
Descenso de BAALC >95%	NR	NR	<b>0,023</b>	ref.		<b>0,034</b>
Descenso de BAALC <95%	11	5,812-16,188		3,220	1,093-9,486	

NR: No alcanzada  
Ref.: Variable de referencia  
Mediana en meses

Únicamente el descenso de expresión de BAALC >95% mostró una asociación significativa con la supervivencia.

Seguidamente se muestran las curvas de supervivencia respecto a descensos mayores del 90% y del 95% en la expresión del BAALC (Figura 6.22 y 6.23) donde se muestra la influencia estadísticamente significativa sobre la supervivencia de un descenso mayor del 95% de BAALC tras la quimioterapia.

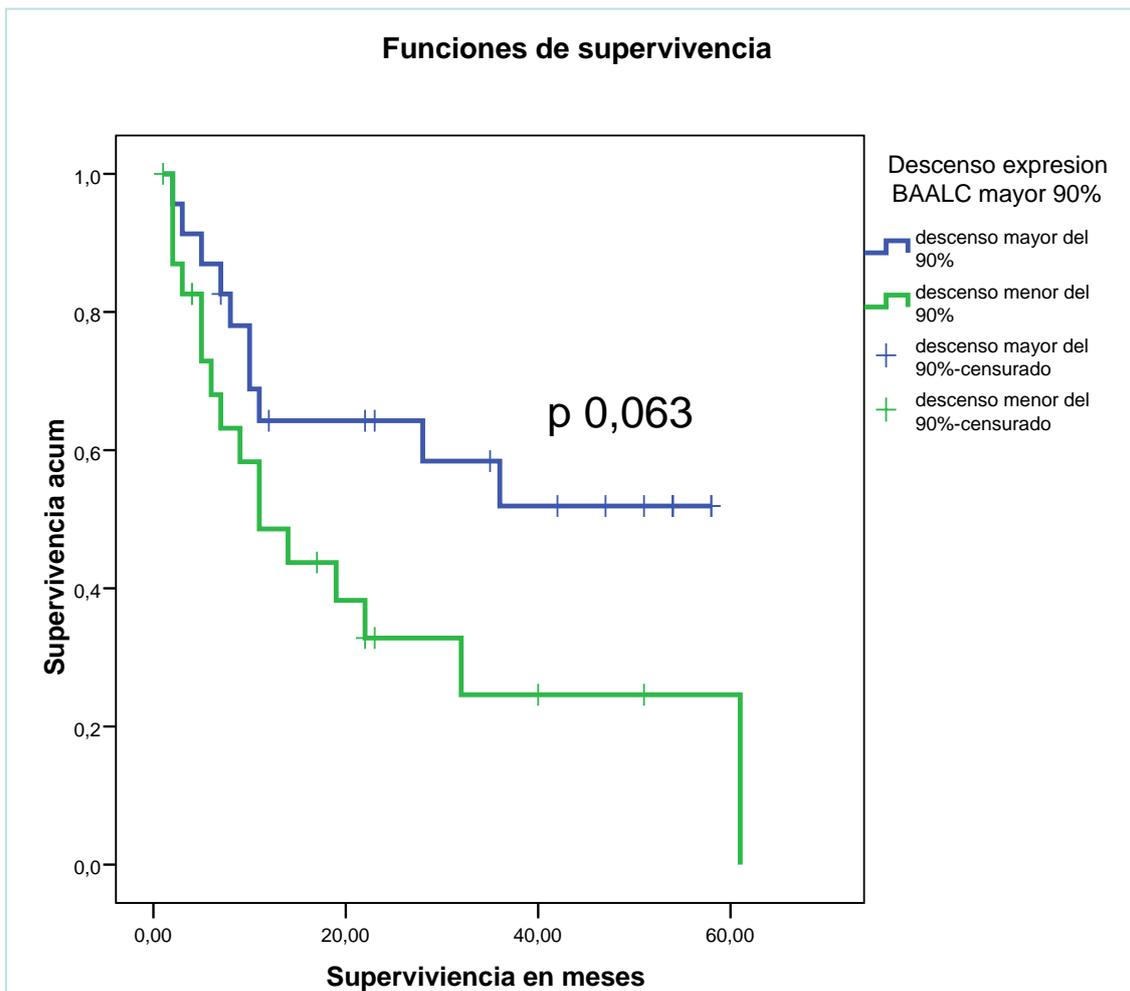
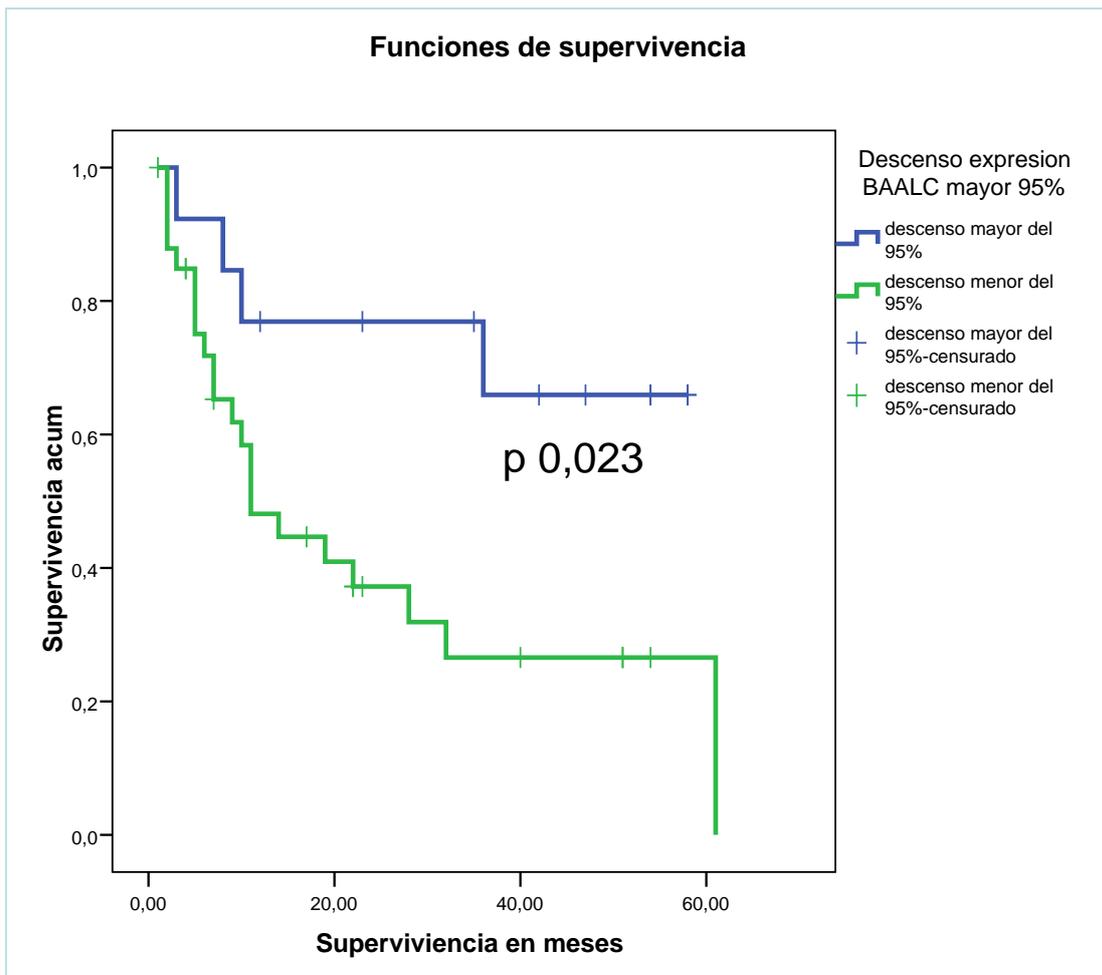


Figura 6.22 Curva de supervivencia según los pacientes presente descensos mayores del 90% en la expresión de BAALC

Tabla 6.60		Distribución de los pacientes con descenso mayor del 90% de BAALC según su riesgo citogenético				
		Riesgo citogenético			Total	
			bueno	intermedio	adverso	bueno
Descenso expresión BAALC	descenso mayor del 90%	Recuento	6	14	2	22
		%	27,3%	63,6%	9,1%	100,0%
	descenso menor del 90%	Recuento	2	19	3	24
		%	8,3%	79,2%	12,5%	100,0%
Total		Recuento	8	33	5	46
		% total	17,4%	71,7%	10,9%	100,0%



**Figura 6.23** Curva de supervivencia según los pacientes presente descensos mayores del 95% en la expresión de BAALC

Tabla 6.61		Distribución de los pacientes con descenso mayor del 95% de BAALC según su riesgo citogenético				
			Riesgo citogenético			Total
	bueno		intermedio	adverso		
Descenso Expresión BAALC	descenso mayor del 95%	Recuento	5	7	1	13
		%	38,5%	53,8%	7,7%	100,0%
	descenso menor del 95%	Recuento	3	26	4	33
		%	9,1%	78,8%	12,1%	100,0%
Total		Recuento	8	33	5	46
		% Total	17,4%	71,7%	10,9%	100,0%

### **6.5 Patrones de expresión de los genes MN1 y BAALC medidos en el momento de la recaída de los pacientes. Estudio descriptivo.**

En la cohorte se identificaron un total de 43 recaídas de la enfermedad en pacientes que alcanzaron la remisión completa morfológica previamente.

Sobre esta serie de 43 pacientes se estudiaron los niveles de expresión de MN1 y BAALC en el momento de la recaída, con resultados pareados disponibles para 30 casos de MN1 y 29 de BAALC.

En primer lugar se hizo un análisis descriptivo de las características de ambas variables, entendidas como cuantitativas al momento de la recaída y se compararon con los resultados al diagnóstico en esos mismo 31 pacientes. (Tabla 6.62, 6.63 y Figuras 6.24 y 6.25).

Tabla 6.62	Valores descriptivos de la variable MN1 al diagnóstico y la recaída		
VALOR MN1 al diagnóstico	Media		1,0590
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,0064
		Límite superior	2,1116
	Mediana		,2600
	Rango		15,18
	Amplitud intercuartil		,70
VALOR MN1 recaída	Media		,5154
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,1952
		Límite superior	,8356
	Mediana		,1600
	Rango		3,56
	Amplitud intercuartil		,38
Diferencias para los rangos de las medias por test de Wilcoxon			p 0,422

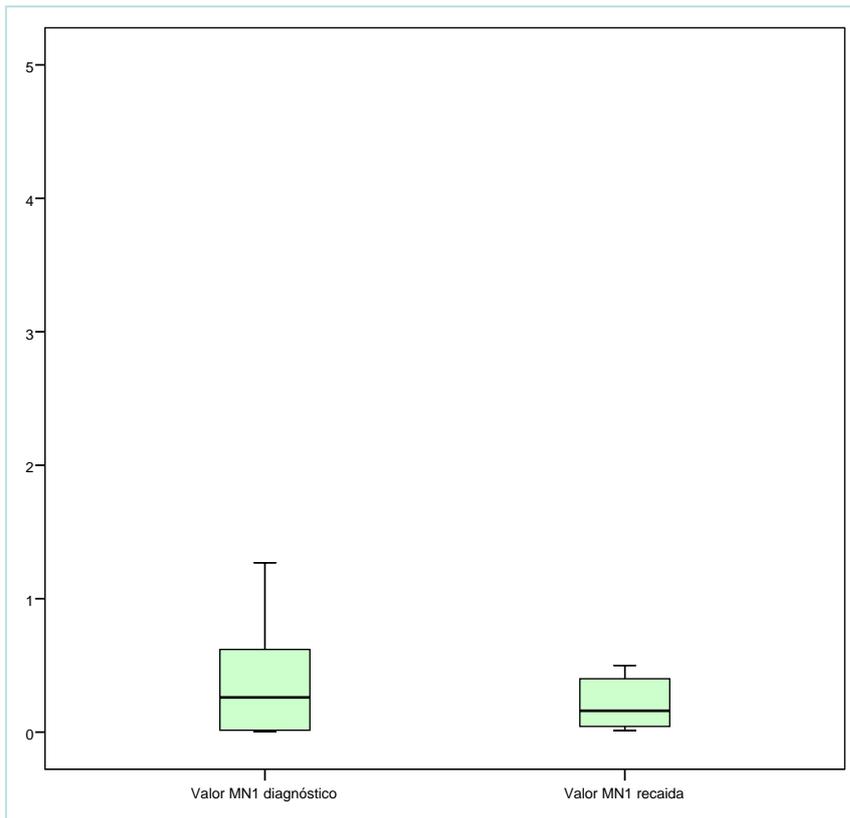
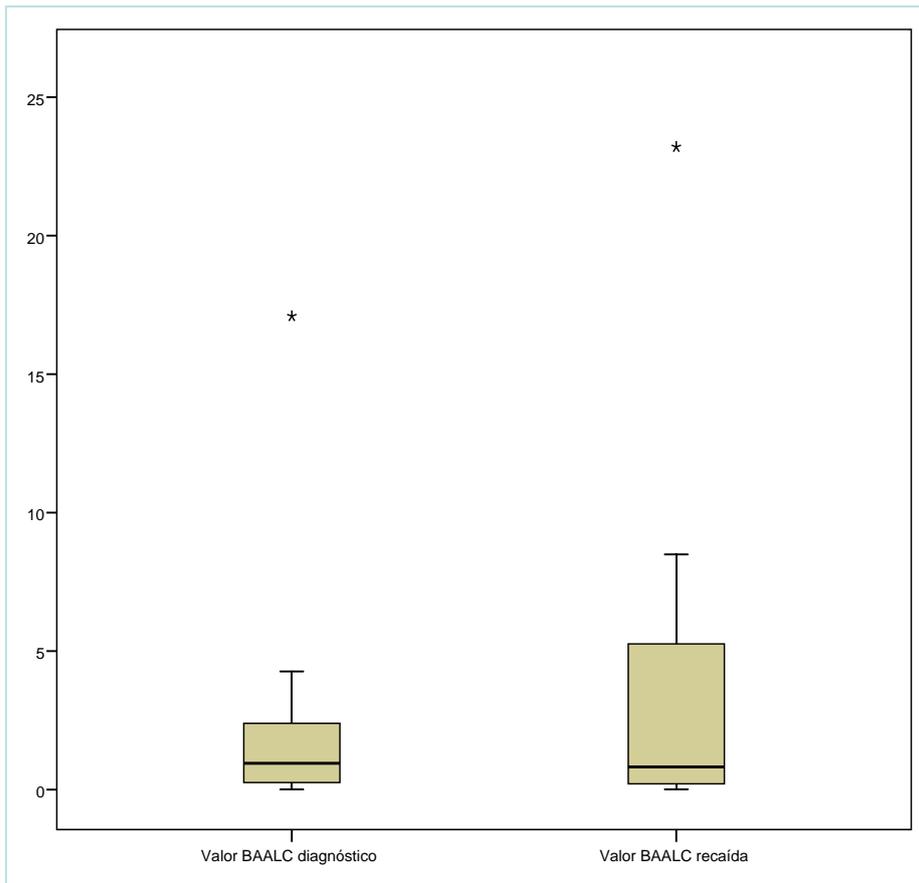


Figura 6.24 Comparación de la variable MN1 al diagnóstico y a la recaída

Tabla 6.63	Valores descriptivos de la variable BAALC al diagnóstico y la recaída		
Valor BAALC diagnóstico	Media		3,7960
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	-,2787
		Límite superior	7,8706
	Mediana		,9500
	Rango		54,80
	Amplitud intercuartil		2,24
Valor BAALC recaída	Media		4,9721
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,1687
		Límite superior	8,7754
	Mediana		,8200
	Rango		39,79
	Amplitud intercuartil		5,32
Diferencias para los rangos de las medias por test de Wilcoxon			p 0,699



**Figura 6.25 comparación de la variable BAALC al diagnóstico y a la recaída**

Se compararon los perfiles de expresión de ambos genes (MN1 y BAALC) al momento del diagnóstico y en la recaída. Para ello se definió sobreexpresión de acuerdo a los dos puntos de corte explorados en este trabajo. A continuación se muestran los resultados para la variable MN1:

Tabla 6.64		Tabla de asociación entre Sobreexpresión MN1 por >P50 al momento de la RECAIDA con el DIAGNÓSTICO			
		MN1 P50 diagnóstico		Total	
		positivo	Negativo		
MN1 P50 RECAIDA	positivo	Número	6	1	7
		% de MN1 P50 RECAIDA	85,7%	14,3%	100,0%
	negativo	Número	7	16	23
		% de MN1 P50 RECAIDA	30,4%	69,6%	100,0%
Total		Número	13	17	30
		% de MN1 P50 RECAIDA	43,3%	56,7%	100,0%
Prueba de McNemar para muestras pareadas					p 0,070

Tabla 6.65		Tabla de asociación entre Sobreexpresión MN1 por 2,5DS al momento de la RECAIDA con el DIAGNÓSTICO			
		MN1 al Diagnóstico		Total	
		positivo	negativo	positivo	
MN1 RECAIDA	positivo	Número	12	5	17
		% de MN1 RECAIDA	70,6%	29,4%	100,0%
	negativo	Número	4	9	13
		% de MN1 RECAIDA	30,8%	69,2%	100,0%
Total		Número	16	14	30
		% de MN1 RECAIDA	53,3%	46,7%	100,0%
Prueba de McNemar para muestras pareadas				p >0,5	

A continuación (Tabla 6.66 y 6.67) se resumen los resultados para la variable BAALC. El análisis se realizó sólo con los pacientes de los que se disponía de muestra al diagnóstico y en la recaída, con una n=29.

Tabla 6.66		Tabla para sobreexpresión BAALC si >P50 población enferma. Comparación al momento diagnóstico con la recaída.			
		BAALC P50 diagnóstico		Total	
		Positivo	Negativo	Positivo	
BAALC P50 RECAIDA	Positivo	Número	10	3	13
		% de BAALC P50 RECAIDA	76,9%	23,1%	100,0%
	Negativo	Recuento	5	11	16
		% de BAALC P50 RECAIDA	31,3%	68,8%	100,0%
Total		Recuento	15	14	29
		% de BAALC P50 RECAIDA	51,7%	48,3%	100,0%
Prueba de McNemar para muestras pareadas				p > 0,5	

Tabla 6.67		Tabla para sobreexpresión BAALC por 2,5DS población control. Comparación al momento diagnóstico con la recaída.			
		BAALC Diagnóstico		Total	
		Positivo	Negativo	Positivo	
BAALC Recaída	Positivo	Número	17	5	22
		% de BAALC RECAIDA	77,3%	22,7%	100,0%
	Negativo	Número	4	3	7
		% de BAALC RECAIDA	57,1%	42,9%	100,0%
Total		Número	21	8	29
		% de BAALC RECAIDA	71,4%	28,6%	100,0%
Prueba de McNemar para muestras pareadas				p >0,5	

En la tabla 6.68 se resumen los valores de sensibilidad y especificidad para la condición de recaída de cada definición de sobreexpresión de las variables MN1 y BAALC al diagnóstico

<b>Tabla 6.68</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<b>MN1 &gt;P50</b>	46%	94%	86%	70%
<b>MN1&gt;2,5</b>	76%	64%	72%	69%
<b>BAALC &gt;P50</b>	67%	79%	77%	69%
<b>BAALC&gt;2,5DS</b>	81%	38%	77%	43%



## 7.- Discusión de resultados.

### 7.1 *Características generales de la serie.*

Nuestra serie de pacientes refleja una población con las características habituales de los enfermos con LMA, pero con la siguiente particularidad: no puede considerarse en términos de estudio epidemiológico por presentar dos sesgos importantes en los criterios de inclusión de pacientes, ya que sólo se consideraron para el estudio los pacientes que habían sido seleccionados para un tratamiento con quimioterapia intensiva, y únicamente aquellos que habiendo recibido quimioterapia disponían de un estudio para la evaluación de la respuesta.

En nuestra serie la mediana de la edad es de 56 años, que es inferior a la de los principales estudios epidemiológicos que la sitúan a partir de las sexta década de vida (Dores et al., 2012; Juliusson et al., 2009). Sin embargo, la edad de nuestra serie es alta para una cohorte de pacientes que han recibido todos, tratamiento de inducción de tipo intensivo con la combinación de un antraciclínico y citarabina.

Por ejemplo, en los 24 trabajos analizados en el metaanálisis publicado por Richard Schlenk et al en JAMA en el año 2009 para estudiar el papel del ALo-TPH, solamente en 2 se incluían pacientes hasta los 60 años (Koreth et al., 2009), de tal manera que las recomendaciones propuestas por la European Leukemia NET reconoce como pacientes jóvenes candidatos a quimioterapia intensiva aquellos con edades inferiores a los 60 años (Dohner et al., 2010).

La distribución de los pacientes en relación a los grupos citogenéticos, respeta las proporciones descritas en la bibliografía, con predominio claro del grupo de riesgo intermedio sobre los otros (D. Grimwade et al., 2010). Sin embargo, en nuestra cohorte, la incidencia de pacientes con riesgo intermedio (75,6%, ver Tabla 6.6) fue superior a la descrita debido a una mayor proporción de enfermos con cariotipo normal (59%).

Este hecho se explica por varios motivos, en primer lugar en esta serie se excluyeron los paciente con t(15;17), lo que contribuye a una proporción menor de pacientes con

buen pronóstico. Por otro lado, al considerar únicamente pacientes que habían recibido quimioterapia de inducción, se excluyeron aquellos que por edad y presencia de cariotipo adverso no se consideraron beneficiarios de la administración de un tratamiento intensivo (Kantarjian et al., 2010; Malfuson et al., 2008; Wheatley et al., 2009).

En cuanto a las presencia de mutaciones importantes con respecto al pronóstico como son NPM1 y FLT3-ITD tuvimos una incidencia similar a la descrita (37% y 31,5% respectivamente) (Brunangelo Falini et al., 2005; Thiede et al., 2002). Si el análisis de los grupos pronóstico se hace además en base a la presencia o no de estas mutaciones siguiendo las recomendaciones de la ELN 2010, la distribución fue más proporcionada. Así, hubo menos pacientes en el grupo de riesgo intermedio (60,5%) y más en el de pronóstico favorable (23,5%) al pasar los que tenían un cariotipo normal y mutaciones en NPM1 a este último grupo (Dohner et al., 2010).

En cuanto al tratamiento recibido tras la quimioterapia de inducción, los pacientes se distribuyeron entre las cuatro opciones definidas en el apartado 5.3.2 (tabla 6.10) con predominio de las estrategias de intensificación basadas en Alo-TPH (32%) y TAPH (32%) aunque persiste un 33 % de pacientes que no pudo completar un tratamiento de intensificación.

Esta distribución terapéutica puede ser considerada subóptima si tenemos en cuenta la estratificación basada en las clasificaciones del ELN o del grupo PETHEMA (Dohner et al., 2010; Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010), ya que hasta el 75% de los pacientes de nuestra serie serían considerados como grupos de riesgo intermedio o adverso y por tanto deberían ser considerados para Alo-TPH en primera RC. Sin embargo los datos basados en registros poblacionales reflejan que, en la práctica, la frecuencia del tratamiento con Alo-TPH en primera RC es similar a lo observado en nuestro trabajo. Así por ejemplo A. Burnett et al, han descrito una frecuencia de Alo-TPH del 23,8% para aquellos que alcanzaron primera RC dentro de los ensayos clínicos

MRC AML 10, 12 y 15 con más de 3500 enfermos reclutados y considerados para el estudio (A. K. Burnett et al., 2013).

Cabe señalar que, esta distribución de los pacientes en base a la terapia postinducción hay que considerarla a la hora de interpretar los hallazgos de SG de nuestra serie, porque puede ser fuente de sesgos, ya que las distintas opciones terapéuticas mostraron un impacto significativo tanto en SG como en supervivencia libre de progresión, con ventaja para aquellos que recibieron Alo-TPH en cualquiera de sus modalidades (Ver tablas 6.42 y 6.48).

En nuestra serie la tasa global de RC tras el primer ciclo de quimioterapia de inducción fue del 55%, inferior a la publicada, que oscila en cifras cercanas al 70% (Faderl & Kantarjian, 2012; Sierra & Brunet, 2009). Sin embargo, con sucesivos ciclos o quimioterapia de rescate se elevó hasta el 78,2%, porcentaje que sí es congruente con lo descrito. No obstante, y tal como se definió en el capítulo de material y métodos, con el fin de evitar sesgos y mantener una muestra lo más homogénea posible, se analizó la tasa de RC tras el primer ciclo para asegurar que todos los pacientes hubieran recibido el mismo tratamiento.

Entre los factores clínicos y biológicos que influyeron de manera significativa en la tasa de RC en nuestra cohorte (ver tablas 6.21 y 6.22), destacaron la edad, las mutaciones en NPM1, o el cariotipo con ventaja para los pacientes con CG de buen pronóstico frente al adverso, todas ellas variables contempladas y reconocidas en la literatura médica (David Grimwade & Hills, 2009) y consideramos que ayudan a confirmar la reproducibilidad y la viabilidad de nuestra cohorte.

Hemos de destacar como variable con alto impacto, el tipo de quimioterapia de inducción con una tasa de RC para el esquema "5+2" de solo el 25% valor significativamente inferior de los pacientes que recibieron "7+3" (58,9%), con un RR para persistencia del 1,824 y diferencias estadísticamente significativas (p 0,025)

Los datos de la bibliografía publicada hasta el momento, han demostrado que en pacientes mayores de 65 años el esquema "5+2" recomendado en el protocolo PETHEMA LMA 2007 (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2007) produce resultados similares al tradicional 7+3 en términos de RC (Montesinos-Fernández, 2015). Los hallazgos observados en nuestra serie justifican que los pacientes con esquema 5+2 fueran eliminados del estudio de riesgo asociado al fallo de la quimioterapia de inducción, con el fin de evitar sesgos y mantener una cohorte lo más homogénea posible.

La SG de la serie mostró una mediana de 22 meses, fue de 63% al año y de 29,1% a los 5 años, con influencia significativa de variables como la citogenética, edad (categorizada en tres grupos de menores de 40 años, 40 a 59 años y mayores de 60 años), clasificación de la ELN y tratamiento de intensificación recibido,. Estos hallazgos se corresponden con lo descrito en la bibliografía (David Grimwade & Hills, 2009). En nuestra serie no mostraron impacto en la probabilidad de supervivencia ni la cifra de leucocitos, ni la presencia de mutaciones de NPM1 y FLT3 (considerando solo a los pacientes con cariotipo normal). Este hecho probablemente esté relacionado con el escaso tamaño muestral (solo hay 72 pacientes con perfil mutacional disponible) y la heterogeneidad del tratamiento de intensificación recibido.

Sí creemos importante destacar el fuerte impacto que en la SG mostró el fracaso de respuesta a la primera quimioterapia de inducción (36 meses frente a 11. (Ver Fig 6.11).

Esta observación, fuertemente contrastado en varios trabajos previos (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010; Schlenk, 2014) nos reafirma en nuestra hipótesis principal de búsqueda de marcadores que sean capaces de identificar a los pacientes con mayor riesgo de fracaso a la primera quimioterapia de inducción por el mal pronóstico que implica.

Los resultados globales de nuestra serie, con un 29% de pacientes potencialmente curados (supervivencia a los 5 años del diagnóstico) es similar a la publicada recientemente por Sha et al. en su estudio epidemiológico acerca de la supervivencia de LMA en el Reino Unido, donde a partir de la década de los años 2000, en los pacientes con un rango de edad entre 40-59 años, observaron una SG del 30% a los 5 años, (Shah, Andersson, Racht, Björkholm, & Lambert, 2013).

En definitiva, podemos afirmar que el análisis de las principales variables demográficas, biológicas y terapéuticas de nuestra cohorte, confirma que se trata de una muestra que reproduce las principales características de la bibliografía revisada, por lo que la consideramos como una cohorte válida para proceder a nuestro estudio de investigación.

## ***7.2 Características globales de las variables MN1 y BAALC***

### **7.2.1. Variable MN1**

En primer lugar se comentan los resultados de MN1 entendida como una variable categórica. Siguiendo la definición de sobreexpresión usada en la bibliografía (a partir del percentil 50 de la población), se obtuvo una distribución casi homogénea entre aquellos pacientes definidos como positivos y los negativos (Heuser et al., 2006), Siguiendo nuestra definición se consideraron positivos un mayor número de casos (68,1% de la cohorte).

Para comprobar la viabilidad biológica de ambas definiciones, estudiamos las asociaciones con las principales variables biológicas descritas en la bibliografía.

Así, se observó una fuerte asociación de la condición de sobreexpresión de MN1 con el fenotipo CD34+ y con el genotipo NPM1 germinal, tal y como previamente había sido reportado por varios autores (Heuser et al., 2006; Langer et al., 2009; Liu et al., 2010; Rockova et al., 2011). Ambas asociaciones se establecieron, y fueron significativas, tanto para el punto de corte estándar como para nuestra definición (ver tabla 6.13 y 6.14).

Pero además de esta aproximación basada en una definición categórica de la expresión de MN1, en nuestro trabajo también quisimos analizar la influencia de esta variable considerándola como cuantitativa. Se estudiaron los valores de la media y mediana de MN1 en tres momentos de la evolución de los pacientes, al diagnóstico, tras el primer ciclo de quimioterapia y en el momento de la recaída. Los resultados ya presentados en las tablas 6.52 y 6.62 se muestran de forma resumida en la siguiente tabla:

**Tabla 7.1 cambios en expresión MN1 en distintos momentos de la evolución clínica**

Momento \ Variable	Diagnóstico	Tras primera quimioterapia	Recaída
<b>N</b>	113	48	30
<b>Media expresión</b>	1,89	0,25	0,51
<b>Mediana expresión</b>	0,41	0,084	0,16

Si bien no se pueden establecer comparaciones directas por tratarse de cohortes independientes, si se observa una tendencia clara de descenso de expresión entre el momento del diagnóstico y el análisis posterior al primer ciclo de quimioterapia, así como que en la recaída se produce de nuevo un aumento en los niveles de expresión.

De hecho, cuando se realizó la comparación directa para los 48 pacientes con muestra pareadas entre el diagnóstico y la inducción si se demostró que esta diferencia era estadísticamente significativa. Sin embargo, al comparar los niveles al diagnóstico y en la recaída en los 30 pacientes con muestras válidas, la diferencia de medias no fue significativa.

Que nosotros sepamos, este hallazgo de cambios de expresión de MN1 tras la quimioterapia no ha sido descrito previamente.

Dado que MN1 tiene un papel reconocido en la leucemogénesis (Imren et al., 2014) estos cambios de expresión observados tras administrar quimioterapia, y el hecho de no encontrar diferencias significativas entre el diagnóstico y la recaída, puede constituir la base teórica para explorar su papel como posible marcador de EMR. Por

ejemplo, intentando identificar pacientes en los que el aumento de los niveles de expresión de MN1 se anticipe a la recaída morfológica. Si bien nuestro trabajo carece del número suficiente de pacientes y de determinaciones para aclarar esta cuestión, creemos que este es un campo de investigación que queda abierto.

### **7.2.2 Variable BAALC**

De igual manera que para la variable MN1, la definición de sobreexpresión de BAALC a partir del estándar descrito en la literatura, superior a la mediana de la población (Xiao et al., 2015), distribuyó la serie de manera equitativa en dos grupos, positivos y negativos, mientras que el punto de corte definido “a priori” y sometido a investigación incluyó como positivas hasta el 70,4% de las muestras de los pacientes incluidos en el estudio.

Ambas definiciones de sobreexpresión mostraron las mismas asociaciones estadísticamente significativas con otras variables. En concreto, con NPM1 germinal, y expresión de CD34, hallazgos congruentes con lo descrito en la bibliografía (Damiani et al., 2013; Heuser et al., 2012; Langer et al., 2008) En nuestra serie no pudimos demostrar la asociación de la sobreexpresión de BAALC con cariotipo con +8 o con el genotipo FLT3 mutado (tablas 6.17 y 6.18).

De igual manera a como se procedió con MN1, se estudió BAALC como una variable cuantitativa. Así el análisis secuencial de la expresión de BAALC en los mismos momentos que para MN1 (ver tablas 6.53 y 6.63) reveló cambios significativos en la mediana entre el diagnóstico y tras la primera quimioterapia de inducción mientras que las comparaciones realizadas entre las muestras pareadas de pacientes al diagnóstico y en la recaída no mostró significación estadística.

Los valores medios y mediana se resumen a continuación (Tabla 7.2).

Tabla 7.2 Cambios en la expresión de BAALC en distintos momentos del seguimiento

Momento \ Variable	Diagnóstico	Tras primera quimioterapia	Recaída
N	108	47	30
Media expresión	5,1	1,18	4,97
Mediana expresión	0,96	0,43	0,82

Estos hallazgos son similares a los observados por Weber et al que han reportado descensos en los niveles de expresión de BAALC tras la administración de quimioterapia, en su trabajo tras el segundo ciclo (Weber et al., 2014). Esto da aún más fortaleza a nuestra hipótesis de que los cambios de expresión de MN1 y BAALC, varían con la administración de quimioterapia y se elevan en el contexto de la recaída, por lo que creemos que deben ser investigados de manera individualizada como posible herramienta de estudio de la EMR.

### 7.2.3 Asociación entre MN1 y BAALC

Pudimos documentar la fuerte asociación y correlación de MN1 y BAALC entre sí tal y como ha sido publicado previamente (Langer et al., 2009; Rockova et al., 2011).

Esta asociación alcanzó significación estadística cuando definimos las variables de manera categórica con sobreexpresión positiva por cualquiera de los puntos de corte estudiados, y también cuando se estudió la correlación de ambas entendidas como variables cuantitativas tanto por correlación  $r$  lineal como por Spearman (ver detalles en las Tablas 6.13, 6.14 y figura 6.5).

Finalmente, como conclusión a este apartado, creemos que el conjunto de características generales de las variables MN1 y BAALC son congruentes y reproducen lo publicado en la literatura médica, por lo que deben ser estimadas como prueba de la plausibilidad biológica y de nuestra capacidad técnica para cuantificar la expresión de ambos genes.

### **7.3 Análisis de MN1 y BAALC al diagnóstico y asociación con persistencia de la enfermedad tras primer ciclo de quimioterapia.**

Para proceder al estudio de la hipótesis principal del estudio, se eliminaron del análisis del impacto en la persistencia aquellos pacientes que recibieron quimioterapia tipo 5+2.

En nuestra cohorte, comprobamos la asociación estadística que la sobreexpresión de MN1 tiene con la situación de persistencia de enfermedad tras la quimioterapia de inducción. Así el método estándar (>P50) mostró unos riesgos relativos para persistencia significativos, no solo para el grupo de pacientes con cariotipo normal y de riesgo intermedio, hallazgo similar a lo descrito por varios grupos (Aref et al., 2013; Heuser et al., 2006; Langer et al., 2009; Schwind et al., 2011) sino incluso para el conjunto de toda la serie, independientemente del grupo de riesgo citogenético. Este hallazgo no se ha observado en otras series con similar número de pacientes (Carol Guy, 2008).

Sin embargo, cuando usamos nuestro punto de corte (>2.5DS), que aporta la ventaja de ser definido de manera independiente a la cohorte de pacientes y que permite una asignación "a priori" de los mismos, los resultados fueron aun más concluyentes dado que la significación fue mayor. Así nuestra definición mantuvo su significación estadística en todos los grupos citogenéticos analizados, serie completa, solo riesgo intermedio y solo pacientes con cariotipo normal (ver detalles en tablas 6.24-6.29).

A continuación, en la Tabla 7.3 se resumen los RR de ambas aproximaciones para la condición persistencia de enfermedad.

**Tabla 7.3 Resumen de los Riesgos relativos para persistencia tras primer ciclo de quimioterapia para MN1**

Pacientes Variable	RR			
	Todos los cariotipos	Cariotipos riesgo intermedio	Cariotipo normal	
<b>MN1&gt;P50</b>	1,976	2,071	2,194	Todos los IC al 95% excluyen el valor nulo
<b>MN1&gt;2,5DS</b>	4,875	6,274	8,140	

Especialmente significativa fue la capacidad de MN1>2,5DS para discernir los pacientes con cariotipo normal en situación de riesgo de fracaso a la quimioterapia de inducción, de tal manera que de los 28 pacientes definidos como negativos en el momento del diagnóstico para la sobreexpresión, solo 2 (7%) tuvieron persistencia de enfermedad (tabla 6.29).

Para profundizar en la comparación directa entre los dos puntos de corte sometidos a investigación, se exploró la sensibilidad y especificidad de ambos mediante curvas ROC. Nuestro análisis demostró que el punto de corte de nuestro trabajo (>2,5DS) presentó una sensibilidad del 88% con una especificidad del 52%, mientras que el punto de corte definido a partir del estándar de la literatura (>P50) obtuvo una sensibilidad del 65% con una especificidad del 63%.

Es un hecho bien estudiado y reconocido en la literatura científica que el fracaso a la primera quimioterapia de inducción es un factor de mal pronóstico, pues impacta significativamente en la probabilidad de SG, motivo por el cual es considerado actualmente como criterio para re-estratificar a los pacientes en el grupo de mal pronóstico, independientemente de sus hallazgos citogenéticos y moleculares al momento del diagnóstico (Miguel Angel Sanz & Moscardo, 2010; Schlenk, 2014). Esta situación hemos visto que se reproduce en nuestra serie (Figura 6.11).

Por ello, si consideramos que nuestro objetivo es obtener un biomarcador capaz de identificar a la mayor cantidad posible de pacientes en riesgo de fracasar a la primera quimioterapia, creemos que nuestra definición de sobreexpresión (>2,5DS) presenta una sensibilidad muy superior a la estándar (88% vs 52%) sin perder especificidad (52% vs 63%), motivo por el que, en conjunto con los hallazgos observados en el análisis de riesgos relativos, consideramos que nuestra aproximación es capaz de discriminar con mayor potencia estadística a los pacientes en riesgo de fracasar a la quimioterapia de inducción.

Los resultados para la variable BAALC no demostraron tan marcada significación estadística, aunque para el método de referencia (a partir del percentil 50 de la

población enferma) si reproducimos los hallazgos descritos en la bibliografía, tanto en los pacientes con cariotipo normal como de riesgo intermedio, (Xiao et al., 2015), con mayor riesgo de manera significativa para los definidos como sobreexpresión.

Sin embargo, nuestro método para BAALC (>2,5DS) reproduce esta asociación sólo para los pacientes con cariotipos de riesgo intermedio, pero se queda al límite de la significación estadística en los pacientes con cariotipo normal ya que el IC para el RR incluye el valor nulo 1. Ambas aproximaciones pierden su potencia estadística cuando incluimos a todos los grupos citogenéticos (tablas 6.31 a 6.36).

En la tabla 7.4 se resumen los RR para ambas definiciones de sobreexpresión de BAALC.

**Tabla 7.4 Resumen de los Riesgos relativos para persistencia tras inducción para BAALC**

Pacientes	RR			
	Todos los cariotipos	Cariotipos riesgo intermedio	Cariotipo normal	
<b>BAALC&gt;P50</b>	1,384*	1,974	2,171	Todos los IC al 95% excluyen el valor nulo excepto los señalados con *
<b>BAALC&gt;2,5DS</b>	1,853*	2,113	1,872*	

En resumen, estos hallazgos confirman la aproximación descrita en la bibliografía de que la definición de BAALC a partir del percentil 50 de una serie de pacientes afectos de LMA, se asocia a aumento de la probabilidad de fracaso a la quimioterapia de inducción. Nuestra definición a partir de 2,5DS muestra una tendencia a reproducir esa asociación que sólo consigue de manera significativa cuando incluimos a los pacientes con cariotipos de riesgo intermedio.

Cuando profundizamos en la comparación directa entre ambas definiciones de sobreexpresión para BAALC mediante curvas ROC, observamos que el punto de corte estándar a partir del P50 posee una sensibilidad del 57% con una especificidad del 56%, mientras que nuestra aproximación se asocia a una sensibilidad del 79% con una especificidad del 43%.

Dado que la bibliografía documenta la asociación tanto de la sobreexpresión BAALC como de MN1 con la persistencia de enfermedad (Heuser et al., 2006; Xiao et al., 2015), y como ambos genes muestran una fuerte asociación entre sí (Langer et al., 2009; Rockova et al., 2011), hecho que también reproducimos en nuestra serie, comparamos la capacidad de ambos marcadores para predecir la condición de persistencia de enfermedad tras primer ciclo de quimioterapia mediante curvas ROC. El análisis reveló un área bajo la curva de 0,643 para BAALC frente a 0,712 para MN1, lo que apoyaría una mayor capacidad de explicar la situación de persistencia por parte de la variable MN1 sobre BAALC en nuestra serie.

En nuestro estudio, cuando ampliamos el análisis con modelos multivariantes incluyendo variables con influencia demostrada en la probabilidad de persistencia a la quimioterapia de inducción, el valor MN1  $>2,5DS$  conservó su significación estadística junto a la edad, y el grupo citogenético de buen pronóstico (tabla 6.38a-c). Este análisis es de gran relevancia ya que permite demostrar el valor independiente de MN1 $>2.5$  como factor que predice la persistencia, superando incluso a variables como la quimioterapia tipo 5+2 o el genotipo NPM1 que perdieron la significación obtenida en el bivariante (tabla 6.21).

Sin embargo, con esta misma aproximación, BAALC tanto para  $>P50$  como  $>2,5DS$  perdió su significación estadística en el análisis multivariante.

En conjunto, y con las precauciones necesarias, dado que nuestro trabajo se trata de una investigación retrospectiva y no está diseñada expresamente para comparar ambas determinaciones, podemos afirmar que en líneas generales MN1 tiene más capacidad estadística que BAALC para definir el estado de riesgo a fracaso a la quimioterapia de inducción, afirmación que sustentamos en la mayor área bajo la curva ROC, el valor de los Riesgos relativos observados y por conservar su significación en el análisis multivariante frente a variables bien establecidas en la bibliografía.

Hasta nuestro conocimiento, esta sería la primera serie que compara ambas determinaciones en su capacidad de predecir una condición clínica de pronóstico adverso como es el fracaso a la quimioterapia de inducción.

En definitiva, tanto la sobreexpresión de MN1 como de BAALC, se asociaron a mayor riesgo de persistencia de enfermedad tras el primer ciclo de quimioterapia de inducción, pero con una mayor capacidad de acierto para MN1. Además, observamos que la definición de sobreexpresión de MN1 a partir de 2,5 desviaciones estándar de una población control es la que se asocia con una mayor capacidad pronóstica. Ello repercute en una mejor estratificación de los pacientes en cuanto al riesgo, puesto que es una determinación obtenida antes de iniciar el tratamiento, ya que no depende de toda la serie de pacientes para poder definir el punto de corte como es el caso del P50.

#### ***7.4 Impacto de MN1 y BAALC al diagnóstico en la probabilidad de supervivencia global y libre de progresión.***

En la actualidad existen estudios retrospectivos que indican que tanto MN1 como BAALC añaden un pronóstico deletéreo a los pacientes de riesgo intermedio, incluyendo la reciente publicación de una metaanálisis para BAALC en el que se confirman estos hallazgos (Langer et al., 2009; Xiao et al., 2015).

A pesar de las limitaciones epidemiológicas de nuestra serie, con un rango de edad muy amplio (64 años), de los tres grupos de riesgo citogenético, y de que existen distintos tipos de tratamiento postinducción, exploramos el impacto en supervivencia de ambas variables, incluyendo para cada una las dos definiciones de sobreexpresión.

En nuestra serie no conseguimos reproducir el impacto de la asociación de la sobreexpresión de MN1 con menor SG y SLP para ninguno de los dos puntos de corte que definían la sobreexpresión, y para ninguno de los grupos de riesgo citogenético en los que exploramos su papel como factor de riesgo. Tampoco mediante regresión de Cox encontramos tendencias significativas (Ver resultados en detalle en tablas 6.44 a 6.46 y 6.49 a 6.51).

Si bien los trabajos iniciales del grupo CALGB que mostraron el impacto de MN1 en SG (Heuser et al., 2006) no fueron inicialmente corroborados por autores británicos (Carol Guy, 2008), trabajos recientes reproducen esta condición de riesgo (Aref et al., 2013; Schwind et al., 2011; Xiang et al., 2013), pero todos con la particularidad de basarse en análisis bivariante.

Cuando se ha explorado su potencial como marcador pronóstico para supervivencia en estudios más complejos, enfrentado a otras variables para desarrollar modelos multivariantes, los resultados han sido contradictorios, ya que, aún siguiendo una metodología similar, existen publicaciones en la que MN1 conservó su significación para unos autores pero no para otros (C. Haferlach et al., 2012; Rockova et al., 2011). A nivel nacional, cabe citar el trabajo del grupo de Salamanca en el que tampoco encuentran impacto en la SG ni SLP para la sobreexpresión de MN1 (Santamaria et al., 2009).

En definitiva, con los matices y limitaciones comentados acerca de la capacidad de nuestra serie de explorar impactos en supervivencia global, aunque sí se reproducen para variables contrastadas en la bibliografía como edad y citogenética (David Grimwade & Hills, 2009), no encontramos datos que sugieran un impacto en la probabilidad de supervivencia global para los pacientes con sobreexpresión de MN1, independientemente del punto de corte seleccionado para definirlo. Dado que no es un tema resuelto en la literatura médica, creemos que debe seguir siendo considerado como un tema abierto de investigación.

El análisis de supervivencia para BAALC tampoco muestra datos con significación estadística, pero si se aprecia una tendencia clara, que con una serie de mayor tamaño permitiría sacar conclusiones.

En la tabla 7.5 se resume la evolución de la supervivencia a medida que vamos acotando el estudio al grupo de pacientes que más se puede beneficiar de este marcador como son los de cariotipo normal, grupo en el que a pesar de no llegar a la significación estadística, observamos como la mediana de supervivencia no ha sido

alcanzada en el momento del análisis para aquellos paciente sin sobreexpresión por la definición estándar por P50 (tablas 6.44 a 6.46 y figura 6.15), y bordea marginalmente la significación estadística.

**Tabla 7.5 Resumen de mediana de supervivencia para sobreexpresión de BAALC**

Resumen de mediana de supervivencia para sobreexpresión de BAALC						
Pacientes Variable	Todos los cariotipos		Cariotipos riesgo intermedio		Cariotipo normal	
	Meses	P	Meses	p	Meses	p
<b>BAALC&gt;P50</b>						
<b>Positivo vs Negativo</b>	22 vs 27	0,439	22 vs 27	0,173	21 vs NR	0,064
<b>BAALC&gt;2,5DS</b>						
<b>Positivo vs Negativo</b>	22 vs 27	0,427	22 vs 27	0,360	22 vs 49	0,150

Esta evolución es similar cuando analizamos los riesgos mediante regresión de Cox con unos HR e IC que se acercan a evitar el valor nulo cuando acotamos a los pacientes con cariotipo normal.

Estos hallazgos son similares en estudio de SLP, donde MN1 no consigue impacto de manera significativa y BAALC muestra una tendencia llegando a bordear la validez estadística para aquellos definidos a partir de >P50.

En conjunto, y dada la solidez de la literatura científica que apoya el impacto de BAALC en supervivencia global y libre de progresión (Baldus et al., 2003; Weber et al., 2014; Xiao et al., 2015), nuestro trabajo parece mostrar también que BAALC es un biomarcador válido para ayudar a la correcta estratificación pronóstica y terapéutica de los pacientes con cariotipo normal, pero con las salvedades referidas anteriormente en cuanto a las características de nuestra serie.

De los dos puntos de corte estudiados, es la definición estándar a partir del P50 la que parece acercarse más a la significación estadística, sin que nuestra definición a partir de 2,5 DS de la media de una población normal parezca superar su capacidad predictiva.

En conclusión, en el presente trabajo, MN1 no impacta en la supervivencia global ni libre de progresión mientras que BAALC parece ser un biomarcador con capacidad para ayudar a la asignación del riesgo de supervivencia de los pacientes con cariotipo normal, si bien necesitamos ampliar y homogenizar los tratamientos recibidos por los pacientes para confirmar tal hallazgo.

### ***7.5 Análisis de niveles de MN1 y BAALC post primera quimioterapia de inducción.***

Hemos visto anteriormente cómo en los pacientes con muestras pareadas entre el diagnóstico y estudio post inducción presentaron descensos significativos en los niveles medios de expresión tanto de MN1 como de BAALC (tablas 6.52 y 6.53).

Este hallazgo ha sido documentado previamente por Weber et al quienes estudiaron los cambios en los niveles de expresión de BAALC normalizado frente a ABL1, tras el segundo ciclo de quimioterapia (Weber et al., 2014) Los autores documentaron cómo la quimioterapia de inducción influía sobre los niveles de expresión de BAALC, con una tendencia casi uniforme hacia el descenso en los pacientes con niveles elevados al diagnóstico. Este hallazgo ha sido reproducido en nuestra serie para ambos genes, y hasta nuestro conocimiento, no hemos encontrado trabajos que hayan comunicado previamente este hallazgo para MN1.

En conjunto, nuestra interpretación inicial, fue que la quimioterapia induce cambios en los niveles de expresión de MN1 y BAALC, en pacientes con niveles elevados al diagnóstico, lo que puede ser fundamento y base teórica para estudiar su papel como potencial marcador de EMR.

Sin embargo, al explorar esta posibilidad para ambos genes entendidos como variables categóricas (sobrexpresión positiva/negativa), no se encontró buena asociación con el estado de respuesta morfológica alcanzado, dado que se observaron pacientes sin sobreexpresión con respuesta de persistencia, y pacientes que alcanzado la RC, fueron

categorizados como positivos para la sobreexpresión, lo cual ocurría en aproximadamente el 30% de los casos para MN1 y casi en el 50% para BAALC (ver tablas 6.54 y 6.55).

De igual manera, ni la sobreexpresión persistente de MN1 ni la de BAALC tras el primer ciclo de quimioterapia de inducción, influyeron de manera significativa en la SG para ninguno de los dos puntos de corte explorados (ver tablas 6.56 y 6.57).

Sin embargo, cuando se estudió el impacto en la supervivencia de los pacientes definidos como “doble positivos” (aquellos en los que tras la quimioterapia de inducción persistió la sobreexpresión de ambos genes) se observó una asociación marginalmente significativa a peor pronóstico global. En especial a partir de la definición basada en el estándar descrito en la bibliografía (si  $>P50$ ), con unas medianas en meses de 5 frente a 32, en el límite de la significación ( $p=0,053$ ) (tabla 6.58 y Figura 6.21).

Este hallazgo, no ha sido descrito en la bibliografía revisada, pero creemos que debe ser matizado en función de los siguientes hechos:

a) Las características de nuestra serie. Tal y como se comentó con anterioridad es una serie de pacientes con tratamientos heterogéneos después de la quimioterapia de inducción, con un rango de edad muy amplio, lo cual influye en el estudio de probabilidades de supervivencia.

b) El escaso número de pacientes. El grupo de pacientes definidos como “dobles positivos” sólo reúne a 6 casos.

Sin embargo, a pesar de estas matizaciones, y dada la alta correlación biológica entre MN1 y BAALC (Schwind et al., 2011) creemos que esta aproximación, basada en los niveles de expresión de ambos genes tras la inducción debe ser explorado en una serie de pacientes más amplia y homogénea por poder constituir un marcador biológico pronóstico relevante, y que no ha sido estudiado previamente.

Por último, estudiamos el impacto pronóstico de la expresión de manera individualizada para cada paciente, considerando las variables de manera cuantitativa.

Para ello, cuantificamos el nivel de descenso de expresión para cada gen y en cada paciente entre el momento del diagnóstico y el del análisis de la respuesta a la primera quimioterapia de inducción.

Globalmente para MN1 no encontramos significación estadística, pero para los pacientes con descensos de la expresión de BAALC de > del 95% respecto al diagnóstico, se observaron diferencias en la probabilidad de supervivencia estadísticamente significativas, siendo de 11 meses frente a mediana no alcanzada, para aquellos que tuvieron un mayor descenso de la expresión de BAALC tras un ciclo de quimioterapia (Figura 6.23).

Este hallazgo, con las diferencias metodológicas comentadas, confirma lo observado por Weber et al., que además documentaron un aumento en la probabilidad de SLP para los pacientes con mayor descenso en la expresión de BAALC tras el segundo ciclo de quimioterapia.

Si bien las matizaciones para este hallazgo deben ser las mismas que en lo observado para los pacientes definidos como “doble positivos” en cuanto a las limitaciones por las características de la serie, y por tanto ser cautelosos en nuestras conclusiones, existen suficientes evidencias en otras hemopatías malignas de la importancia del aclaramiento temprano de la enfermedad como marcador pronóstico.

Un ejemplo es el de EMR por citometría de flujo en la leucemia linfoblástica aguda. Desde la década de los noventa se han publicado innumerables trabajos que han demostrado, primero de manera retrospectiva, y luego en cohortes prospectivas, el impacto pronóstico que tiene la persistencia de EMR tras la inducción. Esto ha permitido identificar a un grupo de pacientes pobres respondedores a la quimioterapia y que requieren de estrategias alternativas como Alo-TPH para conseguir el control definitivo de la enfermedad (Coustan-Smith et al., 1998; Eckert et al., 2013).

Más recientemente, en el contexto de la leucemia mieloide crónica, se ha demostrado la importancia de conseguir respuestas lo más profundas posible y de la manera más precoz, definidas como respuesta molecular profunda, como marcador válido para conseguir una mayor SLP (Marin et al., 2012).

En el contexto de la LMA, se ha buscado trasladar estos descubrimientos, para optimizar el manejo clínico de los pacientes. Sin embargo, se han podido optimizar pocos marcadores, en especial los transcritos relacionados con las LMA CBF (Jourdan et al., 2013; Yin et al., 2012) y con NPM1 (Kronke et al., 2013), mientras que los trabajos basados en técnicas de citometría de flujo todavía requieren de validación prospectiva y confirmar su reproducibilidad (Buccisano et al., 2012).

De igual manera se ha explorado el papel de los niveles de expresión de determinados genes como potenciales marcadores de EMR, en especial basados en los niveles del gen WT1, con trabajos que han medido sus niveles al final del tratamiento, pero también tras la quimioterapia de inducción, (Cilloni et al., 2008; David Grimwade & Hills, 2009; Lapillonne et al., 2006) de manera similar a nuestra aproximación.

En nuestra serie, el descenso pronunciado de los niveles de expresión de BAALC tras primer ciclo de quimioterapia, parece presentarse como un sólido valor pronóstico, con la ventaja de ser un valor individual, sin requerir medidas relativas ni en el contexto de poblaciones de referencia, y que confirmaría lo observado por Weber et al., si bien su cohorte es de sólo 27 pacientes por 45 la que presentamos (Weber et al., 2014).

Cuando analizamos los pacientes categorizados por el descenso  $>0<$  del 95% de BAALC por el tipo de intensificación recibida, observamos que el grupo con menor descenso tenía más casos que se consolidaron con A1o-TPH y TAPH (18 frente a 13). Este grupo con descenso  $<95\%$  Se caracterizó por incluir hasta 7 casos que fueron primariamente refractarios a las distintas líneas de quimioterapia. Esto reafirma nuestras conclusiones de que el descenso de los niveles de expresión de BAALC tras primer ciclo de

quimioterapia, puede identificar precozmente a pacientes con pocas probabilidades de conseguir un adecuado control de su enfermedad con quimioterapia, si bien estos hallazgos requieren de validación en cohortes más grandes de pacientes.

En resumen, el estudio de los niveles de expresión tras primer ciclo de inducción, reveló un descenso en los niveles de expresión de ambos genes de manera estadísticamente significativa frente al momento del diagnóstico, si bien la definición categórica de sobreexpresión ( $>P50$  o  $>2.5DS$ ) no tuvo buena asociación con la respuesta morfológica alcanzada ni impacto pronóstico. Sin embargo, la persistencia de sobreexpresión de ambos genes simultáneamente en un mismo paciente (doble positivos) y un descenso de más del 95 % del nivel respecto al diagnóstico de BAALC, se asociaron de manera significativa con peor pronóstico global, lo que tendrá que ser validado en nuevas y más amplias cohortes de pacientes.

### ***7.6 Análisis de MN1 y BAALC en el momento de la recaída.***

De los 43 pacientes que presentaron recaída en nuestra serie, se disponía de muestras para estudio de MN1 en 30 y 29 para BAALC. Tal y como se comentó previamente, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre la mediana de expresión en el momento del diagnóstico y en el de la recaída. Esto puede servir como prueba de concepto para explorar el papel de estos genes como marcadores de EMR. Hasta nuestro conocimiento este es el primer trabajo que ha explorado la diferencia en los niveles de expresión de MN1 entre el momento de la recaída y en el del diagnóstico.

A pesar de la limitación metodológica existente por no disponer de los niveles de todos los pacientes con recaída, se exploró la relación entre el perfil de expresión en el momento del diagnóstico y la recaída

Cuando vemos la evolución de los pacientes definidos con sobreexpresión de MN1 a partir de  $>2,5DS$ , observamos que globalmente de las 30 muestras válidas no existió una adecuada asociación entre el nivel de expresión del gen al diagnóstico y la recaída

con errores en aproximadamente en el 30% de los casos, de tal manera que 5 de los 18 pacientes que eran positivos al diagnóstico, recaen siendo clasificados como negativos.

Por otro lado, MN1 >P50 a pesar de ser más restrictivo, por ser un punto de corte de valor superior, igualmente clasificó como negativos en la recaída un 30% de los pacientes clasificados como positivos al diagnóstico.

En lo referente a BAALC >2,5DS de los 17 pacientes positivos de entrada, permitió que 4 casos recaigan definidos como negativos. Y al igual que con la definición de MN1 >2,5DS, existen pacientes que siendo negativos, recaen como positivos (5 en este caso) Por último BAALC>P50, evidencia los mismo problemas, no pudiendo identificar como positivos a 5 de los 15 que si etiquetó con sobreexpresión al momento del diagnóstico.

En conjunto estos hallazgos, a pesar del sustrato biológico que aportan los cambios en los niveles de expresión en los tres momentos analizados, no parecen apoyar el desarrollo de investigaciones futuras dirigidas a investigar el papel de MN1 y BAALC como marcador de EMR basado en su uso como variables categóricas, Si bien, queda por investigar el desarrollo de estrategias de cuantificación de manera individualizada, comparando con el momento del diagnóstico del paciente.

Además de estos hallazgos, encontramos motivos en la bibliografía que podrían explicar su escasa fiabilidad para predecir recaídas en el seguimiento.

En primer lugar, autores del grupo de Seattle (Ding et al., 2012) y posteriormente otros grupos (Kronke et al., 2013; Welch et al., 2012) han demostrado mediante estudios de secuenciación masiva que los pacientes con LMA pueden seguir dos patrones en la recaída: Presencia de clones minoritarios en el momento del diagnóstico que son resistentes al tratamiento o adquisición de nuevos eventos secundarios por la toxicidad de la quimioterapia en la clona dominante al diagnóstico.

En nuestro caso podemos especular que recaídas que no siguen el mismo patrón de expresión entre el diagnóstico y la recaída puede deberse a la presencia de clones

minoritarios al diagnóstico o por ganancia de mutaciones que condicionan cambios en la expresión de estos genes

En segundo lugar, la evidencia científica en modelos animales ha puesto de manifiesto que tanto MN1 como BAALC son genes que juegan un papel en la hematopoyesis normal, lo cual puede motivar hallazgos de falsos positivos en el contexto de respuesta a estímulos como la salida de la aplasia o procesos infecciosos (Magda A. Meester-Smoor et al., 2008; Tanner et al., 2001). Ambas situaciones son habituales en el seguimiento de los pacientes con LMA.

### ***7.7 Limitaciones del presente trabajo.***

Tal y como se ha ido desglosando en apartados previos se deben tener en cuenta las siguientes limitaciones.

1.- Es una cohorte con una frecuencia elevada de pacientes con persistencia de enfermedad después del primer ciclo de quimioterapia, lo cual favorece la búsqueda de marcadores con alta sensibilidad para predecir la condición de persistencia.

2.- Es una serie de pacientes con tres grupos de riesgo citogenético y un rango de edad muy amplio. Ambas condiciones son variables de reconocida influencia en la probabilidad de SG, SLP y de alcanzar la RC.

3.- La heterogeneidad en cuanto a los tratamientos de intensificación recibidos, dificulta los análisis de SG y SLP

4.- Estudio de diseño retrospectivo.

### ***7.8 Vías de potencial desarrollo futuro.***

A pesar de las limitaciones comentadas, en nuestra serie se consigue validar la hipótesis principal del estudio y obtenemos conclusiones en el desarrollo de las hipótesis secundarias que sustentan la posibilidad de futuras líneas de investigación a partir de este trabajo.

Los hechos que consideramos prioritarios en nuestro grupo son los siguientes.

1.- La validación en una cohorte externa de la sobreexpresión de MN1 a partir del punto de corte definido como mayor a 2,5 DS de la media de los controles sanos, como factor de riesgo de fracaso a la quimioterapia de inducción.

2.- El estudio en una cohorte externa y con tratamiento homogéneo del valor pronóstico en términos de SG y SLP de la sobreexpresión de BAALC a partir del percentil 50 de nuestra serie.

3.- El estudio del impacto pronóstico de los cambios de expresión de ambos genes tras primer ciclo de quimioterapia en una serie de pacientes con tratamiento de intensificación homogéneo.

4.- El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de ambos genes en el seguimiento de los pacientes como potencial marcador predictor de recaída.

## **8.- Conclusiones:**

**1.- La sobreexpresión de MN1 y BAALC definidas por el estándar descrito en la bibliografía (>P50), se asocian a mayor riesgo de persistencia de enfermedad tras el primer ciclo de quimioterapia en pacientes de riesgo intermedio y en especial en los que presentaban un cariotipo normal.**

**2.- La medida de sobreexpresión de MN1 por nuestro método (>2,5DS) mejora el método estándar, en términos de sensibilidad y riesgo relativo, a la hora de seleccionar los pacientes con mayor probabilidad de fracasar a la quimioterapia de inducción y mantienen su significación en el análisis multivariante.**

**3.- En nuestra cohorte, globalmente, la variable MN1 fue superior a BAALC en la identificación de la probabilidad de fracasar a la quimioterapia de inducción, tanto como variable cuantitativa como por las dos definiciones categóricas usadas.**

**4.- Tanto MN1 como BAALC presentaron descensos estadísticamente significativos en sus niveles de expresión entre el momento del diagnóstico y postquimioterapia. Por el contrario no encontramos diferencias significativas entre los niveles de expresión entre momento del diagnóstico y la recaída.**

**5.- Ninguno de los puntos de corte propuestos para MN1 alcanzó un impacto significativo en la probabilidad de supervivencia. Sin embargo, la sobreexpresión de BAALC, especialmente a partir del estándar se aproximó a la significación estadística**

**6.- Los pacientes con menor descenso en la expresión de BAALC tras la inducción presentaron un pronóstico significativamente peor que aquellos con mayor descenso. En especial, a partir del 95% de descenso se apreció un impacto significativo en la probabilidad de supervivencia.**

**7.- El estudio en la recaída reveló que ninguno de los dos puntos de corte explorados para definir la sobreexpresión tanto de MN1 como de BAALC mostraron una adecuada asociación entre el diagnóstico y el momento de la recaída.**



## 9.- Bibliografía

- Alvarez-Errico, D., Vento-Tormo, R., Sieweke, M., & Ballestar, E. (2015). Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nat Rev Immunol*, *15*(1), 7-17. doi: 10.1038/nri3777
- Alvarez, S. (2014). *Epigenética en LMA*. Paper presented at the Charla simposio avances LMA Congreso Nacional de SEHH, Madrid.
- Arber, D. A., Brunning, R. D., Orazi, A., Bain, B. J., Porwit, A., Vardiman, J. W., . . . Greenberg, P. L. (2008). Acute myeloid leukaemia (AML) and related precursor neoplasms. In E. C. S.H. Swerdlow, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J Thiele, J.W. Vardiman, (Ed.), *WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4 ed., pp. 109-148): WHO.
- Aref, S., Ibrahim, L., Morkes, H., Azmy, E., & Ebrahim, M. (2013). Meningioma 1 (MN1) expression: refined risk stratification in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics (CN-AML). *Hematology*, *18*(5), 277-283. doi: 10.1179/1607845412Y.0000000065
- Arnold Levine, C. F., Philip Hinds. (2004). P53 is a Tumor Suppressor Gene. *Cell*, *516*, S67-S69.
- Bacher, U., Kohlmann, A., & Haferlach, T. (2009). Current status of gene expression profiling in the diagnosis and management of acute leukaemia. *Br J Haematol*, *145*(5), 555-568. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07656.x
- Baldus, C. D., Tanner, S. M., Ruppert, A. S., Whitman, S. P., Archer, K. J., Marcucci, G., . . . Bloomfield, C. D. (2003). BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*, *102*(5), 1613-1618. doi: 10.1182/blood-2003-02-0359
- Baldus, C. D., Thiede, C., Soucek, S., Bloomfield, C. D., Thiel, E., & Ehninger, G. (2006). BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol*, *24*(5), 790-797. doi: 10.1200/JCO.2005.01.6253
- Barragán, E., Cervera, J., Bolufer, P., Ballester, S., Martín, G., Fernandez, P., . . . Sanz, M. (2004). Prognostic implications of Wilm's Tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *89*(8), 926-933.
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., & van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, *9*(10), 1783-1786.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M.-T., Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, *33*(4), 451-458. doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
- Bergmann, L., Miething, C., Maurer, U., Brieger, J., Karakas, T., Weidmann, E., & Hoelzer, D. (1997). High levels of Wilm's Tumor gen (WT1) mRNA in AML are associated with a worse long-term outcome. *Blood*, *90*(3), 1212-1225.
- Berliner, A. K.-G. a. N. (2012). Granulocytopenia and monocytopenia In L. E. S. Ronald Hoffman EJB, Helen E. Heslop, Jeffrey I. Weitz, John Anastasi, (Ed.), *Hematology Basic principles and practice*. ( 6th ed ed., pp. 280-291).
- Bienz, M., Ludwig, M., Leibundgut, E. O., Mueller, B. U., Ratschiller, D., Solenthaler, M., . . . Pabst, T. (2005). Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res*, *11*(4), 1416-1424. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1552

- Brunangelo Falini, Cristina Mecucci, Enrico Tiacci, Myriam Alcalay, Roberto Rosati, Laura Pasqualucci, . . . Party\*, f. t. G. A. L. W. (2005). Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*, *352*(3), 254-266.
- Buccisano, F., Maurillo, L., Del Principe, M. I., Del Poeta, G., Sconocchia, G., Lo-Coco, F., . . . Venditti, A. (2012). Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*, *119*(2), 332-341. doi: 10.1182/blood-2011-08-363291
- Burnett, A. K., Goldstone, A., Hills, R. K., Milligan, D., Prentice, A., Yin, J., . . . Russell, N. (2013). Curability of patients with acute myeloid leukemia who did not undergo transplantation in first remission. *J Clin Oncol*, *31*(10), 1293-1301. doi: 10.1200/JCO.2011.40.5977
- Burnett, A. K., Hills, R. K., Milligan, D. W., Goldstone, A. H., Prentice, A. G., McMullin, M.-F., . . . Wheatley, K. (2010). Attempts to Optimize Induction and Consolidation Treatment in Acute Myeloid Leukemia: Results of the MRC AML12 Trial. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(4), 586-595. doi: 10.1200/jco.2009.22.9088
- Byrd, J. C., Dodge, R. K., Carroll, A., Baer, M. R., Edwards, C., Stamberg, J., . . . Bloomfield, C. D. (1999). Patients With t(8;21)(q22;q22) and Acute Myeloid Leukemia Have Superior Failure-Free and Overall Survival When Repetitive Cycles of High-Dose Cytarabine Are Administered. *Journal of Clinical Oncology*, *17*(12), 3767-3775.
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, *368*(22), 2059-2074. doi: 10.1056/NEJMoa1301689
- Carella, C., Bonten, J., Sirma, S., Kranenburg, T. A., Terranova, S., Klein-Geltink, R., . . . Grosveld, G. C. (2007). MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia*, *21*(8), 1679-1690. doi: 10.1038/sj.leu.2404778
- Carol Guy, A. G., Rosemary Gale, David C. Linch, Robert K Hill, Alan K. Burnett. (2008). *The Impact of MN1 Over-Expression on the Outcome of Younger Patients with AML Treated with Intensive Chemotherapy with or without ATRA Therapy*. Paper presented at the 50th ASH Annual meeting, San Francisco.
- Cassileth, P. A., Harrington, D. P., Appelbaum, F. R., Lazarus, H. M., Rowe, J. M., Paietta, E., . . . Wiernik, P. H. (1998). Chemotherapy Compared with Autologous or Allogeneic Bone Marrow Transplantation in the Management of Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *New England Journal of Medicine*, *339*(23), 1649-1656. doi: 10.1056/NEJM199812033392301
- CD Bloomfield, G. J., A Gottlieb, SV Ramanan, J Blom, NI Nissen, A Bank, RR Ellison, F Kung, P, Prager, R. C., MR Cooper, F Haurani, JL Hutchison, RT Silver, G Falkson, P Wiernik, HC Hoagland,, KR Rai, J. H., OJ Glidewell, V Weinberg, K Brunner, JP Obrecht, HD Preisler, IW Nawabi, D, & Henry, O. M. a. S. K. (1981). Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood*, *58*(6), 1203-1212.
- Cilloni, D., Messa, F., Arruga, F., Defilippi, I., Gottardi, E., Fava, M., . . . Saglio, G. (2008). Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica*, *93*(6), 921-924. doi: 10.3324/haematol.12165
- Cohen, A., Holmen, S., & Colman, H. (2013). IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Current neurology and neuroscience reports*, *13*(5), 345-345. doi: 10.1007/s11910-013-0345-4
- Coustan-Smith, E., Behm, F. G., Sanchez, J., Boyett, J. M., Hancock, M. L., Raimondi, S. C., . . . Campana, D. (1998). Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *351*(9102), 550-554. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)10295-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10295-1)
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, *227*(5258), 561-563.

- Chedin, F. (2011). The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 101, 255-258.
- Chen, J., Odenike, O., & Rowley, J. D. (2010). Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer*, 10(1), 23-36. doi: 10.1038/nrc2765
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Büchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., . . . Bloomfield, C. D. (2003). 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. *Journal of Clinical Oncology*, 21(24), 4642-4649. doi: 10.1200/jco.2003.04.036
- Churpek, J. E., & Godley, L. A. (2014, Oct 28, 2014.). Familial acute leukemia and myelodysplastic syndromes. Retrieved 4-5-2015, from <http://www.uptodate.com/contents/familial-acute-leukemia-and-myelodysplastic-syndromes>
- Chute, J. P. (2012). Hematopoietic stem cell biology. In L. E. S. Ronald Hoffman EJB, Helen E. Heslop, Jeffrey I. Weitz, John Anastasi, (Ed.), *Hematology Basic principles and practice* (6th ed ed., pp. 78-87).
- D.L. Nelson, M. M. C. ( 2014). Metabolismo del RNA. In M. M. C. D.L. Nelson (Ed.), *Lehninger. Principios de bioquímica* (6 ed.).
- Damesheck, W. (1966). Survival in Myeloblastic Leukemia of Adults. *N Engl J Med*, 275(13), 700-702.
- Damiani, D., Tiribelli, M., Franzoni, A., Michelutti, A., Fabbro, D., Cavallin, M., . . . Damante, G. (2013). BAALC overexpression retains its negative prognostic role across all cytogenetic risk groups in acute myeloid leukemia patients. *Am J Hematol*, 88(10), 848-852. doi: 10.1002/ajh.23516
- Damm, F., Heuser, M., Morgan, M., Wagner, K., Gorlich, K., Grosshennig, A., . . . Ganser, A. (2011). Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*, 117(17), 4561-4568. doi: 10.1182/blood-2010-08-303479
- Das, B. C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T.-C., . . . Evans, T. (2014). Retinoic Acid Signaling Pathways in Development and Diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(2), 673-683. doi: 10.1016/j.bmc.2013.11.025
- David Grimwade, H., Fiona Oliver, Keith Wheatley, Christine Harrison, Georgina Harrison,, & John Rees, I. H., Richard Stevens, Alan Burnett, and Anthony Goldstone on behalf of the Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. (1998). The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood*, 92(7), 2322-2333.
- Deschler, B., & Lübbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*, 107(9), 2099-2107. doi: 10.1002/cncr.22233
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., . . . DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481(7382), 506-510. doi: 10.1038/nature10738
- Dohner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Buchner, T., Burnett, A. K., . . . European, L. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453-474. doi: 10.1182/blood-2009-07-235358
- Dolnik, A., Engelmann, J. C., Scharfenberger-Schmeer, M., Mauch, J., Kelkenberg-Schade, S., Haldemann, B., . . . Bullinger, L. (2012). Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood*, 120(18), e83-e92. doi: 10.1182/blood-2011-12-401471
- Dombret, H. (2012). Optimal acute myeloid leukemia therapy in 2012. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association*, 6, 41-48.

- Dores, G. M., Devesa, S. S., Curtis, R. E., Linet, M. S., & Morton, L. M. (2012). Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*, *119*(1), 34-43. doi: 10.1182/blood-2011-04-347872
- Douglas Hanahan, R. A. W. (2000). The Hallmarks of cancer. *Cell*, *100*, 57-70.
- Eckert, C., von Stackelberg, A., Seeger, K., Groeneveld, T. W. L., Peters, C., Klingebiel, T., . . . Henze, G. (2013). Minimal residual disease after induction is the strongest predictor of prognosis in intermediate risk relapsed acute lymphoblastic leukaemia – Long-term results of trial ALL-REZ BFM P95/96. *European Journal of Cancer*, *49*(6), 1346-1355. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.010>
- Estey, E., & Döhner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, *368*(9550), 1894-1907. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69780-8
- Faderl, S., & Kantarjian, H. M. (2012). Clinical manifestations and treatment of acute myeloid leukemia. In R. Hoffman, E. J. Benz, L. E. Silberstein, H. E. Heslop, J. I. Weitz, & J. Anastasi (Eds.), *Hematology. Basic principles and practice* (6 ed., pp. 863-880).
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., . . . Martelli, M. F. (2005). Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *New England Journal of Medicine*, *352*(3), 254-266. doi: 10.1056/NEJMoa041974
- Farreras, P. (1963). Enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos *Patología y Clínica Médicas*. (3 ed., pp. 383-411).
- Fernandez, H. F. (2010). New Trends in the Standard of Care for Initial Therapy of Acute Myeloid Leukemia. *ASH Education Program Book*, *2010*(1), 56-61. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.56
- Figueroa, M. E., Wahab, O. A., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., . . . Melnick, A. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, *18*(6), 553-567. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.015
- Frank G. Rucker, Richard F. Schlenk, Lars Bullinger, Sabine Kayser, Veronica Teleanu, Helena Kett, . . . Arnold Ganser, P. L., Konstanze Döhner, Hartmut Döhner. (2012). TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*, *119*(9), 2114-2121. doi: 10.1182/blood-2011-08375758
- Garg, M., Moore, H., Tobal, K., & Yin, J. L. (2003). Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukemia. *Br J Haematol.*, *123*(1), 49-59.
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., . . . Swanton, C. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*, *366*(10), 883-892. doi: 10.1056/NEJMoa1113205
- Gilliland, D. G., & Griffin, J. D. (2002). *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia* (Vol. 100).
- Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005). Eukariotic cytosine methyltransferases *Annual Review of Biochemistry*, *74*(1), 481-514. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721
- Goodman, L. S., Wintrobe, M. M., Dameshek, W., Goodman, M. J., Gilman, A., & McLennan, M. T. (1948). Nitrogen mustard therapy: Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *JAMA*, *251*(17), 2255-2261. doi: 10.1001/jama.1984.03340410063036
- Grafone, T., Palmisano, M., Nicci, C., & Storti, S. (2012). An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev*, *6*(1), e8. doi: 10.4081/oncol.2012.e8

- Grimwade, D., & Hills, R. K. (2009). Independent prognostic factors for AML outcome. *ASH Education Program Book, 2009*(1), 385-395. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.385
- Grimwade, D., Hills, R. K., Moorman, A. V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A. H., . . . National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working, G. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood, 116*(3), 354-365. doi: 10.1182/blood-2009-11-254441
- Gröschel S, L. S., Schlenk RF, et al. (2010). High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol, 28*, 2101–2117.
- Grosveld, G. C. (2007). MN1, a novel player in human AML. *Blood cells, molecules & diseases, 39*(3), 336-339. doi: 10.1016/j.bcmd.2007.06.009
- Guido Marcucci, K. M. z., Michael D. Radmacher, Ramiro Garzon, Clara D. Bloomfield. (2011). The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood, 117*(4), 1121-1129.
- Guido Marcucci, T. H., Hartmut Döhner. (2011). Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. *JCO, 29*(5), 475-486.
- Haferlach, C., Kern, W., Schindela, S., Kohlmann, A., Alpermann, T., Schnittger, S., & Haferlach, T. (2012). Gene expression of BAALC, CDKN1B, ERG, and MN1 adds independent prognostic information to cytogenetics and molecular mutations in adult acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer, 51*(3), 257-265. doi: 10.1002/gcc.20950
- Haferlach, T., Kohlmann, A., Wiecek, L., Basso, G., Kronnie, G. T., Bene, M. C., . . . Foa, R. (2010). Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol, 28*(15), 2529-2537. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4732
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 144*(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hasemann, M. S., Lauridsen, F. K. B., Waage, J., Jakobsen, J. S., Frank, A.-K., Schuster, M. B., . . . Porse, B. T. (2014). C/EBP $\alpha$  Is Required for Long-Term Self-Renewal and Lineage Priming of Hematopoietic Stem Cells and for the Maintenance of Epigenetic Configurations in Multipotent Progenitors. *PLoS Genetics, 10*(1), e1004079. doi: 10.1371/journal.pgen.1004079
- Heuser, M., Argiropoulos, B., Kuchenbauer, F., Yung, E., Piper, J., Fung, S., . . . Humphries, R. K. (2007). MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood, 110*(5), 1639-1647. doi: 10.1182/blood-2007-03-080523
- Heuser, M., Berg, T., Kuchenbauer, F., Lai, C. K., Park, G., Fung, S., . . . Humphries, R. K. (2012). Functional role of BAALC in leukemogenesis. *Leukemia, 26*(3), 532-536. doi: <http://www.nature.com/leu/journal/v26/n3/supinfo/leu2011228s1.html>
- Heuser, M., Beutel, G., Krauter, J., Döhner, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., & Ganser, A. (2006). High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood, 108*(12), 3898-3905. doi: 10.1182/blood-2006-04-014845
- Higuchi, M., O'Brien, D., Kumaravelu, P., Lenny, N., Yeoh, E.-J., & Downing, J. R. (2002). Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell, 1*(1), 63-74. doi: 10.1016/S1535-6108(02)00016-8

- Hospital, M. A., Thomas, X., Castaigne, S., Raffoux, E., Pautas, C., Gardin, C., . . . Dombret, H. (2012). Evaluation of allogeneic hematopoietic SCT in younger adults with adverse karyotype AML. *Bone Marrow Transplant*, *47*(11), 1436-1441.
- Hou, H.-A., Huang, T.-C., Lin, L.-I., Liu, C.-Y., Chen, C.-Y., Chou, W.-C., . . . Tien, H.-F. (2010). WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood*, *115*(25), 5222-5231. doi: 10.1182/blood-2009-12-259390
- Huang, G., Shigesada, K., Wee, H.-J., Liu, P. P., Osato, M., & Ito, Y. (2003). Molecular basis for a dominant inactivation of RUNX1/AML1 by the leukemogenic inversion 16 chimera. *Blood*, *103*(8), 3200-3207.
- Huret, J.-L. (2012, 7-3-2012). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Retrieved 1-5-2015, 2015
- Imren, S., Heuser, M., Gasparetto, M., Beer, P. A., Norddahl, G. L., Xiang, P., . . . Humphries, R. K. (2014). Modeling de novo leukemogenesis from human cord blood with MN1 and NUP98HOXD13. *Blood*, *124*(24), 3608-3612. doi: 10.1182/blood-2014-04-564666
- Issa, J. (2013). The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood*, *121*(19), 3811-3817.
- Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P., Mar, B. G., . . . Ebert, B. L. (2014). Clonal Hematopoiesis with Somatic Mutations Is a Common, Age-Related Condition Associated with Adverse Outcomes. *Blood*, *124*(21), 840-840.
- Jay P. Patel, M. G., Maria E. Figueroa, Hugo Fernandez, Zhuoxin Sun, Janis Racevskis, Pieter Van Vlierberghe, Igor Dolgalev, B.S., Sabrena Thomas, Olga Aminova, , Kety Huberman, J. C., Agnes Viale, Nicholas D. Socci, , Adriana Heguy, Athena Cherry, Gail Vance, Rodney R. Higgins, Rhett P. Ketterling, Robert E. Gallagher, Mark Litzow, , Marcel R.M. van den Brink, Hillard M. Lazarus, , Jacob M. Rowe, Selina Luger, M.D., Adolfo Ferrando, Elisabeth Paietta, Martin S. Tallman, Ari Melnick, , & Omar Abdel-Wahab, and Ross L. Levine, . (2012). Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *366* (12), 1079-1089.
- Ji, H., Ehrlich, L. I. R., Seita, J., Murakami, P., Doi, A., Lindau, P., . . . Feinberg, A. P. (2010). A comprehensive methylome map of lineage commitment from hematopoietic progenitors. *Nature*, *467*(7313), 338-342. doi: 10.1038/nature09367
- Jourdan, E., Boissel, N., Chevret, S., Delabesse, E., Renneville, A., Cornillet, P., . . . Dombret, H. (2013). *Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia* (Vol. 121).
- Juliusson, G., Antunovic, P., Derolf, Å., Lehmann, S., Möllgård, L., Stockelberg, D., . . . Höglund, M. (2009). *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry* (Vol. 113).
- Jurlander, J., Caligiuri, M. A., Ruutu, T., Baer, M. R., Strout, M. P., Oberkircher, A. R., . . . Bloomfield, C. D. (1996). Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood*, *88*(6), 2183-2191.
- Kadia, T. M., Ravandi, F., O'Brien, S., Cortes, J., & Kantarjian, H. M. (2015). Progress in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, *15*(3), 139-151. doi: 10.1016/j.clml.2014.08.006
- Kahn, S. (2013). Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia*, *6*, 1301-1309.
- Kantarjian, H., Ravandi, F., O'Brien, S., Cortes, J., Faderl, S., Garcia-Manero, G., . . . Freireich, E. J. (2010). Intensive chemotherapy does not benefit most older patients (age 70 years or older) with acute myeloid leukemia. *Blood*, *116*(22), 4422-4429. doi: 10.1182/blood-2010-03-276485
- Kaushansky, K. (2006). Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *New England Journal of Medicine*, *354*(19), 2034-2045. doi: 10.1056/NEJMra052706

- Kawagoe, H., & Grosveld, G. C. (2005a). Conditional MN1-TEL knock-in mice develop acute myeloid leukemia in conjunction with overexpression of HOXA9. *Blood*, *106*(13), 4269-4277. doi: 10.1182/blood-2005-04-1679
- Kawagoe, H., & Grosveld, G. C. (2005b). MN1-TEL myeloid oncoprotein expressed in multipotent progenitors perturbs both myeloid and lymphoid growth and causes T-lymphoid tumors in mice. *Blood*, *106*(13), 4278-4286. doi: 10.1182/blood-2005-04-1674
- Keating, M. J., Smith, T. L., Kantarjian, H., Cork, A., Walters, R., Trujillo, J. M., . . . Freireich, E. J. (1988). Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome. *Leukemia*, *2*(7), 403-412.
- Kelly, L. M., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., Amaral, S. M., Curley, D. P., . . . Gilliland, D. G. (2002). PML/RAR $\alpha$  and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(12), 8283-8288. doi: 10.1073/pnas.122233699
- Kenneth Miller, P. D. (2004). Clinical manifestation of Acute Myeloid Leukemia. In E. B. Ronald Hoffman, Sanford Shatil,, Leslie E. Silberstein, Bruce Furie, Harvey Cohen, Philip McGlave (Ed.), *Hematology. Basic Principles and Practice* (4 ed., pp. 1071-1079).
- Khalade, A., Maritta S Jaakkola, Pukkala, E., & Jaakkola, J. J. (2010). Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health*, *9*(31).
- Koreth, J., Schlenk, R., Kopecky, K. J., Honda, S., Sierra, J., Djulbegovic, B. J., . . . Cutler, C. (2009). Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*, *301*(22), 2349-2361. doi: 10.1001/jama.2009.813
- Kornblau, S. M., Tibes, R., Qiu, Y. H., Chen, W., Kantarjian, H. M., Andreeff, M., . . . Mills, G. B. (2009). Functional proteomic profiling of AML predicts response and survival. *Blood*, *113*(1), 154-164. doi: 10.1182/blood-2007-10-119438
- Krause, D. S., & Van Etten, R. A. (2005). Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *New England Journal of Medicine*, *353*(2), 172-187. doi: 10.1056/NEJMra044389
- Kronke, J., Bullinger, L., Teleanu, V., Tschurtz, F., Gaidzik, V. I., Kuhn, M. W., . . . Dohner, K. (2013). Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*, *122*(1), 100-108. doi: 10.1182/blood-2013-01-479188
- Lambert, J., Nibourel, O., Pautas, C., Hayette, S., Cayuela, J., Terre, C., . . . Renneville, A. (2014). MRD Assessed by WT1 and NPM1 transcript level identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gentuzumab ozogamicin. *Oncotarget*, *5*(15), 6280-6288.
- Langer, C., Marcucci, G., Holland, K. B., Radmacher, M. D., Maharry, K., Paschka, P., . . . Bloomfield, C. D. (2009). Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*, *27*(19), 3198-3204. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6110
- Langer, C., Radmacher, M. D., Ruppert, A. S., Whitman, S. P., Paschka, P., Mrozek, K., . . . Leukemia Group, B. (2008). High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*, *111*(11), 5371-5379. doi: 10.1182/blood-2007-11-124958
- Lapillonne, H., Renneville, A., Auvrignon, A., Flamant, C., Blaise, A., Perot, C., . . . Landman-Parker, J. (2006). High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, *24*(10), 1507-1515. doi: 10.1200/JCO.2005.03.5303

- Lars Bullinger, K. D., Eric Bair, Stefan Fröhling, Richard F. Schlenk, & Robert Tibshirani, H. D., Jonathan R. Pollack, (2004). Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 350(16), 1617-1628.
- Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., . . . Wilson, R. K. (2010). DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2424-2433. doi: 10.1056/NEJMoa1005143
- Li, Z., Herold, T., He, C., Valk, P. J., Chen, P., Jurinovic, V., . . . Chen, J. (2013). Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study. *J Clin Oncol*, 31(9), 1172-1181. doi: 10.1200/JCO.2012.44.3184
- Liu, T., Jankovic, D., Brault, L., Ehret, S., Baty, F., Stavropoulou, V., . . . Schwaller, J. (2010). Functional characterization of high levels of meningioma 1 as collaborating oncogene in acute leukemia. *Leukemia*, 24(3), 601-612. doi: 10.1038/leu.2009.272
- Löwenberg, B., Pabst, T., Vellenga, E., van Putten, W., Schouten, H. C., Graux, C., . . . Ossenkoppele, G. J. (2011). Cytarabine Dose for Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 364(11), 1027-1036. doi: 10.1056/NEJMoa1010222
- Lugthart S, v. D. E., van Norden Y, Löwenberg B, Delwel R. (2008). High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: Prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*, 111(8), 4329-4337.
- Lyu, X., Xin, Y., Mi, R., Ding, J., Wang, X., HU, J., . . . Zhao, R. (2014). Overexpression of Wilm's Tumor1 gene as a negative prognostic indicator in acute myeloid leukemia. *PLoS ONE*, 9(3).
- Magda A. Meester-Smoor, Marjolein J.F.W. Janssen, Gerard C. Grosveld, Annelies de Klein, Wilfred F.J. van IJcken, Hannie Douben, & Ellen C. Zwarthoff1. (2008). MN1 affects expression of genes involved in hematopoiesis and can enhance as well as inhibit RAR/RXR-induced gene expression. *Carcinogenesis*, 29(10), 2025-2034. doi: 10.1093/carcin/bgn168
- Malfuson, J. V., Etienne, A., Turlure, P., de Revel, T., Thomas, X., Contentin, N., . . . Acute Leukemia French, A. (2008). Risk factors and decision criteria for intensive chemotherapy in older patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 93(12), 1806-1813. doi: 10.3324/haematol.13309
- Marcucci, G., Maharry, K., Wu, Y.-Z., Radmacher, M. D., Mrózek, K., Margeson, D., . . . Bloomfield, C. D. (2010). IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets Within De Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, 28(14), 2348-2355. doi: 10.1200/JCO.2009.27.3730
- Marcucci G, M. K., Whitman SP. (2007). High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*, 25, 3337-3343.
- Marella de Bruijn, N. A. S. (2004). Core-binding factors in hematopoiesis and immune function. *Oncogene*, 23, 4238-4248.
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330), 343-349.
- Marin, D., Hedgley, C., Clark, R. E., Apperley, J., Foroni, L., Milojkovic, D., . . . O'Brien, S. (2012). Predictive value of early molecular response in patients with chronic myeloid leukemia treated with first-line dasatinib. *Blood*, 120(2), 291-294. doi: 10.1182/blood-2012-01-407486
- Marise Weil, O. J. G., Claude Jacquillat, Robert Levy, Arthur A. Serpick, Peter H. Wiernik, Janet, Cuttner, B. H., Louis Wasserman, Rose Ruth Ellison, Salman Gailani, Kurt Brunner, Richard T., & Silver, V. B. R., M. Robert Cooper, Louis Lowenstein, Nis I. Nissen, Farid

- Haurani, Johannes Blom, Michel Boiron, Jean Bernard, and James F. Holland. (1973). Daunorubicin in the therapy of acute granulocytic leukemia. *Cancer Research*, 33(5), 921-928.
- Matthew J. Walter, D. S., Li Ding, et al. (2012). Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 366(12), 1090-1098.
- Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., . . . Frei, E. (1994). Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 331(14), 896-903. doi: 10.1056/NEJM199410063311402
- McKerrell, T., Park, N., Moreno, T., Grove, C. S., Ponstingl, H., Stephens, J., . . . Vassiliou, G. S. (2015). Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep*, 10(8), 1239-1245. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.005
- Méreau, H., & Schwaller, J. (2013). Trithorax and polycomb cooperation in MLL fusion acute leukemia. *Haematologica*, 98(6), 825-827.
- MF Alemdehy, S. E. (2012). MicroRNAs: key players of normal and malignant myelopoiesis. *Curr Opin Hematol.*, 19(4), 261-267.
- Michael Andreeff, A. Q.-C. (2012). Pathobiology of Acute Myeloid Leukemia. In E. J. B. Ronald Hoffman, Leslie E. Silberstein, Helen E. Heslop, Jeffrey I. Weitz, John Anastasi, (Ed.), *Hematology. Basic principles and practice* (6 ed., pp. 853-862).
- Montesinos-Fernández, P. (2015). *Resultados protocolos PETHEMA LMA2007, LMA2010*. Paper presented at the Reunión anual grupo PETHEMA, Malaga.
- Moriya, K., Suzuki, M., Watanabe, Y., Takahashi, T., Aoki, Y., Uchiyama, T., . . . Ishii, N. (2012). Development of a Multi-Step Leukemogenesis Model of MLL-Rearranged Leukemia Using Humanized Mice. *PLoS ONE*, 7(6), e37892. doi: 10.1371/journal.pone.0037892
- Mrozek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S. P., & Bloomfield, C. D. (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2), 431-448. doi: 10.1182/blood-2006-06-001149
- Müller, M. C., Saglio, G., Lin, F., Pfeifer, H., Press, R. D., Tubbs, R. R., . . . Hochhaus, A. (2007). An international study to standardize the detection and quantitation of BCR-ABL transcripts from stabilized peripheral blood preparations by quantitative RT-PCR. *Haematologica*, 92(7), 970-973.
- Mukherjee, S. (2011). *El emperador de todos los males* (Taurus Ed. 1 ed.): Taurus.
- Muntean, A. G., & Hess, J. L. (2012). The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol*, 7, 283-301. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132434
- Murati, A., Brecqueville, M., Devillier, R., Mozziconacci, M. J., Gelsi-Boyer, V., & Birnbaum, D. (2012). Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer*, 12, 304. doi: 10.1186/1471-2407-12-304
- Naegeli, O. (1934). *Tratado de Hematología Clínica* (5 ed.).
- Ohtake, S., Miyawaki, S., Fujita, H., Kiyoi, H., Shinagawa, K., Usui, N., . . . Ohno, R. (2011). *Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 Study* (Vol. 117).
- OM Garson, A. H., M Sakurai, BR Reeves ,GJ Swansbury ,GJ Williams, G Alimena,DC Arthur,R Berger, A de la Chapelle (1989). Cytogenetic studies of 103 patients with acute myelogenous leukemia in relapse. *Cancer Genet Cytogenet*, 40(2), 187-202.
- Owen, C., Barnett, M., & Fitzgibbon, J. (2008). Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review. *British Journal of Haematology*, 140(2), 123-132. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06909.x
- Paschka, P., & Döhner, K. (2013). Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation? *ASH Education Program Book*, 2013(1), 209-219. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.209

- Paydas, S., Tanriverdi, K., Yayuz, S., Disel, U., Baslamisli, F., & Burgut, R. (2005). PRAME mRNA levels in cases with acute myeloid leukemia: clinical importance and future prospects. *Am J Hematol*, 79(4), 257-261.
- Piller, G. (2001). Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol.*, 112(2), 282-292.
- Porse, B. T., Bryder, D., Theilgaard-Mönch, K., Hasemann, M. S., Anderson, K., Damgaard, I., . . . Nerlov, C. (2005). Loss of C/EBP $\alpha$  cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(1), 85-96. doi: 10.1084/jem.20050067
- Prelich, G. (2012). Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics*, 190(3), 841-854. doi: 10.1534/genetics.111.136911
- Preston, D., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., . . . Matsui, T. (1994). Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*, 137, S68-97.
- RA Alharbi, R. P., HS Pandha, R Morgan (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*, 27(5), 1000-1008.
- Rockova, V., Abbas, S., Wouters, B. J., Erpelinck, C. A., Beverloo, H. B., Delwel, R., . . . Valk, P. J. (2011). Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers. *Blood*, 118(4), 1069-1076. doi: 10.1182/blood-2011-02-334748
- Rollig, C., Thiede, C., Gramatzki, M., Aulitzky, W., Bodenstein, H., Bornhauser, M., . . . Study Alliance, L. (2010). A novel prognostic model in elderly patients with acute myeloid leukemia: results of 909 patients entered into the prospective AML96 trial. *Blood*, 116(6), 971-978. doi: 10.1182/blood-2010-01-267302
- Rose Ruth Ellison, J. F. H., Marise Weil, Marise Weil, Claude Jacquillat, Michel Boiron, Jean Bernard Arthur Sawitsky, Fred Rosner, Bernard Gussof Richard Silver, Arthur Karanas, Janet Cuttner Charles Spurr, donald Hayes Johannes Bloom, louis Leone, Farid Haurani, Robert Kyle, J.L. Hutchinson, R. Jackson Forcier, John H. Moon. (1968). Arabinosyl cytosine: A useful agent in the treatment of acute leukemia in adults. *Blood*, 32(4), 507-523.
- S.H. Swerdlow, E. C., N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J Thiele, J.W. Vardiman, (2008). Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In E. C. S.H. Swerdlow, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein, J Thiele, J.W. Vardiman, (Ed.), *WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4 ed., pp. 26-30): WHO.
- Santamaria, C. M., Chillon, M. C., Garcia-Sanz, R., Perez, C., Caballero, M. D., Ramos, F., . . . Gonzalez, M. (2009). Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, 114(1), 148-152. doi: 10.1182/blood-2008-11-187724
- Sanz, M. A., Martín, G., González, M., León, A., Rayón, C., Rivas, C., . . . Bolufer, P. (2004). *Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group* (Vol. 103).
- Sanz, M. A., & Moscardo, F. (2007). *Protocolo PETHEMA LMA 2007*. Protocolo asistencial de tratamiento quimioterápico.
- Sanz, M. A., & Moscardo, F. (2010). *Protocolo asistencial para el tratamiento de primera línea adaptado al riesgo de la Leucemia Mieloblástica Aguda en pacientes de edad menor o igual a 65 años*. Protocolo Asistencial PETHEMA.
- Schlenk, R. F. (2014). Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 99(11), 1663-1670. doi: 10.3324/haematol.2014.114611
- Schlenk, R. F., Döhner, K., Krauter, J., Fröhling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., . . . Döhner, H. (2008). Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid

- Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 358(18), 1909-1918. doi: 10.1056/NEJMoa074306
- Schlenk, R. F., Döhner, K., Mack, S., Stoppel, M., Király, F., Götze, K., . . . Döhner, H. (2010). Prospective Evaluation of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation From Matched Related and Matched Unrelated Donors in Younger Adults With High-Risk Acute Myeloid Leukemia: German-Austrian Trial AMLHD98A. *Journal of Clinical Oncology*, 28(30), 4642-4648. doi: 10.1200/jco.2010.28.6856
- Schlenk, R. F., Taskesen, E., van Norden, Y., Krauter, J., Ganser, A., Bullinger, L., . . . Löwenberg, B. (2013). *The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA* (Vol. 122).
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M. F., . . . Falini, B. (2005). Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106(12), 3733-3739. doi: 10.1182/blood-2005-06-2248
- Schoofs, T., Berdel, W. E., & Muller-Tidow, C. (2014). Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 28(1), 1-14. doi: 10.1038/leu.2013.242
- Schwind, S., Marcucci, G., Kohlschmidt, J., Radmacher, M. D., Mrozek, K., Maharry, K., . . . Bloomfield, C. D. (2011). Low expression of MN1 associates with better treatment response in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, 118(15), 4188-4198. doi: 10.1182/blood-2011-06-357764
- Shah, A., Andersson, T. M. L., Racht, B., Björkholm, M., & Lambert, P. C. (2013). Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *British Journal of Haematology*, 162(4), 509-516. doi: 10.1111/bjh.12425
- Sheikhha, M. H., Awan, A., Tobal, K., & Liu Yin, J. A. (2003). Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients. *Hematol J*, 4(1), 41-46. doi: 10.1038/sj.thj.6200224
- Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P., & Levine, R. L. (2012). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*, 12(9), 599-612. doi: 10.1038/nrc3343
- Sidney Farber, Louis Diamond, Robert Mercer, Robert Sylvester, & Wolff, J. (1948). Temporary remission in acute leukemia in children prolonged by folic acid antagonist. *New England Journal of Medicine*, 238(23), 787-793.
- Sieff, C. A. (2015a, 5-26-2015). Overview of hematopoiesis and stem cell function. Retrieved 6-30-2015, 2015, from <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-hematopoiesis-and-stem-cell-function>
- Sieff, C. A. (2015b, 1-7-2015). Regulation of myelopoiesis. Retrieved 1-5-2015, 2015, from <http://www.uptodate.com/contents/regulation-of-myelopoiesis>
- Sierra, J., & Brunet, S. (2009). *Risk-adapted treatment for adult acute myeloid leukemia* Paper presented at the Hematology education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association - 2009; volume 3, issue, Berlin.
- Slany, R. K. (2009). The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica*, 94(7), 984-993. doi: 10.3324/haematol.2008.002436
- Soussi, T. (2012, June 2012). The TP53 web site. Retrieved 12/06/2015, 2015, from [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_Pathways.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html)
- Stanghellini, M. T. L. (2013). *Haploidentical Transplantation Outcome Is Not Inferior to Standard Matched Related - Unrelated Donor Transplantation: An Intention-to-Treat Analysis of 611 Patients in 8-Years Experience At San Raffaele Scientific Institute*. Paper presented at the BMT tandem meeting, Salt Lake City, Utah.
- Stock, W., & Thirman, M. J. (2014, Dec 11, 2014.). Pathogenesis of acute myeloid leukemia Retrieved 3-3-2015, 2015, from <http://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-acute-myeloid-leukemia>

- Stone, R. M. (2013). Acute Myeloid Leukemia in First Remission: To Choose Transplantation or Not? *Journal of Clinical Oncology*, 31(10), 1262-1266.
- T. R. Golub, D. K. S., P. Tamayo, C. Huard,, M. Gaasenbeek, J. P. M., H. Coller, M. L. Loh,, J. R. Downing, M. A. C., C. D. Bloomfield,, & Lander, E. S. (1999). Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science*, 286(5439 ), 531-537.
- Tanner, S. M., Austin, J. L., Leone, G., Rush, L. J., Plass, C., Heinonen, K., . . . de La Chapelle, A. (2001). BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24), 13901-13906. doi: 10.1073/pnas.241525498
- Tarella, C., Passera, R., Magni, M., Benedetti, F., Rossi, A., Gueli, A., . . . Rambaldi, A. (2011). Risk Factors for the Development of Secondary Malignancy After High-Dose Chemotherapy and Autograft, With or Without Rituximab: A 20-Year Retrospective Follow-Up Study in Patients With Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 29(7), 814-824. doi: 10.1200/jco.2010.28.9777
- Taskesen, E., Havermans, M., van Lom, K., Sanders, M. A., van Norden, Y., Bindels, E., . . . Delwel, R. (2014). Two splice-factor mutant leukemia subgroups uncovered at the boundaries of MDS and AML using combined gene expression and DNA-methylation profiling. *Blood*, 123(21), 3327-3335. doi: 10.1182/blood-2013-07-512855
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., . . . Illmer, T. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99(12), 4326-4335.
- Thol, F., Bollin, R., Gehlhaar, M., Walter, C., Dugas, M., Suchanek, K. J., . . . Heuser, M. (2014). Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *Blood*, 123(6), 914-920. doi: 10.1182/blood-2013-07-518746
- Thol, F., Damm, F., Lüdeking, A., Winschel, C., Wagner, K., Morgan, M., . . . Heuser, M. (2011). Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 29(21), 2889-2896. doi: 10.1200/jco.2011.35.4894
- Thota, S., Viny, A. D., Makishima, H., Spitzer, B., Radivoyevitch, T., Przychodzen, B., . . . Maciejewski, J. P. (2014). Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood*, 124(11), 1790-1798. doi: 10.1182/blood-2014-04-567057
- Valk, P. J. M., Verhaak, R. G. W., Beijnen, M. A., Erpelinck, C. A. J., van Doorn-Khosrovani, S. B. v. W., Boer, J. M., . . . Delwel, R. (2004). Prognostically Useful Gene-Expression Profiles in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 350(16), 1617-1628. doi: 10.1056/NEJMoa040465
- van Dongen, J. J. M., Lhermitte, L., Bottcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H. J., Flores-Montero, J., . . . Orfao, A. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908-1975. doi: <http://www.nature.com/leu/journal/v26/n9/suppinfo/leu2012120s1.html>
- van Wely, K. H. M., Molijn, A. C., Buijs, A., Meester-Smoor, M. A., Aarnoudse, A. J., Hellemons, A., . . . Zwarthoff, E. C. (2003). The MN1 oncoprotein synergizes with coactivators RAC3 and p300 in RAR-RXR-mediated transcription. *Oncogene*, 22(5), 699-709.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L., & Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100(7), 2292-2302. doi: 10.1182/blood-2002-04-1199
- Vellenga, E., van Putten, W., Ossenkoppele, G. J., Verdonck, L. F., Theobald, M., Cornelissen, J. J., . . . Löwenberg, B. (2011). *Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia* (Vol. 118).

- Verhaak, R. G. W., Wouters, B. J., Erpelinck, C. A. J., Abbas, S., Beverloo, H. B., Lugthart, S., . . . Valk, P. J. M. (2009). Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*, *94*(1), 131-134.
- Visconte, V., Makishima, H., Maciejewski, J. P., & Tiu, R. V. (2012). Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematologic disorders. *Leukemia*, *26*(12), 2447-2454. doi: 10.1038/leu.2012.130
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., . . . Bos, J. L. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, *319*(9), 525-532. doi: 10.1056/NEJM198809013190901
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, *408*(6810), 307-310.
- Ward, P. S., Patel, J., Wise, D. R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B. D., Collier, H. A., . . . Thompson, C. B. (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzymatic activity that converts  $\alpha$ -ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, *17*(3), 225-234. doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.020
- Weber, S., Alpermann, T., Dicker, F., Jeromin, S., Nadarajah, N., Eder, C., . . . Schnittger, S. (2014). BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*, *4*, e173. doi: 10.1038/bcj.2013.71
- Weisser, M., Haferlach, T., Schoch, C., Hiddemann, W., & Schnittger, S. (2004). The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *18*(9), 1551-1553.
- Welch, J. S., Ley, T. J., Link, D. C., Miller, C. A., Larson, D. E., Koboldt, D. C., . . . Wilson, R. K. (2012). The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, *150*(2), 264-278. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.023
- Wheatley, K., Brookes, C. L., Howman, A. J., Goldstone, A. H., Milligan, D. W., Prentice, A. G., . . . Acute Myeloid Leukaemia, S. (2009). Prognostic factor analysis of the survival of elderly patients with AML in the MRC AML11 and LRF AML14 trials. *Br J Haematol*, *145*(5), 598-605. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07663.x
- Wiemels, J. L., Xiao, Z., Buffler, P. A., Maia, A. T., Ma, X., Dicks, B. M., . . . Greaves, M. (2002). In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*, *99*(10), 3801-3805.
- Xavier, A. C., & Taub, J. W. (2010). *Acute leukemia in children with Down syndrome* (Vol. 95).
- Xiang, L., Li, M., Liu, Y., Cen, J., Chen, Z., Zhen, X., . . . Gu, W. (2013). The clinical characteristics and prognostic significance of MN1 gene and MN1-associated microRNA expression in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*, *92*(8), 1063-1069. doi: 10.1007/s00277-013-1729-x
- Xiao, S. J., Shen, J. Z., Huang, J. L., & Fu, H. Y. (2015). Prognostic significance of the gene expression in adult patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*, *3*(4), 880-888. doi: 10.3892/mco.2015.562
- Yang, L., Han, Y., Saurez Saiz, F., & Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, *21*(5), 868-876.
- Yin, J. A. L., O'Brien, M. A., Hills, R. K., Daly, S. B., Wheatley, K., & Burnett, A. K. (2012). *Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial* (Vol. 120).
- Zhang, Y., Chen, A., Yan, X. M., & Huang, G. (2012). Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. *Int J Hematol*, *96*(4), 428-437. doi: 10.1007/s12185-012-1180-0
- Zhao, Z., Zuber, J., Diaz-Flores, E., Lintault, L., Kogan, S. C., Shannon, K., & Lowe, S. W. (2010). p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. *Genes & Development*, *24*(13), 1389-1402. doi: 10.1101/gad.1940710



