



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de Doctorado de **BIOMEDICINA**

TESIS DOCTORAL:

“ESTUDIO MOLECULAR DE LEUCEMIAS AGUDAS

MIELOBLASTICAS DE BAJO RIESGO”

(MOLECULAR ANALYSIS IN FAVORABLE-RISK ACUTE MYELOID LEUKEMIA)

Autora:

Carmen Martínez Losada

Directores:

Joaquín Sánchez García

Josefina Serrano López

Francesco Lo coco

Fecha de depósito tesis en el Idep: 1/06/2018

TITULO: *ESTUDIO MOLECULAR DE LEUCEMIAS AGUDAS
MIELOBLÁSTICAS DE BAJO RIESGO*

AUTOR: *Carmen Martínez Losada*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



TÍTULO DE LA TESIS: ESTUDIO MOLECULAR DE LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLASTICAS DE BAJO RIESGO

DOCTORANDO/A: CARMEN MARTINEZ LOSADA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda inició el desarrollo de esta tesis, evaluando el estado mutacional mediante secuenciación Sanger de los genes mas importantes implicados en la patogenia de las Leucemias Agudas Mieloblásticas (LAM) de bajo riesgo en muestras del diagnostico y recaída, en el prestigioso laboratorio Dr Lo Coco, en Universidad de La Sapienza en Roma durante el año 2014. A su regreso, el estudio fue ampliando el número de muestras integrando a hospitales de Murcia y Valencia con análisis mutacional mediante metodología NGS, ampliando datos clínicos y fenotípicos. Finalmente, durante el año 2017, procedió a la integración de los hallazgos moleculares y al análisis global de los datos y su correlación con los cambios inmunofenotípicos y los hallazgos clínicos.

Los resultados iniciales fueron meritorios de una Comunicación Oral en el congreso nacional de SEHH celebrado en Valencia en el año 2015 y los resultados finales han sido publicados en la prestigiosa revista D1 Haematologica con IF 7.702

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, _1_ de _____ JUNIO _____ de ____2018_____

Firma del/de los director/es

Fdo.: _____ Fdo.: _____

*"Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un **niño colocado** ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."*

Marie Curie

A mis padres

A Rafa

AGRADECIMIENTOS

Hace nada más y nada menos que algo más de cuatro años desde que empecé esta aventura llamada TESIS DOCTORAL. Maleta a cuestas y pasaporte en mano, llegue a la ciudad eterna. Roma me recibía con lluvia y en la Fundación Santa Lucia empecé a hacer mis primeras PCRs y a adentrarme en el mundo de la biología molecular. Ha sido un camino largo y duro, e incluso he estado tentada en alguna ocasión de abandonar. Estas letras que escribo son para dar las gracias a todas las personas que han estado a mi lado estos años y han contribuido a que haya podido terminar este trabajo.

Me gustaría empezar por la Fundación Alfonso Martín Escudero sin la cual no hubiese podido haber realizado mi estancia en Roma. Al Prof. Francesco Lo coco, que me acogió en su grupo de investigación y confió en mi para poder realizar este proyecto. A Nélica Noguera que fue mi primera mentora y me hizo sentir como una más en el grupo. A Eduardo Garza, mi protector y mi gran amigo, que me dio la luz en uno de los peores momentos y siempre ha estado apoyándome. A Loredana, Liliana, Tiziana, Serena y Valentina.

Gracias a Joaquín Sánchez por darme la oportunidad de poder embarcarme en este proyecto, por su admirable vocación clínica y científica, por sus sabios consejos, por la perseverancia, rigurosidad y responsabilidad con la que me ha enseñado a trabajar. Gracias por haberme permitido aprender tanto a tu lado y por seguir haciéndolo. Pero, sobre todo, muchas gracias por haberte mantenido en pie en la recta final de esta Tesis.

A Josefina Serrano, gracias por confiar en siempre en mí, incluso a veces más que yo misma. Gracias por “meterme el gusanillo de la investigación” y por hacer que cada vez sea más curiosa. Gracias también por tus consejos y por hacer que “eche el freno” para esas hacerme reflexionar y hacerme pensar. Y, sobre todo, gracias a enseñarme a trabajar y por poder seguir aprendiendo de ti.

A Juana Serrano. Gracias por ilusionarme y por emocionarte conmigo. Gracias por enseñarme tanto y ayudarme “a contar mi historia”. Gracias por haberme escuchado y por haberme apoyado tanto. Sabes que no hubiese podido terminar este trabajo sin ti.

A las “chicas de epigenética”, Mariví y Teresa. Sabéis que un pedacito de esta tesis es vuestro. Gracias por prestarme vuestra ayuda sin dudarlo y por echarme una mano cada vez que lo he necesitado.

A Andrés Jerez y Ana Hurtado. Gracias por acercarte en el Nacional de Valencia y por entusiasmartelo con mi proyecto. A Pau Montesinos, Esperanza Such y todo el equipo de

la Fé. A Antonio Martínez, por dejarme un trocito de su laboratorio. A Juan Ramón Peinado, por ayudarme “con mis mutaciones”. A Oskar Martínez, gracias por tus explicaciones y por hacer que todo fuese más fácil.

A la Dra. Herrera por haber contado conmigo para formar parte del equipo hematológico del Hospital Reina Sofía y así facilitarme el poder concluir la tesis. Gracias a mis compañeros del servicio, en especial a Carmen Martín, que ya desde que yo era residente, era un modelo para mí y a Víctor y a Mamen por hacerme sonreír las mañanas más difíciles. A mis residentes mayores, que son amigos, y que les debo mucho de lo que soy y a mis residentes pequeños, que espero haber sido un apoyo para ellos. A mis “resis” en especial a Manolo y a Ana, os voy a echar mucho de menos.

A mi pequeña “familia romana”: Azahara, Sandra, Irene, Marieta y sobre todo a Teresa, Ana, Carlos y Nuria. Sin vosotros no hubiese sido igual. Vosotros hicisteis que mereciese la pena. Gracias por esas conversaciones infinitas acompañadas de un spritz aguantando mis lágrimas “cuando una secuencia no me salía”. Gracias por convertirnos en un pilar fundamental y por estar siempre a mi lado. Gracias por ser mi hogar cuando estaba lejos de casa. Y, sobre todo, gracias por seguir cerca, a pesar de que ya no nos veamos todos los días. A ti también Elena, porque también eres Roma, aunque no estuvieras allí.

A mis amigas de la residencia y de la facultad, en especial a María Luisa, que me ayudó en uno de los momentos más difíciles y gracias a ella pude seguir avanzando. Gracias por vuestro apoyo y por estar siempre ahí.

Y, lo más importante, gracias a mi familia. Creo que ellos han sido los verdaderos sufridores de estos años. A mis padres, por ser los mejores, por ser mi ejemplo a seguir en la vida y por quererme de forma incondicional. Gracias papá por ser mi guía, por apoyarme en cada momento y por ayudarme a conseguir mis sueños. Gracias mamá por enseñarme a ser una luchadora, por tenderme una mano cada vez que me he caído y por ser mi ángel de la guarda. A mi hermano José Luis, que, aun siendo más pequeño, ha ejercido muchas veces de hermano mayor. Me has enseñado a que uno siempre puede conseguir lo quiere y eres fiel ejemplo de ello; a no ponerme muros, a no tener miedo a nada y lo que significa constancia. Gracias por estar siempre ahí. A mi hermana Marta, por haber estado cerca en la distancia y por haber estado siempre disponible para escucharme.

A mi abuelo, porque sé que donde quiera que esté, estaría muy orgulloso de mí. A mi abuela, por sus besos y abrazos. A mis tíos y mis primos.

A Rafa. Por ser mi compañero perfecto en este viaje de la vida. Gracias por ser como eres, por entenderme y por aguantar "mis arrebatos". Gracias por tu ayuda, no sé si hubiese podido llegar al final sin ti. Gracias por hacer que no me pierda. Gracias por hacerme ver la luz los días más grises.

GLOSARIO ABREVIATURAS

AcMn: Anticuerpos Monoclonales

Alo-TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico

Auto-TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogo

CEBPA: CCAAT enhancer binding protein alpha

CEBPA^{dm}: CEBPA mutación bialélica

CHIP: Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential

CMH: Células madre hematopoyéticas

CML: Célula madre leucémica

CMF: Citometría de flujo

CBF: Core binding factor

DNMT3A: DNA methyltransferase 3 alpha

EMR: Enfermedad Mínima Residual

ELN: European Leukemia Net

FAB: Franco-Americana-Británica

FISH: hibridación fluorescente in situ

FLT3: Fms related tyrosine kinase 3

FLT3-ITD: Duplicaciones internas en tandem de FLT3

FLT3-TKD: Mutaciones puntuales en el dominio tirosín-quinasa de FLT3

IDH: Isocitrate dehydrogenase

KRAS: Kirsten rat sarcoma oncogene

LAL: Leucemia aguda linfoblástica

LAM: Leucemia aguda mieloblástica

LAP: Leucemia aguda promielocítica

LAM-CN: LAM-cariotipo normal

LMC: Leucemia Mieloide crónica

MPO: Mieloperoxidasa

NGS: Next Generation Sequencing

NPM1: Nucleofosmina 1

NPM1^{mut}: NPM1 mutado

NPM1^{wt}: NPM1 wild-type

NRAS: Neuroblastoma ras oncogene

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAS: Ácido Peryódico de Schiff

RC: Remisión completa

RR: Riesgo de recaída

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa

SG: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SLR: Supervivencia libre de recaída

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

TP53: Tumor protein p53

SMD: Síndromes mielodisplásicos

SMPc: Síndromes mieloproliferativos crónicos

UHR-SNP: Ultra-high resolution- single-nucleotide polymorphism

WES: Whole-exome-sequencing

WGS: Whole-genome-sequencing

TABLAS:

Tabla 1: Clasificación FAB de la LAM

Tabla 2: Asociación marcadores inmunológicos con subtipos FAB.

Tabla 3: Grupos de riesgo citogenético en la LAM

Tabla 4: Clasificación de la OMS 2008 para las LAM.

Tabla 5: Clasificación de las neoplasias mieloides agudas según la OMS, 2016

Tabla 6: Clasificación de la LAM basada en el riesgo según la ELN 2017

Tabla 7: Características de los pacientes incluidos en el estudio (resumen)

Tabla 8: Características de los pacientes incluidos en el estudio

Tabla 9: Secuencias de los cebadores

Tabla 10: Secuencias de los cebadores para la NGS

Tabla 11: Relación de los AcMo empleados en el estudio

Tabla 12: Comparación características clínicas-biológicas según evolución clonal

Tabla 13: Análisis multivariable

Tabla 14: Características de los pacientes con cambios IF y sin cambios

Tabla 15: Características de los pacientes con cambios IF y genotípicos y sin cambios

Tabla 16: Resumen de las principales publicaciones de evolución clonal genotípica

Tabla 17: Resumen de las principales publicaciones de evolución clonal fenotípica

FIGURAS:

Figura 1. Impacto de las alteraciones citogenética en la supervivencia en pacientes con LAM

Figura 2: Concurrencia de diferentes mutaciones en LAM

Figura 3: Categorías funcionales de los genes que están frecuentemente mutados en LAM

Figura 4. Categorías clínicamente relevantes con impacto pronóstico

Figura 5. Estructura y dominios funcionales de NPM1

Figura 6: NPM1 y leucemogénesis.

Figura 7. Vías de señalización de FLT3 y sus mutaciones con inhibidores en fase clínica

Figura 8: Impacto en la supervivencia global y riesgo de recaída de la ración alelica de FLT-ITD en pacientes con LAM-NPM1

Figura 9: Modelo para la acción DNMT3A en CMHs

Figura 10: Desarrollo gradual de la hematopoyesis policlonal a CHIP

Figura 11: Supervivencia de los pacientes con citogenética de riesgo intermedio según el estado mutacional de NPM1/DNMT3A.

Figura 12: Las enzimas mutantes IDH1 e IDH2.

Figura 13: Inmunofenotipo al diagnóstico de LAM-NPM1

Figura 14: Esquema del modelo de leucemogénesis en LAM-CBF

Figura 15: Los genes *RAS*

Figura 16: Inmunofenotipo al diagnóstico de LAM- RUNX-RUNXT

Figura 17: Dominios funcionales de CEBPA

Figura 18: TP53 es considerado el “Guardián del Genoma”.

Figura 19: Modelo de evolución clonal según Ding et al.

Figura 20: Modelo de progresión clonal de CMH a un clon leucémico franco

Figura 21. Representación gráfica del diseño del estudio

Figura 22: Representación gráfica de las mutaciones en cada uno de los genes estudiados

Figura 23: Representación gráfica de la PCR para NRAS

Figura 24: Representación gráfica de la PCR para KRAS

Figura 25: Representación gráfica de la PCR para DNMT3A

Figura 26: Representación gráfica de la PCR para TP53

Figura 27: Representación gráfica de la PCR para IDH1

Figura 28: Representación gráfica de la PCR para IDH2

Figura 29: Detección de la mutación p. F902fs en el gen *DNMT3A* mediante secuenciación directa Sanger en el paciente UPN 7 en la muestra del diagnóstico

Figura 30: Proporción de mutaciones concurrentes con NPM1^{mut} en el grupo de pacientes que recaen y en el grupo control en el momento del diagnóstico de la LAM

Figura 31: Mutaciones detectadas en cada paciente al diagnóstico y a la recaída.

Figura 32: Representación del curso de la LAM en paciente UPN 7.

Figura 33: Detección de la mutación R882H en el gen *DNMT3a* mediante secuenciación directa Sanger en el paciente UPN 2 en las muestras del diagnóstico y recaída

Figura 34: Detección de la mutación D876Y en DNMT3a en el paciente UPN 10 en la muestra de la recaída

Figura 35: Representación del curso de la LAM en paciente UPN 10

Figura 36. Análisis de la variación de la secuencia en el exón 22 del gen *DNMT3a* de los pacientes UPN 7 y 10 por análisis de pirosecuenciación

Figura 37. Modelos tridimensionales para las proteínas *DNMT3A* mutantes (I)

Figura 38. Modelos tridimensionales para las proteínas *DNMT3A* mutantes (II)

Figura 39: Representación gráfica de los patrones inmunofenotípicos diagnóstico/recaída de los 26 pacientes

Figura 40 Cambios de fenotipo diagnóstico/recaída de varios pacientes

Figura 41 Cambios fenotípicos del paciente UPN 10 en representación 3D

Figura 42: Diagrama de distribución de cambios Inmunofenotípicos en los pacientes con o sin evolución clonal mutacional

Figura 43 Supervivencia Global de la serie y según ALo-TPH tras la recaída

Figura 44. Modelo de evolución clonal en LAM-CBF estimado mediante CNV y SNPs

Figura 45. Modelos de evolución clonal en LAM-*NPM1* basado en la estabilidad de marcadores genéticos diagnóstico/recaída

Figura 46: Posibilidades de dinámica de evolución genética y fenotípica en LAM:

ÍNDICE

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	14
1.2. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN	14
1.2.1. Clasificación morfológica FAB	15
1.2.2. Estudios inmunológicos en LAM.....	15
1.2.3. Estudios genéticos en LAM	16
1.2.4. Diagnóstico integrado: Clasificación OMS 2001-2008	18
1.2.5. Revisión OMS 2016.....	21
1.3. CLASIFICACIÓN PRONÓSTICA EUROPEAN LEUKEMIA NET 2017..	23
1.4. LAM DE BAJO RIESGO CON <i>NPM1^{mut}</i>	27
1.4.1. Características clínicas.....	27
1.4.2. Características biológicas de <i>NPM1^{wt}</i> y <i>NPM1^{mut}</i>	27
1.4.3. Mutaciones acompañantes en LAM- <i>NPM1^{mut}</i>	29
1.4.3.1. Mutaciones en FLT3	30
1.4.3.2. Mutaciones en DNMT3A	32
1.4.3.3. Mutaciones en IDH	35
1.4.4. Características fenotípicas de LAM- <i>NPM1^{mut}</i>	36
1.5. LAM DE BAJO RIESGO CBF: CARACTERISTICAS CLINICAS Y BIOLÓGICAS	38
1.5.1. Características clínicas.....	38
1.5.2. Características biológicas.....	38
1.5.3. Mutaciones acompañantes en LAM-CBF	39
1.5.3.1. NRAS/KRAS	40
1.5.3.2. Mutaciones en C-KIT	41
1.5.4. Características inmunofenotípicas de LAM-CBF	41
1.6. LAM DE BAJO RIESGO CEBPA: CARACTERISTICAS CLINICAS Y BIOLÓGICAS	42
1.6.1. Características inmufenotípicas de LAM-CEBPA ^{dm}	43

1.7. OTRAS MUTACIONES DE PRONÓSTICO ADVERSO: TP53.....	44
1.8. EVOLUCION CLONAL GENÉTICA.....	46
1.8.1. Mutaciones en el desarrollo de LAM.....	46
1.8.2. Análisis de evolución de espectro mutacional diagnóstico-recaída.	47
1.9. EVOLUCION FENOTÍPICA EN LAM	49
2. HIPÓTESIS	51
3. OBJETIVOS	55
4. PACIENTES Y MÉTODOS	58
4.1. PACIENTES	60
4.1.1. Criterios de inclusión	60
4.1.2. Características de los pacientes al diagnóstico:	60
4.1.3. Evolución clínica de los pacientes a la recaída:.....	64
4.1.4. Características de los controles.....	64
4.3. DISEÑO DEL ESTUDIO	64
4.4. ESTUDIO GENÉTICO	66
4.4.1. Extracción de ADN	66
4.4.1.1. Extracción de ADN en Trizol	66
4.4.1.2. Extracción de DNA a partir de extensión de médula ósea.....	66
4.4.2. Amplificación completa del ADN genómico	66
4.4.3. Estudio mutaciones en genes <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>IDH1/2</i> , <i>DNMT3A</i> y <i>TP53</i>	67
4.4.3.1. Diseño de cebadores	67
4.4.3.2. Secuenciación directa Sanger.....	70
4.4.3.3. Next Generation Sequencing (NGS)	73
4.4.3.4. Análisis de pirosecuenciación	74
4.4.3.5. Modelado de Homología	74
4.5. ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO	74
4.6. DEFINICIONES	75
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76

5.	RESULTADOS	79
5.1.	PERFIL MUTACIONAL AL DIAGNOSTICO DE PACIENTES CON LAM <i>NPM1^{mut}</i> , <i>LAM- CBF</i> Y <i>LAM-CEBPA^{dm}</i>	81
5.2.	PERFIL MUTACIONAL DE LOS CONTROLES CON <i>LAM-NPM1</i>	81
5.3.	PATRONES GENÉTICOS A LA RECAÍDA:.....	82
5.3.1.	Persistencia del clon original	84
5.4.	ANALISIS DE PIROSECUENCIACIÓN Y MODELADO DE LAS NUEVAS MUTACIONES EN <i>DNMT3A</i>	87
5.5.	PERFIL FENOTÍPICO AL DIAGNOSTICO DE LOS PACIENTES LAM <i>NPM1^{mut}</i> , <i>LAM-CBF</i> Y <i>LAM-CEBPA^{dm}</i>	89
5.6.	PERFIL FENOTÍPICO DE LOS PACIENTES <i>LAM-NPM1^{mut}</i> , <i>LAM-CBF</i> Y <i>LAM-CEBPA^{dm}</i> A LA RECAÍDA	90
5.7.	CORRELACION CAMBIOS FENOTÍPICOS CON CAMBIOS GENOTÍPICOS	93
5.8.	IMPACTO CLINICO DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS A LA RECAÍDA	94
5.8.1.-	Impacto clínico de los patrones de evolución genética	95
5.8.2.	Impacto clínico de los patrones de evolución fenotípica	97
6.	DISCUSION.....	100
6.1.	DIFERENTES PATRONES DE EVOLUCION CLONAL EN LAM DE BAJO RIESGO	102
6.2.	PERSISTENCIA DEL CLON FUNDADOR EN <i>LAM-CBF</i> y <i>CEBPA^{dm}</i> . 104	
6.3.	PATRON DE EVOLUCION CLONAL EN <i>LAM-NPM1^{mut}</i>	105
6.3.1.-	Pérdida de <i>NPM1</i> a la recaída	106
6.3.2	Interacción <i>NPM1</i> y <i>DNMT3A</i>	107
6.4.	EVOLUCION FENOTIPICA	108
6.5.	IMPACTO PRONOSTICO DEL PATRON DE EVOLUCION CLONAL	110
6.6.	AUSENCIA DE MUTACIONES <i>TP53</i> Y <i>K/NRAS</i> EN LAM-BAJO RIESGO	111
6.7.	LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO.....	112
7.	CONCLUSIONES.....	113

8.	BIBLIOGRAFIA.....	118
----	-------------------	-----

RESUMEN

Los pacientes con leucemia aguda mieloblástica (LAM) de bajo riesgo suelen alcanzar altas tasas de remisión completa tras la quimioterapia de inducción estándar; sin embargo, hasta un 30-40% de los pacientes pueden presentar recaída leucémica. En este trabajo hemos realizado un análisis fenotípico y genotípico integral de muestras pareadas al diagnóstico y recaída en 26 pacientes diagnosticados de LAM de bajo riesgo con el fin de buscar patrones biológicos de evolución clonal fenotípica y genotípica, y el impacto potencial en el pronóstico del paciente. Así, hemos demostrado el resurgimiento del clon fundador dominante a la recaída, con presencia de las mismas mutaciones detectadas en el momento del diagnóstico en el 77% de los casos, aunque hasta un 40% de ellos presentaban cambios fenotípicos. Por otro lado, el 23% de los pacientes (todos ellos pertenecientes al grupo *NPM1^{mut}*) presentaban una evolución genética: incluyendo pérdidas de *NPM1^{mut}* y adquisiciones de *DNMT3A^{mut}* y *FLT3-ITD*, de los cuales un 66% presentaban también cambios fenotípicos. Ningún parámetro clínico o biológico fue estadísticamente predictor de la evolución clonal en el momento de la recaída, aunque un alto porcentaje de ellos se había sometido a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en primera remisión completa. Por último, demostramos que los pacientes con evolución genética clonal en la recaída presentaban de forma significativa peor pronóstico al compararlos con los pacientes sin evolución clonal, mostrando estos últimos una supervivencia global aproximadamente del 50%.

Así, podemos concluir que una evaluación exhaustiva de las características genéticas y fenotípicas en el momento de la recaída en la LAM de bajo riesgo proporciona información biológica útil, pudiendo tener importantes implicaciones pronósticas.

Favorable-risk acute myeloid leukemia (AML) patients achieve high rates of complete remissions after standard induction chemotherapy but leukemia relapses still appear in up to 30-40% of patients. Here, we have performed comprehensive genotypic and phenotypic analyses in paired diagnosis/relapse samples of 26 patients diagnosed with favorable-risk AML in order to seek biological patterns of clonal genetic and phenotypic evolution and the potential impact on outcome. We demonstrate the reemergence of the dominant founder clone with the same mutations detected at diagnosis in 77% of the cases but 40% of them displaying phenotypic shifts. The remaining 23% patients, all belonging to *NPM1*^{mut} group, showed genetic clonal evolution including losses of *NPM1*^{mut} and acquisition of *DNMT3A*^{mut} and *FLT3-ITD* with 66% of them also displaying phenotypic changes. No basal or biological parameter was statistically predictor for clonal evolution at relapse, although a high percentage of them had undergone allogeneic stem-cell-transplant at first complete remission. Those patients with genetic clonal evolution showed significantly worse outcomes. Importantly, those patients without clonal evolution at relapse still have an overall-survival probability of nearly 50%.

We conclude that a comprehensive assessment of genetic and phenotypic features at relapse in favorable-risk AML provides useful biological information and could have important prognostic implications.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

La leucemia aguda mieloblástica (LAM) es una enfermedad clonal heterogénea resultante de la transformación maligna de células madre hematopoyéticas (CMH), sobre las que inciden diversas lesiones genéticas que actúan alterando los mecanismos normales de proliferación, auto-renovación y diferenciación celular¹. La proliferación incontrolada dará lugar al acúmulo de precursores mieloides inmaduros en la médula ósea, los cuales mantienen la capacidad de replicarse, pero presentan un bloqueo en la capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras, provocando insuficiencia medular y las consecuencias clínicas que de ello se derivan².

El promedio de la incidencia de la LAM en la población general es de 3-5 casos por cada 100000 habitantes y año, observándose un ligero predominio en varones. Su incidencia aumenta exponencialmente con la edad, de menos de un caso por 100000 habitantes y año para personas menores de 10 años, a 14-16/100000 habitantes a los 75 años³. Esta enfermedad comprende el 80% de las leucemias agudas en adultos y el 15-20% de las pediátricas. Dentro de la totalidad de los procesos neoplásicos, la LAM es la causante del 1,2% de la mortalidad global por cáncer.

La LAM empezó a considerarse una enfermedad en la primera mitad del siglo XIX, cuando se publicaron algunos trabajos en los que se describían pacientes con alteraciones en la sangre. Los pioneros fueron R Virchow⁴, en su trabajo "Sangre blanca y tumoraciones esplénicas" y JH Bennett⁵, en 1845. Gracias a las técnicas de coloración de Ehrlich⁶, basadas en anilinas, se amplió el conocimiento de los distintos tipos de células sanguíneas en 1877. Un año más tarde, sería Neumann⁷ quién distinguiera por primera vez las dos formas de leucemia: linfoide y mieloide, sentando las bases para su estudio en el siglo XX. Los estudios pioneros llevados a cabo mediante el fenómeno de inactivación del cromosoma X⁸ y más recientemente, empleando moleculares sobre el receptor de andrógenos humano, confirmaron el origen clonal de la célula leucémica⁹.

1.2. DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN

El proceso diagnóstico de LAM se inicia con la identificación morfológica de los mieloblastos leucémicos en las preparaciones de sangre periférica y médula ósea. Según los criterios actuales, la presencia de más del 20% de blastos leucémicos establece el diagnóstico de leucemia aguda^{1,9}. Mediante estudio citoquímico de reacción de mieloperoxidasa (MPO), la presencia de $\geq 3\%$ de blastos MPO positivos establece clásicamente la estirpe mieloide y el diagnóstico de LAM.

1.2.1. Clasificación morfológica FAB

La LAM es una enfermedad muy heterogénea, y esta diversidad también se manifiesta morfológicamente existiendo distintos grados de diferenciación en el linaje celular. Esta variabilidad morfológica fue la base para establecer la primera clasificación de la LAM, la clasificación Franco-Americana-Británica (FAB)³ descrita en el año 1976 (**Tabla 1**). Está basada en la apariencia morfológica de los blastos, línea celular afecta, grado de maduración y reactividad a las diferentes tinciones citoquímicas de las células blásticas, entre las que se incluyen: MPO, Negro Sudán B, Esterasa Específica o Naftol ASD Cloroacetato Esterasa, Esterasas no Específicas, Ácido Peryódico de Schiff (PAS), y Fosfatasa Ácida, entre otras.

Tabla 1. Clasificación FAB de la LAM

Denominación	Morfología	Frecuencia (%)
M0	LAM sin diferenciación	3
M1	LAM sin maduración	15-20
M2	LAM con maduración granulocítica	25-30
M3/M3 variante	LAP hipergranular/hipogranular	5-10
M4	LAM mielomonocítica aguda	25-30
M4Eo	LAM mielomonocítica aguda con eosinofilia	5-10
M5a y M5b	LAM monoblastica aguda	2-10
M6	Eritroleucemia	3-5
M7	LAM megacarioblástica	3-12

LAM: Leucemia aguda mieloblástica; LAP: Leucemia aguda promielocítica.

1.2.2. Estudios inmunológicos en LAM

El desarrollo de Anticuerpos monoclonales (AcMn) dirigidos para antígenos de diferenciación mieloide a finales de 1980 y su detección en la superficie de los blastos de LAM mediante técnica de Fosfatasa alcalina-Antifosfatasa alcalina y posteriormente mediante Citometría de Flujo (CFM)¹⁰ supuso un avance en la clasificación FAB para complementar los datos morfológicos y ayudar a definir los subtipos FAB, en especial las variantes más indiferenciadas (M0 y M1) o las de estirpe eritroide (M6) y megacariocítica (M7).

Posteriormente, el desarrollo de técnicas de CMF de marcaje múltiple o multiparamétrica permitieron la identificación de fenotipos leucémicos específicos¹¹ que constituyen actualmente la base para el seguimiento de enfermedad mínima residual (EMR) tras la terapia, ya que los blastos leucémicos mieloides son imposibles de diferenciar de progenitores normales por criterios morfológicos o citoquímicos.

En la **Tabla 2** se resumen los marcadores específicos de cada línea celular, que permiten una caracterización precisa en la mayoría de las LAM.

Tabla 2. Asociación marcadores inmunológicos con subtipos FAB

FAB	MPO	CD34	CD13 CD33	CD117	CD15	CD14	CD11b	GA	CD41 CD61	HLA- DR	CD36
M0	-	++	++	++	+/-	-	-	-	-	++	-
M1	++	++	++	++	-	-	+/-	-	-	++	-
M2	++	+	++	++	+	-	+/-	-	-	++	-
M3	++	-	++	+	+/-	-	-	-	-	-	-
M4	++	+	++	+	+	+	++	-	-	++	++
M5	++	+	+	+	+/-	++	++	-	-	++	++
M6	+	+	+/-	++	-	-	+/-	+	-	+	++
M7	-	+	+/-	++	-	-	-	-	++	++	+

FAB: Grupo cooperativo Franco-Americano-Británico; GA: glicoforina A; MPO: mieloperoxidasa

1.2.3. Estudios genéticos en LAM

En la actualidad, el análisis citogenético al momento del diagnóstico de la LAM es considerado como uno de los factores pronósticos más importantes revelando alguna anomalía numérica y/o estructural en torno al 50% de los pacientes. Son múltiples los estudios que demuestran de forma fehaciente que las alteraciones citogenéticas tienen una marcada influencia en la presentación y evolución de la LAM¹²⁻¹⁴. De forma que, los hallazgos a nivel citogenético tienen un altísimo valor predictivo sobre las tasas de remisión completa (RC), la supervivencia libre de enfermedad (SLE), el riesgo de recaída (RR) y la supervivencia global (SG).

El estudio citogenético convencional puede complementarse con análisis de hibridación fluorescente in situ (FISH) para las alteraciones cromosómicas más importantes, así como con técnicas de biología molecular (RT-PCR, Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa) de los reordenamientos genéticos implicados en las translocaciones cromosómicas más frecuentes. Todos ellos de forma conjunta se han convertido en herramientas necesarias para el manejo de la LAM, y así su uso combinado permite la diferenciación de tres grupos de pacientes en términos de pronóstico: Riesgo Bajo de Recaída o Favorable, Riesgo Intermedio y Riesgo Alto de Recaída o Desfavorable¹⁵ (**Tabla 3**).

Tabla 3. Grupos de riesgo citogenético en la LAM

Grupo pronóstico	%RC	%SLE
FAVORABLE (25-30%)		
-t(8;21)(q22;q22) <i>RUNX1-RUNXT1</i>	98	50-70
-inv(16)(p13q22)/ (t(16;16)(p13;q22) <i>CBFβ-MYH11</i>)	90	50-70
-t(15;17)(q22;q12-21) <i>PML-RARA</i>	80-90	80-90
INTERMEDIO (45-60%)		
-Cariotipo normal*	70-80	30-40
-t(9;11)(p22;q23)/; del(9q); del(11q23); del(20q)		
-Aberraciones numéricas: +8; +11; +13; +21, -Y		
DESFAVORABLE (10-30%)		
-Cariotipo complejo**	40	5-10
-inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26); <i>RPN1-MECOM</i>		
-t(6;9)(p23;q34) t(6;11)(q27;q23); <i>DEK-NUP214</i>	60	10-20
-t(11;19)(q23;p13.1) <i>KMT2A-MLLT1</i>		
-del(5q)		
-Aberraciones numéricas: -5; -7	40	5-10

* No se detectan anomalías clonales en más de 20 metafases analizadas. ** Se define como la presencia de tres o más anomalías en el cariotipo, no se incluyen la inv(16), t(16;16), t(8;21), t(15;17), t(9 ;11).(Moficiado de Mrózej K, Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2006).

Dejando al margen la leucemia aguda promielocítica (LAP), sólo dos alteraciones citogenéticas se asocian a un pronóstico de Bajo Riesgo, la t(8;21) y la inv(16) o t(16;16)¹⁶, representando aproximadamente un 15-20% de todas las LAM. Ambas alteraciones tienen en común que resultan en el reordenamiento de dos transcritos de fusión que engloban los genes encargados de la codificación de los dos heterodímeros del “core binding factor” (CBF), CBFα (AML1/ETO, actualmente denominado RUNX1-RUNX1T1) y CBFβ (CBFβ/MYH11), respectivamente. Ello ha llevado a la denominación de ambas entidades LAM-*CBF*.

En el extremo opuesto se sitúan los pacientes con cariotipo de Alto Riesgo, portadores de alteraciones etiquetadas como de mal pronóstico, entre las que se

encuentran cariotipos complejos o monosomías. Estos pacientes muestran un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción, con una elevada probabilidad de recidiva y en consecuencia una baja SG, en torno al 5-14%^{15,17,18} (**Figura 1**).

Finalmente, en un lugar Intermedio queda un grupo de pacientes muy heterogéneo, que comprende el grupo mayoritario de LAM (45-60%), donde a su vez predomina el grupo de pacientes con cariotipo normal. También se incluyen las alteraciones cromosómicas no clasificadas en los grupos de Bajo y Alto Riesgo. La SLE en el grupo de riesgo Intermedio será mejor que la observada en el grupo de mal pronóstico, aunque con una amplia variabilidad en la evolución clínica dentro del grupo¹⁹.

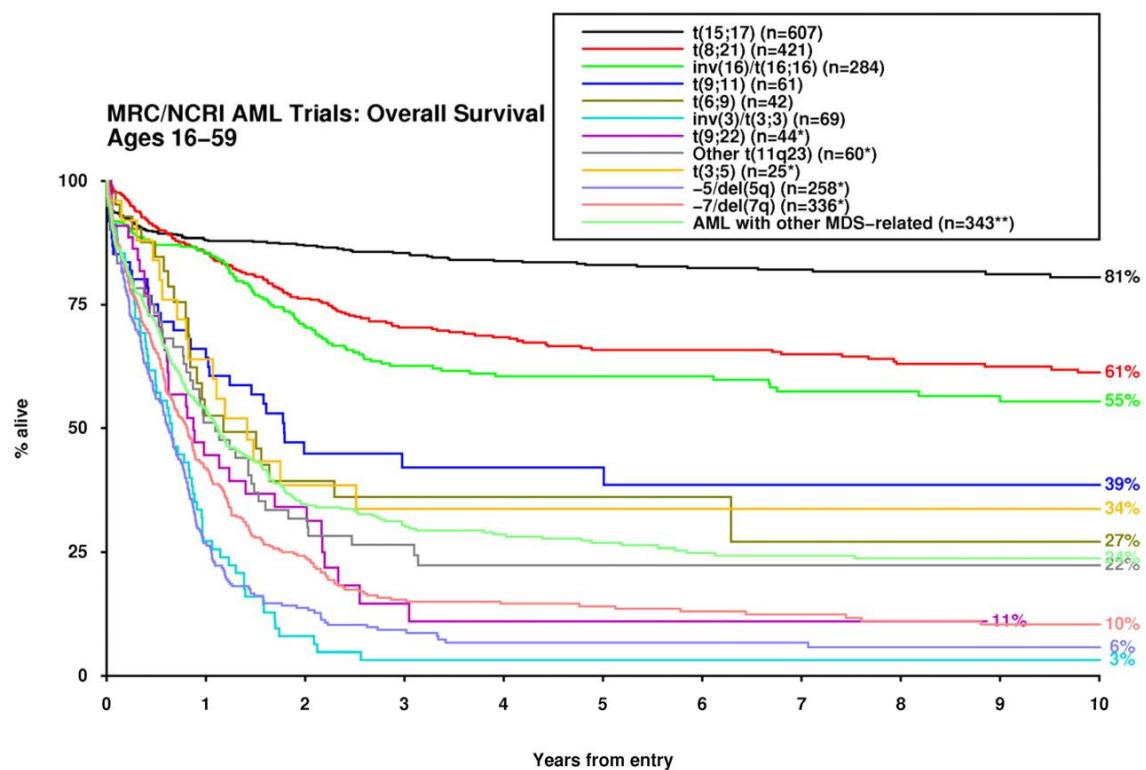


Figura 1. Impacto de las alteraciones citogenética en la supervivencia en pacientes con LAM (Grimwade D. Blood. 2001).

1.2.4. Diagnóstico integrado: Clasificación OMS 2001-2008

Durante las casi 3 décadas en que se utilizó el sistema FAB para clasificar la LAM, se descubrió que muchos casos de LAM están asociados con anomalías genéticas recurrentes que afectan las vías celulares de maduración y proliferación mieloides. La clasificación FAB proporcionó un marco morfológico, citoquímico e inmunológico consistente en el que se pudo apreciar la importancia de las lesiones genéticas. En algunos casos, como la LAP y la leucemia aguda mielomonocítica con eosinófilos anormales (M4Eo), las características morfológicas predicen las anomalías genéticas.

Sin embargo, las correlaciones morfológico-genéticas no son universales, y los hallazgos genéticos pueden predecir el pronóstico y las propiedades biológicas de la leucemia de manera más consistente que la morfología.

Así, nació la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para incorporar e interrelacionar los hallazgos morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y alteraciones moleculares²⁰. Define entidades biológicamente homogéneas, buscando ser no sólo una herramienta útil para el diagnóstico, sino también en clínica, y que se correlacionen de una forma más precisa con el pronóstico. En 2001 se publica la primera clasificación OMS para LAM, reconociendo tres subgrupos únicos: (1) LAM con anomalías genéticas recurrentes [t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22), t(15;17)(q22;q12)], y anomalías 11q23; (2) LAM con displasia multilinea, y (3) LAM y síndromes mielodisplásicos (SMD) relacionadas con la terapia. Los casos que no satisfacían los criterios de ninguno de estos subgrupos, o para los cuales no se podían obtener datos genéticos, se clasifican como una de las entidades de un cuarto subgrupo: LAM, no categorizada de otra manera.

Uno de los mayores desafíos en la posterior revisión 2008 fue cómo incorporar aberraciones genéticas con importancia pronóstica, manteniendo el principio de definir entidades homogéneas, biológicamente relevantes y mutuamente excluyentes, basadas no sólo en el valor pronóstico de una anomalía genética, sino también en propiedades morfológicas, clínicas y fenotípicas únicas. Esto fue particularmente relevante para incluir las mutaciones más frecuentes y con reconocida importancia pronóstica en la LAM: *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*, principalmente en el contexto de LAM con cariotipo normal (LAM-CN).

Así, en la clasificación de 2008, en el subgrupo de LAM con anomalías genéticas recurrentes se conservaron las 3 entidades incluidas en la edición anterior y se incluyen como "entidades provisionales" la LAM con *NPM1* mutado (*NPM1^{mut}*) y LAM con mutación *CEBPA bialélica* (*CEBPA^{dm}*) (**Tabla 4**). Debido a que las mutaciones en *FLT3* frecuentemente acompañan a otras lesiones genéticas, incluyendo anomalías bien reconocidas como la t(15;17) (q22;q12) y la t(6;9)(p23;q34), no se incluyó como criterio definitorio para ninguna entidad diferenciada²¹.

Tabla 4. Clasificación de la OMS 2008 para las LAM.

I. LAM con alteraciones genéticas recurrentes
LAM con t(8;21) (q22;q22), LAM (CBF α)/ETO.
LAP (LAM con t(15;17)(q22;q21)(PML/RAR α) y variantes).
LAM con eosinófilos anormales en médula ósea con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22), (CBFB/MHY11)
LAM con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL y sus variantes.
LAM con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
LAM con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
LAM (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13);RBM15-MKL1
<i>Provisionalmente: LAM con NPM1 mutada</i>
<i>Provisionalmente: LAM con CEBPA mutada</i>
II. LAM con cambios relacionados con la mielodisplasia*
III. LAM relacionadas con tratamientos previos
Relacionados con alquilantes
Relacionados con inhibidores de la topoisomerasa (epipodofilotoxina y adriamicina, principalmente)
Relacionadas con otros tratamientos
IV. LAM no incluidas en otras categorías
LAM minimamente diferenciada
LAM sin maduración
LAM con maduración
LA mielomonocítica
LA monocítica
Eritroleucemia
LA megacariocítica
LA basofílica
Panmielosis aguda con mielofibrosis
V. Sarcoma granulocítico
VI. Proliferación mieloide relacionada con S. Down
VII. Neoplasia de células dentríticas blástica plasmocitoide
VIII. LA de línea ambigua

(*): Deben mostrar: 1) historia de SMD o SMD/SMP; b) alteraciones citogenéticas relacionadas con SMD (3q-, -5, 5q-, -7, 7q-, +8, +9 11q-, 12p-, -18, -19, 20q-, +21, t(1;7), t(2;11) y cariotipos complejos; 3) displasia en \geq 50% células en al menos 2 líneas mieloides LAM: Leucemia Aguda mieloblástica; LAP: Leucemia Aguda Promielocítica; LA: Leucemia Aguda. (Modificado Arber. WHO. 2008)

1.2.5. Revisión OMS 2016

La actualización de la OMS 2016 sigue definiendo entidades específicas para la LAM centrándose en subgrupos significativos de citogenética y genética molecular. Se reconocen un gran número de anomalías citogenéticas recurrentes, que no se incluyen formalmente en la clasificación debido a su baja frecuencia²².

Se resaltan cambios relacionados con las actualizaciones de los nombres de los genes (como el cambio de *MLL* a *KMT2A*), así como el reconocimiento de que las inv(3) (q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2) no representan un gen de fusión, sino que repositionan un potenciador *GATA2* distal para activar la expresión de *MECOM* y, simultáneamente, conferir haploinsuficiencia *GATA2*^{23,24}. Con el fin de subrayar la importancia de la fusión *PML-RARA*, que puede ser críptica o el resultado de complejas reorganizaciones citogenéticas distintas de t(15;17) (q24.1;q21.2), la LPA con esta fusión pasa a denominarse LAP con *PML-RARA*.

Por su parte, LAM con *NPM1*^{mut} y LAM con *CEBPA*^{dm} pasan a ser entidades definitivas, al constatar diversos estudios el pronóstico favorable de dichas entidades independientemente de la presencia de displasia multilinea, y de alteraciones cromosómicas no mayores asociadas²⁵⁻³¹.

Se agregan dos nuevas categorías provisionales: 1) LAM con expresión *BCR-ABL1*, para reconocer estos raros casos de LAM de novo que pueden beneficiarse de la terapia con inhibidores de tirosin-kinasa. Aunque la distinción diagnóstica entre la LAM de novo con expresión *BCR-ABL1* y la transformación blástica de la leucemia mieloide crónica (LMC) puede ser difícil sin información clínica adecuada, se considera que la importancia de detectar esta fusión que permite una terapia dirigida, justifica una categoría de enfermedad provisional. 2) LMA con *RUNX1* mutado, para los casos de LAM de novo con esta mutación que no están asociados con anomalías citogenéticas relacionadas con los SMD, representando un grupo biológicamente distinto con un pronóstico posiblemente peor que otros tipos de LAM (**Tabla 5**).

Se mantienen los criterios de diagnóstico de LAM con cambios relacionados con mielodisplasia (presencia de displasia multilinea, hemopatía mieloide previa, alteraciones citogenéticas relacionadas), aunque con algunas modificaciones en dichas alteraciones genéticas relacionadas (como exclusión del9q).

Aparece como nueva categoría la de Neoplasias Mieloides con predisposición línea-germinal (Neoplasias Familiares Mieloides) que incluyen tanto LAM y SMD. El reconocimiento de estos casos es de gran relevancia clínica, ya que además de

cuidados clínicos y estudios biológicos especiales, dichos pacientes y familias van a requerir consejo genético especializado³².

Tabla 5. Clasificación de las neoplasias mieloides agudas según la OMS, 2016

<p>LAM con anomalías genéticas recurrentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> -LAM con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> -LAM con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> -LAM con <i>PML-RARA</i> -LAM con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3KMT2A</i> -LAM con t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> -LAM con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;26.2); <i>GATA2, MECOM</i> -LAM (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.1;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i> -LAM con mutaciones <i>NPM1</i> -LAM con mutaciones bialélica <i>CEBPA</i> -Entidad Provisional: LAM con <i>BCR-ABL1</i> -Entidad provisional: LAM con mutaciones <i>RUNX1</i>
<p>LAM con cambios relacionados con mielodisplasia</p>
<p>LAM relacionada con tratamientos citotóxicos</p>
<p>LAM no especificada de otro modo</p> <ul style="list-style-type: none"> -LAM mínimamente diferenciada -LAM sin maduración -LAM con maduración -Leucemia aguda mielomonocítica -Leucemia aguda monoblástica o monocítica -Leucemia eritroide pura -Leucemia aguda megacarioblástica -Leucemia aguda basofílica -Panmielosis aguda con mielofibrosis
<p>Sarcoma mioide</p>
<p>Proliferación mioide relacionada con el síndrome de Down</p> <ul style="list-style-type: none"> -Mielopoyesis anormal transitoria -LAM relacionada con el síndrome de Down
<p>Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica</p>
<p>Leucemias agudas de linaje ambiguo</p> <ul style="list-style-type: none"> -Leucemia aguda indiferenciada -Leucemia aguda fenotípicamente mixta con t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR/ABL1</i> -Leucemia aguda fenotípicamente mixta con t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> reordenado -Leucemia aguda fenotípicamente mixta (mioide / linfoide B), (NOS) -Leucemia aguda fenotípicamente mixta (mioide / linfoide T), (NOS)
<p>Neoplasias mieloides familiares con predisposición línea-germinal (Neoplasias Familiares Mieloides)</p>

LAM: Leucemia Aguda mieloblástica. (Modificado de Arber. Blood. 2016)

1.3. CLASIFICACIÓN PRONÓSTICA EUROPEAN LEUKEMIA NET 2017

Desde el año 1990 un grupo de expertos internacionales en LAM constituyen periódicamente grupos de trabajo para elaborar consensos de recomendaciones en LAM. El último consenso ha sido elaborado por European Leukemia-Net (ELN) en el año 2017 e incluyen recomendaciones en el diagnóstico, tratamiento, criterios de respuesta, así como la definición de grupos de riesgo genético/molecular en LAM del adulto.

Estas recientes recomendaciones recopilan los datos moleculares obtenidos en los últimos años mediante técnicas de secuenciación masiva de siguiente generación (NGS; Next Generation Sequencing) que han aportado una visión sin precedentes del espectro y frecuencia de las mutaciones, sus distintos patrones de cooperación y exclusividad mutua, el paisaje epigenético, su arquitectura subclonal y evolución clonal durante la enfermedad^{33,34}. En el año 2008 se publicó el primer caso de secuenciación genómica completa de un caso de LAM-CN evidenciando mutaciones en *NPM1* y *FLT3* así como otras 8 nuevas mutaciones³³. En 2012 Patel y cols³⁵. analizaron el estado mutacional de 18 genes en 398 casos de LAM identificando las combinaciones mutacionales que ocurren más comúnmente (**Figura 2**).

Un año después, la Red de Investigación del Atlas del Genoma del Cáncer analizó el genoma o exoma completo de 200 pacientes con LAM mediante secuenciación masiva, concluyendo que el genoma de pacientes con LAM tiene una media de 13 mutaciones³⁶. Identificaron los 23 genes más frecuentemente mutados y agruparon 8 categorías funcionales: las fusiones del factor de transcripción (18%), el gen que codifica *NPM1* (30%), genes supresores de tumores (16%), modificadores epigenéticos (genes relacionados con la metilación del ADN (44%) y modificadores de la cromatina (30%), genes de señalización (50-60%), genes del factor de transcripción mielóide (22%), complejo de cohesina (13%), y genes del complejo de spliceosoma (14%) (**Figura 3**). Además, volvieron a describir los patrones de cooperación y de exclusividad mutua, sugiriendo fuertes relaciones biológicas entre las categorías genéticas.

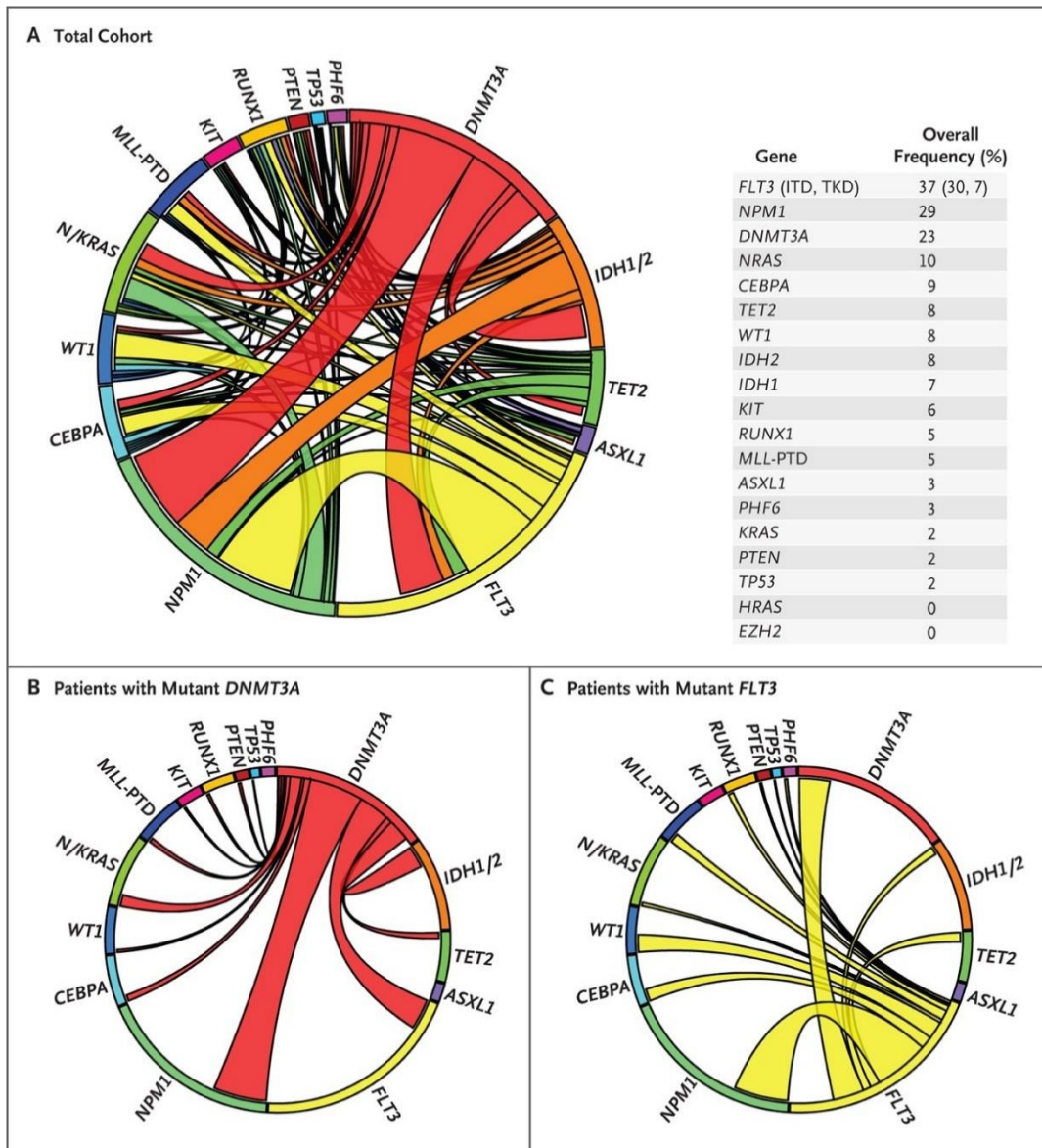


Figura 2: Concurrencia de diferentes mutaciones en LAM (Patel JP. N Engl J Med. 2012)

Posteriormente, en 2016 Papaemmanuil y cols³⁷, analizaron el estado mutacional de 111 genes mieloides en una serie 1540 pacientes con LAM, añadiendo a las 8 categorías ya conocidas, 3 categorías más: LAM con mutaciones en la cromatina y en genes reguladores RNA-splicing (18%), LAM con mutaciones en TP53, aneuploidías cromosómicas o ambas (13%); y, provisionalmente, LAM con mutaciones de IDH2-R172 (1%).

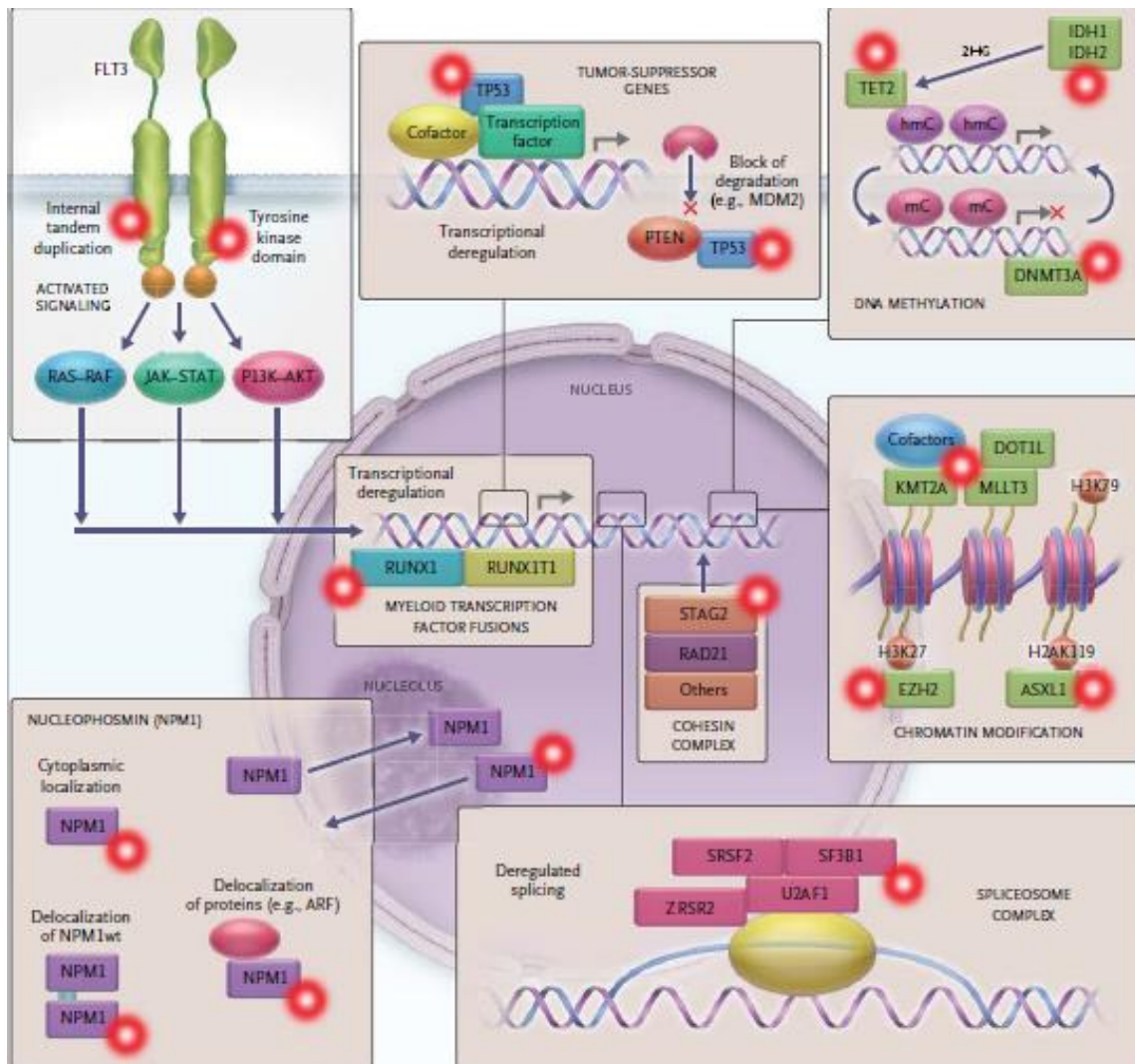


Figura 3: Categorías funcionales de los genes que están frecuentemente mutados en LAM (Döhner H. N Engl J Med 2015).

La frecuencia de mutaciones en los principales genes muestra distinta frecuencia según las categorías genéticas previamente recogidas en la clasificación OMS 2016 aportando información pronóstica de relevancia (**Figura 4**)³⁸.

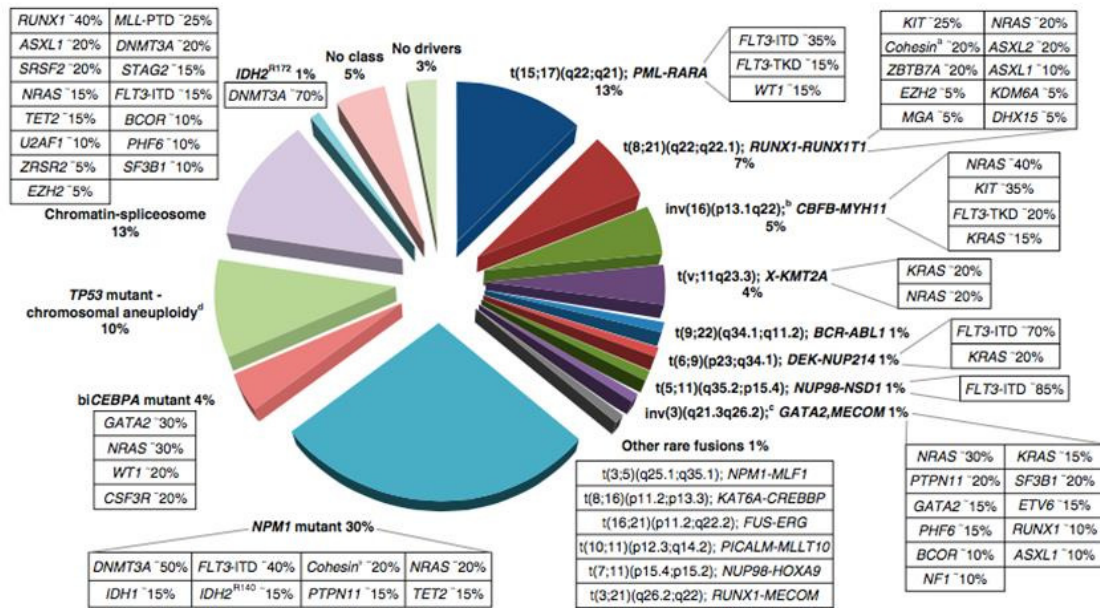


Figura 4. Categorías clínicamente relevantes con impacto pronóstico (Modificado de: Döhner H. Blood. 2017).

Con todo ello el panel de expertos de ELN-2017 decidió simplificar la clasificación pronóstica a 3 grupos (favorable, intermedio, adverso) en lugar del anterior sistema de cuatro grupos. Configurando la categoría de riesgo favorable se incluyen: LAM-CBF, LAM con *NPM1*^{mut} sin *FLT3-ITD* o con ratio baja y LAM con *CEBPA*^{dm} (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de la LAM basada en el riesgo según la ELN 2017

CATEGORIA DE RIESGO	ANORMALIDAD GENÉTICA
Favorable	-t(8;21) (q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> -inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> - <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> ^{low} - <i>CEBPA</i> mutado bialélica
Intermedio	- <i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> ^{alto} - <i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (sin lesiones genéticas de alto riesgo) -t(9;11) (p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> -Anormalidades citogenéticas no clasificadas como de riesgo adverso o favorable
Desfavorable	-t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> -t(v;11 q23.3):reordenamiento de <i>KMT2A</i> -t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> -inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -del(5q) o -5;-7;-17/abn(17p) -Cariotipo complejo, cariotipo monosómico - <i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> ^{alto} - <i>RUNX1</i> mutado - <i>ASXL1</i> mutado - <i>TP53</i> mutado

(Modificado de: Döhner H. Blood. 2017).

Además del riesgo determinado por las características biológicas de la LAM al diagnóstico, el manejo de los pacientes afectados de LAM dependerá de:

a) Factores relacionados con el paciente: fundamentalmente la edad, asociada de manera independiente a peor pronóstico; comorbilidades clínicas específicas y estado general del paciente que modulan la tolerancia a la quimioterapia, así como presencia de alteraciones genéticas relacionadas con LAM de pacientes mayores que comportan mayor resistencia al tratamiento, (asociadas SMD/síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC) o exposición a citotóxicos previos).

b) Factores post-tratamiento: La monitorización de EMR, medida tanto por CMF como por técnicas moleculares, supone una herramienta de gran utilidad en el periodo post-remisión, ayudando a la toma de decisiones terapéuticas tanto pre como post-trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). La profundidad de la respuesta proporciona una valiosa información que debe ser realizada en laboratorios centralizados experimentados³⁹⁻⁴¹.

1.4. LAM DE BAJO RIESGO CON *NPM1*^{mut}

1.4.1. Características clínicas

La incidencia de mutaciones de *NPM1* oscila entre 25 y 50% de las LAM, siendo significativamente más frecuente en los pacientes con cariotipo normal, ascendiendo a un 46-67%⁴². Es por tanto el subtipo de LAM más frecuente. Las mutaciones de *NPM1* se asocian con los subtipos FAB M4 y M5 fundamentalmente, sin que se suelen observar en cambio en la LAM-M3. Suelen tener una cifra de leucocitos más alta, ser más frecuente en mujeres, asociarse a una cifra de plaquetas más elevada y una cifra mayor de blastos en médula ósea⁴³⁻⁴⁷. Presentan altas tasas de RC tras quimioterapia de inducción estándar, pero con SG de 40-50% debido a tasas de recaída de 30-40%⁴⁷⁻⁴⁹.

1.4.2. Características biológicas de *NPM1*^{wt} y *NPM1*^{mut}

El gen *NPM1* se localiza en el cromosoma 5, en el locus 5q35 y codifica una fosfoproteína nucleolar de 294 aminoácidos que actúa de lanzadera entre el núcleo y citoplasma y que en condiciones normales tiene una localización predominantemente nucleolar⁵⁰.

Las actividades biológicas de *NPM1* están relacionadas en gran medida con su estructura (**Figura 5**).

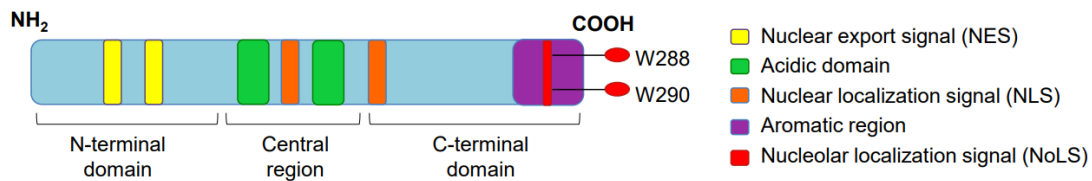


Figura 5. Estructura y dominios funcionales de NPM1. El dominio N-terminal contiene dos dominios de señales de exportación nuclear (NES). La región central contiene dos regiones ácidas que abarcan una señal de localización nuclear bipartita (NLS). La NLS también se localiza en el dominio C-terminal, junto con una región aromática en el extremo terminal, formando la señal de localización nucleolar (NoLS), con los residuos de triptófano (W) 288 y 290. (Heath. Leukemia. 2017)

Aunque NPM1 tiene dominios que permiten la localización citoplasmática, nucleoplasmática y nucleolar, ésta reside principalmente en el nucléolo⁵². La proteína puede ser exportada al citoplasma para realizar funciones bajo ciertas condiciones, mediadas por la unión de CRM1 a los dominios NES. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la importación nuclear predomina sobre la exportación, y el NPM1 es conducida al nucléolo para realizar sus funciones. Hasta la fecha, se han descrito cuatro funciones principales NPM1, que incluyen un papel en la biogénesis del ribosoma, el mantenimiento de la estabilidad genómica, la respuesta al estrés dependiente de p53 y la modulación de las vías de supresión mediante interacción con la proteína del marco de lectura alternativa (Arf)⁵³.

Las mutaciones en NPM1 están generalmente restringidas al exón 12. Hasta la fecha se han identificado >55 mutaciones únicas en el exón 12 de NPM1⁵⁴⁻⁵⁸. La mayoría de las mutaciones consisten en una inserción de 4 pares de bases, ocurriendo en >95% entre los nucleótidos 960 y 961, pero también ocurriendo dentro de 10 nucleótidos hacia arriba o hacia abajo. La mutación más común se llama Tipo A y constituye ~80% de los casos, involucrando la duplicación de TCTG (nucleótidos 956-959), creando una inserción en la posición 960. Las mutaciones tipo B y D son también bastante comunes, ambas produciendo 4 inserciones de pares de bases en la posición 960⁵⁹. Otras mutaciones son raras, ocurriendo en <1% de los casos. Se desconoce la frecuencia de otras mutaciones que ocurren fuera del exón 12, ya que la mayoría de los estudios restringen su análisis a este exón⁶⁰.

Sin importar el tipo de mutación, todas las variantes del exón 12 causan un desplazamiento del marceo de lectura en el C-terminal, resultando en un reemplazo de los últimos 7 aminoácidos, con 11 residuos diferentes. Esto afecta a uno o a ambos de los residuos clave de triptófano en el C-terminal, y da lugar a una secuencia distinta, creando un nuevo dominio NES. Las mutaciones en NPM1 dan lugar a una exportación nuclear funcionalmente más fuerte que la señal de importación, contrariamente al NPM1 wild-type (NPM1^{wt}); y, por consiguiente, a una localización citoplasmática de la proteína⁶¹.

La localización citoplasmática aberrante es una característica común de todas las mutaciones de NPM1, y es probable que sea crítico por su papel en la leucemogénesis. Sin embargo, los mecanismos exactos que conducen a ello, aún no han sido dilucidados. Dadas sus funciones pleiotrópicas, se propone que las mutaciones en NPM1 impulsen a la leucemia a través de una combinación de pérdida y ganancia de funciones y ganancia en diferentes procesos celulares (**Figura 6**)⁶².

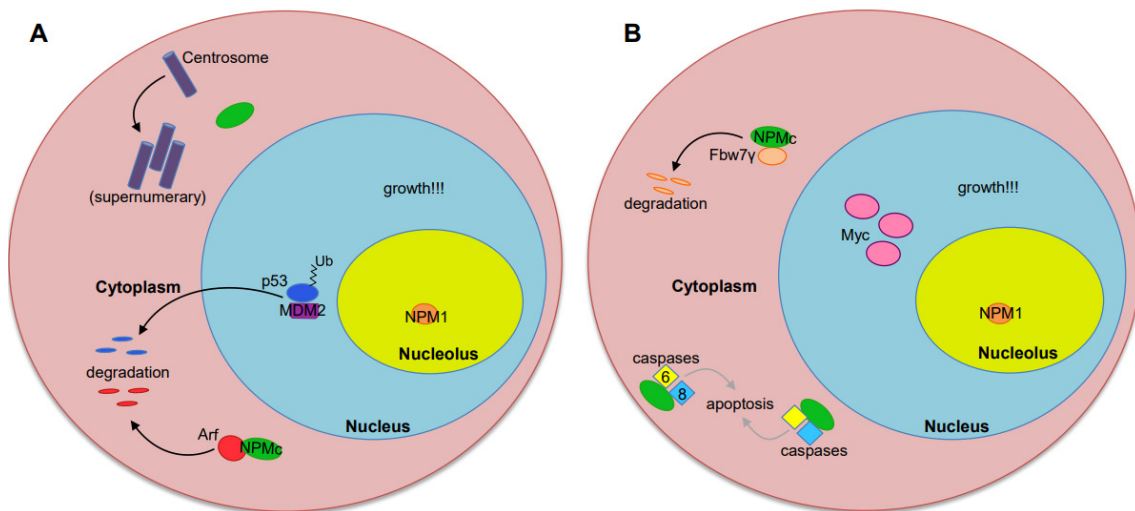


Figura 6: NPM1 y leucemogénesis. A. NPM1c interactúa con Arf y lo aísla para el citoplasma, reduciendo la estabilidad y causando una degradación; la ubiquitinación de p53 por MDM2 causa una degradación de p53, impidiendo la inhibición del crecimiento; la haploinsuficiencia de NPM1 conduce a centrosomas supernumerarios. B. NPM1c se une y deslocaliza a Fbw7γ al citoplasma, disminuyendo la estabilidad y causando una degradación; sin Fbw7γ, los niveles del oncogén Myc aumentan, promueven el crecimiento y la proliferación; NPM1 interactúa e inhibe la caspasa 6 / 8, promoviendo indirectamente el crecimiento (Heath. Leukemia. 2017).

1.4.3. Mutaciones acompañantes en LAM-NPM1^{mut}

Modelos murinos demuestran que la presencia de NPM1^{mut} provoca una proliferación mielóide pero no es suficiente para el desarrollo de LAM, siendo necesaria

la presencia de eventos oncogénicos cooperantes. Numerosos estudios han demostrado que *NPM1^{mut}* se produce simultáneamente con algunas mutaciones asociadas a la LAM, como *FLT3*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* y *NRAS*⁶³. Estas mutaciones parecen no acumularse en un orden aleatorio, sino que pueden ser atribuidas a eventos tempranos y tardíos en el proceso de transformación de una CMH normal o célula progenitora a la leucemia⁶⁴. La coexistencia de mutaciones en estos genes además de contribuir a la leucemogénesis, aportan información pronóstica relevante.

1.4.3.1. Mutaciones en FLT3

El gen *FLT3*, situado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12), codifica una proteína denominada FLT3 que pertenece a la familia de los receptores tirosín kinasa de clase 3, conocido también como stem cell kinasa 1 (STK1) o kinasa fetal hepática 2 (flk2)⁶⁵⁻⁶⁹. FLT3 se expresa fundamentalmente en las células hematopoyéticas progenitoras y media la diferenciación y proliferación de las mismas⁷⁰.

Entre las mutaciones más importantes en LAM, destacan por su frecuencia (20-27% de LAM-CN) e implicación pronóstica, las duplicaciones internas en tandem de FLT3 (*FLT3-ITD*), las cuales afectan a la región yuxtamenbrana (exones 14-15). La duplicación segmental del dominio yuxtamembrana de FLT3 promueve la autodimerización y la autofosforilación del receptor, que en consecuencia pasa a estar constitutivamente fosforilado activando a AKT^{71,72}. Uno de los efectos característicos de las *FLT3-ITD*, es que la proliferación de las células ITD transducidas está mediada por las rutas RAS y STAT5, algo que contrasta con el hecho de que la activación mediada por ligando de FLT3 normal no permite ni la activación de STAT5 ni su unión al ADN⁷³.

El otro tipo de alteraciones encontradas son las mutaciones puntuales en el dominio tirosín-quinasa de FLT3 (*FLT3-TKD*). Éstas suceden con una frecuencia en torno al 5-10% en los pacientes con LMA, y raramente coexisten con las *FLT3-ITD*⁷⁴. La mayoría de las *FLT3-TKD* tienen lugar en el exón 835 con una sustitución de ácido aspártico a tirosina (D835Y o asp835Tyr), sin embargo, además de ésta, se han descrito otras mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, tanto en este mismo codón como en los adyacentes^{71,74,76,77}. Las *FLT3-TKD* promueven una proliferación independiente de ligando a través de la autofosforilación y la activación constitutiva del receptor, al igual que las *FLT3-ITD*, aunque con ciertas diferencias biológicas significativas^{78,79} (**Figura 7**).

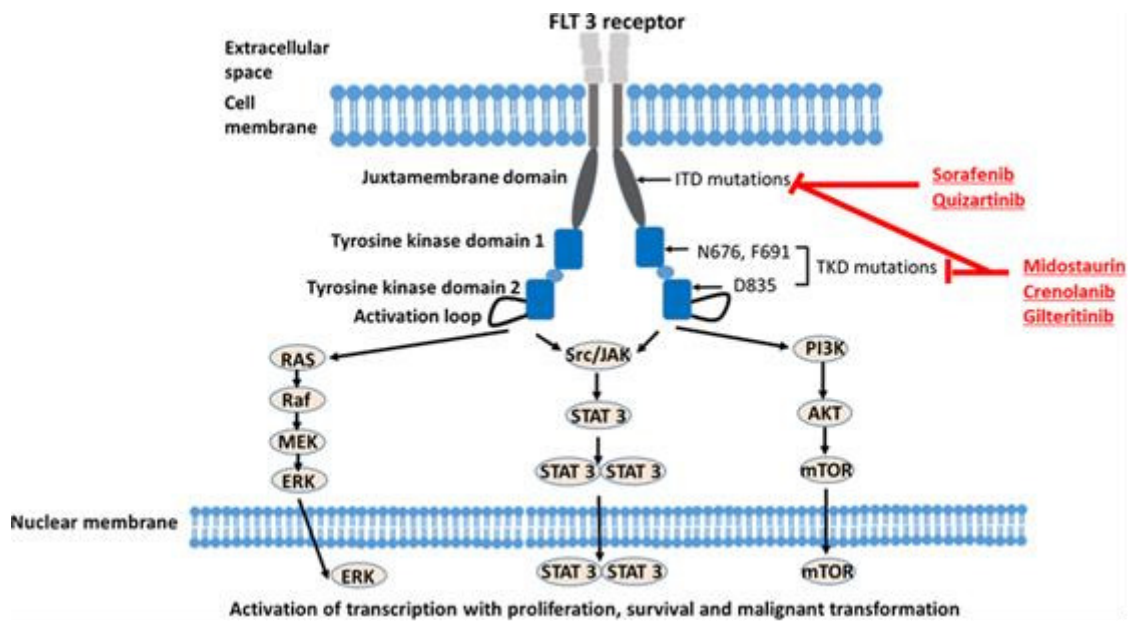


Figura 7. Vías de señalización de FLT3 y sus mutaciones con inhibidores en fase clínica (Lim SH, J tras Med 2017).

La mayoría de estudios otorgan un papel pronóstico adverso a la presencia de mutaciones de *FLT3-ITD*, con mayor riesgo de recaída y menor SG, mientras que las mutaciones *FLT3-D835* no aparecen acompañarse de un pronóstico adverso en los pacientes con LAM-CNI⁸⁰⁻⁸⁹. Las LAM-*NPM^{mut}* presentan *FLT3-ITD* hasta en un 40% de los casos, casi el doble que en el resto de LAM confiriendo pronóstico adverso⁸⁵. Biológicamente parece que *FLT3-ITD* aparece como un evento oncogénico posterior a la mutación *NPM1* afectando a subclones leucémicos. De esta forma la carga alélica de la mutación *FLT3-ITD* es importante ya que, diversos estudios que los pacientes con ratio alelo mutado/alelo WT elevado, presentan un pronóstico desfavorable en cuanto a SLE y SG^{80,90-92}, siendo este pronóstico particularmente desfavorable cuando no se detecta *FLT3^{wt}* (ratio>2). Así, en LAM-*NPM1^{MUT}* Pratcorona y cols⁸⁰. demostraron el impacto desfavorable de *FLT3-ITD* solamente cuando la ratio alélica era superior a 0.5 (Figura 8).

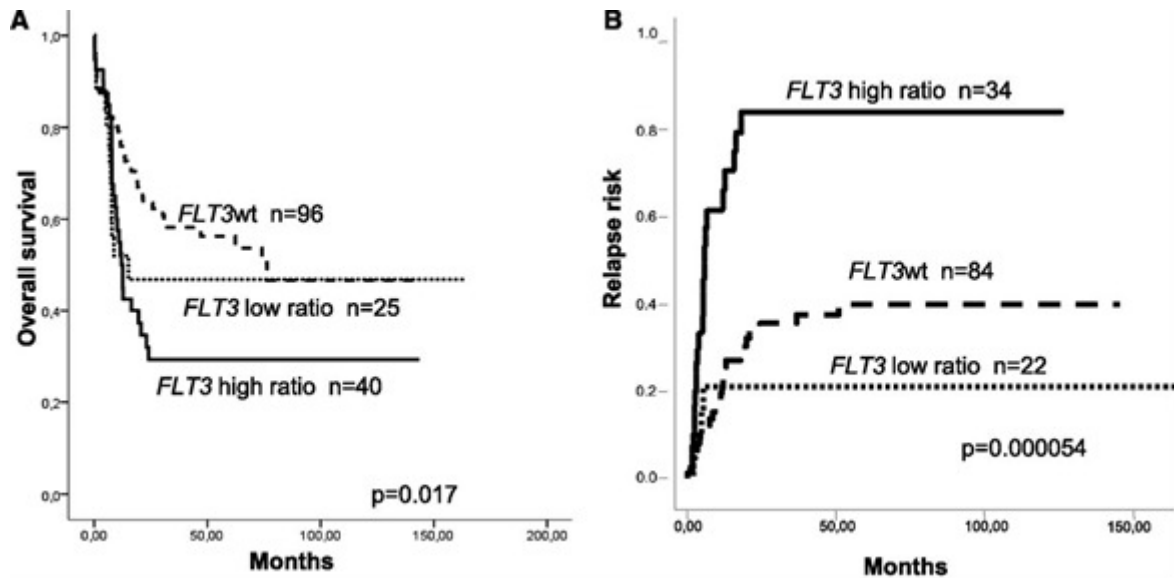


Figura 8: Impacto en la supervivencia global y riesgo de recaída de la raion alelica de FLT-ITD en pacientes con LAM-NPM1(Pratcorona y cols. Blood 2013).

1.4.3.2. Mutaciones en DNMT3A

El gen *DNMT3A* se localiza en el cromosoma 2 (2p23.3), está compuesto por 22 exones y codifica una proteína de 912 aminoácidos denominada ADN (citosina-5) metiltransferasa 3A. Tiene 3 dominios, dos para su unión a ADN y H3 y uno de actividad metiltransferasa que añade grupo metil a la posición C5 de citosina en las regiones CpG de los promotores creando una marca epigenética que regula numerosos procesos incluidos embriogénesis y hematopoyesis normal. (**Figura 9**)^{93,94}.

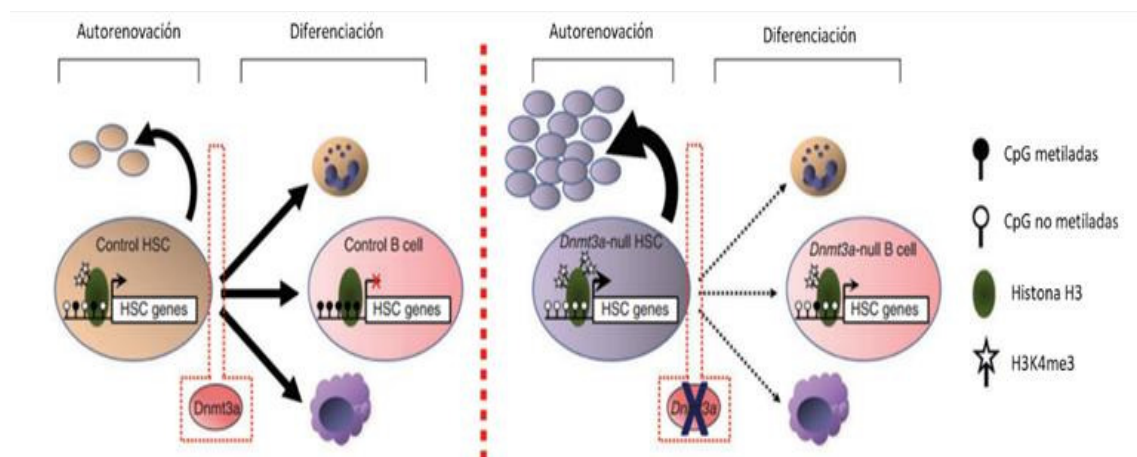


Figura 9: Modelo para la acción DNMT3A en CMHs. Los genes específicos de CMH son en su mayoría no metilados y se expresan en CMHs normales (izquierda). Al recibir una señal para diferenciarse, DNMT3A metila y silencia estas regiones para permitir el compromiso de linaje. Esto se asocia con una pérdida de H3K4me3 y el gen represión en las celdas B. DNMT3A-null CMH (derecha) no puede silenciar los genes CMH, por lo que, al recibir un estímulo para diferenciarse, los genes específicos de CMH permanecen expresados debido a una falta de metilación y H3K4me3 elevado. Al dividirse las células, la vía de auto-renovación de CMH permanece activa en las CMH-DNMT3A-null, resultando en su acumulación en la médula ósea. De los pocos CMH-DNMT3A-null que se diferencian, su progenie muestra metilación incompleta y represión parcial de los genes. (Challen GA, Nat Genet. 201).

Las mutaciones en *DNMT3A* ocurren en alrededor del 14-18% de todos los pacientes con LAM, ascendiendo a un 20-35% en las de cariotipo normal y hasta un 50% de LAM-*NPM1*^{mut}. Las mutaciones más recurrentes se dan en el exón 22, concretamente en la arginina en posición 882 (R882), siendo sustituida en el 70-80% de los casos por una histidina (R882H) y en el resto por una citosina (R882C)⁹⁵⁻⁹⁸. Estas mutaciones sin sentido “*missense*” en heterocigosis actúan con efecto dominante negativo sobre la enzima no mutada *WT* provocando una reducción significativa de la actividad metiltransferasa e hipometilación global del genoma.

Los mecanismos por los cuales *DNMT3A* mutada contribuye a la leucemogénesis no son completamente conocidos. Koya y cols⁹⁹. demostraron, en un experimento murino, que los receptores de células con *DNMT3A*^{mut} presentaban una acumulación aberrante de CMH con desregulación de los genes asociados a la diferenciación, aunque sin cambios en el estado de metilación de las islas CpG asociadas a sus promotores. La enzima *DNMT3A*^{mut} interactúa con el complejo represivo policomb 1 (PRC1), causando silenciamiento transcripcional, independiente de metilación.

La evidencia acumulada hasta la fecha, señala a *DNMT3A*^{mut} como un elemento fundador, que surge en la célula madre hematopoyética incluso antes de que la LAM se desarrolle. La aparición de otras mutaciones asociadas llevaría a la aparición de leucemia^{95,100-102}. Hasta en un 40% de los pacientes con LAM con *DNMT3A*^{mut}, se observó que, aunque las células de la leucemia desaparecían de la médula ósea después de una quimioterapia intensiva, persistía la mutación en *DNMT3A*. Esto sugería que la mutación en *DNMT3A* podría ya estar presente en la CMH. Esta célula se denominó "célula madre premaligna" y contribuiría a la hematopoyesis más que otras células madre (es decir, se ha expandido clonalmente), sin inducir leucemia. Tres estudios recientemente publicados han demostrado la presencia de CMH clonales con mutaciones en genes reguladores epigenéticos pueden estar presentes incluso en individuos normales¹⁰³⁻¹⁰⁵. Se detectaron que los genes mutados con mayor frecuencia son los que también mutan con mayor frecuencia en pacientes con LAM y SMD: *TET2*, *ASXL1* y *DNMT3A*, siendo estas últimas las más frecuentes (26% a 58%). Con todo ello se definió una nueva entidad de enfermedad que se asocia con un mayor riesgo de neoplasias hematológicas y un aumento de la mortalidad., denominada "hematopoyesis clonal de potencial indeterminado" (CHIP) (**Figura 10**)¹⁰⁶.

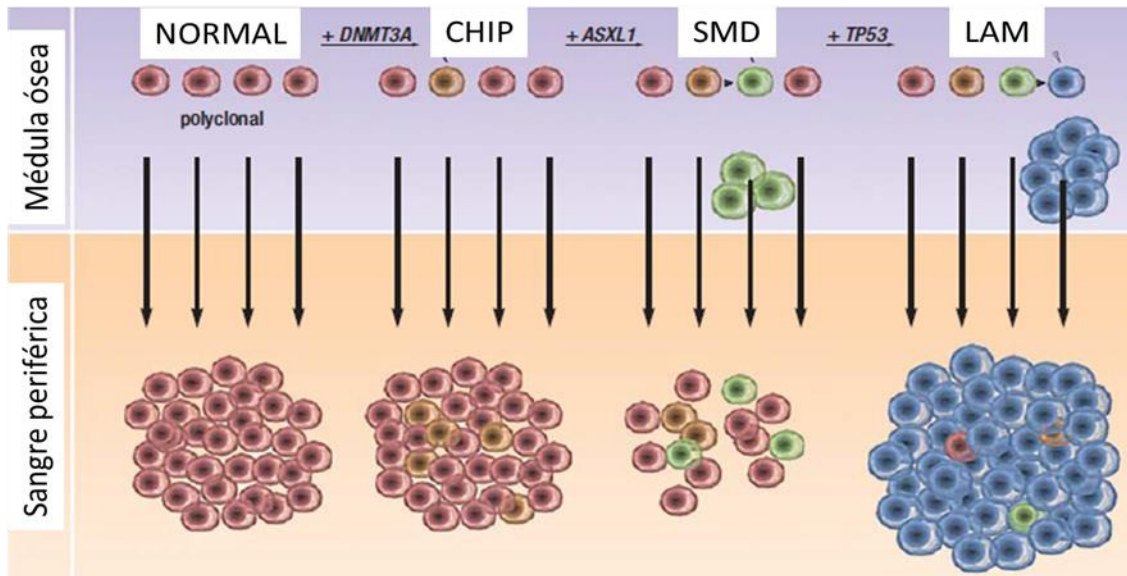


Figura 10: Desarrollo gradual de la hematopoyesis policlonal (normal, sin evidencia de mutaciones somáticas) a la hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP), SMD, LAM, ICUS, citopenia idiopática de importancia indeterminada. Los genes mutados (DNMT3A, ASXL1, TP53) se muestran como ejemplos; otros genes pueden verse afectados, y en un orden diferente (Modificado de Heuser. Dtsch Arztebl Int. 2016).

El impacto pronóstico de la presencia de $DNMT3A^{mut}$ en LAM- $NPM1$ es aún controvertido, con algunos estudios que demuestran un impacto desfavorable (**Figura 11**)¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ y otros estudios en los que $DNMT3A^{mut}$ no modifica el pronóstico en pacientes de riesgo favorable¹⁰⁰.

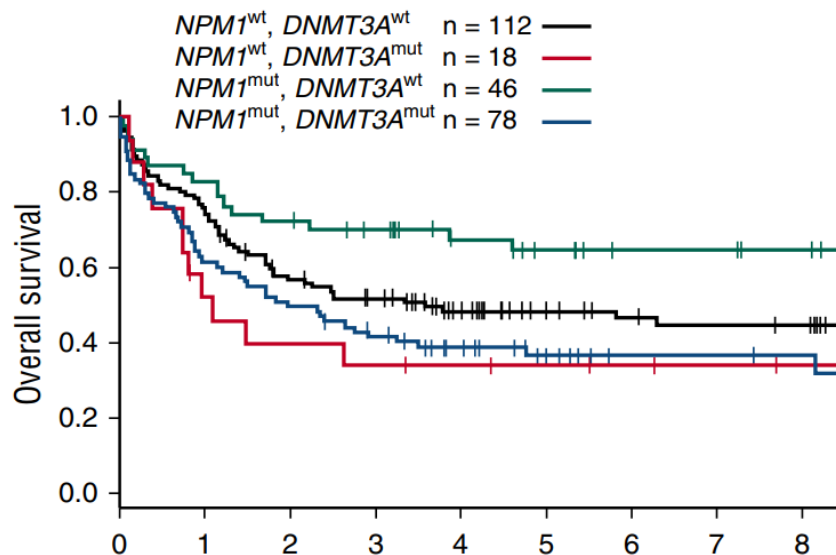


Figura 11: Supervivencia de los pacientes con citogenética de riesgo intermedio según el estado mutacional de $NPM1/DNMT3A$. (Metzeler KH, Blood. 2016).

1.4.3.3. Mutaciones en IDH

Las proteínas IDH son enzimas homodiméricas implicadas en diversos procesos celulares, incluyendo la adaptación a la hipoxia, la desmetilación de las histonas y la modificación del ADN. Ambas participan en el metabolismo de los carbohidratos, catalizando la descarboxilación oxidativa del isocitrato a alfa cetoglutarato (2HG), generando la reducción de los agentes NADPH o NADH, necesarios para diferentes procesos biológicos. La enzima IDH1 está localizada en el citoplasma o en el peroxisoma y cataliza las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato utilizando exclusivamente NADP⁺ como aceptor de electrones^{116,117}. El gen que codifica para esta enzima se encuentra situado en el cromosoma 2 (2q33.3) dando lugar a una proteína de 414 aminoácidos. Su variante mitocondrial es la enzima IDH2, componente crítico del ciclo de Krebs, catalizando las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato a α -cetoglutarato utilizando también exclusivamente NADP⁺ como aceptor de electrones. Esta proteína de 452 aminoácidos está codificada por el gen *IDH2* localizado en el cromosoma 15 (15q26.1). Las enzimas mutantes IDH tienen actividad neomórfica y catalizan la reducción del α -cetoglutarato al enantiómero 2-hidroxiglutarato, que se asocia con el ADN y la hipermetilación de histona, la expresión génica alterada y el bloqueo de la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas (**Figura 12**)^{34,118,119}.

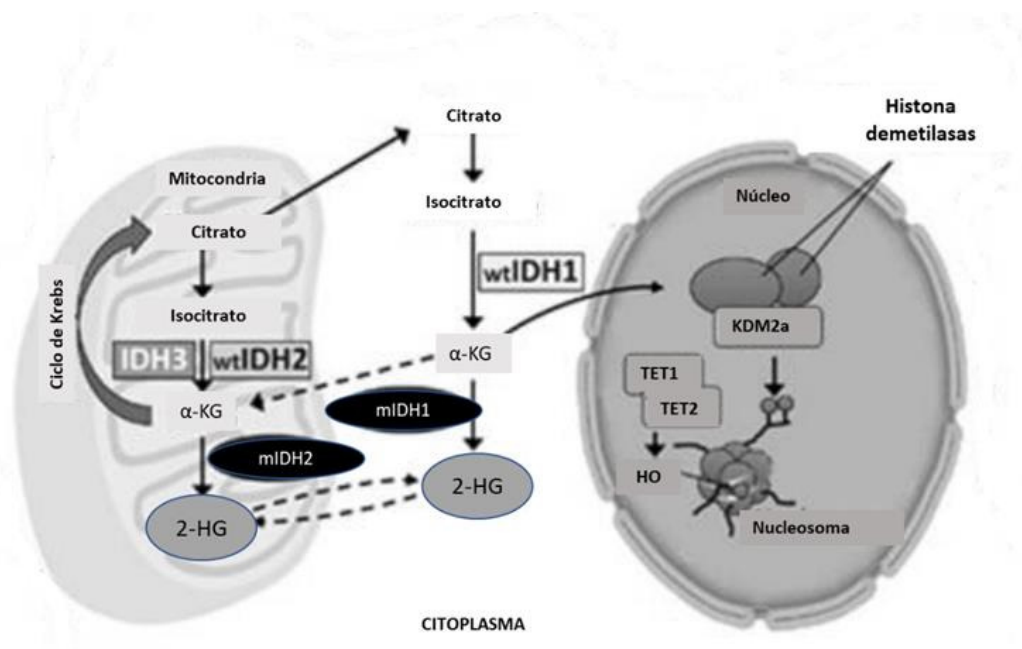


Figura 12: Las enzimas mutantes IDH1 e IDH2 resultan en un aumento del oncometabolito, 2-hidroxiglutarato, el cual, induce un bloqueo de diferenciación celular al inhibir la actividad de la histona que modifica la cromatina y de las demetilinas del ADN. La inhibición de estos reguladores epigenéticos conduce a una "firma de la hipermetilación" que altera la expresión del gen de tal manera que las células pierden la capacidad de progresar de progenitores inmaduros a un estado totalmente diferenciado (Modificado de Madeiros. Leukemia. 2017).

Las mutaciones en *IDH1* e *IDH2* se encuentran entre las mutaciones más comunes en la LAM (aproximadamente un 20% de los pacientes y 15% de LAM-*NPM1^{mut}*), objetivándose un aumento de la frecuencia en pacientes de mayor edad. Ambas mutaciones suelen asociarse con un aumento de las plaquetas en sangre periférica y de los blastos en médula ósea al diagnóstico. En las mutaciones en *IDH2*, la arginina es reemplazada con mayor frecuencia por glutamina en el residuo 140 (R140Q) y por lisina en el residuo 172 (R172K), siendo menos frecuente las sustituciones por otros aminoácidos (p. ej., *IDH2-R172W*)^{120,121}. Las mutaciones en *IDH1* son menos frecuentes que en *IDH2* y rara vez se encuentran simultáneamente en el mismo paciente. En *IDH1*, las mutaciones con mayor frecuencia involucran una sustitución de la arginina por cisteína (R132C) o histidina (R132H) en la posición 132^{120,123,124}. Estudios recientes, parecen indicar que las mutaciones en *IDH* podrían ser considerados eventos pre-leucémicos, que conservarían aún la capacidad de diferenciarse, sobrevivirían a la quimioterapia, proliferarían durante la remisión, y podrían llevar al paciente a la recaída^{120,122,123}.

En impacto pronóstico de las mutaciones de IDH en *LAM-NPM1* es también controvertido. Patel y cols⁶³, estudiaron la relevancia para determinar pronóstica de las mutaciones somáticas más frecuentes en 398 pacientes jóvenes (<60 años) con LAM, mostrando un efecto favorable de *NPM1^{mut}* concurrente con *IDH1^{mut}* o *IDH2^{mut}*. Por el contrario, Paschka y cols¹²⁴ encontraron que el subgrupo de pacientes con LAM-CN con un genotipo *IDH^{mut} /NPM1^{mut}/FLT3-ITD^{wt}*, presentaban una SG significativamente peor que los pacientes con LAM-CN-*IDH^{mut}*. Generalmente, es mucho más probable que *IDH2-R140* esté acompañado por *NPM1^{mut}* u otra mutación recurrente que *IDH2-R172*.

1.4.4. Características fenotípicas de LAM-*NPM1^{mut}*

Los blastos leucémicos de las LAM-*NPM1^{mut}* presentan con frecuencia un inmunofenotipo caracterizado por la ausencia de CD34, y una expresión intensa de CD33, CD123, HLA-Dr y CD15¹²⁵. Asimismo, pueden presentar expresión aberrante de CD7 o CD56 en 11-30% de los casos¹²⁶ (**Figura 13**).

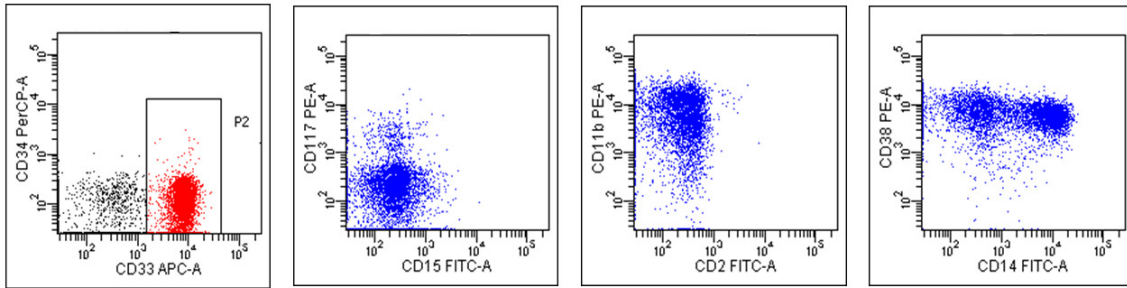


Figura 13: Inmunofenotipo al diagnóstico de LAM-NPM1 con positividad para CD33, CD11b y CD14 y negatividad para CD117, CD15 y CD34.

La ausencia de expresión de CD34 está fuertemente asociada a *LAM-NPM1^{mut}*, ya que se encuentra en un 92.5% de los casos en comparación con un 28.4% en las LAM con *NPM1^{WT54}*. Esta característica puede reflejar el origen de este tipo de LAM a partir de las pocas CMH de la médula ósea con marcador de linaje negativo, CD34 negativo y CD38 negativo. Alternativamente, CD34 podría estar down-regulado como resultado de la transformación leucémica. Asimismo, la falta de expresión de CD34 en *NPM1^{mut}* podría ser un indicador de una buena respuesta a la inducción quimioterapia. Sin embargo, Juncà y cols¹²⁷, demostraron que, aunque la positividad CD34 ha sido considerada como un factor pronóstico adverso en la LAM y que suele ser negativo en la *LAM-NPM1^{mut}*, este marcador puede expresarse en el momento del diagnóstico o adquirirse en una recaída en un número variable de casos, y que su expresión no es un factor de pronóstico desfavorable en el LAM, ni en el momento del diagnóstico ni en la recaída. No obstante, otros trabajos Zhu y cols¹²⁸, indican que la expresión de CD34 podría suponer un pronóstico más desfavorable en *LAM-NPM1*.

Ehninger y cols¹²⁹, analizaron en una cohorte de 319 pacientes con LAM, la expresión de CD33 y CD123 y detectaron que los pacientes con *LAM-NPM1^{mut}*, independientemente del estado de *FLT3-ITD*, tenían niveles significativamente más altos de CD33 que los pacientes con *NPM1^{wt}*. De manera similar, los niveles de CD123 fueron significativamente más altos en los pacientes con *LAM-NPM1^{mut}* que los pacientes *NPM1^{wt}*. De Propis¹³⁰, investigó la relación entre la expresión cualitativa y cuantitativa de CD33 y la presencia de mutaciones en *NPM1* y *FLT3* en pacientes con LAM. Determinó que los niveles de expresión de CD33 en la superficie de células LAM pueden tener implicaciones clínicas y que una mayor intensidad de expresión del antígeno podría implicar una mayor unión de los anticuerpos terapéuticos y, en consecuencia, una mejor respuesta a la administración de quimioterapia conjugada con anticuerpos. De hecho, las células que muestran una mayor intensidad de CD33 tienen

una mayor probabilidad de capturar e interiorizar los agentes antileucémicos, observado ya en pacientes con LAP. Sin embargo, la pérdida de expresión de los antígenos en las células leucémicas a lo largo de la enfermedad, podría interferir con el tratamiento con estos agentes terapéuticos.

1.5. LAM DE BAJO RIESGO CBF: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS

1.5.1. Características clínicas

Las LAM que afectan a los genes encargados de la codificación de los dos heterodímeros del CBF, son la $t(8;21)(q22;q22)$ e $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13q22)$ y resultan en la generación de los genes de fusión anormales correspondientes *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH112*, respectivamente¹³¹. La LAM $t(8;21)$ se clasifican mayoritariamente en subtipos FAB M1-M2 y la $inv(16)$ en M4-Eo y suponen aproximadamente un 15-20% de todas las LAM. Los pacientes con LAM-CBF muestran mejor pronóstico comparado con otros grupos citogenéticos alcanzando RC 85-90% de los pacientes¹³². Sin embargo, la SG global a 5 años es aproximadamente del 50% debido a una tasa de recaída de ~40%¹³³.

1.5.2. Características biológicas

RUNX1 y CBF β forman un complejo de factores de transcripción heterodiméricos CBF que regula la ontogenia hematopoyética normal. El factor básico de unión está compuesto por una subunidad alfa y una subunidad beta. La subunidad alfa se une a una secuencia consensuada de ADN TGT/cGGT y la subunidad beta estabiliza la interacción entre la subunidad alfa y el ADN. La asociación de CBF β induce un aumento de 40 veces en la afinidad de unión del ADN de RUNX. Por lo tanto, ambas subunidades son necesarias para lograr la máxima eficacia transcripcional de los genes diana posteriores, como la proteína tirosina quinasa específica de los linfocitos, el receptor del factor 1 estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, la interleukina 3 y la mieloperoxidasa (**Figura 14A**)¹³⁴.

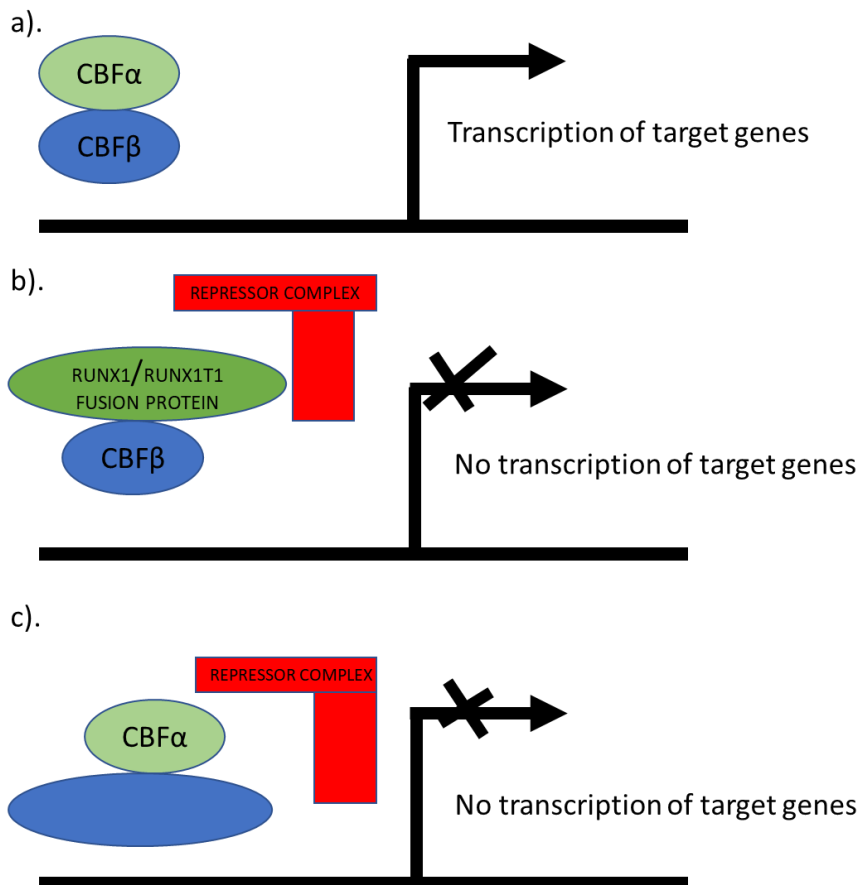


Figura 14: Esquema del modelo de leucemogénesis en LAM-CBF. A: Subunidades normales alfa y beta complejo CBF que permiten transcripción génica. En RUNX-RUNX1T1 y CBFβ-MYH11 el heterodimero formado con la subunidad mutada provoca silenciamiento transcripcional. (Solh M, AM J Hematol 2012)

El gen de fusión *CBFB-MYH11* se identificó inicialmente en 1993 y la proteína de fusión correspondiente CBFβ-SMMHC (cadena pesada de miosina del músculo liso) se identificó en 1996. CBFβ-SMMHC forma grandes agregados nucleares, captura la subunidad alfa RUNX1 en el citoplasma y detiene la diferenciación celular (**Figura 14C**). La t(8;21) fue descrita por primera vez en 1973 y el gen de fusión RUNX1-RUNX1T1 fue identificado en 1992. El producto de la proteína de fusión de t(8;21) está compuesto por el dominio de homología RUNT de unión del ADN de RUNX1 y la mayoría de los RUNX1T1 excepto los primeros 30 aminoácidos en el N-terminal. La ausencia del dominio de transactivación C-terminal en la proteína de fusión RUNX1-RUNX1T1 interrumpe la hematopoyesis normal de forma dominante-negativa¹³⁵.

1.5.3. Mutaciones acompañantes en LAM-CBF

Los modelos murinos de knock-in, han demostrado que ambos genes de fusión CBF son necesarios, pero no suficientes para causar una leucemia y que se requieren mutaciones adicionales. Así, en los modelos preclínicos de ratones, la inducción

mutagénica de segundas mutaciones daba lugar al desarrollo de la LAM. En los pacientes con LAM-CBF, las mutaciones que se detectan con más frecuencia son, *NRAS/KRAS* (19-40%), *C-KIT* (15-35%) y *FLT3-TKD*^{88,136}.

1.5.3.1. NRAS/KRAS

NRAS y *KRAS* pertenecen a la familia de oncogenes RAS. Las proteínas producidas por estos genes juegan un papel importante en la división y diferenciación celular, así como en la apoptosis. Ambas proteínas son proteínas G monoméricas, con actividad GTP hidrolasa. Esta se puede encontrar activa cuando está unida a GTP y la inactiva cuando está unida a GDP. Participan en la señalización de las vías PI3K/PTEN/AKT y RAF/MEK/ERK.

El gen que sintetiza *NRAS* se localiza en el cromosoma 1 (1p13.2), mientras que el de *KRAS* se localiza en el cromosoma 12 (12p12.1). El 90% de las mutaciones suele presentarse en los exones 12 y 13 y suelen ser mutaciones puntuales¹³⁷. Conducen a un aumento de la actividad de RAS que resulta en un aumento de la proliferación y disminución de la apoptosis (**Figura 15**).

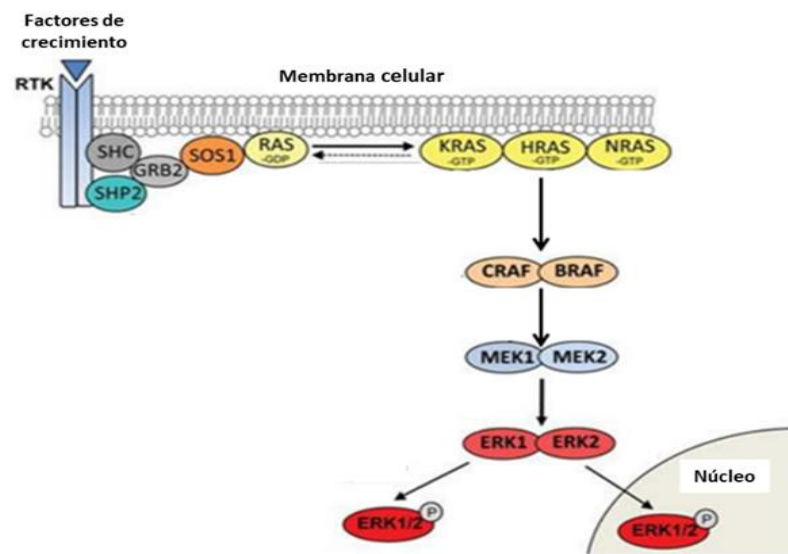


Figura 15: Los genes *RAS* desempeñan un papel importante en la vía de señalización dependiente de la proteína cinasa de activación mitogénica (MAPK), una ruta metabólica encargada de regular la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular o apoptosis. (N. Rodón. Biopat).

Las mutaciones de *NRAS* parecen ser de las más prominentes en pacientes con LAM y se han reportado en alrededor de un 11% a 30% de los casos de LAM, de ellas hasta en un 20% y 40% se presentan en LAM-CBF con t(8;21) e inv(16%),

respectivamente. Aunque en las mutaciones en *K/NRAS* fueron descritas en LAM hace años, el impacto pronóstico de estas mutaciones sigue siendo controvertido^{138,139}.

Algún estudio las asocia con peor supervivencia¹⁴⁰, mientras que otros autores encuentran sólo un impacto pronóstico negativo en casos de LAM con cariotipo favorable⁴⁵. En cambio, Neubauer y cols¹⁴¹, describen asociación con pronóstico favorable, mientras que otros trabajos no muestran ningún tipo de impacto en la evolución de la LAM.

1.5.3.2. Mutaciones en C-KIT

C-KIT (CD117) es un receptor de tirosina cinasa de la subfamilia clase III. Generalmente, C-KIT en interacción con el ligando, juega un papel importante en la supervivencia, proliferación, diferenciación y activación funcional de las células progenitoras hematopoyéticas. La expresión C-KIT se produce en los mieloblastos y está presente en el 60-80% de los pacientes con LAM¹⁴².

Las mutaciones en *C-KIT* suelen asociarse a las LAM-CBF, encontrándose en un 13-46%. Estas mutaciones ocurren principalmente en el exón 8 o 17 y se observan en el 20-25% de los casos de t(8;21) y 30% de los casos de inv(16). La mayoría de trabajos han confirmado la mutación en *C-KIT* a un pronóstico desfavorable, con una menor supervivencia. Así, en pacientes con LAM-CBF, la presencia de *C-KIT* supone una mayor tasa de recaídas (hasta 80%) tras alcanzar similares tasas de RC¹⁴³.

1.5.4. Características inmunofenotípicas de LAM-CBF

Adriaansen y cols¹⁴⁴, fue uno de los primeros que describió el inmunofenotipo de LAM-inv(16) (p13q22), analizando las muestras de 8 pacientes. Así, describió varias poblaciones celulares heterogéneas; principalmente debido a la presencia de múltiples subpoblaciones, que variaban en tamaño entre los pacientes. Sin embargo, el inmunofenotipo de estas subpoblaciones fue comparable, independientemente de su tamaño relativo, expresando prácticamente todos los blastos leucémicos CD13, CD2, CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD34, CD36, CDw65, CD2 y HLA-DR. A su vez, Nucifora y cols¹⁴⁵, relacionaron la expresión aberrante de CD56 y CD19 con LAM-(8;21) (**Figura 16**).

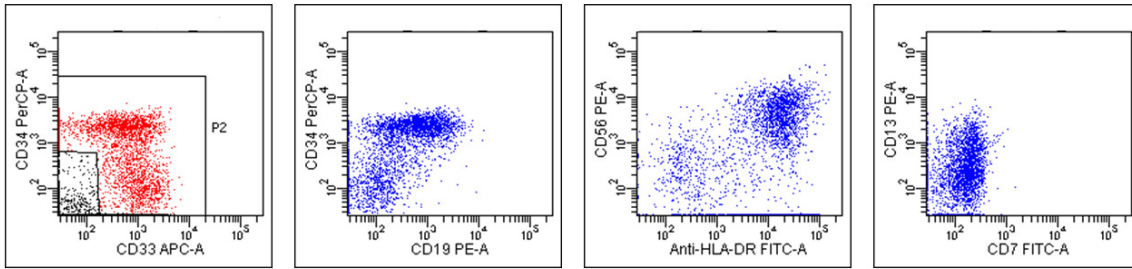


Figura 16: Inmunofenotipo al diagnóstico de LAM- RUNX-RUNXT con positividad para CD34, CD33 doble población, expresión aberrante de CD56 y CD19 con CD13low.

Estudios posteriores han definido que el inmunofenotipo frecuente de los blastos de la LAM con $t(8;21)/RUNX1-RUNX1-T1$ se corresponde con la expresión de CD34, CD117, CD13, CD33, CD19 y CD56, mientras que la LAM con $inv(16)/CBFB-MYH11$ expresan generalmente antígenos de línea mielomonocítica (con un subconjunto de blastos que expresan un inmunofenotipo mielóide típico y otro subconjunto de blastos que expresaban un inmunofenotipo monocítico)¹⁴⁶.

1.6. LAM DE BAJO RIESGO CEBPA: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS

El gen *CEBPA* se encuentra localizado en la banda del cromosoma 19q13.1 y pertenece a la familia de las proteínas CCAAT/enhancer-binding, que participan en el equilibrio entre la proliferación celular y la diferenciación terminal¹⁴⁷. La proteína CEBPA 42-kDa tiene cuatro dominios principales: la parte C-terminal que contiene un dominio de la cremallera (bZIP) leucina que media la homo- o heterodimerización; el dominio de unión al ADN (DBD), un dominio básico cargado positivamente capaz de interactuar con secuencias específicas de ADN; y dos dominios reguladores y transactivadores TAD1 y TAD2¹⁴⁸ (**Figura 17**).

En la hematopoyesis, el gen *CEBPA* juega un papel fundamental en las primeras etapas de la diferenciación mielóide y se expresa particularmente en las células mielomonocíticas. *CEBPA* tiene múltiples acciones como la disminución de la expresión de *C-MYC* que permite la diferenciación, la regulación directa de la expresión de genes específicos del linaje granulocítico y la acción sinérgica con otros genes clave en el desarrollo mielóide, incluyendo genes complejos de CBF y PU.1¹⁴⁸.

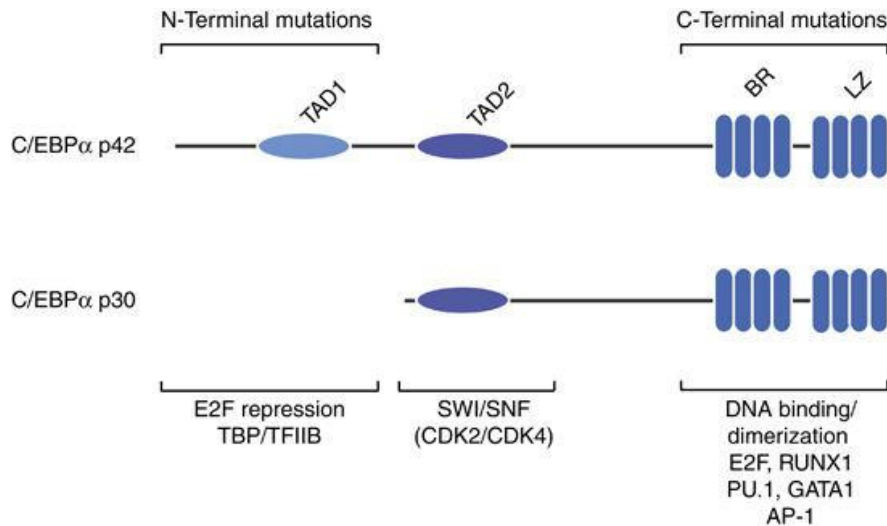


Figura 17 Dominios funcionales de CEBPA p30 y p42 (Ohlsson E, Leukemia 2016)

Las mutaciones en *CEBPA* se encuentran en aproximadamente el 5-10% de los casos de LAM. La mayoría de las mutaciones en *CEBPA* son dos, que frecuentemente involucran una combinación de una mutación en N-terminal y otra en C-terminal, típicamente en diferentes alelos. Datos recientes han demostrado que los casos de *CEBPA^{dm}* en lugar de mutaciones únicas, están asociados con una firma de expresión génica común y con un pronóstico relativamente favorable¹⁴⁹. Basándose en estas observaciones, la LAM-*CEBPA^{dm}* ha sido reconocida como una entidad propia en la clasificación revisada de la OMS³⁸. Se han reportado síndromes de predisposición genética familiar LAM-*CEBPA*. La asociación de *CEBPA^{dm}* con mutaciones en *GATA2* confirió mejor SG mientras que con mutaciones en *TET2* supone peor SG¹⁵⁰.

1.6.1. Características inmufenotípicas de LAM-*CEBPA^{dm}*

La LAM con mutación en *CEBPA* no ha sido asociada con un inmunofenotipo específico. Más bien, se ha descrito que muestra positividad para antígenos comúnmente expresados en los blastos mieloides como CD15, CD7, CD34 y HLA-DR. Sin embargo, este perfil fenotípico no fue capaz de detectar eficazmente los casos con mutación por *CEBPA*, no detectándose en alrededor del 25% de ellos. Mannelli y cols¹⁵¹, desarrollaron un método de cribado basado en el inmunofenotipo, y a través de un extenso análisis fenotípico en una cohorte de 251 casos de LAM, encontraron que varias aberraciones fenotípicas ocurrían recurrentemente en la población blástica en el subconjunto de casos de *CEBPA^{dm}*. Los blastos mostraron características de asincronía de maduración con expresión de CD34 y CD117 concomitantes con CD15, CD65 y MPO de alta intensidad, además, hubo una expresión de CD7. Este hallazgo es consistente

con publicaciones anteriores, que correlacionaban la expresión de CD7 en la LAM con la pérdida de *CEBPA*^{wt} debido a mutaciones o silenciamiento por mecanismos epigenéticos^{152,153}. Además, se objetivo que los neutrófilos y monocitos presentaban una sobreexpresión de CD64 y que la serie eritroide se amplió cuantitativamente en los casos *CEBPA*^{dm} en comparación con los casos *CEBPA*^{wt} y *CEBPA*sm, especialmente en sus etapas más inmaduras. De hecho, la falta de función normal de CEBPA se ha asociado con un desequilibrio del programa transcripcional de las células hematopoyéticas. Las consecuencias funcionales de la alteración del *CEBPA* provocarían un bloqueo de la diferenciación granulocítica y una reorientación preferencial hacia el linaje eritroide. Los hallazgos de este trabajo serían una prueba de la correlación entre las anomalías fenotípicas y el estado *CEBPA*^{dm}, lo que indica la participación de varios linajes y, por lo tanto, el origen clonal común de los diferentes linajes. Además, estos datos explicarían la homogeneidad fenotípica observada, debido a las vías de maduración dependientes de la mutación del *CEBPA*.

1.7. OTRAS MUTACIONES DE PRONÓSTICO ADVERSO: TP53

El gen *TP53* se encuentra en el cromosoma 17 (p13.1), se extiende a lo largo de 20 kb de ADN genómico y contiene 11 exones. Codifica una proteína, denominada proteína tumoral p53, formada por 393 aminoácidos que se agrupan en tres dominios diferenciados: 1) el dominio aminoterminal transactivador, y que interacciona con la RNA polimerasa aumentando la transcripción; 2) el dominio de unión al ADN, en la región central, resistente a la acción de enzimas proteolíticas que permite la función de p53 como factor de transcripción; 3) el dominio carboxiterminal que dota a p53 de las funciones como señal de localización nucleolar, oligomerización y como diana de fosforilación para una quinasa dependiente de ciclina, interviniendo también en la apoptosis, en la regulación de la transcripción y en el reconocimiento del daño de la doble cadena de ADN¹⁵⁴.

La activación del gen *TP53* se produce por daño celular y por algunos oncogenes, y produce un incremento de las formas activas de la proteína con capacidad de unión al ADN y con capacidad de funcionar como factor de transcripción. Una vez activada la proteína p53 se une a las zonas promotoras de muchos genes, impidiendo la progresión del ciclo celular en G1 y en G2, permitiendo que las enzimas de reparación de ADN corrijan los defectos inducidos y en el caso de que éstos sean irreparables, la célula sea desviada hacia la apoptosis. Por todo ello, se ha denominado a p53 como el

guardián del genoma, puesto que interviene una vez activada, en el mantenimiento de su integridad (**Figura 18**)¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

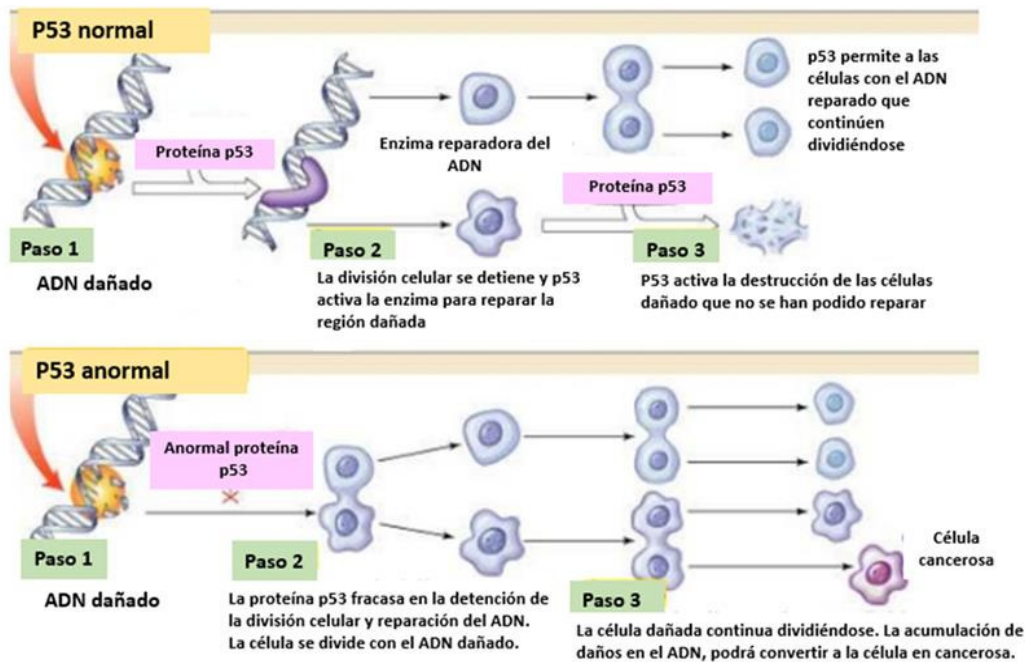


Figura 18: TP53 es considerado el “Guardián del Genoma”. Las mutaciones en TP53 dará lugar a que la célula dañada escape y continúe dividiéndose, dando lugar a la célula cancerosa. (Modificado de Kamp, *Curr Opin Genet Dev.* 2016).

Hasta el momento se han identificado un gran número de mutaciones diferentes en *TP53*, dando lugar a una proteína alterada. Aproximadamente el 95% de las mutaciones descritas se localizan en el dominio de unión al ADN, perdiendo los mutantes su afinidad por el mismo. Las consecuencias funcionales de las mutaciones de *TP53* son variadas y dependen no sólo de la región o dominio afectado sino también del tipo de mutación. Se han encontrado mutaciones en *TP53* en líneas celulares generadas a partir de casos con LAM, lo que sugiere que estas lesiones pueden contribuir a la inmortalización celular. La mayoría de las mutaciones corresponden a mutaciones puntuales que originan un cambio en el aminoácido que codifican, aunque también se han descrito mutaciones que desplazan la pauta de lectura¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

Actualmente, en pacientes con LAM de novo, la frecuencia de mutaciones en TP53 es menor del 10%, asociándose con cariotipos complejos/aneuploides y monosómicos y corroborándose su asociación con una mayor resistencia a la quimioterapia y con una supervivencia más corta. Los pacientes que presentaban cualquier alteración en *TP53* se caracterizaban por presentar mayor edad, un mayor grado de complejidad genómica y frecuentemente presentan leucemias secundarias a otras neoplasias, tanto hematológicas como no hematológicas¹⁶²⁻¹⁶⁴.

1.8. EVOLUCION CLONAL GENÉTICA

Como se ha comentado con anterioridad, un alto porcentaje (85-90%) de pacientes afectos de LAM de bajo riesgo (*NPM1^{mut}*, *LAM-CBF* y *CEBPA^{dm}*) alcanzan RC con 1-2 ciclos de quimioterapia de inducción. Sin embargo, la SG a 5 años se sitúa en torno al 35-50% siendo la causa fundamental de muerte, la recidiva de LAM que con frecuencia muestra refractariedad o peor respuesta al tratamiento. Todo ello indica que el clon leucémico puede resistir a la quimioterapia y que las células leucémicas a la recaída han evolucionado biológicamente con respecto al diagnóstico.

Estudios pioneros analizaron los hallazgos de cariotipo convencional comparando diagnóstico y recaída en LAM y demostraron que ~65% presentaban cambios citogenéticos en la recaída estableciendo el concepto de evolución clonal citogenética^{165,166}. Sin embargo, ha sido en los últimos años, gracias al desarrollo de las plataformas de secuenciación masiva, cuando se ha producido un notable avance en el conocimiento del papel de las mutaciones en el desarrollo de la LAM y su cinética de evolución clonal en las recidivas

1.8.1. Mutaciones en el desarrollo de LAM

La evidencia reciente sugiere que, en la LAM, la mutación inicial a menudo se origina en la CMH y crea una célula madre pre-leucémica. La célula madre pre-leucémica conserva la capacidad de diferenciarse en el espectro completo de células mieloides y linfoides maduras, y son las mutaciones subsecuentes en los niveles de células madre o células progenitoras las que llevarían a la transformación en células madre de leucemia o células “iniciadoras de leucemia”. Incluso un clon de células tumorales podría ser reemplazado por otro clon que adquiere nuevas mutaciones y crece más agresivamente¹⁶⁷⁻¹⁷². Podrían ser necesarias décadas, para que una CMH alterada se convirtiese en una leucemia franca. En LAM, los estudios de secuenciación masiva han demostrado que hasta 10 mutaciones son adquiridas en serie en un solo linaje celular, que finalmente generará un clon leucémico dominante.

Así, en este mapa mutacional, surgen dos nuevos conceptos: las mutaciones “drivers o conductoras”, que conducen a la formación del tumor porque propician que las células cancerosas crezcan y las mutaciones “passengers o pasajeras”, que representan la mayoría de mutaciones en la enfermedad, que por sí solas no provocan la aparición de tumores, pero una vez adquiridas tras el evento iniciador, podría ser responsable de la inestabilidad genómica, impulsando la evolución clonal¹⁷³.

1.8.2. Análisis de evolución de espectro mutacional diagnóstico-recaída

El trabajo esencial en el estudio de la evolución clonal en la LAM a la recaída fue realizado en 2012 por Ding y cols¹⁶⁹. Realizaron secuenciación genómica completa en muestras pareadas diagnóstico-recaída, de 8 LAM (3 casos LAM-*NPM1*^{mut}) hallando en cada caso un cluster de mutaciones dominantes en el clon fundador en la muestra del diagnóstico. A la recaída observaron la pérdida de subclones del tumor primario en 4 de los 8 casos, sugiriendo eran erradicados gracias al tratamiento. Sin embargo, algunas mutaciones eran adquiridas a la recaída y podrían conferir resistencia a la quimioterapia. Establecieron dos patrones cinéticos de evolución clonal: Patrón 1: El clon dominante al diagnóstico produce la recaída adquiriendo nuevas mutaciones (3 de 8 pacientes) y Patrón 2: un clon minoritario al diagnóstico sobrevive y se expande a la recaída (5 de 8 pacientes) (**Figura 19**)

Independientemente del patrón de evolución clonal, se evidenció una alta frecuencia de transversiones probablemente inducidas por la quimioterapia. Ding y cols¹⁶⁹. sugerían que, aunque la quimioterapia es requerida para lograr una inicial remisión en los pacientes con LAM, podría contribuir a la recaída generando nuevas mutaciones en el clon fundador o en los subclones, los cuales posteriormente eran sometidos a la selección y expansión clonal.

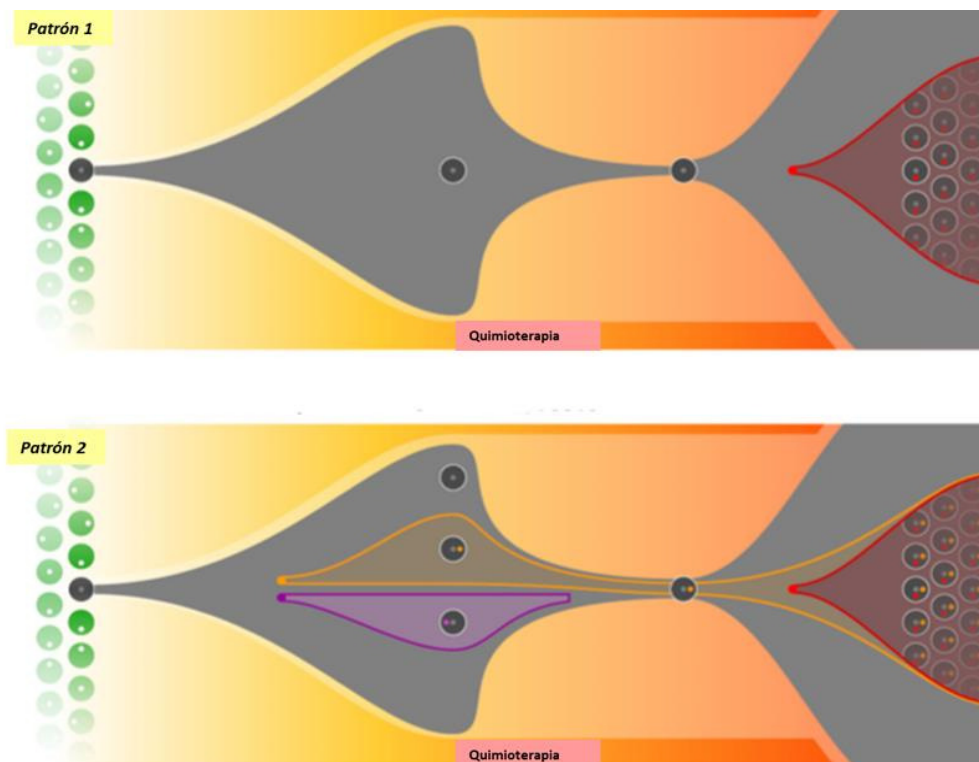


Figura 19: El modelo 1 muestra el clon dominante en el tumor primario que evoluciona hacia el clon de la recaída al obtener mutaciones específicas de recidiva. El modelo 2 muestra un clon minoritario que lleva la gran mayoría de las mutaciones tumorales primarias, que sobrevive y al expandir, produce la recaída(Modificado de Ding L., Nature. 2012).

Por tanto, se abrían varias alternativas hipotéticas de evolución clonal en LAM. La primera hipótesis más simple es que el clon leucémico predominante persistía después del tratamiento, eventualmente expandiéndose para dar lugar al clon refractario y recidivante (**Figura 20a**). La segunda hipótesis, es que, a lo largo de la enfermedad, se seleccione un subclon resistente al tratamiento, que se expandiría y sería el responsable de la recaída (**Figura 20b**). Una tercera hipótesis, es que el tratamiento con agentes terapéuticos, dañinos a su vez para el ADN, contribuya a la evolución genética de la leucemia, lo cual resultaría en el clon recidivante (**Figura 20c**). Y, por último, es que los agentes terapéuticos, actúen sobre las células pre-leucémicas para inducir mutaciones adicionales que resulten en un nuevo clon recidivante (**Figura 20d**)¹⁶⁷.

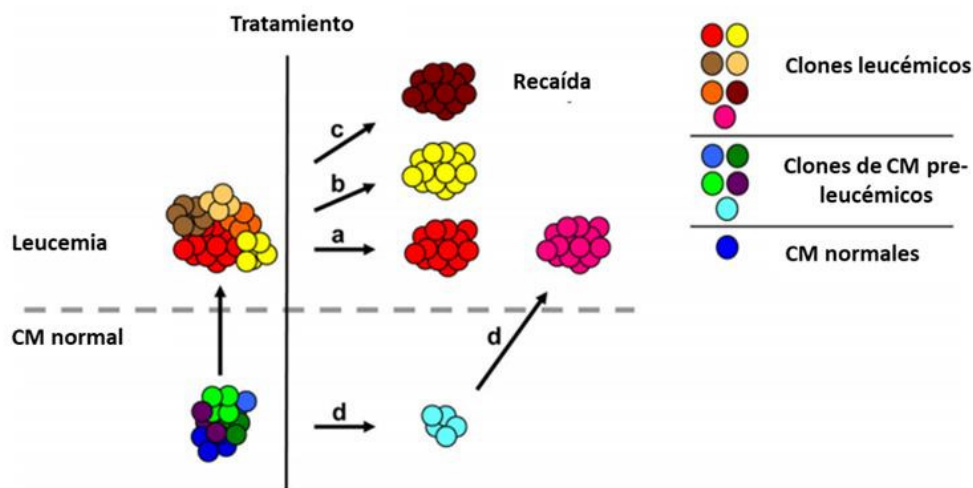


Figura 20: Modelo de progresión clonal de CMH a un clon leucémico franco. Los estudios genómicos y funcionales han demostrado que son necesarios múltiples mutaciones para transformar células normales en un clon leucémico. En el caso de una leucemia aguda, estas mutaciones pueden ocurrir en las células hematopoyéticas en la médula ósea, la mayoría de las cuales tienen una corta vida. Dado que las células madre hematopoyéticas (CMH) son las únicas células autorrenovables entre los progenitores de médula ósea, se ha propuesto un modelo según el cual las mutaciones deben acumularse secuencialmente dentro de distintos clones de CMH a lo largo del tiempo (eje x), dando lugar a la generación de un clon leucémico (eje y). Según este modelo, el compartimento de CMH en el momento del diagnóstico estaría compuesto por CMH genéticamente normales y clones de CMH pre-leucémicas, que presentarían algunas mutaciones, pero no todas fundadoras de la leucemia. (Modificado Jan M. Oncogene. 2013).

Posteriormente en 2013, Parkin y cols¹⁷⁴, analizaron muestras pareadas diagnóstico-recaída de 28 LAM (Incluyendo 8 casos de LAM-*NPM1*^{mut}) y 11 muestras pareadas diagnóstico-refractariedad primaria. Realizaron perfil genómico mediante SNP-arrays y secuenciación de 13 genes comúnmente recurrentes. Sus resultados demostraban que la LAM recidivante representaba en todos los casos el resurgimiento o evolución de un clon fundador. En esta serie, todas las alteraciones genéticas presentes en el momento del diagnóstico, persistían también en la recaída. Por otro

lado, en algunos pacientes se encontraron 2 clones dominantes que coexistían en el momento del diagnóstico, siendo al menos uno sensible a la quimioterapia, pero otro resistente, reforzando el concepto de que la recaída y/o persistencia de la LAM, es debida a la erradicación incompleta de los clones fundadores de LAM y no a la aparición de nuevos clones no relacionados. Así, demostraron una creciente complejidad genómica en el momento de la recaída, pero manteniendo un clon ancestral común, fundador de la LAM¹⁷⁴.

Por tanto, los estudios genómicos realizados en los últimos 5 años demuestran que en la LAM existen múltiples clones y subclones de forma paralela, que se someten a una competencia evolutiva durante la progresión de la enfermedad, produciendo una jerarquía clonal dentro de cada paciente^{168,169,172,173}. Estos clones pueden tener diferentes susceptibilidades a las opciones de tratamiento y, por lo tanto, representarían reservorios importantes durante la recaída de la enfermedad^{140,155,156}. Además, las células de la LAM de forma habitual, adquieren un pequeño número de mutaciones adicionales a la recaída sugiriendo que algunas de estas mutaciones pueden contribuir a la selección clonal y a la resistencia a la quimioterapia^{168,175,176}. Así, el genoma de la LAM en un paciente individual tiene en “continuo movimiento el objetivo” y por tanto la erradicación del clon fundador como la totalidad de sus subclones son imprescindibles para conseguir la cura. Por tanto, podemos afirmar que la evolución clonal es el sello distintivo de la LAM.

1.9. EVOLUCION FENOTÍPICA EN LAM

Para el diagnóstico de la LAM, la determinación del patrón de expresión de antígenos, además del análisis citomorfológico, es esencial. La detección de inmunofenotipos asociados a la leucemia (IAL) mediante el uso de CMF permite el diagnóstico fiable de la LAM en hasta el 90% de los pacientes con una sensibilidad entre 10^{-3} y 10^{-5} . La determinación de IAL se basa en la combinación de un marcador de progenitor (CD34, CD133, CD117) combinado con marcador mielóide (CD13, CD33) o DR y otros marcadores de expresión aberrante como son antígenos infidelidad de línea (CD7, CD2, CD19, CD56), asincronismo madurativo y alteración cuantitativa de marcadores normales. Así, el uso de la CFM se considera una herramienta aplicable a la mayoría de pacientes para la monitorización de la EMR durante el tratamiento con importancia pronóstica ampliamente demostrada tanto en adultos como en población pediátrica^{178,179}.

Sin embargo, el principal inconveniente de la monitorización de EMR por CMF es la dificultad de estandarización debido, entre otros aspectos, a que el IAL establecido al diagnóstico y altamente inestable presentando cambios de expresión hasta en un 90% de los pacientes afectados de LAM¹⁷⁹⁻¹⁸⁴. Los mecanismos precisos que conducen a esta evolución clonal fenotípica no son bien conocidos y podría deberse a cambios espontáneos o más plausiblemente a selección de subpoblaciones minoritarias resistentes al tratamiento¹⁸¹. En este sentido, Lagenbrake y cols¹⁸². analizaron los cambios inmunofenotípicos en una población pediátrica con LAM, encontrando cambios, que incluían tanto la ganancia y como la pérdida de antígenos en el 88% de los pacientes. Evidenciaron que las células blásticas mostraron un inmunofenotipo más inmaduro en el momento de la recaída expresando antígenos asociados a progenitores CD34 y CD117 que podrían ser más resistentes al tratamiento quimioterápico. Además, Yébenes y cols¹⁸⁴, analizaron la evolución clonal fenotípica en 41 pacientes afectados de LAM a la recaída y evidenciaron un 7.3% de casos con expansión de un clon minoritario al diagnóstico.

Además, algunos estudios han valorado la co-ocurrencia de cambios fenotípicos y citogenéticos a la recaída en pacientes con LAM^{179,180,183,184}. Globalmente, el porcentaje de pacientes con cambios fenotípicos es mayor en el grupo de pacientes que también presentan cambios citogenéticos sugiriendo mecanismos comunes de evolución clonal.

2. HIPÓTESIS

La patogenia de la LAM implica la adquisición secuencial de varias lesiones genéticas y gracias a los estudios de secuenciación, la lista de mutaciones recurrentes está bien caracterizada. El espectro completo de mutaciones, las distintas combinaciones posibles, su potencial valor diagnóstico, pronóstico o terapéutico y, sobre todo, cuáles de ellas tienen un carácter causal, son áreas de gran interés actual.

La recaída sigue siendo la principal causa de mortalidad en la LAM. Por ello, los últimos trabajos se han centrado en estudiar su base patogénica, sabiendo hoy en día que la LAM es una enfermedad dinámica, que va evolucionando a lo largo de su curso y esta evolución es lo que lleva a que uno o varios clones resistentes al tratamiento, produzcan la recaída de la enfermedad. Esto se traduce en frecuentes cambios moleculares y fenotípicos a la recaída en LAM.

La mayoría de los estudios se han centrado en las LAM de riesgo citogenético/intermedio molecular, probablemente por ser el grupo más heterogéneo y, amplio. Sin embargo, aquellos pacientes incluidos en el grupo de bajo riesgo citogenético/molecular, con excepción de los pacientes *PML/RARA α* , siguen teniendo unas tasas de recaída nada despreciables. La hipótesis de trabajo es establecer si el comportamiento clonal a la recaída en el grupo específico de LAM de bajo riesgo podría tener reflejo en las características fenotípicas y en el impacto pronóstico tras los tratamientos de rescate

3. OBJETIVOS

1. Estudio mutacional de los genes *DNMT3A*, *IDH1/2*, *N/KRAS* y *TP53* en los pacientes catalogados como LAM de bajo riesgo citogenético/molecular en las muestras del diagnóstico y de recaída.
2. Estudio inmunofenotípico de los pacientes catalogados como LAM de bajo riesgo citogenético/molecular en las muestras del diagnóstico y de recaída.
3. Establecer los patrones de evolución clonal en los pacientes catalogados como LAM de bajo riesgo citogenético/molecular y su correlación con los resultados inmunofenotípicos.
4. Relacionar los resultados citométricos/moleculares con los datos clínicos de los pacientes.
5. Analizar el impacto en la supervivencia y recaída de los patrones de evolución clonal.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. PACIENTES

Diseño de estudio clínico-biológico retrospectivo no intervencionista, para el cual definimos los siguientes criterios de inclusión:

4.1.1. Criterios de inclusión

1. LAM-Bajo Riesgo citogenético-molecular según criterios de ELN 2010¹⁸⁵.
2. RC documentada tras recibir tratamiento de inducción, con posterior recaída medular de la enfermedad.
3. Disponibilidad de muestra de ADN procedente de médula ósea tanto del diagnóstico como de la recaída de la leucemia.
4. Disponibilidad de los datos citométricos de la LAM tanto del diagnóstico como de la recaída.
5. Disponibilidad de los datos clínicos, biológicos y evolutivos.

Con estos criterios, se reclutaron un total de 26 pacientes que habían sido diagnosticados de LAM entre los años 1990-2012. Los pacientes procedían de los hospitales: Universitario Reina Sofía de Córdoba (N=10), Universitario Morales Messeguer de Murcia (N=7), Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (N=6), y Policlinico Tor Vertaga, de Roma (N=3).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. Los pacientes vivos firmaron el consentimiento informado en concordancia con las recomendaciones de la Declaración de Derechos Humanos, la conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales.

4.1.2. Características de los pacientes al diagnóstico:

La **Tabla 7** muestra las características globales y la **Tabla 8** las características clínicas individuales de los 26 pacientes. El diagnóstico morfológico se realizó según clasificación FAB¹⁸⁶ y OMS²¹. La serie estaba compuesta por 13 varones (50%) y 13 mujeres (50%), con una mediana de edad al diagnóstico de 49.5 años (rango: 13-71 años), siendo 8 pacientes mayores de 60 años. La mediana de leucocitos fue de $16.8 \times 10^9/L$ (rango: $1.4-149 \times 10^9/L$) y el porcentaje de blastos en médula ósea 69% (rango: 32-100%). De acuerdo con la clasificación FAB, un paciente fue catalogado como LAM-M0, 6 como LAM-M1, 9 como LAM-M2, 8 como LAM-M4 y 2 como LAM-M5. En todos los pacientes se realizó al diagnóstico estudio citogenético mediante cariotipo de bandeado convencional a partir de cultivo estimulado con mitógenos. A su vez, se realizó estudio

molecular en todos los pacientes de la mutación: en *NPM1* mediante curvas Melting de alta resolución¹⁸⁷ (10 pacientes) o mediante análisis de fragmentos de restricción¹⁸⁸ (16 pacientes); de *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11* mediante RT-PCR estandarizado^{189,190} y de *CEBPA* y *C-KIT* por secuenciación. *FLT3-ITD* y *FLT3-TKD* se estudiaron al diagnóstico mediante RT-PCR¹⁹¹ y/o mediante análisis de fragmentos de restricción. Con respecto al estudio citogenético-molecular, 16 pacientes presentaron CN-*NPM1*^{mut}/*FLT3*^{wt}; 4 pacientes presentaron t(8;21)/*RUNX-RUNX1T1*, 4 pacientes presentaron inv(16)/*CBF-MYH11* y 2 pacientes presentaron CN-*CEBPA*^{dm}. Todos los estudios básicos al diagnóstico se realizaron de forma rutinaria en cada paciente en su hospital de procedencia.

Los pacientes fueron tratados con los protocolos de tratamiento PETHEMA/GIMEMA LAM vigentes en el momento del diagnóstico, empleando quimioterapia estándar de inducción que incluía daunorrubicina o idarrubicina más citarabina con o sin etopósido. La terapia post-remisión consistió en 1 ó 2 cursos de quimioterapia de consolidación con dosis intermedias/altas de citarabina y posterior intensificación con trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH) (N=7) o alogénico (alo-TPH) (N=10) según las guías terapéuticas vigentes.

Tabla 7. Características de los pacientes incluidos en el estudio (N=26)

Edad, años	
Mediana	49.5
Rango	13-71
Sexo N(%)	
Hombre	13 (50%)
Mujer	13 (50%)
Citogenética N(%)	
CN-NPM1 ^{mut} /FLT3 ^{wt}	16 (61.5%)
t(8;21)	4 (15.4%)
inv(16)	4 (15.4%)
CN-CEBPA ^{dm}	2 (7.6%)
Leucocitos al diagnóstico, x10⁹L	
Mediana	16.8
Rango	1.4-149
Blastos en MO, %	
Mediana	69
Rango	32-100
Consolidación 1^oRC	
Altas dosis de citarabina	9 (34.6%)
Auto-TPH	7 (26.9%)
Alo-TPH	10 (38.5%)
IA de recaída	
Mediana	17.5
Rango	4-252

CN: cariotipo normal, TPH: trasplante progenitores hematopoyéticos, Auto: Autólogo, ALO: alogénico, MO: Médula ósea, IA: índice acumulado, NPM1: nucleofosmina-1 CEBPA^{dm}: CCAAT potenciador de la proteína de unión alfa con mutación bialélica. RC: remisión completa

Tabla 8: Características de los pacientes.

PACIENTE	CENTRO	DG	EDAD	SEXO	WBC	Blastos*	FAB	CARIOTIPOE	MOLECULAR	TPH 1 RC	RECAIDA	SLR(días)	VIVO	SG TRAS RECAIDA	TTO RECAIDA
1	HURS	1.02.08	47	Hombre	55.5	90	M4	46XY	NPM1 ^{MUT}	AUTO	16.10.09	623	Sí	87	ALO
2	HURS	14.05.11	39	Mujer	145.0	92	M5a	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALO	16.11.11	186	No	5	AZA
3	HURS	1.05.90	54	Mujer	NA	NA	M2	46XX	NPM1 ^{MUT}	No	10.05.11	7679	No	38	QT
4	HURS	31.10.11	61	Mujer	7.1	58	M2	46XX	NPM1 ^{MUT}	AUTO	10.06.13	696	Sí	43	ALO
5	HURS	31.05.09	47	Hombre	4.9	85	M1	46XY, t(8;21)	RUNX1-RUNXT1	AUTO	16.12.10	564	No	26	ALO
6	HURS	2.11.11	71	Hombre	2.9	53	M2	46XY,t(8;21)	RUNX1-RUNXT1	No	21.05.12	201	No	3	NO
7	HURS	6.03.07	52	Mujer	72.6	80	M2	46XX	NPM1 ^{MUT}	AUTO	4.01.08	304	No	7	QT
8	HURS	16.06.07	65	Hombre	69.9	98	M4	46XY	NPM1 ^{MUT}	ALO	21.07.08	401	No	15	AZA
9	HURS	23.02.09	32	Hombre	15.0	39	M1	46XY	NPM1 ^{MUT}	ALO	9.09.09	198	No	5	AZA
10	HURS	4.05.12	64	Mujer	61.3	92	M5a	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALO	10.12.12	220	No	1	NO
11	HPTV	19.08.11	39	Hombre	NA	54	M1	46XY	NPM1 ^{MUT}	No	29.12.11	132	No	1	NO
12	HPTV	10.04.12	28	Hombre	8.8	80	M2	46XY,inv16	CBFb/MYH1	AUTO	18.06.13	434	Si	43	ALO
13	HPTV	21.1.13	57	Hombre	149.0	35	M1	46XY	NPM1 ^{MUT}	No	2.01.14	365	Si	36	ALO
14	HMM	25.02.09	13	Mujer	2.1	75	M1	46XX	CEBPA ^{dm}	ALO	26.07.12	1247	Si	54	2 ALO
15	HMM	13.05.09	46	Hombre	19.1	32	M4	46XY	NPM1 ^{MUT}	AUT	12.01.12	974	Si	60	ALO
16	HMM	25.02.12	66	Mujer	16.6	52	M4	46XX	NPM1 ^{MUT}	No	12.11.13	536	Si	38	ALO
17	HMM	10.07.02	65	Mujer	17.0	35	M2	46XX,t(8;21)	RUNX1-RUNXT1	No	09.01.13	183	No	5	QT-AZA
18	HMM	14.05.13	21	Hombre	1.4	58	M2	46XY,t(8;21)	RUNX1-RUNXT1	ALO	26.12.13	226	No	2	AZA
19	HMM	08.11.13	46	Mujer	14.4	59	M4	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALO	28.04.15	536	No	1	QT
20	HMM	07.02.14	14	Mujer	77.0	80	M2	46,XX, inv16	CBFb/MYH1	No	30.09.15	600	Si	16	ALO
21	HLF	16.06.04	52	Hombre	4	83	M0	46XY	FLTNP1 ^{MUT}	ALO	28.01.10	2052	No	0	QT-AZA
22	HLF	12.08.08	32	Mujer	1.7	100	M1	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALO	10.02.11	912	Si	71	2-3 ALO
23	HLF	14.07.08	37	Hombre	110	55	M4	46XY,inv16	CBFb/MYH1	No	5.03.09	234	Si	94	ALO
24	HLF	27.06.09	64	Mujer	14.3	NA	M4	46,XX, inv16	CBFb/MYH1	AUT	17.06.11	720	Si	67	QT
25	HLF	11.04.11	60	Hombre	110.9	NA	M2	46XY	CEBPA ^{dm}	ALLO	27.05.13	777	No	16	AIR-ALO
26	HLF	4.04.07	68	Mujer	21.4	63	M4	46XX	NPM1 ^{MUT}	No	12.08.08	496	No	4	QT

HURS: Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba), HPTV: Policlínico di tor Vergata (Roma), HMM: Hospital Universitario Morales Meseguer (Murcia), HLF: Hospital Universitario La Fe (Valencia).
 NA: No disponible. Mut: Mutado, RC: Remisión Completa; AUT: Autólogo, ALO: Alogénico, *: Blastos en médula ósea, WBC: Leucocitos (x10⁹/L), SLE: Supervivencia libre de enfermedad; TTO: tratamiento. NPM1: Nucleofosmina-1; CEBPA: CCAAT potenciador de la proteína de unión alfa ; dm: bialélica, AZA: Azacitidina, QT: quimioterapia.

4.1.3. Evolución clínica de los pacientes a la recaída:

Todos los pacientes recayeron con una mediana de tiempo de 17.5 meses (rango 4-252 meses). A los pacientes sometidos a Alo-TPH en primera RC se realizó seguimiento del quimerismo hematopoyético en todos los pacientes mediante PCR cuantitativa, siendo todas las recaídas en células del receptor.

Tras la recaída, 17 pacientes fueron tratados con quimioterapia intensiva nuevamente, de los cuales 12 fueron sometidos a Alo-TPH; otros 6 pacientes recibieron azacitidina, y 3 pacientes solamente tratamiento paliativo y/o de soporte. A fecha de cierre del análisis (31/10/2017), 15 pacientes habían fallecido, todos a causa de progresión leucémica, encontrándose 11 pacientes vivos y en RC. La mediana de seguimiento desde la recaída fue de 54 meses (rango:16-94).

4.1.4. Características de los controles

Como controles, incluimos 7 pacientes con LAM de novo de Bajo Riesgo citogenético/molecular con cariotipo normal con *NPM1^{mut}/FLT3^{wt}*. De los 7 pacientes, 4 eran varones (57.4%) y mujeres (42.8%), con una mediana de edad al diagnóstico de 46.7 años (rango: 22-69 años), siendo 2 pacientes mayores de 60 años. La mediana de leucocitos fue de $12.8 \times 10^9/L$ (rango: $1.2-98 \times 10^9/L$) y el porcentaje de blastos en médula ósea fue 58% (rango: 36-100%). De acuerdo con la clasificación FAB, 1 como LAM-M1, 2 como LAM-M2, 3 como LAM-M4 y 1 como LAM-M5.

Todos fueron tratados con quimioterapia intensiva, alcanzando la remisión completa tras la inducción, siendo consolidados con Auto-TPH en 4 casos y 3 con Alo-TPH. La mediana de seguimiento es de 24 meses (rango: 16-38), encontrándose en el momento de análisis del estudio todos los pacientes vivos y en RC.

4.3. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio biológico incluyó a) análisis genético mediante secuenciación directa Sanger y/o NGS de los genes seleccionados y b) análisis del perfil inmunofenotípico obtenido mediante CMF en los centros de origen. Ambos estudios biológicos se realizaron de forma pareada en las muestras de diagnóstico y de recaída. En la fase final se integraron los datos obtenidos y se correlacionaron los hallazgos genéticos y fenotípicos con las variables clínicas.

La **Figura 21** resume gráficamente el diseño de nuestro estudio:

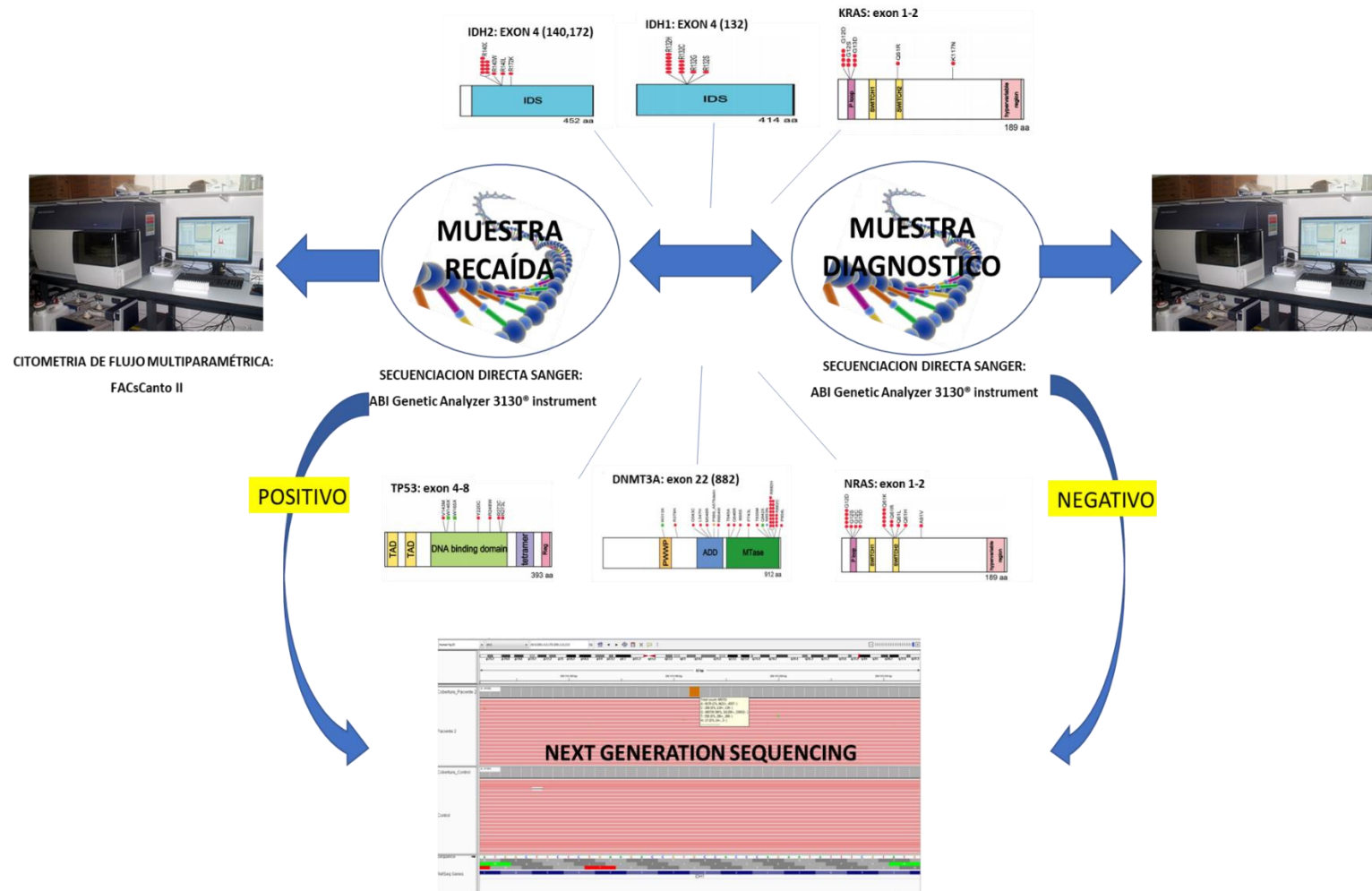


Figura 21: Resumen del diseño del estudio.

4.4. ESTUDIO GENÉTICO

Para el análisis genético, seleccionamos los genes *DNMT3A*, *NRAS*, *KRAS*, *IDH1*, *IDH2* ya que, según diversos autores frecuentemente se coexpresan en las LAM-Bajo Riesgo. Además, incluimos también el estudio de *TP53* por asociarse con firmas genéticas de alto riesgo y hallarse frecuentemente mutado en LAM secundarias, y con escasa respuesta/nula respuesta a tratamiento. Posteriormente, buscamos a lo largo de cada gen, las “zonas calientes o hot-spots”, aquellas donde se concentran el 80-90% de las mutaciones relacionadas con LAM, de tal manera que fuera factible su estudio mediante secuenciación directa Sanger.

4.4.1. Extracción de ADN

4.4.1.1. Extracción de ADN en Trizol

. Para la extracción de ADN de muestras de aspirado de médula ósea empleamos TRIzol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dejamos secar bien el pellet y añadimos 20 µL de agua libre de RNasa, quedando el ADN resuspendido, y cuantificándolo mediante análisis espectrofotométrico (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE).

4.4.1.2. Extracción de DNA a partir de extensión de médula ósea

En 20 casos partimos de una extensión de médula ósea en un porta almacenado con cubreportas. Tras retirada del cubreporta, se añadieron 250 µl de PBS 1x, con posterior arrastre de la muestra y depósito en placa de Petri. Una vez recogida toda la muestra, la pasamos desde la placa a un tubo eppendorf. Añadimos 250 µl de buffer AL y 20 µl de proteinasa K [KIT QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (Qiagen)] siguiendo las instrucciones del fabricante. Dejamos secar y resuspendimos en 20 µl de RNasa, quedando el ADN resuspendido y cuantificado mediante análisis espectrofotométrico (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE).

4.4.2. Amplificación completa del ADN genómico

Se realizó amplificación completa del ADN genómico mediante el REPLI-g Midi Kit de QIAGEN. Para ello, partimos de una cantidad de ADN genómico mayor a 10 ng suspendido en tampón Tris-EDTA (TE) hasta obtener un volumen final de 2,5 µl. En aquellos casos en los que el ADN de partida era de mejor calidad, se partió de una cantidad de 1-10 ng de ADN genómico. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se obtuvo una gran cantidad de ADN amplificado uniformemente, con un rendimiento de aproximadamente 40 µg por 50 µl de reacción. El ADN amplificado se diluyó en TE a

una concentración 1:100 y se usó de forma general 3 µl del ADN diluido para cada PCR. El ADN amplificado se trató del mismo modo que el ADN genómico con los mínimos ciclos congelación-descongelación posibles, por lo que se almacenó a 4°C a corto plazo o a -20°C para almacenaje a largo plazo.

4.4.3. Estudio mutaciones en genes *NRAS*, *KRAS*, *IDH1/2*, *DNMT3A* y *TP53*

4.4.3.1. Diseño de cebadores

Buscamos la secuencia del gen mediante la aplicación web PubMed del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y las mutaciones más frecuentes en cada gen que se asocia con LAM, mediante Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) (**Figura 22**). Así, teniendo en cuenta donde se concentran las mutaciones en cada gen (“puntos calientes”) y poder abarcarlas de forma segura con un correcto análisis, diseñamos dos parejas de cebadores para *NRAS*, otros dos para *KRAS*, tres para *TP53*, una para *IDH1*, una para *IDH2* y una para *DNMT3A*.

El diseño de los cebadores se realizó empleando el programa Oligonucleotide Properties Calculator (OligoCalc) y Primer3 Input (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) (versión 0.4.0)¹⁹². Además, se probó que sólo amplificaran la región de interés, es decir, que fueran específicos (mediante un BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de alineamiento de secuencias de nucleótidos entre dichos cebadores y la secuencia consenso del genoma humano proporcionada por el NCBI. Una vez obtenidos los cebadores, se realizó una PCR de comprobación in silico mediante UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>). En la **Tabla 9** se detallan las secuencias de los cebadores usados. Todos los cebadores fueron de diseño propio, salvo para *IDH1/2*, que fueron los reportados por Keyur y cols¹⁹³.

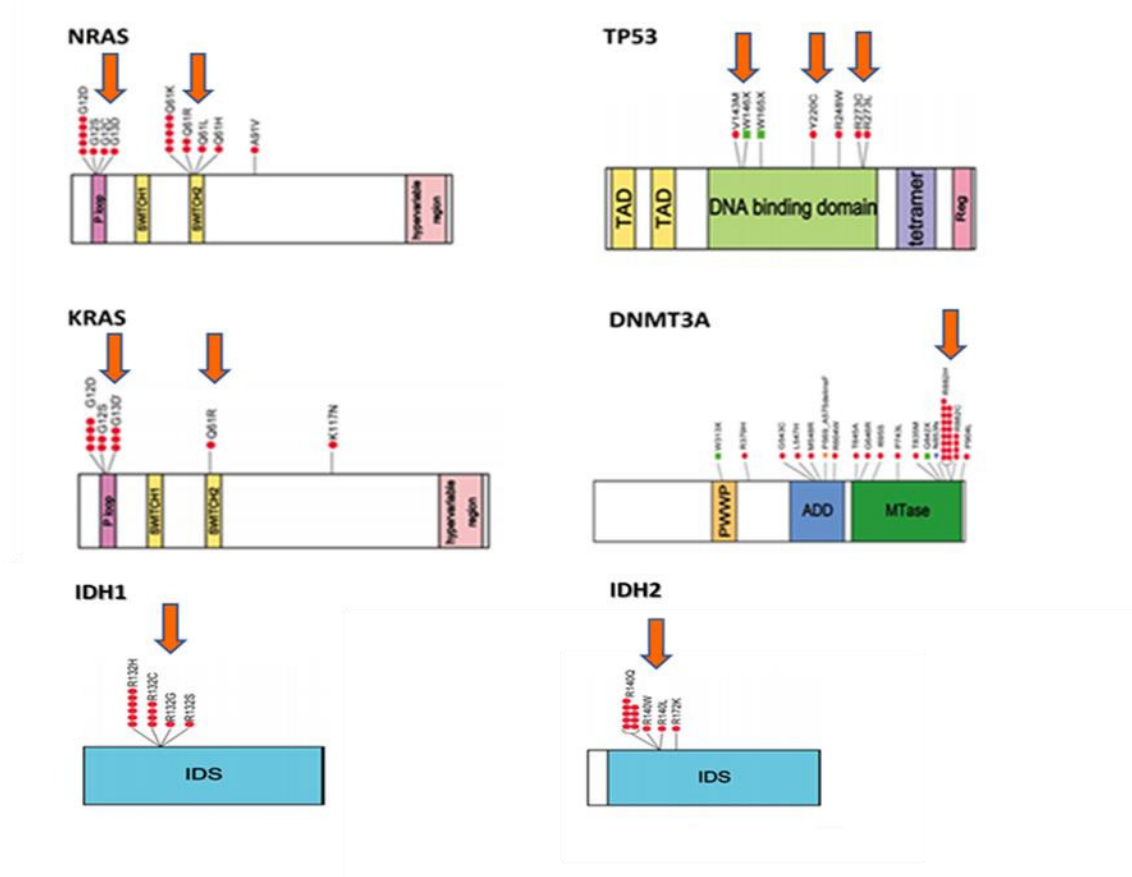


Figura 22. Representación gráfica de las mutaciones en cada uno de los genes estudiados. Cada flecha “naranja” representa una pareja de primers. En NRAS, los hot-spot se encuentran en los exones 1-2, en KRAS en los exones 1-2, en TP53 en los exones 4-8, en DNMT3a en el exón 22, en IDH1 en el exón 4 y en IDH2 en exón 4 (Modificado de Kihara R. Leukemia. 2014).

Tabla 9. Secuencias de los cebadores

GEN	CEBADOR	SECUENCIA 5' - 3'
NRAS_exon1	Sequence amplification FW	CGGTGTTTTTTCGTTCTCTA
NRAS_exon1	Sequence amplification RV	TTGCATAACTGAATGTATACCCAAA
NRAS_exon1	Internal sequencing FW	GATGTGGCTCGCCAATTAAC
NRAS_exon1	Internal sequencing RV	TGGGTAAAGATGATCCGACA
NRAS_exon2	Sequence amplification FW	CAATGTCAAACAACCTAAAACCA
NRAS_exon2	Sequence amplification RV	GGCAGAAATGGGCTTGAATA
NRAS_exon2	Internal sequencing FW	TTGCATTCCCTGTGGTTTTT
NRAS_exon2	Internal sequencing RV	TGGTAACCTCATTTCCCATA
KRAS_exon1	Sequence amplification FW	CTTAAGCGTCGATGGAGGAG
KRAS_exon1	Sequence amplification RV	CCCTGACATACTCCCAAGGA
KRAS_exon1	Internal sequencing FW	AAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGA
KRAS_exon1	Internal sequencing RV	AGAATGGTCCTGCACCAGTAA
KRAS_exon2	Sequence amplification FW	ATCCTAATGGGTATGTGGTAGCAT
KRAS_exon2	Sequence amplification RV	AAGAGTACAGAAGGCTGTGGAGTC
KRAS_exon2	Internal sequencing FW	GGTGCTTAGTGGCCATTTGT
KRAS_exon2	Internal sequencing RV	TGCATGGCATTAGCAAAGAC
TP53_exon4_5	Sequence amplification FW	AAAAAGAAAAGCTCCTGAGGTGAG
TP53_exon4_5	Sequence amplification RV	CCCATTTACTTTGCACATCTCA
TP53_exon4_5	Internal sequencing FW	GGAGGTGCTTACGCATGTTT
TP53_exon4_5	Internal sequencing RV	GGGAGGTCAAATAAGCAGCA
TP53_exon6	Sequence amplification FW	TGTGCAAAGTAAATGGGTTAACTA
TP53_exon6	Sequence amplification RV	AAGAAAAGTGAAGTGGGAGCAGTAAG
TP53_exon6	Internal sequencing FW	AAAAAAGGCCTCCCCTGCTTGCCAC
TP53_exon6	Internal sequencing RV	GATGTGATGAGAGGTGGATGGGTA
TP53_exon7_8	Sequence amplification FW	ACTCAGTTTTCTTTTCTCTGGCTTT
TP53_exon7_8	Sequence amplification RV	CAAATGCCCAATTGCAGGTAACA
TP53_exon7_8	Internal sequencing FW	CTTAGGCTCCAGAAAGGACAAG
TP53_exon7_8	Internal sequencing RV	CAAATGCCCAATTGCAGGTAACA
DNMT3A	Sequence amplification FW	TTTATAAAGGACAGAAGATTCGGCAGAA
DNMT3A	Sequence amplification RV	CCTTACACACACGCAAATACTCCTT
DNMT3A	Internal sequencing FW	TTTATAAAGGACAGAAGATTCGGCAGAA
DNMT3A	Internal sequencing RV	CCTTACACACACGCAAATACTCCTT
IDH_1	M13_Sequence amplification FW	TGTA AAAACGACGGCCAGTTGAGAAGAGGGTTGAGGAG TT
IDH_1	M13_Sequence amplification RV	CAGGAAACAGCTATGACCAACATGCAAAATCACATTAT TGCC
IDH_1	M13_Internal sequencing FW	TGTA AAAACGACGGCCAGT
IDH_1	M13_Internal sequencing RV	CAGGAAACAGCTATGACC
IDH_2	M13_Sequence amplification FW	TGTA AAAACGACGGCCAGTGGGTTCAAATTCTGGTTGAA
IDH_2	M13_Sequence amplification RV	CAGGAAACAGCTATGACCTAGGCGAGGAGCTCCAGT
IDH_2	M13_Internal sequencing FW	TGTA AAAACGACGGCCAGT
IDH_2	M13_Internal sequencing RV	CAGGAAACAGCTATGACC

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogen homolog; TP53: Tumor protein p53; TP53; DNMT3a: DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha; IDH: Isocitrate dehydrogenase.

- ✓ NRAS reference sequence <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>; Accession number: **NG_007572.1**
- ✓ KRAS reference sequence <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>; Accession number: **NG_007524.1**
- ✓ TP53 reference sequence <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>; Accession number: **NG_017013.2**
- ✓ DNMT3a reference sequence <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>; Accession number: **NG_029465.2**
- ✓ IDH1: reference sequence <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>; Accession number **NG_023319.2**
- ✓ IDH2: reference sequence <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg>; Accession number **NG_023302.1**

4.4.3.2. Secuenciación directa Sanger

Se amplificó cada segmento usando el KIT AmpliTaqGold® en termociclador (2720-Thermal Cycler) Applied Biosystems, Roche (New Jersey, USA) adaptando las condiciones del fabricante. Los productos amplificados obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 2%. Las **Figuras 23-28** muestran las características y condiciones de amplificación y ejemplo de la banda de cada uno de los genes amplificados (modificado de Kihara R y cols. Leukemia. 2014)¹⁹⁴.

REACCION DE PCR PARA NRAS

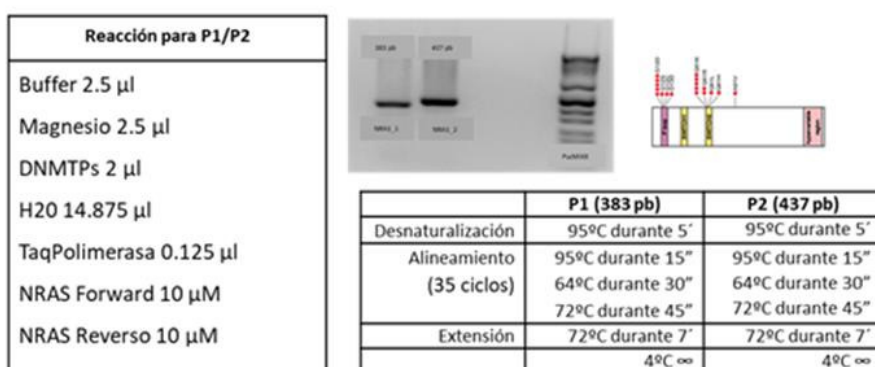


Figura 23. Representación de la PCR para *NRAS*

REACCION DE PCR PARA KRAS

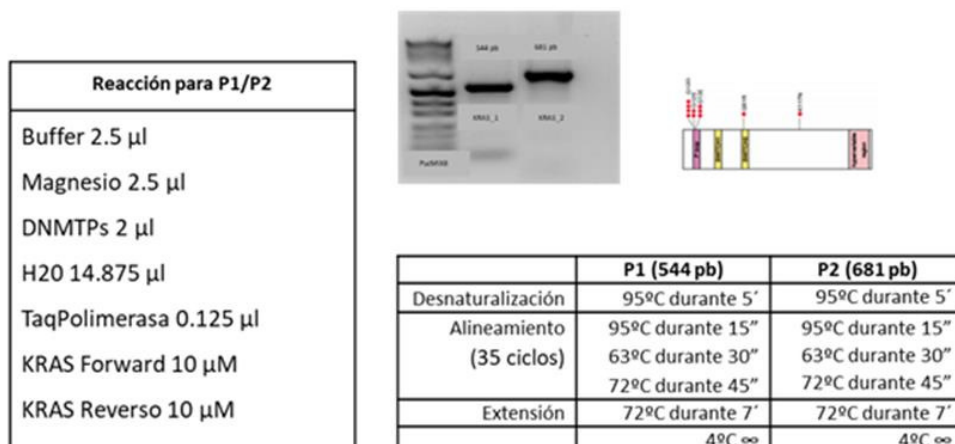


Figura 24. Representación de la PCR para *KRAS*

REACCION DE PCR PARA DNMT3A

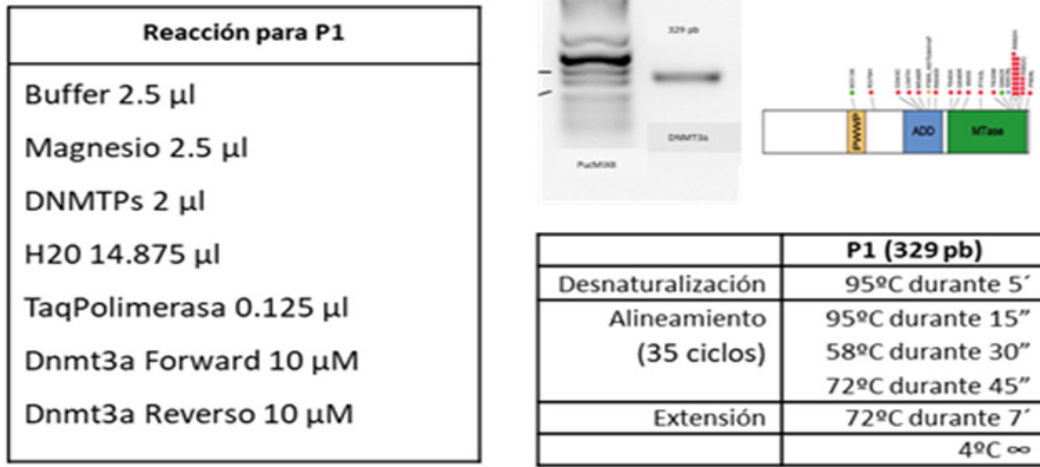


Figura 25. Representación de la PCR para *DNMT3a*

REACCION DE PCR PARA TP53

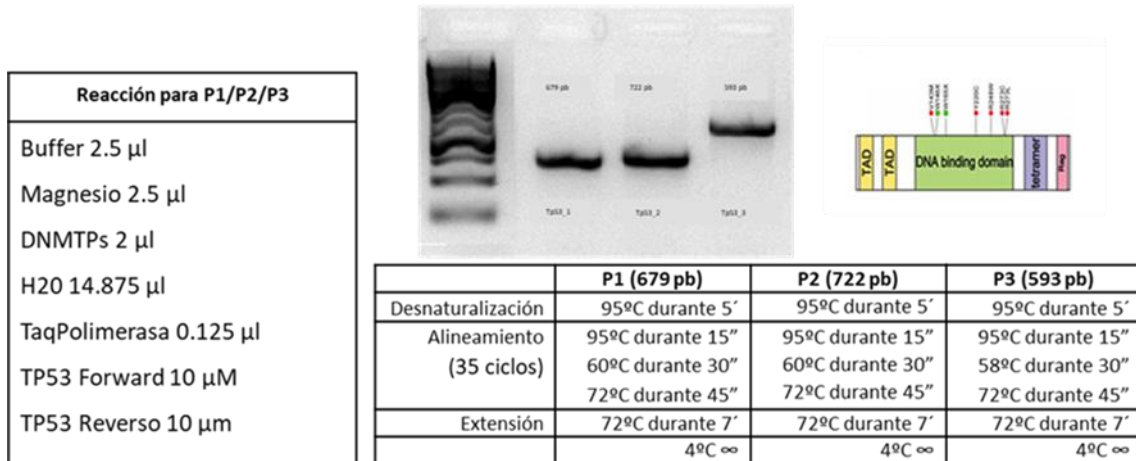


Figura 26. Representación de la PCR para *TP53*

REACCION DE PCR PARA IDH1

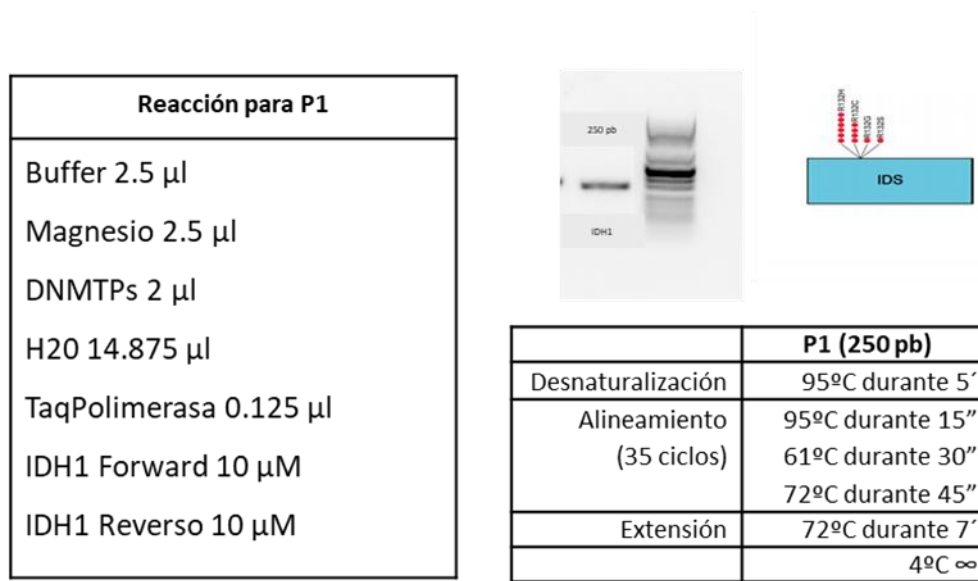


Figura 27. Representación de la PCR para *IDH1*

REACCION DE PCR PARA IDH2

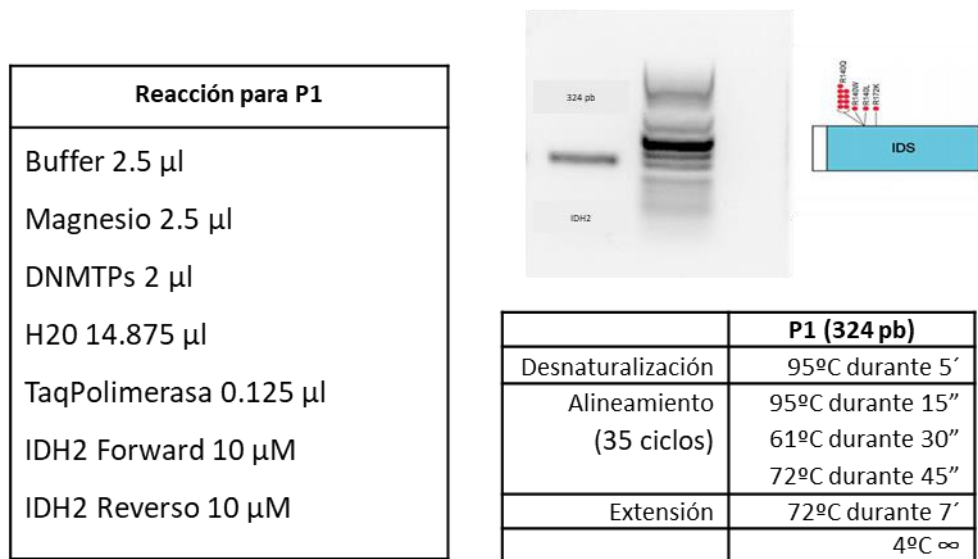


Figura 28. Representación de la PCR para *IDH2*

Una vez que todos los productos han sido amplificados, se realiza la purificación con el KIT QIAquick® PCR Purification / Gel Extraction KIT (QIAGEN Valencia CA. USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y realizamos la PCR de secuenciación. Para ello, usamos 5 µM del cebador forward, 1 µL de la enzima Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Reaction KIT (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 µL del Buffer

5x Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction kit y 5 µL del producto purificado. Se realizó otra purificación mediante el empleo del KIT comercial Centri-SEP Spin Columns. Princeton Separation KIT (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, el producto obtenido fue resuspendido en 20 µL de formamida y se secuenció en ABI Genetic Analyzer 3130 platform (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Los resultados de secuenciación fueron analizados mediante Seq Scanner® V1.0 software (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). En aquellas muestras en las que se encontró una mutación, se confirmó de forma bidireccional.

La sensibilidad de la secuenciación por Sanger fue de un 10%¹⁹⁵.

4.4.3.3. Next Generation Sequencing (NGS)

Se diseñaron cebadores específicos para las secuencias de interés (**Tabla 10**) en los genes *DNMT3A* e *IDH1/2*, para analizar la presencia de las mutaciones detectadas por Sanger en las muestras de la recaída, pero no en el diagnóstico, en los pacientes UPM 10 (*DNMT3A*), UPN 2 (*IDH1/IDH2*) y UPN 9 (*IDH1/IDH2*) con una técnica de mayor sensibilidad. La reacción de amplificación de PCR se realizó con 10 ng de ADN, usando un programa de 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos; 60°C durante 10 segundos; 72°C durante 30 segundos y un último paso de elongación a 72°C durante 30 segundos. Los productos de PCR se prepararon para la secuenciación utilizando el KIT NEXTFlex™ Rapid DNA Sequencing (Bio Scientific, Austin TX).

Las librerías resultantes fueron secuenciadas en el secuenciador Illumina Hi-Seq 1500 con una profundidad 100x. Los análisis primarios, incluyendo el base-calling, filtrado de lectura y demultiplexación se realizaron con el software estándar de Illumina (CASAVA 1.8.2). Se utilizaron herramientas SAM para calcular la profundidad de lectura y las frecuencias de nucleótidos para cada posición de los amplicones^{196,197}. La sensibilidad de la secuenciación por NGS fue de un 0.5%¹⁹⁵.

Tabla 10. Cebadores para la NGS

Mutación	Posición (hg19)	Cebador Forward	Cebador Reverse	Tamaño amplicon	Región amplificada
DNMT3A-D876Y	chr2:25457261C>A	CTTCAGCGGAGCGA AGAG	TGCCCTCTCTGCCTT TTCT	147bp	chr2:25457169- 25457315
IDH1-SNP105	chr2:209113192G> A	TTTACCCATCCACTC ACAAGC	TGATGAGAAGAGGG TTGAGGA	144bp	chr2:209113130- 209113273
IDH2-R140Q	chr15:90631934C> T	CTAGGCGTGGGATG TTTTTG	GCTGCAGTGGGACC ACTATT	144bp	chr15:90631872- 90632015

4.4.3.4. Análisis de pirosecuenciación

En nuestro estudio, encontramos dos mutaciones en el gen *DNMT3A*, no reportadas hasta ahora en la bibliografía. Para demostrar su especificidad leucémica, decidimos estudiarlas mediante pirosecuenciación en ADN procedente de médula ósea de donantes sanos, así como en las muestras en RC de los pacientes portadores.

Los cebadores para el análisis de cuantificación de alelos se diseñaron utilizando el software PyroMark 2.0.1.15 (Qiagen). La reacción PCR se realizó con 0,05 $\mu\text{mol/l}$ de cebadores forward y reverso, 0,2 mmol/l de dNTPs, 50 ng de ADN genómico, 1,5 mmol/l de cloruro de magnesio, 1 \times PCR buffer y 0,2 U de Immolase DNA polimerasa (Bioline) sometiéndola a 45 ciclos con una temperatura de 56°C. Los productos de la PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% mediante campana ultravioleta, obteniendo un producto amplificado de 178 pb.

La secuenciación pirotática se completó utilizando el pirosecuenciador PyroMark Q24 (Qiagen, Valencia CA) con 15 μl de producto PCR. Los resultados fueron analizados con software PyroMark Q24 versión 2.0.6.

4.4.3.5. Modelado de Homología

Para predecir el efecto sobre la proteína DNMT3A que podrían tener las nuevas mutaciones halladas en el gen, se empleó un servidor de modelado semi-automático Swiss-Model (Biozentrum, Basel, <https://swissmodel.expasy.org>), y análisis con el programa Swiss-Pdb Viewer, version 4.1.0 (https://spdbv.vital-it.ch/download_prerelease.html). Obtuvimos una secuencia de aminoácidos de la proteína mutada y se comparó con las secuencias de las estructuras proteicas depositadas en el Banco de Datos de Proteínas, seleccionando aquellas secuencias peptídicas con más similitud a la nuestra, que fueron las 3a1b. 1. A y 4u7p. 1. A. Las plantillas seleccionadas fueron superpuestas y alineadas de forma estructural con nuestras proteínas mutadas. La calidad de los modelos resultantes fue verificada manualmente con Swiss-Pdb Viewer y las figuras fueron realizadas con software POV-Ray 3.7.0 (<http://www.povray.org/download>).

4.5. ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO

Para el análisis inmunofenotípico en los pacientes del H. Reina Sofia (N=10) se incubaron 20 μL de médula ósea en EDTA, durante 10 minutos a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), complejo proteína peridín-clorofil (PerCP) o alofocianina (APC): anti-CD65 (clon 88H7), anti-CD15 (clon HI98), anti-HLADR (clon

L243), anti-CD7 (clon 4H9), anti-CD2(clon S5.2), anti-CD14 (clon MΦP9) , anti-CD19 (clon J3-119), anti-CD117 (clon 104D2), anti-CD56 (clon N901), anti-CD13 (clon L138), anti-CD11b (clon ICRF44), anti-CD38 (clon HB-7), anti-CD34 (clon 8G12) y anti-CD33 (clon WM53), siendo la mayoría de Becton-Dickinson (San Agustín Guadalix, ES). En la **Tabla 11** se detallan los AcMo empleados.

Tras la incubación, las muestras fueron lisadas con cloruro de amonio y resuspendidas en solución salina con fosfato. La adquisición de al menos 30.000 episodios leucémicos se realizó en citómetros de flujo FACScalibur™ o FACSCanto™ II (Becton-Dickinson). El análisis de los datos fenotípicos comparando el diagnóstico y la recaída se realizó mediante los softwares FACSDIVA™ or PAINT-A-GATE Software (Becton-Dickinson).

La expresión del antígeno se clasificó en cada centro como: fuerte (presencia en más del 50% de las células, débil (presencia de 10% al 50% de las células) o negativa (presencia en menos del 10%) para cada uno de los antígenos anteriores. El análisis multidimensional de los inmunofenotipos de diagnóstico y recaída se realizó utilizando las funciones de fusión y cálculo del software Infinicyt (Cytognos SL, Salamanca, España) cuando los archivos citométricos (List-Modes) contenían los marcadores comunes necesarios.

Tabla 11. Relación de AcMo empleados en el estudio

Anticuerpo monoclonal	Tipo de Ig	Clon	Fluorocromo	Proveedor
CD65	IgM	88H7	FITC	Beckman-Coulter
CD15	IgM	HI98	FITC	Becton-Dickinson
HLA-DR	IgG2a	L243	PerCP	Becton-Dickinson
CD7	IgG2a	4H9	FITC	Becton-Dickinson
CD2	IgG2a	S5.2	FITC	Becton-Dickinson
CD14	IgG2b	MΦP9	FITC	Becton-Dickinson
CD19	IgG1	J3-119	PE	Beckman-Coulter
CD117	IgG1	104D2	PE	Becton-Dickinson
CD56	IgG1	N901	PE	Beckman-Coulter
CD13	IgG1	L138	PE	Becton-Dickinson
CD11b	IgG1	IRCF44	PE	Becton-Dickinson
CD38	IgG1	HB-7	PE	Becton-Dickinson
CD34	IgG1	8G12	FITC	Becton-Dickinson
CD33	IgG1	WM53	APC	Becton-Dickinson

4.6. DEFINICIONES

Las definiciones clínicas aplicadas para los análisis estadísticos fueron las definidas por ELN-2017³⁸

-*RC*: Porcentaje de blastos en médula ósea inferior al 5% sobre la celularidad nucleada con normalización de los recuentos hematopoyéticos en sangre periférica, lo que implica un recuento absoluto de neutrófilos $>1.000/\mu\text{l}$ y de plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{L}$ ¹⁹⁹.

-*Recaída de la LAM*: Después de haber alcanzado RC la presencia de $\geq 5\%$ de blastos en médula ósea o reaparición de blastos en sangre periférica o desarrollo de enfermedad extramedular.

-*Supervivencia libre de recaída (SLR)*: Se calcula desde que el paciente alcanza RC hasta que se documenta la reaparición de la enfermedad según los criterios previamente descritos.

-*SG*: Se calcula desde la fecha de diagnóstico de la leucemia hasta la fecha de la última visita o hasta la muerte del paciente, sea ésta por la causa que sea y con independencia del estado de la enfermedad.

-*Supervivencia Libre de Evento (SLE)*: Se calcula desde la fecha que el paciente alcanza RC, hasta la fecha que recae de la enfermedad o fallece o cualquiera de las dos cosas que ocurra en primer lugar.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de variables continuas entre grupos se realizó mediante el estadístico t-Student para variables con una distribución normal o con test no paramétrico U de Mann-Whitney. La homogeneidad de las varianzas para la t-Student se estudió mediante la prueba de Levene. La comparación de variables cualitativas entre grupos se realizó mediante Chi-cuadrado.

La estimación de la SLE, SLR y SG se realizó mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en dichas estimaciones de acuerdo a las distintas variables de agrupación se calcularon con el test de log-rank.

El análisis de supervivencia se completó con un análisis multivariante mediante un modelo de regresión de Cox. Todas las variables con un valor de $P < 0,1$ en el análisis univariante fueron trasladadas al análisis multivariante, junto con aquellas que sin tener dicho valor de P han sido descritas previamente como potenciales variables de valor pronóstico en la LAM. Las variables en las que el número de casos perdidos era mayor al 10% fueron excluidas del estudio multivariante.

En todos los casos el nivel de significación estadística se estableció con un valor de $P < 0,05$. Todos los estudios estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS en su versión 17.0.

5. RESULTADOS

5.1. PERFIL MUTACIONAL AL DIAGNOSTICO DE PACIENTES CON LAM *NPM1^{mut}*, LAM- *CBF* Y LAM-*CEBPA^{dm}*

Mediante secuenciación convencional Sanger encontramos las siguientes mutaciones en las muestras obtenidas en el momento del diagnóstico en los 26 pacientes con LAM de bajo riesgo.

En los 16 pacientes con LAM-*NPM1^{mut}*, encontramos: 3 casos (18.7%), con *DNMT3A^{mut}* [dos casos c. 2645G>A, p. arg882his (R882H) y una nueva mutación c.2705_2706delTC, p.phe902fs (F902fs) (**Figura 29**)]; 2 casos (12.5%) con *IDH1^{mut}* SNP rs11554137 (G105); 2 casos (12.5%), con *IDH2^{mut}* c.419G>A, p. arg140glu (R140Q) y 1 caso (6.2%) con mutación *FLT3-TKD* (c.2503T, ratio:0.18). No se encontraron mutaciones en los genes *NRAS*, *KRAS* y *TP53* en el momento del diagnóstico inicial.

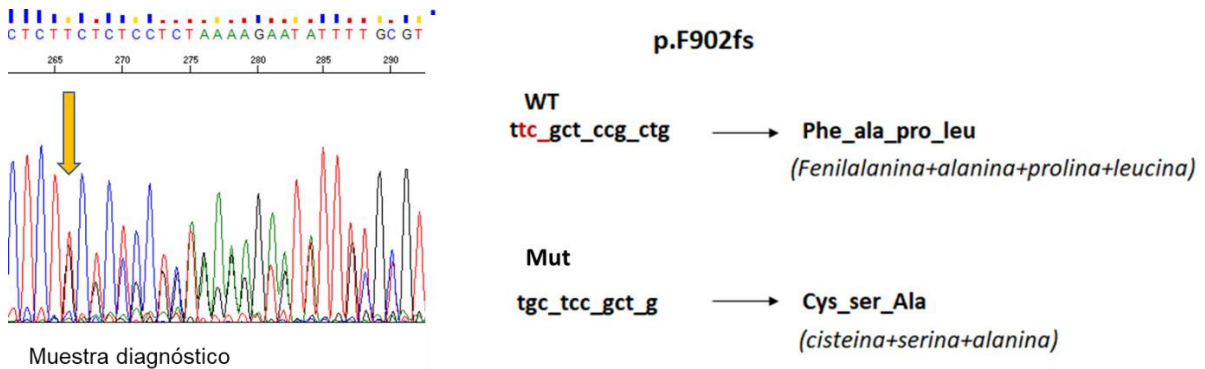


Figura 29. Detección de la mutación p. F902fs en el gen *DNMT3A* mediante secuenciación directa Sanger en el paciente UPN 7 en la muestra del diagnóstico, así como afecta la mutación a la secuencia de aminoácidos.

De los 8 pacientes con LAM-*CBF* se detectó 1 caso (12,5%), con *DNMT3A^{mut}* R882H y 1 caso (12,5%) con mutación *C-KIT* y finalmente no se encontraron mutaciones adicionales en los 2 pacientes con LAM-*CEBPA*.

5.2. PERFIL MUTACIONAL DE LOS CONTROLES CON LAM-*NPM1*

Analizamos la presencia de mutaciones en las muestras de 7 pacientes controles con LAM-*NPM1^{mut}* que permanecen en RC. Encontramos que los pacientes que no recaen, muestran al diagnóstico menos complejidad genética que el grupo de pacientes recaídos, detectando tan sólo un caso (14.3%), con una mutación en *IDH1* c.395G>A, p. arg132his (R132H). sin detectarse ningún caso con *DNMT3A^{mut}* o en el resto de genes

analizados. En la **Figura 30**, se representan los porcentajes comparativos de las mutaciones en los pacientes recaídos del estudio y los controles en RC.

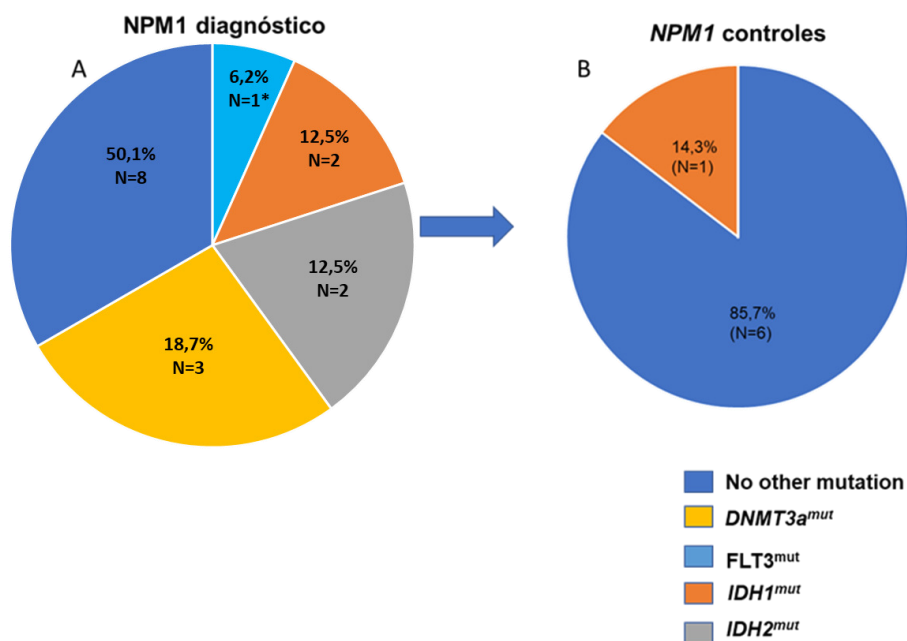


Figura 30. Proporción de mutaciones concurrentes con $NPM1^{mut}$ en el grupo de pacientes que recaen (a) y en el grupo control (b) en el momento del diagnóstico de la LAM *FLT3: RATIO <0.8.

5.3. PATRONES GENÉTICOS A LA RECAÍDA:

Analizamos mediante secuenciación Sanger convencional la presencia de mutaciones en las muestras obtenidas en el momento de la recaída leucémica. Encontramos dos patrones: a) Persistencia de las mismas mutaciones que en el clon diagnóstico (N=20) y b) Cambios en el perfil mutacional con respecto al clon diagnóstico (N=6).

En la **Figura 31** se detallan las mutaciones detectadas en cada paciente al diagnóstico y a la recaída.

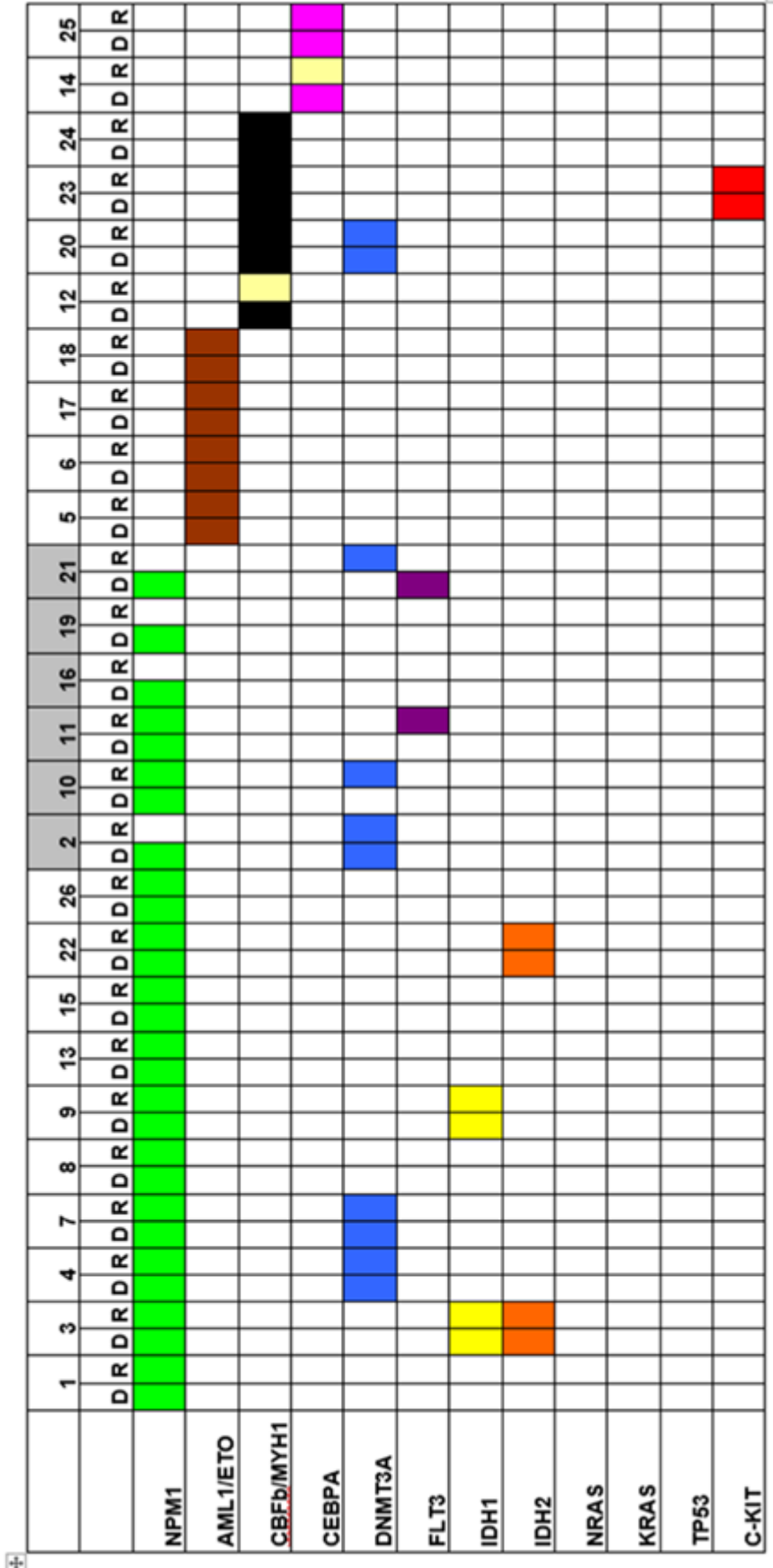


Figura 31. Análisis pareado de las mutaciones en las muestras de diagnóstico (D) y recaída (R) en los 26 pacientes. Cada columna representa a un paciente individual. Las barras coloreadas indican la presencia de mutación, las barras en blanco representan tipo wild type para el gen específico y las barras beige representan datos no disponibles.

5.3.1. Persistencia del clon original

Este patrón se evidenció en 20 pacientes (77%), perteneciendo 10 al grupo LAM-*NPM1^{mut}* (62.5%), 8 al grupo LAM-*CBF* (100%) y 2 al grupo LAM-*CEBPA* (100%).

En los 10 pacientes LAM-*NPM1^{mut}*, las mutaciones tanto en *NPM1*, como en *DNMT3A* e *IDH1/2*, permanecieron estables con la misma variante de la fracción alélica (VAF) y estando presentes tanto en la muestra de la recaída como del diagnóstico. Entre estos pacientes, cabe destacar el paciente UPN 3 que presentó la recaída leucémica más tardía de la serie (a los 21 años del diagnóstico) y detectándose *NPM1^{mut}* junto con las mismas mutaciones de *IDH2* e *IDH1* en ambas muestras.

En los grupos de LAM-*CBF* y LAM-*CEBPA*, tanto las fusiones *RUNX1-RUNX1T* y *CBFB-MYH11*, como las mutaciones en *CEBPA*, así como *DNMT3A* y *C-KIT*, permanecieron estables, sin adquisición de nuevas mutaciones.

La **Figura 32**, representa el caso del paciente UPN 7, con la evolución esquemática (modificada de Ding y cols¹⁶⁹) del curso de la LAM con el comportamiento de las mutaciones detectadas con persistencia del clon original.

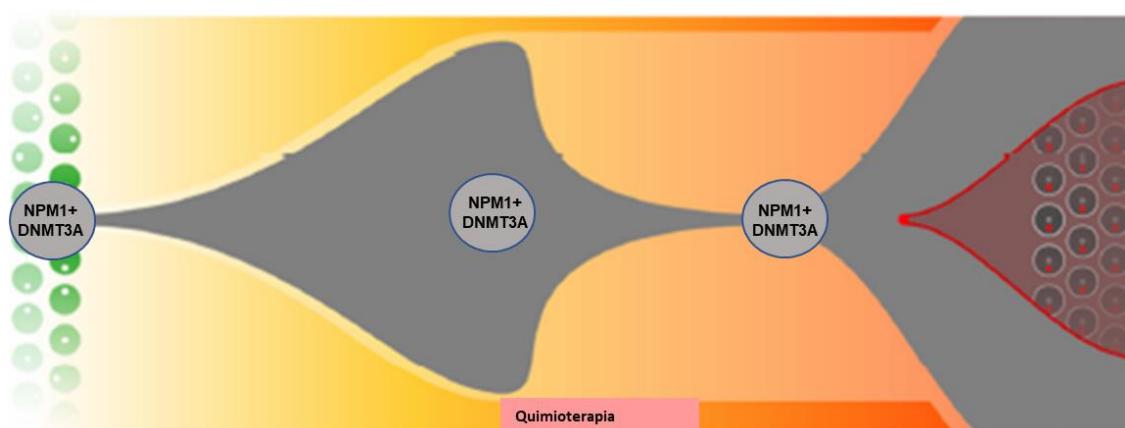


Figura 32. Representación gráfica de la recaída en el paciente UPN 7: la leucemia es provocada por un clon principal con *NPM1* y *DNMT3a* mutados que persiste tras la QT y origina la recaída expandiéndose (no evolución clonal) (Modificado de Ding L, Nature. 2012).

5.3.2. EVOLUCIÓN CLONAL

Este patrón de cambios en el perfil mutacional a la recaída, se evidenció en 6 de los 26 pacientes (23%), todos ellos pertenecientes al grupo LAM-*NPM1^{mut}* (36,5%). Los cambios que se evidenciaron fueron: pérdida de *NPM1^{mut}* en 4 casos, adquisición de *DNMT3A^{mut}* en 2 casos [R882H y una nueva mutación c.2626 G>T, p.asp876tir (D876Y)] y 1 paciente adquirió *FLT3-ITD*. La ausencia inicial de estas mutaciones adquiridas a la recaída (2 *DNMT3A* y 1 *FLT3-ITD*), fue confirmada en las muestras del diagnóstico por

NGS, así como por RT-PCR. La pérdida de mutación *NPM1* a la recaída se confirmó por PCR-Melting (N=1), análisis de fragmentos (N=2) y por NGS= 1) Los hallazgos mutacionales de los pacientes individuales, se detallan a continuación:

- *Paciente UPN 2: NPM1^{mut}* presente en la muestra del diagnóstico, pero ausente en la muestra de la recaída. Además, se detectó tanto en la muestra del diagnóstico como de la recaída, una mutación en el gen *DNMT3a*, la mutación clásica R882H (**Figura 33**).

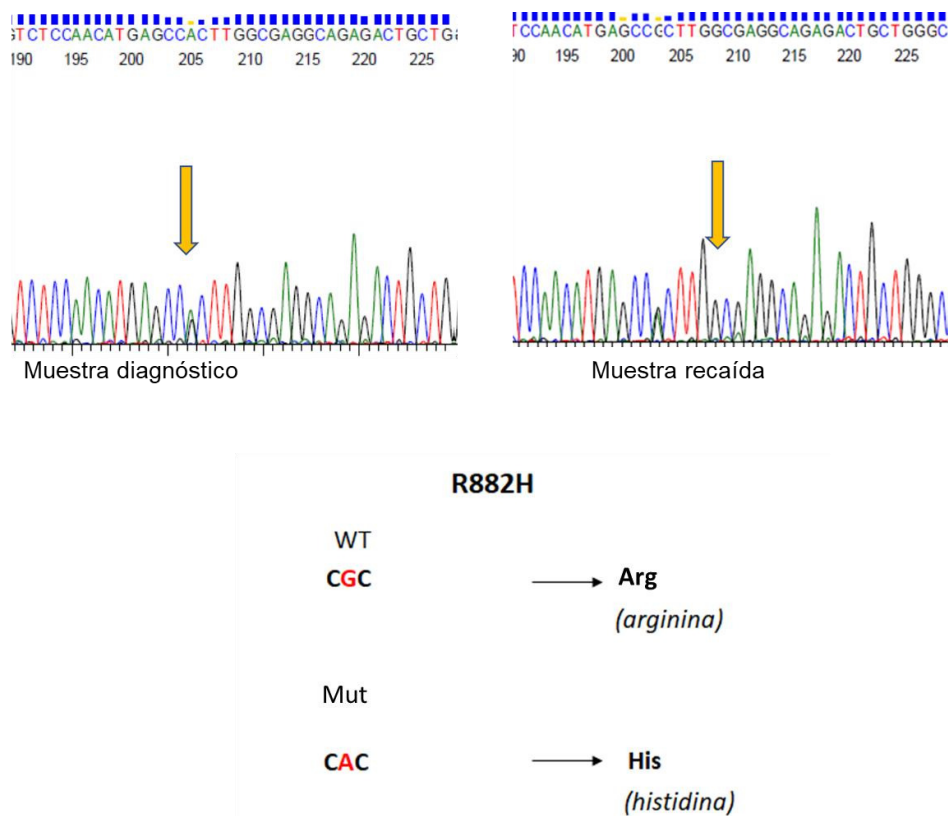


Figura 33. Detección de la mutación R882H en el gen *DNMT3a* mediante secuenciación directa Sanger en el paciente UPN 2 en las muestras del diagnóstico y recaída, así como afecta a la secuencia de aminoácidos.

- *Paciente UPN 10: NPM1^{mut}* presente tanto en la muestra del diagnóstico como de la recaída. Se detectó en la muestra de la recaída una mutación en el gen *DNMT3A*, una mutación nueva hasta ahora no reportada en la bibliografía, D876Y. Esta mutación sólo se encontró en la muestra de la recaída, analizando la muestra del diagnóstico tanto por secuenciación directa Sanger como por NGS, sin detectarla (VAF: 0 a 48.4%) (**Figura 34**).

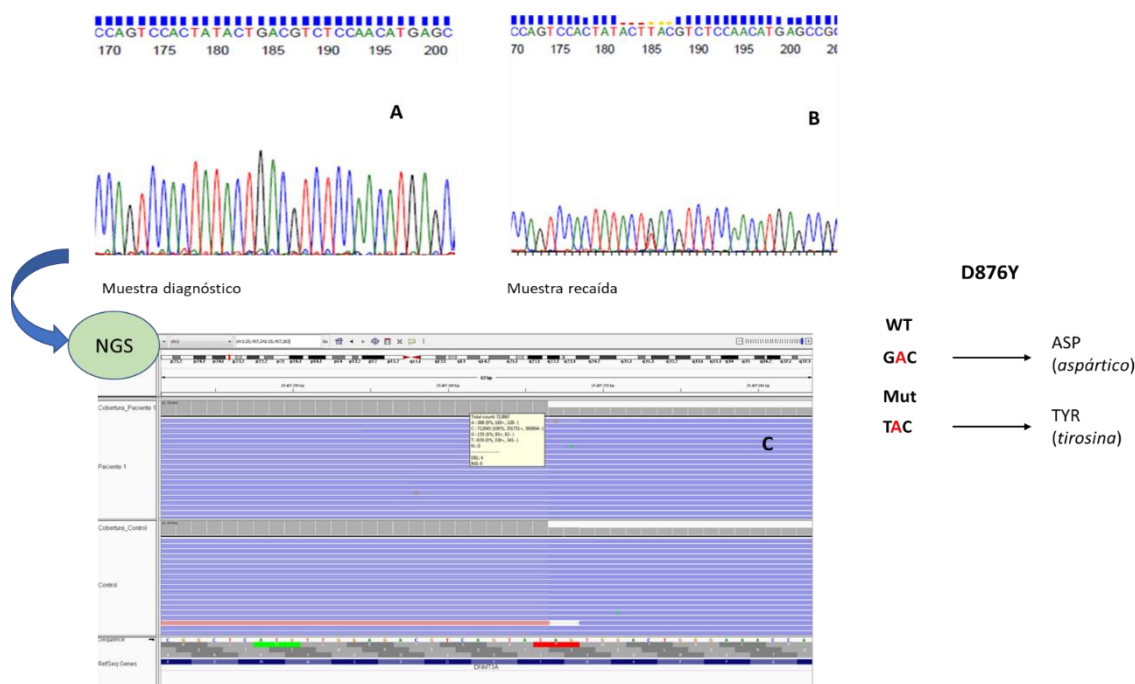


Figura 34. Detección de la mutación D876Y en *DNMT3a*. A). No se detecta la mutación en la muestra del diagnóstico mediante Sanger. B). Se detecta la mutación en la muestra de la recaída mediante Sanger. C). Al realizar el análisis mediante NGS, no se detecta la mutación.

- *Paciente UPN 11*: *NPM1^{mut}* presente tanto en la muestra del diagnóstico como de la recaída. Además, se detectó una mutación en *FLT3-ITD*, solo en la muestra de la recaída.
- *Paciente UPN 16*: *NPM1^{mut}* presente sólo en la muestra del diagnóstico. No se detectó en la muestra de la recaída. No se detectó ninguna mutación adicional.
- *Paciente UPN 19*: *NPM1^{mut}* presente sólo en la muestra del diagnóstico. No se detectó en la muestra de la recaída. No se detectó ninguna mutación adicional.
- *Paciente UPN 21*: *NPM1^{mut}* presente sólo en la muestra del diagnóstico. No se detectó en la muestra de la recaída. Además, se detectó una mutación en *FLT3-TKD*, (ratio alélica <0.18) en la muestra del diagnóstico, pero no en la de la recaída y una mutación en el gen *DNMT3A*, R882H (VAF: 7.1 % a 49.1%). Ambas muestras, se analizaron por Sanger y por NGS.

La **Figura 35**, representa el caso del paciente UPN 10, con la evolución esquemática (modificada de Ding y cols¹⁶⁹) del curso de la LAM con el comportamiento de las mutaciones detectadas con evolución clonal.

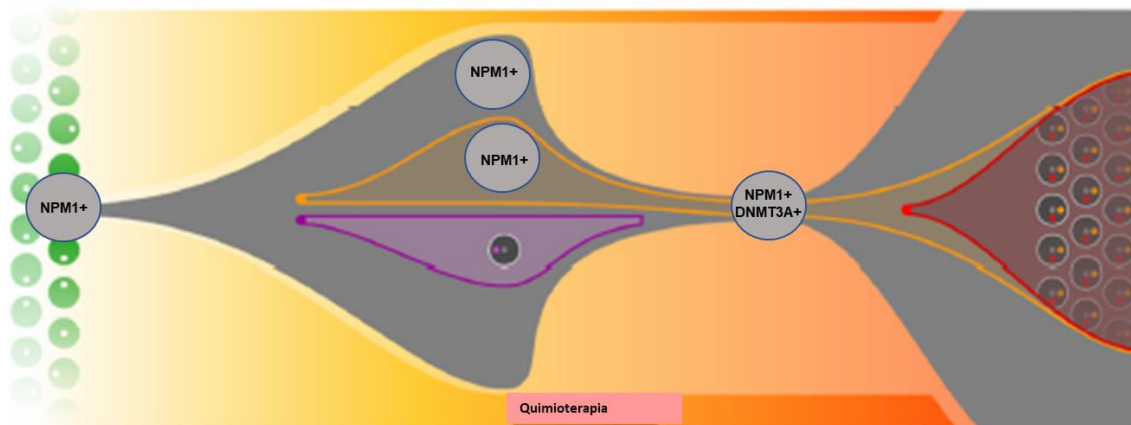


Figura 35. Representación gráfica de la recaída en el paciente UPN 10: la leucemia es provocada por un clon principal con NPM1 mutado. La recaída es provocada por un nuevo clon, con NPM1^{mut} y adquisición de una nueva mutación en el gen DNMT3a (evolución clonal) (Modificado de Ding L. Nature. 2012)

5.4. ANALISIS DE PIROSECUENCIACIÓN Y MODELADO DE LAS NUEVAS MUTACIONES EN *DNMT3A*

En el estudio mutacional de nuestra serie hallamos dos mutaciones nuevas no reportadas previamente y que no figuraban en la base de SNPs, en el gen *DNMT3A* (c. p. F902fs del paciente UPN 7 y D876Y del paciente UPN 10). Decidimos demostrar mediante análisis cuantitativo de pirosecuenciación, que éstas se relacionaban con el clon tumoral y no se detectaban en las muestras de RC del paciente ni en muestras de controles sanos.

Analizamos la presencia de ambas mutaciones mediante pirosecuenciación en muestras de pacientes a la RC (confirmada por morfología, CFM y RT-PCR) obtenidas previo al trasplante y en muestra de sangre periférica de donante sano. Nuestros resultados mostraban que ninguna de las mutaciones se encontraba presentes ni en las muestras en RC de ambos pacientes ni en el sujeto sano (**Figura 36**).

Como aproximación a la relevancia biológica que podrían tener ambas mutaciones sobre la función de *DNMT3A*, construimos un modelo 3D *in silico* de la proteína normal, uno resultante de la mutación D876Y (mutante 1) y otro resultante de la mutación F902fs (mutante 2). Como se puede ver en las **Figuras 37 y 38**, ambas mutaciones ocurren en el C-terminal, lejos del centro activo. En el caso de la mutación D876Y se trata de un cambio de un aminoácido aromático, por uno menos complejo, no alterando la estructura terciaria de la proteína. Sin embargo, de la mutación F902fs, el aminoácido que se introduce es una cisteína, que tiene carga negativa, interaccionando con otras cisteínas, pudiendo agregarse entre sí. Esto dificultaría su salida del retículo

endoplásmico, no pudiendo ejercer su función, y como consecuencia podría implicar una disminución de la actividad de metilación del ADN.

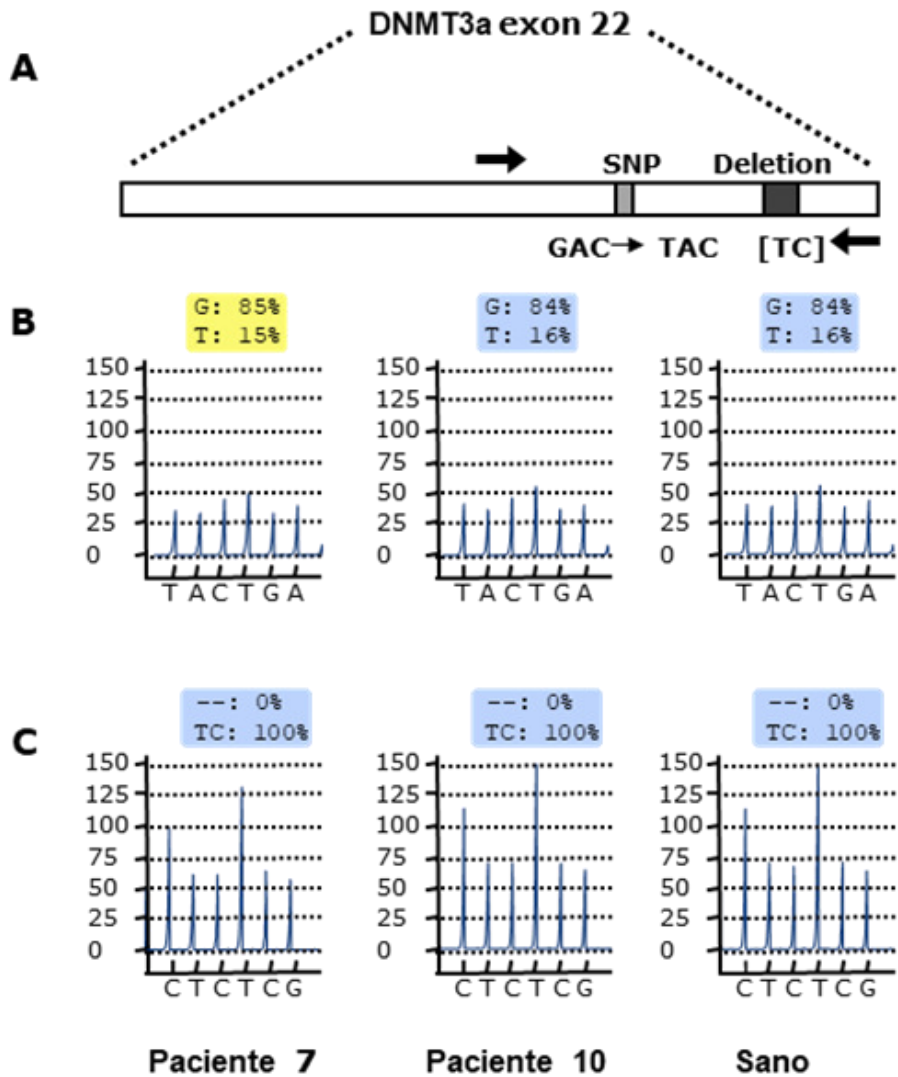


Figura 36. Análisis de la variación de la secuencia en el exón 22 del gen *DNMT3a* de los pacientes 7 y 10 por análisis de pirosecuenciación. A). Mapa del exón 22 del gen *DNMT3a* mostrando las regiones analizadas (flechas negras) de la sustitución c.2626 G>T y delección c. 2705_2706delTC respectivamente. B). Determinación de la frecuencia alélica del polimorfismo de un único nucleótido c.2626 G>T. C). Análisis del porcentaje de la delección c.2705_2706delTC.

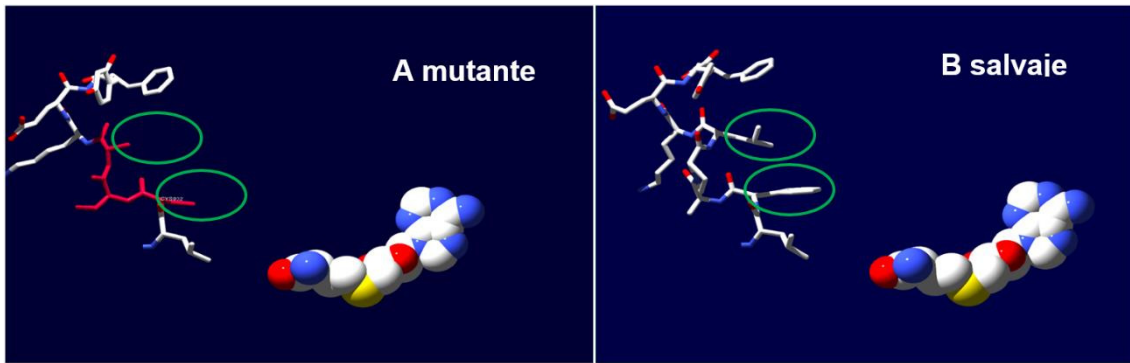


Figura 37. Modelos tridimensionales para las proteínas *DNMT3A* mutantes. La línea roja señala el lugar de las mutaciones y los círculos verdes la sustitución de los aminoácidos más complejos por otros más simples.

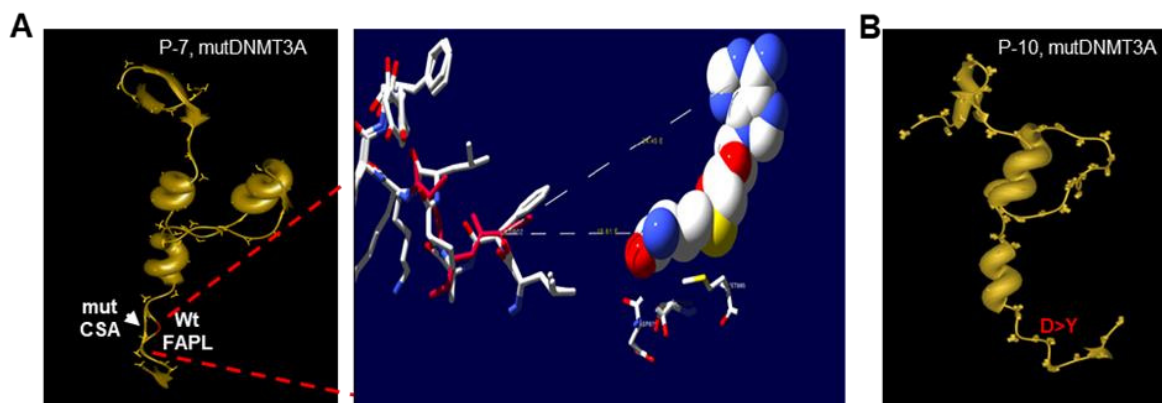


Figura 38. Modelos tridimensionales para las proteínas *DNMT3a* mutantes. La secuencia de aminoácidos del *DNMT3a* mutado se comparó con las secuencias de tipo wild type del Banco de Datos de Proteínas. A) La eliminación de dos nucleobases en el ADN introdujo pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos (izquierda) aunque lejos del lado activo (centro). B) Los cambios en una nucleobase producen una sustitución de aminoácidos y alteración no secuencial fueron encontrados en superposición 3D.

5.5. PERFIL FENOTÍPICO AL DIAGNOSTICO DE LOS PACIENTES LAM *NPM1^{mut}*, LAM-*CBF* Y LAM-*CEBPA^{dm}*

El análisis fenotípico por CMF fue evaluado en todas las muestras en el momento del diagnóstico. La mayoría de los pacientes con LAM-*NPM1^{mut}* mostraron una fuerte expresión de CD33 y CD13 (93,8% y 62,5% respectivamente) con una fuerte expresión de CD117 y CD34 en 43,8% de los casos y una expresión aberrante de CD56 en 12,5%. Por otro lado, los blastos de LAM-*CBF* tuvieron una expresión de CD117 fuerte en todos los casos, así como CD34 en 87,5% de los casos y expresión de CD56 y CD19 aberrante en el 12,5% de los casos. Por último, ambos pacientes con LAM-*CEBPA* se caracterizaron por una expresión de CD34, CD117, HLA-DR, CD33 y CD13.

5.6. PERFIL FENOTÍPICO DE LOS PACIENTES LAM-*NPM1^{mut}*, LAM-CBF Y LAM-*CEBPA^{dm}* A LA RECAÍDA

Analizando la expresión de los marcadores en cada paciente y comparando su expresión en los momentos del diagnóstico y recaída, se objetivó una estabilidad completa de la expresión de los marcadores en 14 pacientes (53,8%).

Por el contrario, se confirmó la evolución del perfil fenotípico (definida como una modificación significativa de la intensidad en al menos un marcador) en 12 pacientes (46%): 8 de los 16 del grupo *NPM1^{mut}* (50%) y 4 de los 10 del grupo CBF y *CEBPA*. Los cambios más frecuentes fueron en la expresión en CD15 (58.3% de los pacientes), CD117, CD34 y CD56 (41.6%), CD7 y CD13 (33.3%), CD11b, CD4, CD33 y CD14 (25%).

Se objetivó la adquisición de CD34 en la recaída en dos pacientes del grupo *NPM1^{mut}*, así como la adquisición de CD56 en 2 pacientes (1 del grupo *NPM1^{mut}* y otro del grupo CBF) y la pérdida de CD56 en 4 pacientes (3 del grupo *NPM1^{mut}* y otro del grupo *CEBPA*) y la adquisición de CD7 en 2 pacientes del grupo *NPM1^{mut}* y la pérdida de CD7 en otros dos pacientes (1 del grupo *NPM1^{mut}* y otro del grupo *CEBPA*) otro del grupo *CEBPA*)

En la **Figura 39** se muestran de forma gráfica los cambios en la expresión de cada paciente diagnóstico/recaída.

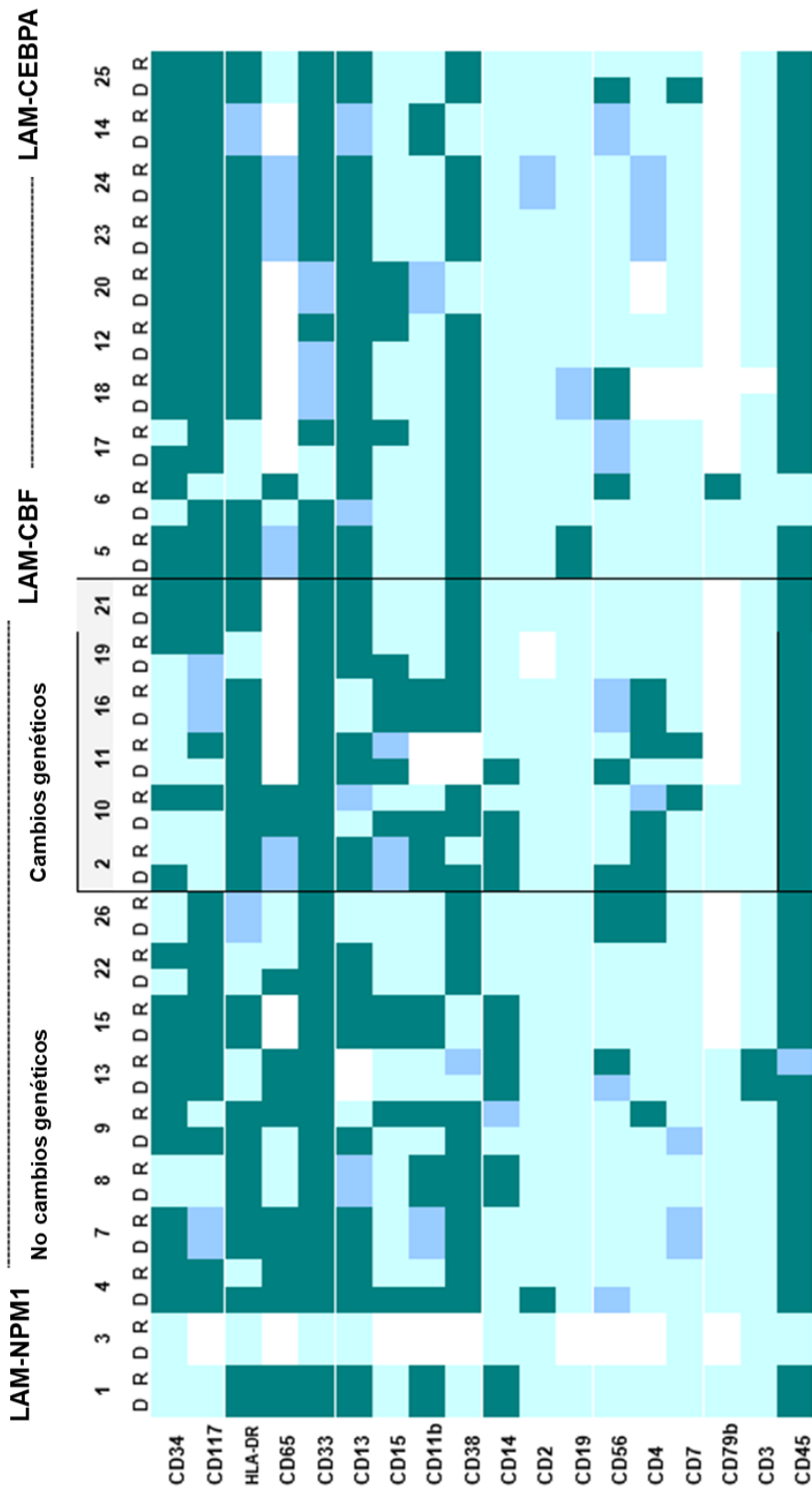


Figura 39: Representación gráfica de los patrones inmunofenotípicos diagnóstico (D)/ recaída (R) de los 26 pacientes. Cada columna representa a un paciente individual. Las barras de color indican una detección fuerte, media y negativa del antígeno CD para cada marcador. Fuerte "significa mayor de 10⁴," tenue "significa entre 10³ y 10⁴" y negativo "significa menor de 10³. Las barras en blanco representan datos no disponibles.

En la **Figura 40** se muestra los cambios de fenotipo diagnóstico/recaída de varios pacientes y en las **Figura 41** el paciente 10 en representación 3D.

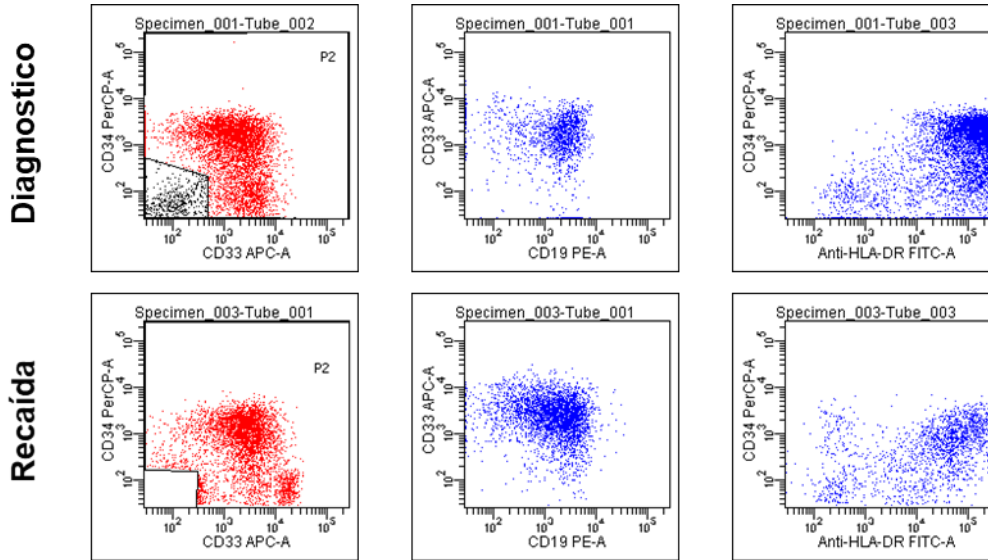


Figura 40a: Paciente UPN 5 RNUX-RUNXT1 No cambios fenotípicos a la recaída

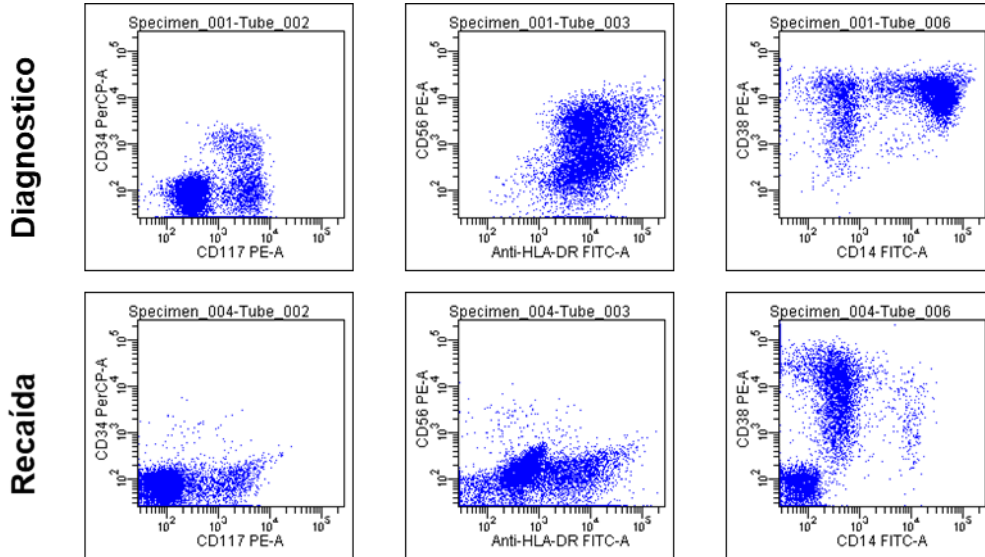


Figura 40b: Paciente UPN 2 NPM1^{mut} Cambios fenotípicos a la recaída con pérdida de expresión de CD34,CD56 y CD14

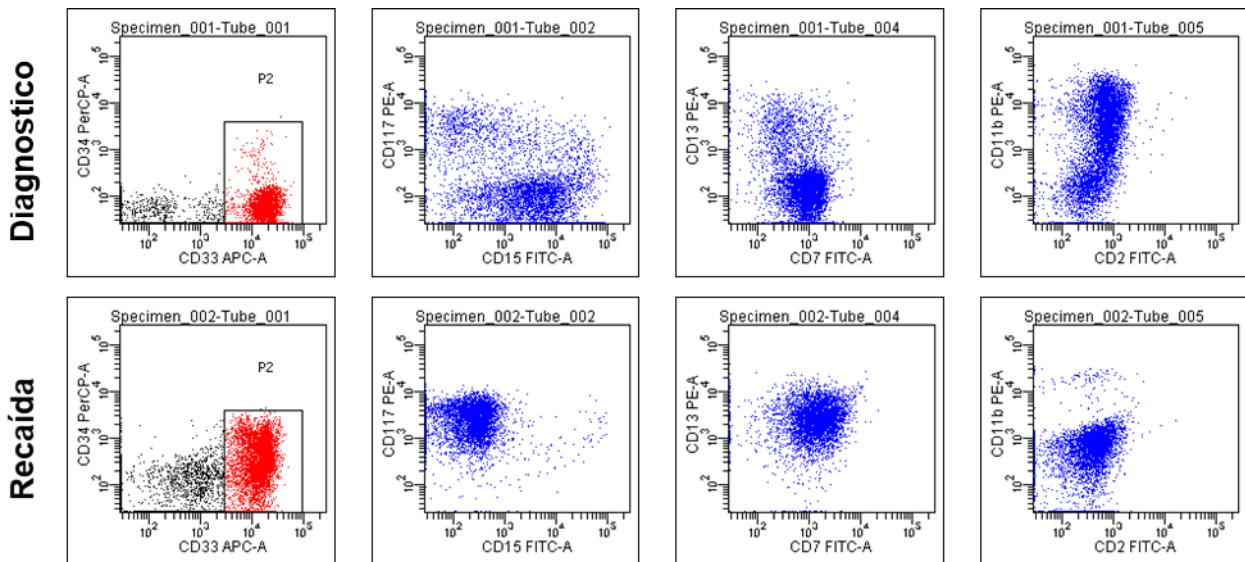


Figura 40c: Paciente UPN 10 NPM1^{mut} Cambios fenotípicos a la recaída con pérdida de expresión de CD15 y CD11b con ganancia de CD7, CD34 y CD117

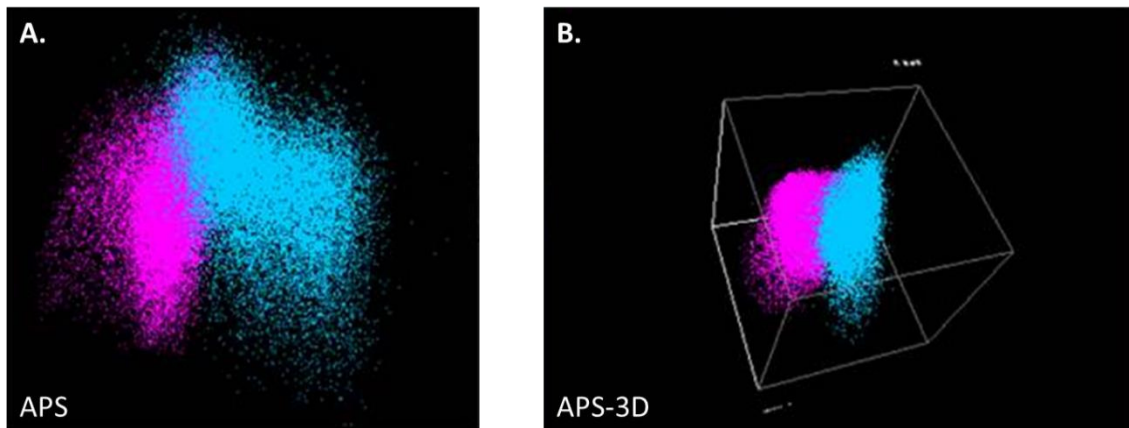


Figura 41: Un caso representativo (paciente UPN 10) de análisis multidimensional del perfil completo del inmunofenotipo utilizando la función de Separador Automático de Población (APS) del software Infinicyt. La población rosada corresponde al diagnóstico y la población azul corresponde a la recaída.

5.7. CORRELACION CAMBIOS FENOTÍPICOS CON CAMBIOS GENOTÍPICOS

De los 6 pacientes en los que se detectó evolución clonal, 4 presentaron también cambios fenotípicos (66.7%), mientras que, en los 20 pacientes con persistencia del clon original, 8 (40%) presentaban cambios fenotípicos, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística ($P=0.3$) (**Figura 42**).

De la serie global, un total de 12 (46.1%) mostraron a la recidiva el mismo perfil mutacional y fenotípico.

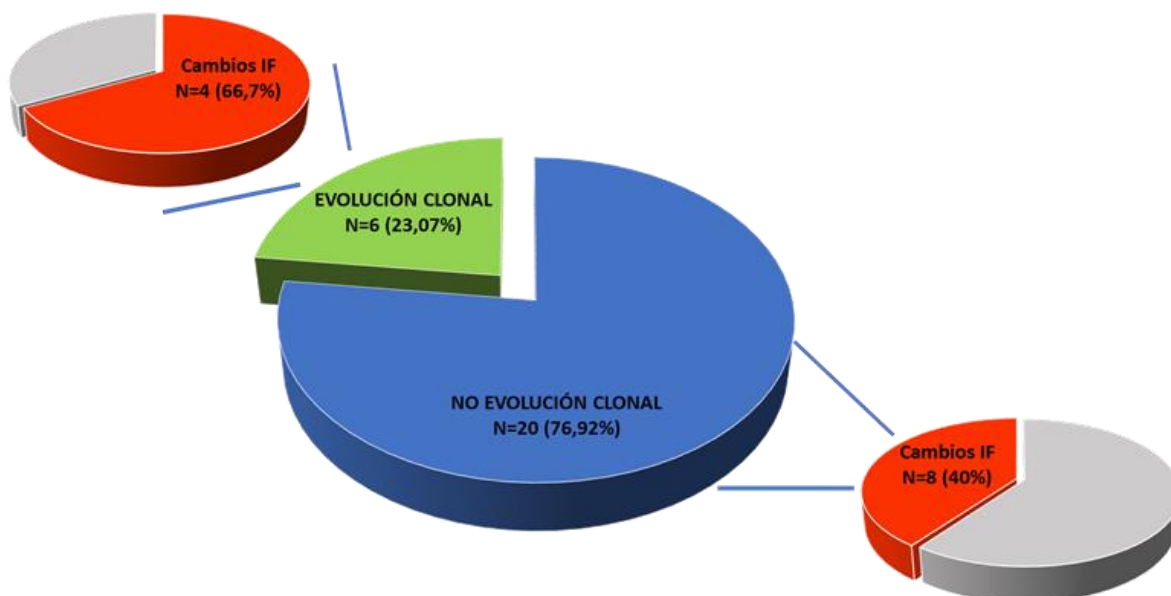


Figura 42: Diagrama de distribución de cambios Inmunofenotípicos en los pacientes con o sin evolución clonal mutacional

5.8. IMPACTO CLINICO DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS A LA RECAÍDA

En el momento del análisis de resultados, 11 pacientes estaban vivos y en RC, con una mediana de seguimiento desde la recaída de 55 meses (rango: 16.3-96.3), siendo la probabilidad de SG de $40,7\% \pm 10$ para la serie global (**Figura 43-A**). El tratamiento de rescate incluyó quimioterapia intensiva y posterior alo-TPH [N=12 (46.1%)] y quimioterapia intensiva y/o azacitidina [N=11 (42.3%)], mientras que 3 pacientes recibieron sólo tratamiento paliativo. Los pacientes que se sometieron a procedimientos de quimioterapia intensiva y posterior Alo-TPH, mostraron una probabilidad de SG significativamente superior ($82.5 \pm 11.3\%$ versus $7.1 \pm 6.9\%$), siendo la media de SG en el grupo que se sometió a Alo-TPH de 83.2 meses (IC 95%: 66.7 a 99.7) y de 11.6 meses (IC 95% 28.1 a 62.0) en el grupo que no se realizó ($P < 0.01$) (**Figura 43-B**).

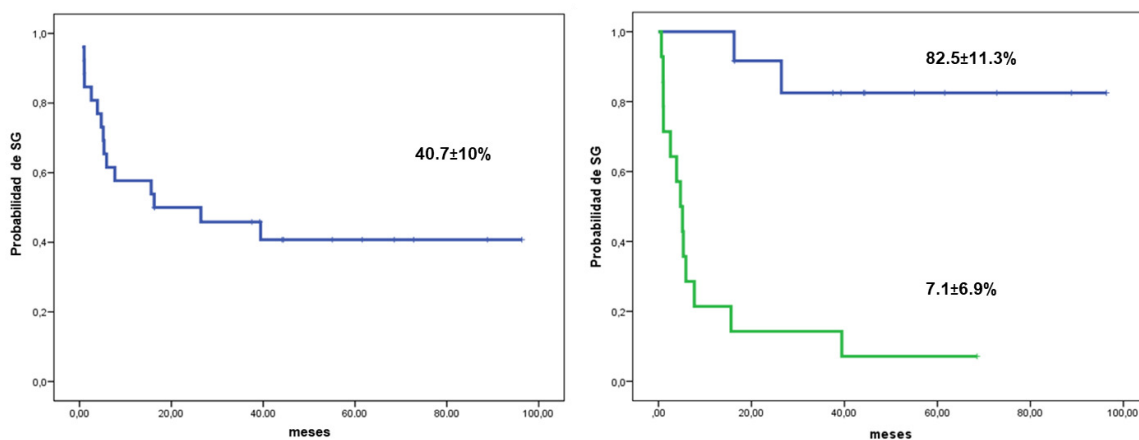


Figura 43A. Supervivencia Global de la serie (N=26); **43B.** Supervivencia Global según Alo-Trasplante tras la recaída (Si, N=12, azul; No, N=14, verde).

5.8.1.- Impacto clínico de los patrones de evolución genética

Analizamos las principales características clínicas y biológicas comparando los pacientes sin evolución clonal (N=20) con los pacientes *NPM1^{mut}* con cambios genéticos (N=6) (**Tabla 12**). El tiempo medio transcurrido entre la RC y recaída fue más corto en los pacientes que mostraron evolución clonal [12,6 meses, rango: 6-67 vs. 18.5 meses (rango: 6-252) ($P=0.236$). Considerando sólo el grupo *NPM1^{mut}* (N=16), el 66.7% (4/6) de los pacientes con evolución clonal se habían sometido a Alo-TPH en primera RC frente al 20% (2/10) en el grupo de evolución no-clonal ($P=0.780$).

Es importante destacar que los pacientes con LAM sin evolución clonal en la recaída tuvieron una SG estimada significativamente mejor en comparación con el grupo que si mostraron evolución clonal ($48.5 \pm 11.5\%$ vs. $16.7 \pm 15.2\%$, $P=.003$), con un tiempo medio estimado de SG de 53.6 (95%IC: 34.8-72.4) versus 8 meses (95%IC: 0-19.3) respectivamente. Cabe destacar que la probabilidad de SG fue idéntica ($48,5\% \pm 16,3$) para los pacientes con LAM con o sin *NPM1^{mut}* dentro del grupo sin evolución clonal (**Figura 44**).

Tabla 12. Comparación de las características clínicas y biológicas evolución clonal/no evolución clonal

	<i>No evolución clonal</i> N (%)	<i>Evolución clonal</i> N (%)	Valor de P
Número de pacientes	20	6	
Género (Hombre)	11 (55)	2 (33,3)	0.782
Mediana (rango) WBC x10 ⁹ /l	17 (1.49-149)	16.6 (4-145)	0.623
Mediana (rango) blastos MO	63 (32-100)	71 (52-92)	0.125
Genético/molecular			
-CN- <i>NPM1</i> ^{mut}	10 (50)	6 (100)	0.129
-t(8;21)	4 (20)	0	
-inv(16)	4 (20)	0	
-CN- <i>CEBPA</i> ^{dm}	2 (10)	0	
TPH en1 ^o RC			
-Alogénico	6 (30)	4 (66,7)	0.236
-Autólogo	7 (35)	0	
Cambios fenotípicos	8 (40)	4 (66.7)	0.121
Mediana hasta la recaída	18.5 meses(6-252)	12 meses(6-67)	0.236
Alo-TPH tras recaída	11 (55)	1(16.7)	0.235
Probabilidad de SG	48.5±11.5%	16.7±17.9%	0.003
SLE/SLR	36.1±13.6%	16.7±15.2%	0.008

WBC: Leucocitos totales en sangre periférica; MO: médula ósea; CN: cariotipo normal; TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; alo-tph: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; RC: Remisión completa; SG: supervivencia global; SLE: Supervivencia libre de evento; SLR: Supervivencia libre de recaída.

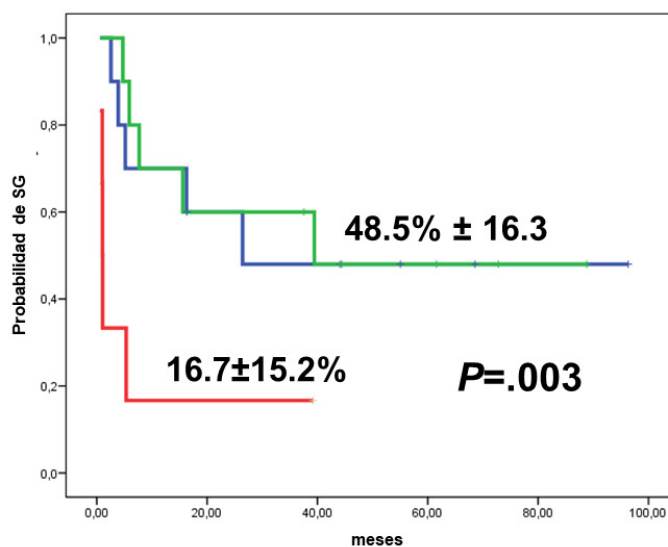


Figura 44. SG según evolución clonal SI/No: el grupo de pacientes que no presentó cambios genotípicos en la recaída tuvo una supervivencia global mejor tras la recaída (48.5±11.5%) que el grupo que si presento cambios genotípicos (16.7±15.2%), $p=.003$. A su vez, la SG fue idéntica (48,5% ± 16,3) para los pacientes con LAM con o sin *NPM1*^{mut} dentro del grupo sin evolución clonal

En el análisis multivariante para SG, sólo la evolución clonal como factor adverso ($P=0.01$) y el ser sometido a Alo-TPH como tratamiento de rescate tras recaída como factor clínico favorable ($P<0.001$) permanecieron con significación estadística. Así, los pacientes con evolución clonal tendrían un riesgo de fallecer de casi cinco veces superior que los pacientes sin evolución clonal, siendo el riesgo un valor comprendido entre 1.43 y 17.43 veces superior, con un error del 5%. Por otro lado, los pacientes sometidos a alo-TPH tras la recaída, tendrían un riesgo de fallecer hasta 16 veces menor, que los que no se sometían a dicho procedimiento, disminuyendo este riesgo entre un valor de 100 y 3.33 con un error del 5% (**Tabla 13**). El resto de variables no alcanzaron significación estadística.

Tabla 13. Análisis multivariable

<i>Variables (categorías)</i>	<i>Supervivencia global</i>		
	Coeficiente Beta (SE)	Hazard ratio (95% IC)	Valor de P
Alo-TPH como tratamiento tras recaída (Si,No)	- 0.28 (.80)	0.06 (0.01 – 0.30)	0.001
Evolución clonal (Si, No)	1.60 (.64)	4.99 (1.43 – 17.43)	0.01
Edad a la recaída, años (Continua)	-	-	0.907
Supervivencia libre de recaída (Continua)	-	-	0.339
Alo-TPH en 1º RC (Si, No)	-	-	0.236
Cambios fenotípicos (Si, No)	-	-	0.242
Subgrupo genético (<i>NPM1</i>^{mut}, CBF,CEBPA)	-	-	0.483

IC: Intervalo de confianza; RC: remisión completa, TPH trasplante de progenitores hematopoyéticos.

5.8.2. Impacto clínico de los patrones de evolución fenotípica

No hubo diferencias estadísticas significativas en las variables clínico/biológicas al diagnóstico comparando los 12 pacientes con estabilidad fenotípica y los 14 con cambios fenotípicos (**Tabla 14**). La probabilidad de SG fue de $33.3\pm 13.6\%$ y 46.9 ± 14.1 para los pacientes con y sin cambios fenotípicos, respectivamente, sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas, siendo la media de 27.5 (IC95%: 9.3 a 45.7) en el grupo con cambios fenotípicos y 53.2 (IC 95%: 30.6 a 75.7) en el grupo sin cambios fenotípicos (**Figura 45A**). Por otro lado, los pacientes que presentaron adquisición o

pérdida de CD7 tuvieron una menor SG frente al resto de pacientes 0% vs 50.4±11.4, siendo la media de 6.1 (IC95%: 0 a 13.1) en el grupo con adquisición/pérdida de CD7 y 54.4 (IC 95%:35.6 a 73.3) en el grupo sin cambios en CD7, P=0.13. Esta peor SG se mantuvo en el grupo con adquisición/pérdida de CD56 frente al resto de pacientes y adquisición de CD34 frente al resto de pacientes, pero sin alcanzar la significación estadística.

Si agrupamos los 12 pacientes que presentan estabilidad fenotípica completa y genotípica a la recaída con los 14 que presentan cambios fenotípicos y/o genotípicos, no entramos diferencias significativas comparando las principales características clínicas (**Tabla 15**). La SG fue de 47.6±15 y 35.7±12.8%, para el grupo estable y grupo con evolución, respectivamente sin alcanzar diferencias significativas, siendo la media 28.8 (IC 95%: 11.6 a 46.1) en el grupo con cambios y 54.7 (IC95%: 31.0 a 78.3) en el grupo sin cambios (**Figura 45B**).

Tabla 14. Características de los pacientes con cambios inmunofenotípicos y sin cambios

	No cambios IF	Cambios IF	Valor P
Total de pacientes	14	12	
Genero (Hombre)	7 (50%)	6 (50%)	P= 0.625
Mediana leucocitos	19,1 (1,4-110)	15 (1,7-149)	P= 0.235
Mediana blastos (MO) (%)	77,5 (32-98)	58 (35-100)	P= 0.241
Citogenetica / molecular			P= 0.122
-CN-NPM1 ^{mut}	8 (57,1%)	8 (66,7%)	
-t(8;21)	2 (14,3%)	2 (16,7%)	
-inv(16)	3 (21,4%)	1 (8,3%)	
-CN-CEBPA ^{dm}	1 (7,1%)	1 (8,3%)	
TPH en 1ºRC (si)	9 (64,3%)	8 (66,7%)	P= 0.235
Mediana meses hasta recaída	19,5 (7—252)	12,5 (6-125)	P= 0.478
SG	46.9±14.1%,	36.4±14.5%	P= 0.234
SLE/SLR	34.1±16	33.3±13.6	P= 0.359

MO: médula ósea; CN: cariotipo normal; RC: remisión completa; TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; SG: supervivencia global. MO: médula ósea; CN: cariotipo normal; RC: remisión completa; TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; SG: supervivencia global, SLE: Supervivencia libre de evento; SLR: Supervivencia libre de recaída

Tabla 15. Características de los pacientes con cambios inmunofenotípicos y genotípicos y sin cambios

	No cambios	Cambios	Valor P
Total de pacientes	12	14	
Genero (Hombre)	6 (50%)	7 (50%)	P= 0.214
Mediana leucocitos	21,4 (1,4-110)	15 (1,70-149)	P= 0.478
Mediana blastos (MO) (%)	77,5 (32-98)	58 (35-100)	P= 0.568
Citogenetic / molecular			P= 0.124
-CN-NPM1 ^{mut}	6 (50%)	10 (71,4%)	
-t(8;21)	2 (16,7%)	2 (14,2%)	
-inv(16)	3 (25%)	1 (7,1%)	
-CN-CEBPA ^{dm}	1 (8,3%)	1 (7,1%)	
TPH en 1^oRC (si)	8 (66,7%)	9 (64,3%)	P= 0.184
Mediana meses hasta recaída	18,5 (7-252)	15,5 (6-125)	P= 0.478
SG	47±15%	38.5±13.5%	P= 0.245
SLE/SLR	35.7±12.8%	31.7±16.4%	P=0.348

MO: médula ósea; CN: cariotipo normal; RC: remisión completa; TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; SG: supervivencia global. MO: médula ósea; CN: cariotipo normal; RC: remisión completa; TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; SG: supervivencia global, SLE: Supervivencia libre de evento; SLR: Supervivencia libre de recaída

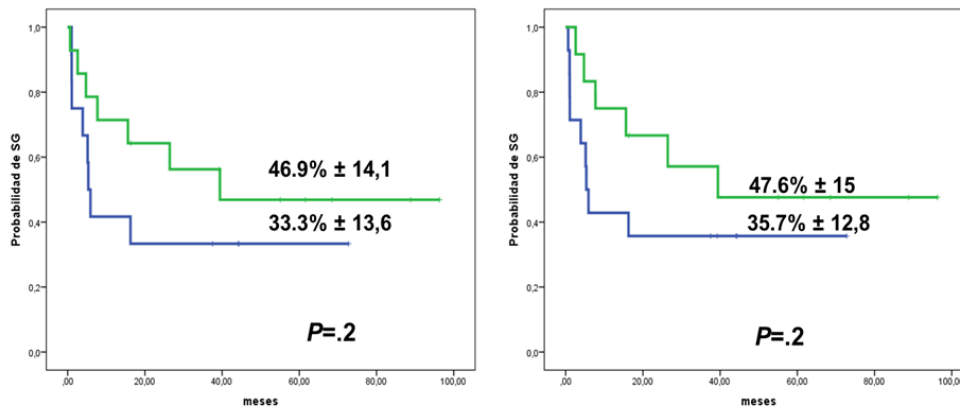


Figura 43. A). La supervivencia global es mayor en el grupo de pacientes sin cambios inmunofenotípicos(49.9±14.1%, verde) que los que presentaron cambios (33.3±13.6%, azul) pero sin alcanzar la significación estadística. B). La supervivencia global es mayor en los pacientes sin cambios inmunofenotípicos/moleculares (47.6±15, verde) que los que presentaron cambios (35.7±12.8%, azul), pero sin alcanzar la significación estadística.

6. DISCUSSION

Las LAM-bajo riesgo citogenético/molecular presentan unas altas tasas de curación, sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes continúan falleciendo como consecuencia de la enfermedad. La principal causa de recaída leucémica es la persistencia de un clon leucémico resistente al tratamiento quimioterápico recibido. Así, la LAM es una enfermedad heterogénea, en la cual existen múltiples clones y subclones que se someten a una competencia evolutiva durante la progresión de la enfermedad, produciendo una jerarquía dentro de cada paciente. Estos clones tienen diferentes susceptibilidades al tratamiento y, por tanto, representarían reservorios importantes durante la recaída de la enfermedad. Por otro lado, las células leucémicas pueden adquirir mutaciones adicionales a la recaída, las cuales podrían contribuir a la selección clonal y a la resistencia a la quimioterapia.

En este estudio hemos abordado el comportamiento clonal genotípico y fenotípico en una serie de 26 pacientes con LAM de bajo riesgo citogenético/molecular que, tras alcanzar la RC tras el tratamiento, presentaron una recaída de la enfermedad. Hemos demostrado el resurgimiento del clon dominante fundador de la LAM, el cual presentaba las mismas mutaciones que se detectaron en el momento del diagnóstico en el 77% de los casos, mientras que, en un 23%, se objetivó una evolución clonal con adquisición o pérdida de mutaciones. Todos los casos con evolución clonal pertenecían al grupo *NPM1^{mut}* y, además, el 66% de ellos mostraron también cambios fenotípicos. Ningún parámetro basal o biológico se relacionó de forma estadísticamente significativa con la evolución clonal en recaída, aunque un alto porcentaje de ellos se había sometido a Alo-TPH en la primera RC. Los pacientes con evolución clonal genética mostraron resultados de SG significativamente peores a los que no la presentaron. Por otro lado, los pacientes sin evolución clonal a la recaída presentaron una probabilidad de SG de alrededor del 50%.

6.1. DIFERENTES PATRONES DE EVOLUCION CLONAL EN LAM DE BAJO RIESGO

En los últimos años diferentes grupos de investigación^{169,174,198} han estudiado la cinética del comportamiento clonal a la recaída LAM mediante estudios genéticos heterogéneos, (WGS, WES, SNPs o Mutaciones genes diana) en muestras pareadas diagnóstico-recaída, identificando dos patrones principales: a) Patrón1 aquellos pacientes en los que la recaída es producida por el propio clon fundador de la LAM que no es completamente erradicado con el tratamiento quimioterápico y, tras adquirir mutaciones, se expande dando lugar a la recaída leucémica, y b) Patrón 2, en el que la

recaída era producida por un subclon minoritario existente en el momento del diagnóstico, que sobrevivía a la terapia inicial, ganaba mutaciones adicionales y se

expandía provocando la recaída. En ambos casos, la quimioterapia era obviamente, insuficiente para erradicar la leucemia. Sin embargo, el porcentaje de pacientes que presentan cada uno de los patrones, difiere notablemente entre los estudios. Así, Ding y cols¹⁶⁹, encontraron un 60% de pacientes con recaída en clon fundador, mientras que Garg y cols¹⁹⁸ en una serie de LAM-*FLT3^{mut}*, encontraron un 40% y Parkin y cols¹⁷⁴ un 100%.

En nuestro estudio de 26 pacientes con LAM de bajo riesgo, y analizando perfil mutacional de genes diana: (*NPM1*, *FLT3*, *C-KIT*, *DNMT3A*, *NRAS*, *KRAS*, *TP53*, *IDH1* e *IDH2*) encontramos 20 de 26 casos (77%) recaen con Patrón 1 de persistencia del mismo clon fundador, mientras que 6 (23%) recaen con cambios genéticos mutacionales sugiriendo el Patrón 2 de expansión de clon minoritario.

Si encontramos diferencias notables en el comportamiento clonal según el grupo de LAM de bajo riesgo, Así, todos los pacientes afectos de LAM-*CBF* y *CEBPA^{dm}* mostraron en su totalidad Patrón 1 de persistencia del clon fundador mientras que los pacientes con LAM-*NPM^{mut}*, 62.5% presentaron Patrón 1 de persistencia del clon fundador, y 37.5% presentaron evolución clonal Patrón 2 (**Tabla 16**).

Tabla 16. Resumen de las principales publicaciones de evolución clonal genotípica.

Referencia, Año	Nº Pacientes	LAM Bajo riesgo	Metodología	Clon Fundador/ Subclon
Ding y cols ¹⁶⁹ , 2012	8	3	WGS	3/5
Parkin y cols ¹⁷⁴ , 2013	28	8	UHR-SNP 6.0 arrays	28/0
Garg y cols ¹⁹⁸ , 2015	13	0	WES	2/5
Krönke y cols ¹⁹⁹ , 2013	51	44	HR-SNP-array profiling and mutation analysis	10/44
Sood y cols ²⁰⁰ , 2016	10	10	WES and SNP arrays	6/4
Martínez-Losada, 2018	26	26	Sanger and NGS	20/6

WGS: Whole-genome-sequencing; UHR: Ultra-high resolution; WES: Whole-exome-sequencing; HR: High-resolution; SNP: single-nucleotide polymorphism, NGS: Next Generation Sequencing.

6.2. PERSISTENCIA DEL CLON FUNDADOR EN LAM-CBF y CEBPA^{dm}

En nuestra serie todos los pacientes afectados de LAM-CBF (N=8) y LAM-CEBPA^{dm} y un 62.5% de los pacientes con LAM-NPM1^{mut} recaen debido a la persistencia del clon leucémico fundador, demostrando la ineffectividad de la quimioterapia para erradicar la célula madre leucémica en estos pacientes.

El comportamiento de la célula madre leucémica (CML) ha sido estudiado por varios grupos. Así, en la LAM se ha evidenciado la existencia de una organización celular jerárquica, ocupando el vértice una pequeña fracción de éstas CML, que persistirían de forma autorrenovable a lo largo de la evolución de la enfermedad, siendo las responsables de mantener la leucemia²⁰¹. Esta idea conceptual de que la leucemia está organizada de manera jerárquica se remonta a estudios realizados para identificar progenitores de LAM clonogénicos in vitro. Shlush²⁰² demostró más tarde que la LAM está organizada de esta manera jerárquica in vivo, siendo similar a la hematopoyesis normal, y siendo repuesta por las CML. Estas CML podrían desplazar a las CMH normales de sus nichos y ser capaces de permanecer inmóviles durante largos períodos de tiempo, como sería en caso del paciente UPN 3 de nuestra serie, el cual recaía con el mismo perfil genético y fenotípico 20 años después de alcanzar la RC. Así, desde una perspectiva clínica, el modelo de CML implica que para erradicar la enfermedad y lograr una cura a largo plazo para los pacientes, el tratamiento también tiene que eliminar esta población residual. Las CML constituyen un reservorio celular neoplásico que probablemente contribuya a la resistencia a la quimioterapia, a la generación de subclones, a la persistencia de enfermedad residual y como consecuencia, a la eventual recaída de la enfermedad y por ello, son un objetivo atractivo para el desarrollo de nuevas terapias anti-leucémicas.

En cuanto a los pacientes con LAM-CBF, presentan estabilidad de los transcritos de fusión RUNX-RUNXT1 y CBFb-MYH11 a lo largo del curso de la enfermedad y por ello, representan buenos marcadores genéticos para la monitorización de la EMR. Pueden asociar mutaciones en otros genes, con más frecuencia en *NRAS*, *C-KIT* o y de forma menos frecuente suelen asociarse a mutaciones epigenéticas²⁰². En nuestro trabajo también hemos demostrado también la estabilidad de las mutaciones acompañantes (*C-KIT* y *DNMT3A*) a lo largo de la enfermedad, detectándose tanto al diagnóstico como a la recaída. Estos hallazgos están en concordancia con los publicados por Sood y cols²⁰⁰, que demuestran que la recaída en LAM-CBF se produce mayoritariamente por el clon fundador que adquiere mayor complejidad genética.

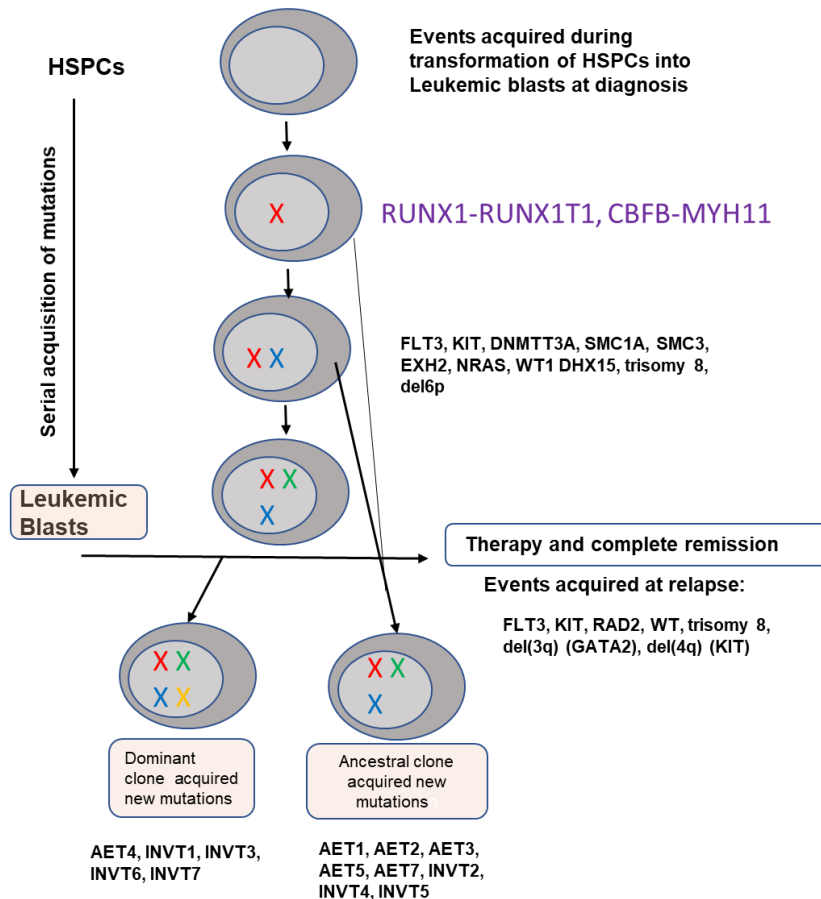


Figura 44. Modelo de evolución clonal en LAM-CBF estimado mediante CNV y SNPs. Las mutaciones están representadas con X de colores, siendo en rojo la mutación inicial. Modificado de Sood y col Leukemia 2016.

En los 2 pacientes incluidos en nuestra serie con mutaciones bialélicas en CEBPA no encontramos mutaciones acompañantes en el diagnóstico ni adquisición de mutaciones nuevas a la recaída.

6.3. PATRON DE EVOLUCION CLONAL EN LAM-*NPM1*^{mut}

En nuestra serie, un 37.5% de las LAM-*NPM1*^{mut} presentó evolución clonal, con cambios en el perfil mutacional de los genes incluidos en el estudio, mientras que el 62.5% mantienen el mismo patrón genético. Estos hallazgos están en concordancia con los resultados de Krönke y cols¹⁹⁹, que analizando perfil mutacional y SNPs arrays en 53 pacientes LAM-*NPM1*^{mut} al diagnóstico y recaída, demuestran que aproximadamente la mitad de los pacientes recaen debido a la persistencia del clon fundador y otra mitad por expansión de clon ancestral minoritario

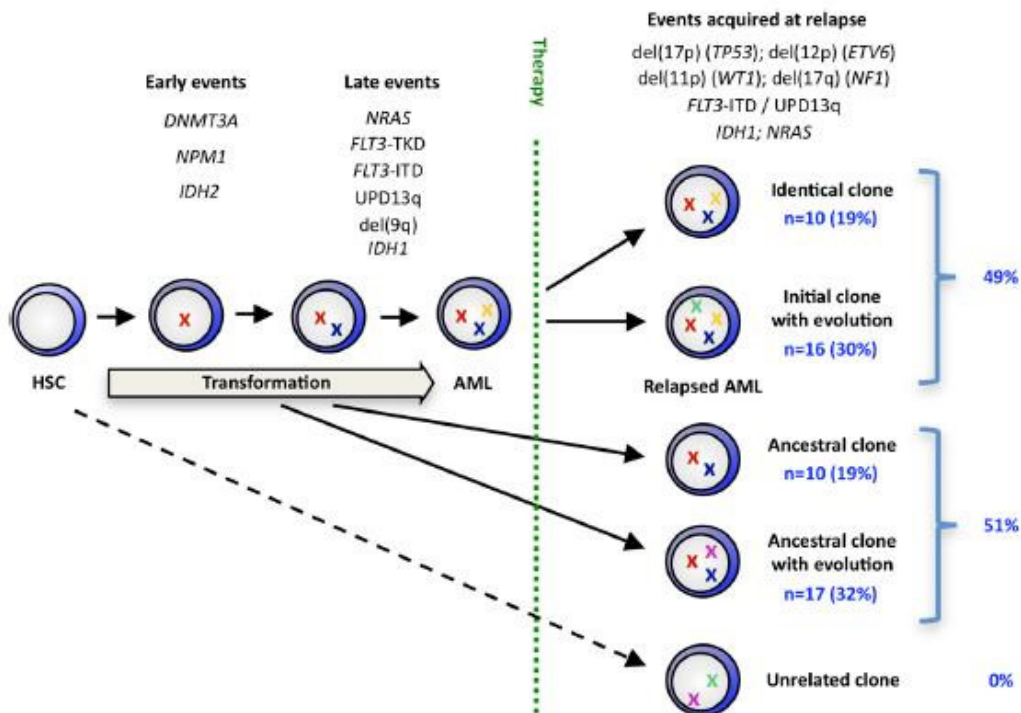


Figura 45. Modelos de evolución clonal en LAM-*NPM1* basado en la estabilidad de marcadores genéticos diagnóstico/recaída. Adaptado de Krönke y cols. Blood 2013)

En nuestra serie, la pérdida de *NPM1*^{mut} en la recaída fue la evolución genética más frecuente (N=4, 25%), seguida por la adquisición de mutaciones en el gen *DNMT3* (N=2) y de *FLT3-ITD* (N=1). Estos hallazgos tienen notables implicaciones biológicas y clínicas.

6.3.1.- Pérdida de *NPM1* a la recaída

Si bien es cierto, que *NPM1* está considerada una de las mutaciones más estables en el transcurso de la LAM, existen trabajos recientes donde, al igual que en nuestra serie, describen la pérdida de *NPM1* en las muestras de recaída. Krönke y cols¹⁹⁹, encontraron pérdida de *NPM1*^{mut} en 5 de 53 pacientes (9.4%). Este hallazgo había sido previamente reportando, ocurriendo en aproximadamente 10% de los pacientes, siendo considerada la recaída como una LAM secundaria no relacionada con la LAM original²⁰³⁻²⁰⁵. Sin embargo, la persistencia de mutaciones en *DNMT3A* al diagnóstico y recaída en los 5 pacientes de la serie de Krönke y en 1 caso de nuestra serie, demuestra que la recaída es debida al mismo clon ancestral. De hecho, más recientemente, Herold y cols²⁰⁶, analizó el comportamiento de *NPM1* en una serie de pacientes que habían desarrollado SMD tras el tratamiento con quimioterapia de LAM-

NPM1^{mut}, detectando en cinco pacientes la pérdida de *NPM1*, pero conservando mutaciones ancestrales comunes.

La explicación biológica de la persistencia de LAM a pesar de la pérdida del evento fundador, se deriva del estudio con modelos de ratones transgénicos con *NPM1*^{mut}, demostrando que, si bien *NPM1* era el promotor del cáncer hematológico, requiere eventos cooperativos para promover la leucemogénesis, siendo insuficiente para generar por sí sólo una leucemia abierta. A su vez, estos eventos cooperativos podrían ser los causantes de la recaída leucémica, incluso en ausencia de la *NPM1*^{62,207}.

La pérdida de *NPM1*^{mut} tiene, además, implicaciones clínicas. Así, las recientes guías ELN-2017 recomiendan la monitorización secuencial de EMR por CMF o RT-qPCR para un marcador genético³⁸, ya que ha demostrado ser clínicamente relevante, tanto para la determinación de la respuesta al tratamiento como para la detección temprana de recaídas. Se ha considerado que *NPM1*^{mut} es estable durante la evolución de la enfermedad y, de hecho, se utiliza como marcador molecular para la EMR por RT-qPCR. Recientemente, se ha demostrado la asociación de la persistencia de transcripciones mutadas en sangre periférica tras la quimioterapia con un significativo mayor riesgo de recaída^{58,208} de tal forma que la monitorización cuantitativa de *NPM1*^{mut} se ha incorporado a las guías más recientes de manejo de LAM-NPM1 para la toma de decisiones terapéuticas de intensificación de tratamiento en casos de persistencia de EMR. Es, por tanto, importante conocer que entre 9-25% de los pacientes pueden presentar recaídas *NPM1* negativas y por tanto la monitorización molecular de EMR para *NPM1* puede beneficiarse de la monitorización simultánea mediante CMF.

6.3.2 Interacción *NPM1* y *DNMT3A*

Hasta un 50% de los pacientes LAM-*NPM1*^{mut} muestran mutaciones en *DNMT3A*^{62,209}, siendo consideradas como eventos previos a *NPM1*. Las mutaciones *DNMT3A* proporcionan una ventaja de repoblación para las CMH, configurándose como clones pre-leucémicos, y sugiriendo que persisten meses o años antes de que se desarrolle LAM-*NPM1*. De hecho, al diagnóstico la frecuencia de la variable alélica del mutante *DNMT3A* es más alta que *NPM1*. Y, además, el análisis de las mutaciones en el momento del diagnóstico y la recaída, reveló que las mutaciones en *DNMT3A* persistían incluso en pacientes que perdieron las mutaciones en *NPM1* en el momento de la recaída, siendo por tanto más estables. Esto confirma las mutaciones en *DNMT3A* como un evento temprano, que probablemente precede a las mutaciones en *NPM1* en la leucemogénesis y persiste en las CMH pre-leucémicas²¹⁰⁻²¹⁵.

Sin embargo, en nuestra serie dos pacientes adquirieron *DNMT3A^{mut}* en la recaída, uno de ellos con pérdida asociada de *NPM1^{mut}*. Esto pone de manifiesto la complejidad cinética de las interacciones de *DNMT3A^{mut}* y *NPM1^{mut}* en pacientes con LAM en recaída. En la serie de Krönke y cols¹⁹⁹, también reportaron que en este modificador epigenético podrían ocurrir nuevas mutaciones, incluso como un "evento tardío". Además de la mutación más conocida, R882H²¹⁶, hemos encontrados dos mutaciones nuevas, D876Y (a la recaída) y p. F902fs (al diagnóstico y recaída), habiendo demostrado in silico el papel que podría tener en la proteína, traducándose en una disminución de la actividad de metilación del ADN y, por tanto, pudiendo estar implicada en la leucemogénesis.

6.4. EVOLUCION FENOTIPICA

En nuestra serie, hemos confirmado la presencia de cambios fenotípicos a la recaída en el 46% de los pacientes (12 de 26, 8 del grupo LAM-*NPM1^{mut}* y 4 del grupo LAM-*CBF*). Los pacientes que mostraron evolución clonal a la recaída presentaron con más frecuencia cambios fenotípicos (67% vs 40%).

Numerosos estudios han demostrado que los cambios fenotípicos en los blastos de LAM a la recaída son frecuentes, aunque los porcentajes varían (10-80%) según la metodología empleada y puntos de corte.

La evolución fenotípica tiene implicaciones clínicas y biológicas. Desde el punto de vista clínico, el seguimiento de EMR mediante CMF puede estar dificultado por el porcentaje de cambios fenotípicos observados. La mayoría de los centros realizan EMR empleando un panel amplio de AcMns para evitar los falsos negativos provocados por los cambios en el fenotipo del diagnóstico, de tal forma que se detectan y reportan como positivas todas aquellas combinaciones fenotípicas que son consideradas aberrantes independientemente de si estaban presentes o no al diagnóstico. En nuestra serie de LAM de bajo riesgo, la monitorización de EMR se realiza mediante RT-PCR cuantitativa de transcritos de fusión *RUNX1-RUNX1T1*, *CBF β -MYH11* o *NPM1^{mut}* siendo los primeros muy estables. Sin embargo, como se ha comentado la pérdida de *NPM1* puede ocurrir 10-25% de pacientes y en nuestra serie esta evolución clonal conlleva también fenómenos de cambios fenotípicos hasta en un 67% de los pacientes.

Las implicaciones biológicas de los cambios fenotípicos vienen determinadas por su potencial relación con los cambios genéticos. Hipotéticamente los cambios en el perfil genómico a la recaída, independientemente del tipo de patrón de evolución clonal,

provocarían modulación en la expresión antigénica. Algunos estudios, además de identificar los cambios fenotípicos han intentado correlacionarlos con los cambios a nivel citogenético, sin alcanzar significación estadística en la mayoría de los estudios. Del mismo modo nuestros resultados tampoco pueden confirmar de forma estadísticamente significativa la asociación de cambios mutacionales con cambios fenotípicos (**Figura 17**).

Tabla 17. Resumen de las principales publicaciones de evolución clonal fenotípica

Grupo	Nºpacientes	Bajo riesgo	Cambios Fenotipo SI/NO	Cambios Cariotipo SI/NO
Baer 2001¹⁷⁹	136	ND	12/124	32/40
Langebrake 2005¹⁸²	48	ND	6/42	ND
Voskova 2010¹⁸³	49	ND	27/22	39/10
Cui 2013¹⁸⁰	48	5	35/12	14/34
Zeijlemaker2014¹⁸¹	33	ND	19/14	ND
Yébenes 2016¹⁸⁴	41	13	18/23	16/9
Martinez-Losada 2018	26	26	12/14	ND

En nuestra serie, un total de 12 pacientes (46.1%) recaen con el mismo fenotipo y perfil mutacional, 8 solamente con cambios fenotípicos, 2 solamente con cambios mutacionales y 4 con cambios fenotípicos y genotípicos. Todos estos hallazgos configuran un perfil de evolución clonal compleja que hacen de la LAM una diana terapéutica y de seguimiento de EMR en “continuo movimiento”.

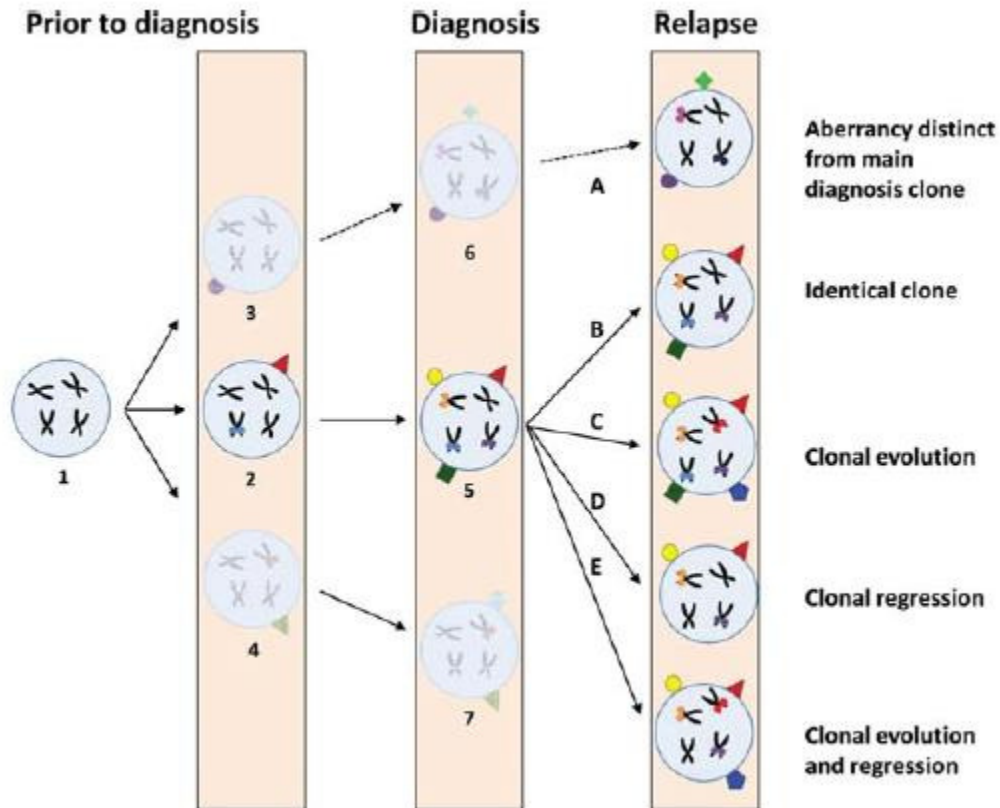


Figura 46: Posibilidades de dinámica de evolución genética y fenotípica en LAM: Cada color en cromosomas representa una mutación y cada color en superficie un antígeno fenotípico. Adaptado de Zeijlemaker y cols. Cyt Part B 2014.

6.5. IMPACTO PRONOSTICO DEL PATRON DE EVOLUCION CLONAL

La inestabilidad genómica puede desempeñar un papel clave en el desarrollo de la resistencia a la terapia anti-leucémica. Por lo general, después de una recaída, las células leucémicas suelen ser más resistentes a la quimioterapia estándar²¹⁷. Esta resistencia suele estar correlacionada con la adquisición de nuevas mutaciones en caso de recaída. Por lo tanto, varios estudios han demostrado que la progresión cariotípica o molecular en la recaída de la LAM puede predecir un mal pronóstico como factor independiente²¹⁸. Esto se evidencia en nuestro estudio: por un lado, hemos observado que los pacientes que han recaído presentan una mayor complejidad genómica a la hora del diagnóstico al compararlo con los pacientes control (1 sólo paciente en el grupo control, sin recaída, presentaba una mutación en el gen IDH1) y por otro lado, los pacientes con cambios moleculares recaída/ diagnóstico, presentaban una menor tasa de supervivencia $48.5 \pm 11.5\%$ vs. $16.7 \pm 15.2\%$, ($p=.003$) y, además, falleciendo más precozmente, 12.6 meses (6-67 meses) versus 18.5 meses (6-252 meses). La evolución clonal permanece como un factor adverso independiente en el análisis multivariante. Es interesante señalar que en el grupo *NPM1^{mut}* (N=16), el 66,7% de los pacientes que

revelaron evolución clonal se habían sometido a Alo-TPH en primera RC (4 de 6) en comparación con el 20% (2 de 10) dentro del grupo sin evolución clonal. En los estudios genéticos realizados hasta la fecha en LAM en muestras pareadas diagnóstico-recaída (**Tabla 16**) no se había reportado el impacto en la supervivencia de los patrones de evolución clonal. Es interesante mencionar que la SG de los pacientes *NPM1^{mut}* que recaen sin cambios mutacionales, es similar a la reportada para los pacientes LAM-*CBF* en primera recaída por el Intergrupo Frances de LAM²¹⁹.

La presencia de cambios fenotípicos se asocia también a peor supervivencia, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos, refuerzan el concepto de que los cambios mutacionales confieren a las células mecanismos intrínsecos de resistencia, mientras que los cambios fenotípicos podrían ser solamente reflejo de cambios genéticos en algunos casos como, por ejemplo, la activación de genes específicos de línea B como PAX5 característico de LAM-*CBF* con *RUNX1-RUNX1T1*, que provoca la expresión de CD19²²⁰.

6.6. AUSENCIA DE MUTACIONES TP53 Y K/NRAS EN LAM-BAJO RIESGO

Las mutaciones en *TP53* y suele estar asociado a pacientes con LAM con cariotipos complejos o monosomías¹⁶³, siendo muy infrecuente su asociación con *NPM1*, *CEBPA* o *CBF*. Las mutaciones en *TP53* son características de LAM secundarias a quimioterapia previa. En nuestra serie no encontramos mutaciones de *TP53* en las muestras del diagnóstico ni tampoco a la recaída, señalando que la quimioterapia empleada para el tratamiento de LAM de bajo riesgo puede ser insuficiente para eliminar el clon fundador o clones minoritarios emergentes, pero no induce nuevos clones secundarios. *TP53* positivos. En la serie de Krönke y cols¹⁹⁹, solamente en un paciente (2%) se detectó una mutación en *TP53* a la recaída.

Por otro lado, mutaciones en *NRAS* y *KRAS* suelen asociarse con *NPM1⁶³*, y LAM-*CBF* no estando bien definido el posible valor pronóstico. En nuestro trabajo, no hemos encontrado ninguna mutación de la vía RAS en muestras al diagnóstico ni a la recaída.

6.7. LIMITACIONES DE NUESTRO ESTUDIO

Las principales limitaciones de nuestro estudio son: i) naturaleza retrospectiva de casos no consecutivos, ii) el número limitado de casos proporcionados por diferentes instituciones, iii) la heterogeneidad de los tratamientos de primera línea y de recaída. Asimismo, hemos limitado el estudio solamente a los genes más frecuentemente mutados y la metodología de secuenciación convencional y NGS empleada nos aporta una sensibilidad 5-10% lo cual no permite detectar clones minoritarios. Asimismo, no se ha caracterizado completamente la relevancia biológica de las mutaciones nuevas detectadas en el gen *DNMT3A*.

A pesar de estas limitaciones, nuestra serie aporta por primera vez información completa fenotípica, mutacional y pronóstica de los pacientes de riesgo favorable a la recaída, Sin embargo, se necesitan series más grandes con LAM de riesgo favorable uniformemente tratada para confirmar la evolución clonal como un factor de pronóstico adverso independiente.

7. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con LAM de bajo riesgo citogenético/molecular que presentan una recaída de la enfermedad muestran mayor complejidad genética al diagnóstico que los que permanecen en remisión completa.
2. La totalidad de los pacientes con LAM-*CBF* y el 62.5% de los pacientes con LAM-*NPM1^{mut}* recaen por resurgimiento del clon principal que es resistente al tratamiento quimioterápico de primera línea.
3. Hasta un 25% de pacientes afecto de LAM-*NPM1^{mut}* presenta pérdida de *NPM1^{mut}* a la recaída, lo cual puede implicar dificultades en la monitorización molecular de EMR.
4. Las interacciones entre mutaciones en *DNMT3A* y *NPM1* son dinámicas pudiendo ocurrir las mutaciones epigenéticas de forma inicial en la leucemogénesis o aparecer de forma tardía en la recaída.
5. Los pacientes de LAM de bajo riesgo citogenético/molecular con *NPM1^{mut}* que presentan evolución clonal genética en la recaída muestran también con alta frecuencia (66.7%) cambios fenotípicos.
6. Los pacientes de LAM de bajo riesgo citogenético/molecular con *NPM1^{mut}* que presentan evolución clonal genética en la recaída presentan un pronóstico significativamente desfavorable comparado con los pacientes con recaída del mismo clon fundador
7. Los pacientes con LAM de bajo riesgo citogenético/molecular que presentan cambios fenotípicos a la recaída presentan peor supervivencia que los que no muestran cambios fenotípicos, aunque sin alcanzar significación estadística.
8. No hemos encontrado aparición de mutaciones en TP53 a la recaída de LAM de bajo riesgo que sugieran LAM secundaria a quimioterapia.

1. Patients diagnosed with favourable-risk AML who relapse, showed more complex mutational landscape at diagnosis than those who are in sustained complete remission
2. All AML-*CBF* patients and 62.5% of AML-*NPM1^{mut}* patients relapse with reappearance of main founder clone which is resistant to first line chemotherapy schedules.
3. Up to 25% of AML-*NPM1^{mut}* patients show loss of *NPM1^{mut}* at relapse which can hamper molecular monitoring of MRD
4. Interactions between *DNMT3A* and *NPM1* mutations are dynamic and epigenetic modifiers mutations can be acquired either early in leukemogenesis process or later at relapse.
5. AML-*NPM1^{mut}* patients who show clonal evolution at relapse displayed also frequent (66.7%) phenotypic shifts.
6. AML-*NPM1^{mut}* patients who show clonal evolution at relapse harbor significant worse outcome than those relapsing from the same founder clone
7. Favourable-risk AML patients who show phenotypic changes at relapse harbor worse outcome than those without changes, albeit no statistical difference was reached.
8. We have not detected *TP53* mutations acquired at relapse of favourable-risk AML that could have pointed the development of secondary AML:

8. BIBLIOGRAFIA

1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006; 368:1894-907.
2. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG et al: Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005; 23:6285-6295.
3. Butturini A, Gale RP. Causes of leukemia. Newland A (eds). *Haematological Oncology*. 1992; 103-17.
4. Virchow R. Weisses Blut und Milztumoren. *Froriep's Notizen*. 1845; 36:151-156.
5. Bennet JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from supuration of the blood. *Edinburgh Med. Surg J*. 1845; 64:413-423.
6. Ehrlich P, Lazarus A: *Histology of the blood*. Cambridge University Press (UK). 1900.
7. Neumann E. Über myelogene Leukämie. *Berliner Klinische Wochenschrift* 1878; 15:69.
8. P.J. Fialkow, Singer JW, Adamson JW et al. Acute nonlymphocytic leukemia: Heterogeneity of stem cell origin. *Blood*. 1981; 57:1068.
9. Guan Y, Ralph S, Hogge ED. Polyclonal normal hematopoietic progenitors in patients with acute myeloid leukemia, *Exp Hematology*. 2002; 30:721-728.
10. H G Drexler, M Menon, M Klein et al. Correlation of surface marker expression with morphologically and immunologically defined subclasses of acute myeloid leukaemias. *Clin Exp Immunol*. 1986; 65: 363–372.
11. A Macedo, J F San Miguel, M B Vidriales et al. Phenotypic changes in acute myeloid leukaemia: implications in the detection of minimal residual disease. *J Clin Pathol*. 1996; 49: 15–18.
12. Grimwade D, Walker H, Harrison G et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001; 98:1312-20.
13. Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998; 92:2322-2333.

14. Mrózek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, et al: Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2009; 16:64-69.
15. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010; 116:354-65.
16. Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome Aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia, *American Society of Hematology*. 2006; 169-177.
17. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: A Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000; 96:4075-83.
18. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002; 100:4325-36.
19. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008; 358:1909-18.
20. Vardiman JW, Lee Harris N and Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms, *Blood*. 2002; 100:2292-2302.
21. Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, et al. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities. In: *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. (ed. Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J.) World Health Organization. 2008; p. 76-81.
22. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127:2391-2405.
23. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, et al. A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. *Cell*. 2014; 157:369-381.

24. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, et al. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell*. 2014;25: 415-427.
25. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009;113: 3088-3091.
26. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer*. 2009;100: 1343-1346.
27. Hou HA, Lin LI, Chen CY, Tien HF. Reply to 'Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favorable prognosis. *Br J Cancer*. 2009;101: 738-740.
28. Green CL, Koo KK, Hills RK et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. 2010;28:2739-2747.
29. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favourable clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2010;28: 570-577.
30. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011;117: 2469-2475.
31. Schlenk RF, Taskesen E, van Norden Y et al. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood*. 2013;122: 1576-1582.
32. Churpek JE, Godley LA. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128:1800- 1813.
33. Ley TJ, Mardis ER, Ding L et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008; 456:66-72.

34. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009; 361:1058-1066.
35. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012; 366:1079-89.
36. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 368: 2059–2074
37. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 374:2209-21.
38. Döhner H, Estey E, Grimwade D et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017; 26: 129:424-447
39. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? *Blood.* 2014;124:3345-3355
40. Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. MRD in AML: it is time to change the definition of remission. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014;27: 265-271.
41. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010;116: 2295-2303.
42. Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *New Engl Med.* 2005; 352: 254-266.
43. Heath K, Schlenk RF, Habdank M et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favourable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood.* 2005; 106:3740-3746.
44. Schnittger S, Schoch C, Kern W et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favourable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood.* 2005; 106:3733-3739.
45. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and

previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005; 106:3747-3754.

46. Falini B, Sportoletti P, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2009; 21:573-81.

47. Greiner J, Schneider V, Schmitt M et al. Immune responses against the mutated region of cytoplasmatic NPM1 might contribute to the favorable clinical outcome of AML patients with NPM1 mutations (NPM1mut). *Blood*. 2013; 122:1087-8.

48. Foucar K, Anastasi J. Acute myeloid leukemia with recurrent cytogenetic abnormalities. *Am J Clin Pathol*. 2015; 144:6-18.

49. Bhatnagar B, Garzon R. The use of molecular genetics to refine prognosis in acute myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014; 9:148-57.

50. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci*. 2013;22:545–56

51. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*. 2005;7:823–30.

52. Bolli N, Nicoletti I, De Marco MF et al. Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. *Cancer Res*. 2007;67:6230–7.

53. Falini B, Martelli MP, Bolli N et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;108:1999–2005.

54. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1. *Neoplasia*. 2005;106:2854–61.

55. Thiede C, Koch S, Creutzig E et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107:4011–20.

56. Jeon Y, Seo SW, Park S et al. Identification of two novel NPM1 mutations in patients with acute myeloid Leukemia. *Ann Lab Med*. 2013;33:60–4.

57. Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leuk Res.* 2007;31:109–11.
58. Ivey A, Hills RK, Simpson MA et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med.* 2016;374:422–33.
59. Boissel N, Renneville A, Biggio V et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood.* 2005;106:3618–20.
60. Nakagawa M, Kameoka Y, Suzuki R. Nucleophosmin in Acute Myeloigenous Leukemia. *New Engl J Med.* 2005;352:1819–20.
61. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R et al. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res.* 2006;66:3044–50.
62. Heath EM, Chan SM, Minden MD et al. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* 2017; 31: 798-807.
63. Patel JL, Schumacher JA, Frizzell K et al. Coexisting and cooperating mutations in NPM1-mutated acute myeloid leukemia *Leuk Res.* 2017;56:7-12
64. Lin PH, Li HY, Fan SC et al. A targeted next-generation sequencing in the molecular risk stratification of adult acute myeloid leukemia: implications for clinical practice. *Cancer Med.* 2017;6:349-360.
65. Moore MA. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol.* 2005; 33:719-37.
66. Lyman SD. Biology of FLT3 ligand and receptor. *Int J Hematol.* 1995; 62:63-73.
67. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013:220-6.
68. Zhang S, Mantel C, Broxmeyer HE. FLT3 signaling involves tyrosylphosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with GRB2 and SHC in BAF3/FLT3 cells. *J Leukoc Biol.* 1999; 65: 372-380.
69. Lavagna-Sevenier C, Marchetto S, Birnbaum D and Rosnet O. The CBL-related protein CBLB participates in FLT3 and interleukin-7 receptor signal transduction in pro-B cells. *J BiolChem.* 1998; 273: 14962-14967.

70. Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3- tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev.* 2012;6:e8
71. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H and Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene.* 2002; 21: 2555-2563.
72. Griffith J, Black J, Faerman C et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell.* 2004; 13: 169- 178.
74. Mizuki M, Fenski R, Halfter H et al. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the RAS and STAT5 pathways. *Blood.* 2000; 96: 3907-3914.
75. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001; 97: 2434-2439.
76. Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C et al. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002; 100: 3423-3425.
77. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood.* 2005;106:3658-3665.
78. Lim Y, Gondek L, Li L et al. Integration of Hedgehog and mutant FLT3 signaling in myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2015;7:291ra96.
79. Grundler R, Miething C, Thiede C et al. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005; 105: 4792-4799.
80. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood.* 2013; 121:2734- 8.

81. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012; 30:4515-23.
82. Alpermann T, Kern W, Schnittger S et al. Evaluation of the proposed reporting system of the European Leukemia Net and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2013; 37:197-200.
83. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P et al. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukaemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification. *Blood* 2007; 109:431-448.
84. Govedarovic N, Marjanovic G. Frequency and prognostic impact of FLT3-ITD mutation in patients with acute myeloid leukaemia. *J BUON.* 2011; 16:108-11.
85. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favourable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood.* 2005; 106:3740-3746.
86. Tzakos AG, Fokas D, Johannes C et al. Targeting oncogenic protein-protein interactions by diversity-oriented synthesis and combinatorial chemistry approaches. *Molecules.* 2011; 16: 4408-4427.
87. Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1 mutated AML cells. *Blood.* 2015;125:3455-65
88. Renneville A, Roumier C, Biggio V et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia.* 2008; 22:915-931.
89. Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK et al. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 111:5078-5085.
90. Thiede C, Steudel C, Mohr B et al. Analysis of FLT3- activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99:4326-4335.
91. Blau O, Berenstein R, Sindram A, Blau IW. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54:145- 52.

92. Gale RE, Green C, Allen C et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111: 2776-2784.
93. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:107-16.
94. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007; 8:286-98.
95. Hou HA, Kuo YY, Liu CY et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012; 119:559-68.
96. Thol F, Damm F, Lüdeking A et al. Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2889-96.
97. Shah MY, Licht JD. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011; 43:289-290.
98. Walter MJ, Ding L, Shen D et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011; 25:1153-1158
99. Koya J, Kataoka K, Sato T et al. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. *Nat Commun*. 2016;7:109-24.
99. Thol F, Damm F, Lüdeking A et al. Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2889-96.
100. Ribeiro AF, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012; 119:5824-31
101. LaRochelle O, Bertoli S, Vergez F et al. AML patients with DNMT3A exon 23 mutations benefit from idarubicin as compared to daunorubicin? A single center experience. *Oncotarget*. 2011; 2:850-61.
102. Marková J, Michková P, Burčková K et al. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2012; 88:128-35.
103. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J et al.: Age-related clonal hematopoiesis

- associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2488–98.
104. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al.: Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014; 371: 2477–87.
105. Xie M, Lu C, Wang J, et al.: Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* 2014; 20: 1472–8.
106. Heuser M, Thol F and Ganser A. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. *Dtsch Arztebl Int.* 2016; 113: 317–322.
107. Guryanova OA, Shank K, Spitzer B et al. DNMT3A mutations promote anthracycline resistance in acute myeloid leukemia via impaired nucleosome remodeling. *Nat Med.* 2016;22:1488-95.
108. Sun Y, Shen H, Xu T et al. Persistent DNMT3A mutation burden in DNMT3A mutated adult cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients in long-term remission. *Leuk Res.* 2016;49:102-7
109. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016; 128:686-98.
116. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L et al. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2010; 24:1094-6.
117. Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393:555-9.
118. Lu C, Ward PS, Kapoor GS et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012; 483:474-8
119. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010; 18:553-67
120. Gross S, Cairns RA, Minden MD et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med.* 2010; 207:339-44

121. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010; 116:2122-6.
121. Ward PS, Patel J, Wise DR et al. The common feature of leukemia associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010; 17: 225–234.
122. Gross S, Cairns RA, Minden MD et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010; 207:339-44
123. Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 393:555-9.
124. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010; 28:3636-43.
125. Chauhan P.S, Rakhshan I, Singh L.C. et al. Mutation of NPM1 and FLT3 Genes in Acute Myeloid Leukemia and Their Association with Clinical and Immunophenotypic Features *Disease Markers*. 2013;35: 581–588
126. Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*. 2005; 352:254-66.
127. Juncà J, Garcia O, Garcia-Caro M et al. CD34 expression and the outcome of nucleophosmin 1-mutated acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2016 Dec;95(12):1949-1954
128. Zhu HH, Liu YR, Jiang H et al. CD34 expression on bone marrow blasts is a novel predictor of poor prognosis independent of FLT3-ITD in acute myeloid leukemia with the NPM1-mutation. *Leuk Res*. 2013;37:624-30.
129. Ehninger A, Kramer M, Röllig C et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia *Blood Cancer J*. 2014; 13;4:e218.

130. De Propriis MS, Raponi S, Diverio D et al. High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation *Haematologica*. 2011;96:1548-51
131. Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 1997; 24:17-31.
132. Mrozek K, Prior TW, Edwards C et al. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2001;19:2482-2492.
133. Marcucci G. Core binding factor acute myeloid leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2006;4:339-341.
134. Solh M, Yohe S, Weisdorf D and Ustun C. Core-binding factor acute myeloid leukemia.: heterogeneity, monitoring and therapy. *Am J Hematol*. 2014;89:1121-31
135. Sinha, C, Cunningham, LC and Liu P. Core binding factor AML: New prognostic categories and therapeutic opportunities *Semin Hematol*. 2015; 52: 215–222.
136. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:502–513.
137. Mane SM, Meltzer SJ, Gutheil JC et al. RAS gene activation in acute myelogenous leukemia: analysis by in vitro amplification and DNA base sequence determination. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990; 2:71-7
138. Pomeroy EJ, Lee LA, Lee RDW et al. Ras oncogene-independent activation of RALB signaling is a targetable mechanism of escape from NRAS(V12) oncogene addiction in acute myeloid leukemia *Oncogene*. 2017; 36:3263-73.
139. Kong G, Chang YI, Damernsawad A et al. Loss of wild-type Kras promotes activation of all Ras isoforms in oncogenic Kras-induced leukemogenesis. *Leukemia*. 2016; 30:1542-51
140. Zhou JD, Yao DM, Li XX et al. KRAS overexpression independent of RAS mutations confers an adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2017; 8:66087-97

141. Neubauer A, Dodge RK, George SL, Prognostic importance of mutations in the RAS proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia *Blood*. 1994;83:1603-11
142. Ayatollahi H, Shajiei A, Sadeghian MH et al. Prognostic Importance of C-KIT Mutations in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017; 10, 1– 7
143. Heo SK, Noh EK, Kim JY et al. Targeting c-KIT (CD117) by dasatinib and radotinib promotes acute myeloid leukemia cell death *Sci Rep*. 2017 ;7:15278
144. Adriaansen HJ, Boekhorst P.W.A, Hagemeijer A.M et al. Acute Myeloid Leukemia M4 With Bone Marrow Eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) Exhibits a Specific Immunophenotype With CD2 Expression. *Blood*. 1993;93: 3043-3051.
145. Nucifora G. and Rowley J.D. AML and the 8;21 and 3;21 Translocations in Acute and Chronic Myeloid Leukemia *Blood*. 1995; 86: 1-14
146. Ouyang J, Goswami M, Peng J et al. Comparison of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotypic Analysis and Quantitative RT-PCR for the Detection of Minimal Residual Disease of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2016;145:769-777.
147. H. Leroy, C. Roumier, P Huyghe et al. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*. 2005; 19: 329-334.
148. Ohlsson E, Schuster MB, Hasemann M, Porse BT. The multifaceted functions of C/EBP α in normal and malignant haematopoiesis *Leukemia*. 2016; 30:767-75
149. Li H.-Y., Deng D.-H., Huang Y. et al. Favorable prognosis of biallelic CEBPA gene mutations in acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis. *European Journal of Haematology*. 2015;94:439–448.
150. Grossmann V., Haferlach C., Nadarajah N. et al. CEBPA double-mutated acute myeloid leukaemia harbours concomitant molecular mutations in 76.8% of cases with TET2 and GATA2 alterations impacting prognosis. *British Journal of Haematology*. 2013;161:649–658

151. Mannelli F, Ponziani V, Bencini S et al. *CEBPA*–double-mutated acute myeloid leukemia displays a unique phenotypic profile: a reliable screening method and insight into biological features *Haematologica*. 2017; 102:529-540
152. Lin LI, Chen CY, Lin DT et al. Characterization of *CEBPA* mutations in acute myeloid leukemia: most patients with *CEBPA* mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1372–1379.
153. Röhrs S, Scherr M, Romani J et al. CD7 in acute myeloid leukemia: correlation with loss of wild-type *CEBPA*, consequence of epigenetic regulation. *J Hematol Oncol*. 2010; 3:15.
154. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad*. 1996; 93:15335-40.
155. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997; 88:323-31.
156. Lang GA, Iwakuma T, Suh YA et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004, 119:861-872.
157. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV et al. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad*. 1992, 89:7491-95.
158. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*. 1998; 16:3158-3168
159. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R et al: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*. 1996: 271:1744-1747.
160. Petitjean A, Mathe E, Kato S et al. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC *TP53* database. *Hum Mutat*. 2007; 28:622-629.
161. Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004; 119:847-860.
162. Kurosawa M, Okabe M, Kunieda Y et al. Analysis of the p53 gene mutations in acute myelogenous leukemia: the p53 gene mutations associated with a deletion of chromosome 17. *Ann Hematol*. 1995; 71:83-87

163. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012; 119:2114-21.
164. Seifert H, Mohr B, Thiede C et al. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009; 23:656-663
165. Garson OM, Hagemeijer A, Sakurai M et al. *Cancer Genet Cytogenet*. 1989; 15;40:187-202
166. Estey E, Keating MJ, Pierce S, Stass S. *Leukemia*. 1995;9:972-6.
167. Jan M and Majeti R. Clonal Evolution of Acute Leukemia Genomes. *Oncogene*. 2013; 32:135–140
168. Xuehong Zhang, Dekang Lv, Yu Zhang et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia highlighted by latest genome sequencing studies. *Oncotarget*, 2016;7:58586-94
169. Ding L, Ley T, Larson D et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukemia revealed by whole genome sequencing. *Nature*. 2012; 481: 506–510.
170. Adam S. Sperling, Christopher J. Gibson et al. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal hematopoiesis to secondary leukemia *Nat Rev Cancer*. 2017; 17: 5–19
171. Masetti R, Castelli I, Astolfi A et al. Genomic complexity and dynamics of clonal evolution in childhood acute myeloid leukemia studied with whole-exome sequencing *Oncotarget*. 2016; 7: 56746–56757
172. Jan M, Snyder T. Clonal Evolution of Pre-Leukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia *Sci Transl Med*. 2012; 4: 149ra118.
173. Welch J, Ley T, Link D et al. The origin and evolution of mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. 2012; 150: 264–278
174. Parkin B, Ouillet P, Li Y et al. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2013; 121: 369-77.
175. Grimwade D, Ivey A and Brian J. P. Huntly. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016; 127: 29–41.

176. Walter RB, Laszlo GS, Lionberger JM et al. Heterogeneity of Clonal Expansion and Maturation-Linked Mutation Acquisition in Hematopoietic Progenitors in Human Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia*. 2014; 28: 1969–77
177. Tierens A, Bjørklund E, Siitonen S et al. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study. *Br J Haematol*. 2016;174:600-9.
178. Terwijn M, van Putten WL, Kelder A et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol*. 2013;31:3889-97.
179. Baer M, Stewart C, Dodge R et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361) *Blood*. 2001; 7: 11.
180. Cui W, Zhangs D, Cunningham L et al. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *IJLH*. 2014; 36: 636-649
181. Zeijlemaker, J. Gratama W and. Schuurhuis JG. Tumor Heterogeneity Makes AML a “Moving Target” for Detection of Residual Disease Cytometry Part B (Clinical Cytometry). 2014; 8: 3-14
182. Langebrake C, Brinkmann I, Teigler-Schlegel A et al. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;63:1–9.
183. Voskova D, Schoch C, Schnittger S et al. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;62:25– 38.
184. Yébenes M, Serrano J, Martínez Losada C et al. Clinical and biological prognostic factors in relapsed acute myeloid leukemia patients. *Med Clin (Barc)*. 2016; 2;147:185-191.
185. Döhner H, Estey EH, Amadori S et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*. 2010;115:453-74

186. Bennet JM, Catavsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias: French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematology* 1976; 33:451-458.
187. Tan a, Westerman D, Carney D.A et al. Detection of *NPM1* exon 12 mutations and *FLT3* – internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia. *J. Hemat. Oncol.* 2008; 1:10
188. Roti G, Rosati R, Bonasso R et al. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Valid Approach for Identifying *NPM1* Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Mol Diagn.* 2006; 8: 254–259.
189. Willekens C, Blanchet O, Renneville A et al. Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in *RUNX1-RUNX1T1*-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial. *Haematologica.* 2016; 101: 328–335.
190. Kadkol S, Bruno A, Dodge C et al. Comprehensive Analysis of *CBFβ-MYH11* Fusion Transcripts in Acute Myeloid Leukemia by RT-PCR Analysis. *J Mol Diagn.* 2004; 6: 22–27
191. Nakao M, Yokota S, Iwai T et al. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996;10:1911-8.
192. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009 15;25:2078-9
193. Kihara R, Patel K, Barkoh B et al. Diagnostic Testing for *IDH1* and *IDH2* Variants in Acute Myeloid Leukemia *J Mol Diagn.* 2011; 13: 678–686.
194. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia.* 2014;28:1586-95
195. Fabiani E, Falconi G, Fianchi L et al. Clonal evolution in therapy-related neoplasms *Oncotarget.* 2017; 8: 12031–12040.
196. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25:1754-60.
197. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e1157

198. Garg M, Nagata Y, Kanojia D et al. Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse. *Blood*. 2015;126:2491-501.
199. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 122: 100-08
200. R Sood, NF Hansen, FX Donovan et al. Somatic mutational landscape of AML with inv(16) or t(8;21) identifies patterns of clonal evolution in relapse leukemia. *Leukemia* 2016; 30:501–504
201. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2017; 129: 1577-85.
202. Shlush LI, Mitchell A, Heisler L et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*. 2017 6;547:104-08
202. Park SH, Lee HJ, Kim IS et al. Incidences and Prognostic Impact of c-KIT, WT1, CEBPA, and CBL Mutations, and Mutations Associated With Epigenetic Modification in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Multicenter Study in a Korean Population. *Ann Lab Med*. 2015;35:288-97
203. Papadaki C, Dufour A, Seibl M et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol*. 2009;144:517-23
204. Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011;29:2709-16
205. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106:2854-61.
206. Herold S, Sockel K, Sayehli C, et al. Evolution of NPM1-negative therapy-related myelodysplastic syndromes following curative treatment of NPM1-mutant AML. *Leukemia* 2017; 31: 2247-51
207. Vassiliou GS, Cooper JL, Rad R et al. Mutant nucleophosmin and cooperating pathways drive leukemia initiation and progression in mice. *Nat Genet* 2011; 43: 470-75.
208. Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute

Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol* 2017; 35: 185-193.

209. Ley, T.J., Ding, L., Walter, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 363: 2424–33

210. Kunimoto H, Nakajima H. Epigenetic dysregulation of hematopoietic stem cells and preleukemic state. *Int J Hematol*. 2017;106:34-44.

211. Koefler HP, Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia*. 2017;31:534-542.

212. Mayle A, Yang L, Rodriguez B et al. DNMT3A loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood*. 2015;125:629-38.

213. Eriksson A, Lennartsson A, Lehmann S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: Early key events during leukemogenesis. *Exp Hematol*. 2015;43:609-24

214. Debarri H, Lebon D, Roumier C et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association Oncotarget. 2015;6:42345-53.

215. Rothenberg-Thurley M, Amler S, Goerlich D et al. Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017.

216. Lin N, Fu W, Zhao C et al. Biologico-clinical significance of DNMT3A variants expression in acute myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;494:270-77.

217. Vujkovic M, Attiyeh EF, Ries RE et al. Genomic architecture and treatment outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a Children's Oncology Group report. *Blood*. 2017

218. Hackl H, Astanina K, Wieser R. Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017; 10:51.

219. Hospital MA, Prebet T, Bertoli S et al. Core-binding factor acute myeloid leukemia in first relapse: a retrospective study from the French AML Intergroup. *Blood*. 2014;124:1312-9.

220. Ray D, Kwon SY, Tagoh H et al. Lineage-inappropriate PAX5 expression in t(8;21) acute myeloid leukemia requires signaling-mediated abrogation of polycomb repression. *Blood*. 2013;122:759-69.



Clonal genetic evolution at relapse of favorable-risk acute myeloid leukemia with NPM1 mutation is associated with phenotypic changes and worse outcomes

by Carmen Martínez-Losada, Juana Serrano-López, Josefina Serrano-López, Nelida I. Noguera, Eduardo Garza, Liliana Piredda, Serena Lavorgna, María Antonietta Irno Consalvo, Tiziana Ottone, Valentina Alfonso, Juan Ramón Peinado, María Victoria Garcia-Ortiz, Teresa Morales-Ruiz, Andrés Jérez, Ana María Hurtado, Pau Montesinos, José Cervera, Esperanza Such, Marian Ibañez, Amparo Sempere, Miguel Ángel Sanz, Francesco Lo Coco, and Joaquín Sánchez-García

Haematologica 2018 [Epub ahead of print]

*Citation: Carmen Martínez-Losada, Juana Serrano-López, Josefina Serrano-López, Nelida I. Noguera, Eduardo Garza, Liliana Piredda, Serena Lavorgna, María Antonietta Irno Consalvo, Tiziana Ottone, Valentina Alfonso, Juan Ramón Peinado, María Victoria Garcia-Ortiz, Teresa Morales-Ruiz, Andrés Jérez, Ana María Hurtado, Pau Montesinos, José Cervera, Esperanza Such, Marian Ibañez, Amparo Sempere, Miguel Ángel Sanz, Francesco Lo Coco, and Joaquín Sánchez-García. Clonal genetic evolution at relapse of favorable-risk acute myeloid leukemia with NPM1 mutation is associated with phenotypic changes and worse outcomes. Haematologica. 2018; 103:xxx
doi:10.3324/haematol.2018.188433*

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

TITLE: Clonal genetic evolution at relapse of favorable-risk acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation is associated with phenotypic changes and worse outcomes.

AUTHORS: Carmen Martínez-Losada¹, Juana Serrano-López¹, Josefina Serrano-López¹, Nelida I. Noguera^{2,3}, Eduardo Garza⁴, Liliana Piredda², Serena Lavoragna², María Antonietta Irno Consalvo², Tiziana Ottone², Valentina Alfonso², Juan Ramón Peinado⁵, María Victoria García-Ortiz⁶, Teresa Morales-Ruiz⁶, Andrés Jérez⁷, Ana María Hurtado⁷, Pau Montesinos⁸, José Cervera⁸, Esperanza Such⁸, Marian Ibañez⁸, Amparo Sempere⁸, Miguel Ángel Sanz⁸, Francesco Lo-Coco^{2,3}, Joaquín Sánchez-García¹.

FROM: Hematology Department, University Hospital Reina Sofía / Maimonides Biomedical Research Institute of Córdoba (IMIBIC)/University of Córdoba, Córdoba, Spain¹; Department of Biomedicine and Prevention, "Tor Vergata" University, Rome, Italy²; Laboratory of Neuro-OncoHematology, Santa Lucia Foundation, Rome, Italy³; Laboratorios Dr. Moreira, Monterrey, Mexico⁴; Medical Sciences Department, Faculty of Medicine/University of Ciudad Real (UCLM)⁵; Maimónides Biomedical Research Institute of Córdoba (IMIBIC) / University of Córdoba/ Reina Sofia University Hospital, Spain⁶; Haematology Department University Hospital Morales Meseguer-IMIB⁷; Hematology Department, Hospital Universitari I Politècnic La Fe, Valencia, Spain⁸.

Address for correspondence:

Juana Serrano Lopez, PhD.

Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC)

Avda. Menéndez Pidal s/n 14004 Córdoba SPAIN

Phone/Fax number: 34-957-010241

E-mail: juantitolea@yahoo.es

Keywords: favorable-risk AML, relapse, mutations, phenotype, clonal-evolution.

Running title: Clonal evolution at relapse in favorable-risk AML.

Word count: 1500

Tables and figures: 1 table and 2 figures.

Acute myeloid leukemia (AML) is a dynamic disease caused by accumulating somatically acquired driver mutations generating branching competing clones¹. In favorable-risk-AML, high resolution genomic profiling by single-nucleotide-polymorphism-array of paired diagnosis-relapse *NPM1*^{mut} and *CBF* AML samples has revealed increased genomic complexity at relapse but most patients retained founding mutations^{2,3}. Furthermore, it has been extensively reported that phenotypic changes are commonly found at relapse in AML patients. It seems plausible that clonal evolution could be also reflected in the phenotypic-shifts of AML blast cells found at relapse, although the correlation with genetic clonal evolution has not been established^{2,4-7}. The aim of our work is to determine the patterns of genetic clonal evolution occurring from diagnosis to relapse in favorable-risk-AML-patients by tracking the kinetic behavior of most frequent co-mutations in paired samples and correlated with the occurrence of phenotypic-shifts on blast cells and with the clinical outcome.

We included a total of 26 favorable-risk-AML (non-promyelocytic) patients, according to European Leukemia Net (ELN) criteria who relapsed after achieving complete remission (CR). They were treated with the intensive chemotherapy schedules standard at the time of diagnoses and experienced a relapse after a median of 17.5 months (range 4-252) (**Table1**). As controls, we used seven *NPM1*^{mut} AML-patients (median age of 46.7 years, range 22-69) who achieved sustained CR after treatment with a median follow-up of 24 months and no-evidence of leukemia relapse at last follow-up.

Bone marrow-derived genomic DNA was obtained from paired diagnosis-relapse samples. Detailed methods are available in **supplementary material**. At diagnosis, we found: In 16 *NPM1*^{mut} AML-patients: 3 cases with *DNMT3A*^{mut} (18.7%, two R882H and one new mutation c.2705_2706delTC), 2 cases with *IDH1*^{mut} (12.5%), 2 cases with *IDH2*^{mut}(12.5%) and 1 case with *FLT3-TKD*^{mut}(c.2503>T, at low ratio 0.18). No mutations in *RAS* and *TP53* were found. In contrast, 7 non-relapsing *NPM1*^{mut} controls showed less genetic complexity: we only detected one case with *IDH1*^{mut} (14.3%) and no *DNMT3A*^{mut} was detected. For CBF-AML (N= 8) we detected 1 case with *DNMT3A*^{mut} (12.5%) and 1 with *C-KIT*^{mut}(12.5%) and no mutations were found in 2 *CEBPA*-patients. At the time of relapse, two patterns of genetic findings were observed. A pattern of persistence of mutations of the original founding clone (*No clonal evolution*) was found in 20 patients (77%): 10 from *NPM1*^{mut} AML-group (62.5%), 8 from *CBF*-AML(100%) and 2 from *CEBPA*(100%). In 10 *NPM1*^{mut} AML-patients,

IDH^{mut} and *DNMT3A* remained stable with the same variant allelic fraction (VAF) and no acquisition of *TP53*^{mut} was detected. In the *CBF*-AML and *CEBPA* groups, *DNMT3A*^{mut} and *CKIT*^{mut} remained stable at relapse and acquisition of *TP53*^{mut} was not observed (**Fig1a**). Interestingly, a second pattern consisting of changes in gene mutation profile at relapse (*clonal evolution*) was found in the remaining 6 patients(23%), all belonging to *NPM1*^{mut} AML-group (36.5%):loss of *NPM1*^{mut} was confirmed in 4 cases, evolution of *DNMT3A*^{mut} in 2 cases [one R882H (7.1 % to 49.1% of VAF) and one new mutation p.D876Y (0 to 48.4% VAF)], 1 patient acquired *FLT3*-ITD and 1 patient lost previous *FLT3*-TKD^{mut}. Absence of these newly acquired mutations (2 *DNMT3A* and 1 *FLT3*-ITD) in diagnosis samples was confirmed by NGS as well as by RT-PCR(**Fig1a**). By quantitative pyrosequencing analysis we demonstrated that both new *DNMT3A* mutations (c.2705_2706delTC,p.F902fs from patient-7 and c.2626G>T,p.D876Y from patient-10) were only found in leukemic samples and were absent in marrow samples obtained in CR as well as in healthy donor (**Suppl-Fig1**). From *in silico* approach, both mutations could alter normal function of native DNMT3A decreasing the activity of DNA methylation (**Suppl-Fig2**)

For immunophenotypic analyses, at least 30.000 leukemic events were acquired mostly in FACSCalibur or FACSCanto II dual-triple laser flow cytometers and list modes files were analyzed with CELLQUEST™, FACSDIVA™ or PAINT-A-GATE Software(BD,Biosciences). Multidimensional analyses of immunophenotypes obtained at diagnosis and relapse were performed using the File merge and Automatic Population Separator (APS) functions of the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca,Spain). At diagnosis, most of *NPM1*^{mut} AML-patients displayed strong CD33 and CD13 expression (93.8% and 62.5% respectively) with strong CD117 and CD34 expression in 43.8% and aberrant CD56 in 12.5%. *CBF*-AML blast cells expressed strong CD117 in all cases, CD34 in 87.5%, CD56 and aberrant CD19 in 12.5% of cases. At the time of relapse, complete stability in the expression of all markers was observed in 14 patients (53.8%). By contrast, phenotypic profile evolution (defined as a significant intensity modification in at least one marker) was confirmed in 12 patients (46%): 8 out of 16 *NPM1*^{mut} group (50%) and 4 out of 10 no-*NPM1*^{mut} group (40%). More frequently shifted expression was observed in CD15 (58.3% of patients), CD117, CD34 and CD56 (41.6%), CD7 and CD13 (33.3%), CD11b, CD4, CD33 and CD14 (25%) (**Fig1b**). When seeking for the incidence of phenotypic shifts comparing both genetic groups, we found that a significant percentage of patients that showed no-clonal evolution pattern still displayed phenotypic shifts (8 out of 20, 40%) and this percentage was even higher in those showing clonal evolution pattern (4 out of 6, 66.7%), although statistical difference was not reached ($P = .3$). Altogether, 12 (46.1%)

favorable-risk AML patients relapsed maintaining the same mutational and phenotypic profile. A representative case of phenotypic shift is shown in **Supplementary Figure 3**.

Finally, we analyze the impact on outcomes of genetic patterns and phenotypic shifts. At the time of analyses 11 patients were alive and in CR. Median follow-up after leukemia relapse was 55 months (range:16.3-96.3) and OS probability was 40.7%± 10 for the global series (**Fig2a**). Salvage rescue treatment included allo-SCT after re-induction chemotherapy (N=12, 46.1%) and intensive chemotherapy±azacitidine (N=11, 42.3%) whereas 3 patients received only supportive care. Patients who underwent allo-SCT showed a statistical significant better OS probability (82.5 ± 11.3% vs. 7.1± 6.9, $p= <.01$). Median time elapsed from CR to relapse was shorter in patients disclosing clonal evolution [12.6 (6-67) months versus 18.5 (6-252) months] compared to no-clonal evolution group. Considering only *NPM1*^{mut} group (N=16), 66.7% of patients disclosing clonal evolution had undergone allo-SCT at first CR (4 out of 6, 66.7%) compared to 20% (2 out of 10) within no-clonal evolution group (**Suppl-Table1**). Importantly, favorable-risk AML patients with no-clonal evolution at relapse harbored a significantly better estimated OS compared to clonal evolution group (48.5±11.5% vs.16.7±15.2%, $P=.003$) with an estimated OS mean time of 53.6 (95% CI: 34.8;72.4) versus to 8 months (95 CI%: 0;19.3) respectively. Of note, OS probability was identical (48.5% ± 16.3) for AML patients with or without *NPM1*^{mut} within the no-clonal evolution group (figure 2b). In the multivariate analysis, only clonal evolution remained as significant adverse factor and allo-SCT as salvage treatment of relapse as favorable clinical factor (**Suppl-Table2**).

In this study, we have addressed the genotypic and phenotypic clonal behavior in a series of 26 relapsing favorable-risk AML patients. Our study demonstrated that the main scenario for leukemia relapse is the re-emergence of founder clone with no-clonal evolution (77% of cases), albeit 40% of them displayed phenotypic changes. This finding suggests that conventional chemotherapy protocols could be unable to achieve a complete eradication of founder AML clone which is able to regenerate the bulk of leukemic blasts after a variable period of time. This is in agreement with previous reports of genomic profiling studies by SNP-arrays in AML series including all risk-subtypes or *NPM1*^{mut} cases^{2,8} demonstrating increasing genomic complexity at relapse, showed significantly worse outcomes^{2,3} but maintaining a common ancestral founder clone. Our data suggest the persistence of a rare subset of leukemic-stem-cell (LSC) in favorable-risk-AML after achievement of CR. These LSC are capable to remain quiescent for long periods⁹, such as in patient-3 who relapsed with the same genetic and phenotypic profile 20 years after CR achievement. On our series, all CBF-AML showed mutational stability, albeit displaying phenotypic changes in 40% of

cases. By contrast, clonal evolution was present in 36.5% of *NPM1*^{mut} AML and 66% of them displayed also phenotypic shifts. Loss of *NPM1*^{mut} at relapse was the most frequent genetic evolution in our series followed by the acquisition of *DNMT3*^{mut}. Loss of *NPM1* at relapse was confirmed in 4 cases (25% of 16 *NPM1* cases). Three of them had undergone allogeneic SCT at first CR and received Aza and/or CT with dismal outcome. It is plausible to consider these cases as “secondary therapy-related” or “clonally unrelated” AMLs. Importantly, our findings suggest that MRD monitoring can be hampered by frequent phenotypic changes and also by the possibility of *NPM1*^{mut} losses. Therefore, MRD-monitoring by MFC or RT-qPCR for a genetic marker¹¹, can be complementary and parallel monitoring could be quite useful to avoid false-negative MRD results providing useful biological information to trace clonal evolution^{12,13}.

Strikingly, in our series, *DNMT3A*^{mut} evolved in two patients, one of them with concurrent loss of *NPM1*^{mut}. These findings, also in accordance with those reported by Krönke et al²., point out the kinetic complexity of the interactions of *DNMT3A*^{mut} and *NPM1*^{mut} in AML-patients at relapse, where new mutations in this epigenetic modifier occur as a “late event” in some instance^{2,10}.

As conclusion, a comprehensive assessment of genetic and phenotypic features at relapse in favorable-risk AML provides useful biological information and could have important prognostic implications.

ACKNOWLEDGEMENTS: We want to thank Dr. Antonio Martinez-Peinado from Clinical Analysis Department, University Hospital Reina Sofia (Córdoba, Spain) for technical support with Sanger sequencing. We also want to Oskar Martínez from Health in Code Foundation (La Coruña, Spain) for technical support with NGS and Maria Saarela for editing manuscript. This work was supported in part by a fellowship grant from Fundación Alfonso Martín Escudero (Madrid, Spain).

REFERENCES:

1. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506-510.
2. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(1):100-108.
3. Sood R, Hansen NF, Donovan FX, et al. Somatic mutational landscape of AML with inv(16) or t(8;21) identifies patterns of clonal evolution in relapse leukemia. *Leukemia*. 2016;30(2):501-504.
4. Ho TC, LaMere M, Stevens BM, et al. Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. *Blood*. 2016;128(13):1671-1678.
5. Ferrell PB, Jr., Diggins KE, Polikowsky HG, Mohan SR, Seegmiller AC, Irish JM. High-Dimensional Analysis of Acute Myeloid Leukemia Reveals Phenotypic Changes in Persistent Cells during Induction Therapy. *Plos One*. 2016;11(4):e0153207.
6. Cui W, Zhang D, Cunningham MT, Tilzer L. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(6):636-649.
7. Yebenes-Ramirez M, Serrano J, Martinez-Losada MC, Sanchez-Garcia J. Clinical and biological prognostic factors in relapsed acute myeloid leukemia patients. *Med Clin (Bar)*. 2016;147(5):185-191.
8. Parkin B, Ouillette P, Li Y, et al. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2013;121(2):369-377.
9. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1577-1585.

10. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31(4):798-807.
11. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-447.
12. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(7):1482-1490.
13. Getta BM, Devlin SM, Levine RL, et al. Multicolor Flow Cytometry and Multigene Next-Generation Sequencing Are Complementary and Highly Predictive for Relapse in Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(7):1064-1071

Table 1. Clinical and biological data of 26 favourable-risk AML patients.

PT	CENTRE	DIAGNOSIS	AGE	SEX	WBC	Blasts *	FAB	KARYO TYPE	MOLECULAR	TRANSP LANT at 1 st CR	RELAPSE	RFS (days)	ALIVE	OS after relapse	Treatment relapse
1	HURS	1.02.08	47	M	55.5	90	M4	46XY	NPM1 ^{MUT}	AUT	16.10.09	623	Yes	87	ALLO
2	HURS	14.05.11	39	F	145.0	92	M5a	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALLO	16.11.11	186	No	5	AZA
3	HURS	1.05.90	54	F	NA	NA	M2	46XX	NPM1 ^{MUT}	No	10.05.11	7679	No	38	QT
4	HURS	31.10.11	61	F	7.1	58	M2	46XX	NPM1 ^{MUT}	AUT	10.06.13	696	Yes	43	ALLO
5	HURS	31.05.09	47	M	4.9	85	M1	46XY,t(8:21)	RUNX1-RUNXT1	AUT	16.12.10	564	No	26	ALLO
6	HURS	2.11.11	71	M	2.9	53	M2	46XY,t(8:21)	RUNX1-RUNXT1	No	21.05.12	201	No	3	NO
7	HURS	6.03.07	52	F	72.6	80	M2	46XX	NPM1 ^{MUT}	AUT	4.01.08	304	No	7	QT
8	HURS	16.06.07	65	M	69.9	98	M4	46XY	NPM1 ^{MUT}	ALLO	21.07.08	401	No	15	AZA
9	HURS	23.02.09	32	M	15.0	39	M1	46XY	NPM1 ^{MUT}	ALLO	9.09.09	198	No	5	AZA
10	HURS	4.05.12	64	F	61.3	92	M5a	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALLO	10.12.12	220	No	1	NO
11	HPTV	19.08.11	39	M	NA	54	M1	46XY	NPM1 ^{MUT}	No	29.12.11	132	No	1	NO
12	HPTV	10.04.12	28	M	8.8	80	M2	46XY,inv16	CBFb/MYH1	AUT	18.06.13	434	Yes	43	ALLO
13	HPTV	21.1.13	57	M	149.0	35	M1	46XY	NPM1 ^{MUT}	No	2.01.14	365	Yes	36	ALLO
14	HMM	25.02.09	13	F	2.1	75	M1	46XX	CEBPA ^{MUT}	ALLO	26.07.12	1247	Yes	54	2 ND ALLO
15	HMM	13.05.09	46	M	19.1	32	M4	46XY	NPM1 ^{MUT}	AUT	12.01.12	974	Yes	60	ALLO
16	HMM	25.02.12	66	F	16.6	52	M4	46XX	NPM1 ^{MUT}	NO	12.11.13	536	Yes	38	ALLO
17	HMM	10.07.02	65	F	17.0	35	M2	46XY,t(8:21)	RUNX1-RUNXT1	No	09.01.13	183	No	5	QT-AZA
18	HMM	14.05.13	21	M	1.4	58	M2	46XY,t(8:21)	RUNX1-RUNXT1	ALLO	26.12.13	226	No	2	AZA
19	HMM	08.11.13	46	F	14.4	59	M4	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALLO	28.04.15	536	No	1	QT
20	HMM	07.02.14	14	F	77.0	80	M2	46,XX,inv16	CBFb/MYH1	No	30.09.15	600	Yes	16	ALLO
21	HLF	16.06.04	52	M	4	83	M0	46XY	FLT3/NPM1	ALLO	28.01.10	2052	No	0	QT-AZA
22	HLF	12.08.08	32	F	1.7	100	M1	46XX	NPM1 ^{MUT}	ALLO	10.02.11	912	Yes	71	2 ND -3 RD ALLO
23	HLF	14.07.08	37	M	110	55	M4	46XY,inv16	CBFb/MYH1	No	5.03.09	234	Yes	94	ALLO
24	HLF	27.06.09	64	F	14.3	NA	M4	46,XX,inv16	CBFb/MYH1	AUT	17.06.11	720	Yes	67	QT
25	HLF	11.04.11	60	M	110.9	NA	M2	46XY	CEBPA	ALLO	27.05.13	777	No	16	RIC-ALLO
26	HLF	4.04.07	68	F	21.4	63	M4	46XX	NPM1 ^{MUT}	No	12.08.08	496	No	4	QT

PT: patient, HURS: University Hospital Reina Sofía (Córdoba); HPTV: Policlinico di tor Vergata (Roma); HMM: University Hospital Morales Meseguer (Murcia); HLF: University Hospital La Fe (Valencia); M: Male; F: Female; NA: not available; *: Blasts in bone marrow; Mut: Mutated; CR: Complete remission; AUT: Autologous; Allo: Allogeneic; RFS: Relapse free survival; OS: Overall survival.

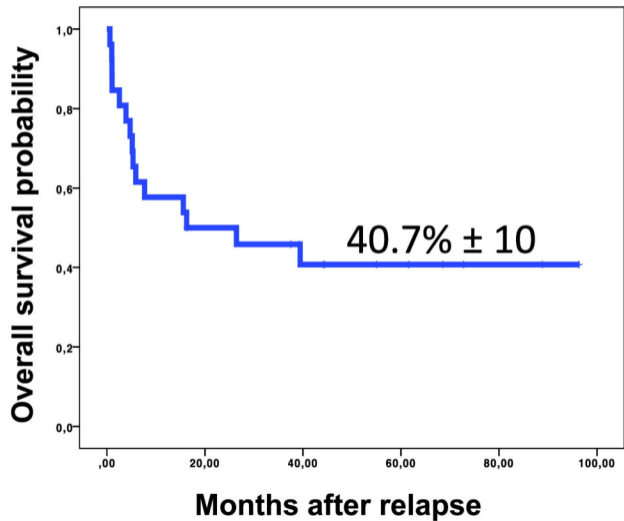
MAIN FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Clonal behavior in a series of 26 relapsing favorable-risk AML patients. (A) Mutation analyses in paired diagnosis (D) and relapse (R) samples in 26 patients. Each column represents an individual patient. Colored bars indicate the presence of mutation, blank bars represent wild type for the specific gene and beige bars represent not available data. *VAF 0%; **VAF: 48.4%; #VAF 7.1%; ## VAF 44.8%. (B) Immunophenotypic patterns in paired diagnosis (D)/ relapse (R) of 26 patients. Each column represents an individual patient. Colored bars indicate strong, dim and negative CD antigen detection for each marker. “Strong” means greater than 10^4 , “dim” means between 10^3 and 10^4 and “negative” means lower than 10^3 . Blank bars represent non-available data.

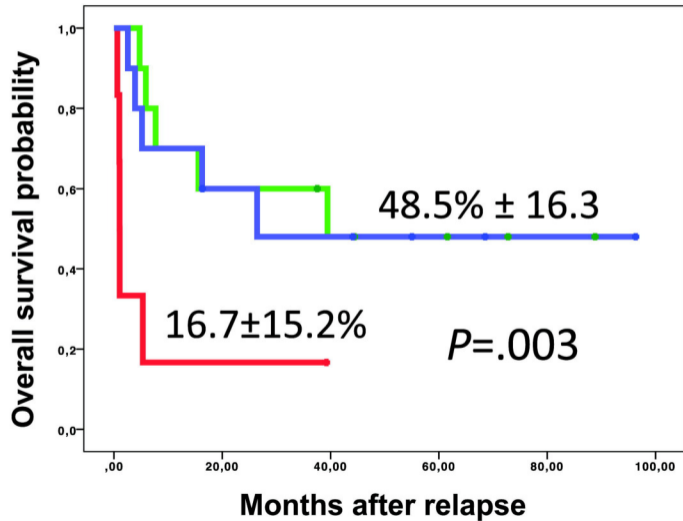
Figure 2.- Overall Survival. (A) OS for the whole series (N=26). (B) OS comparing patients with *NPM1* and clonal evolution (red), *NPM1* without clonal evolution (green) and *CBF/CEBPA* without clonal evolution (blue).

FIGURE 2

A



B



SUPPLEMENTARY METHODS

Bone marrow-derived genomic DNA was obtained from paired diagnosis-relapse samples using QIAmp® DNA Mini Kit, (Qiagen, Valencia CA) following manufacturer's instructions. The quality and concentration of extracted DNA were assessed by spectrophotometry by Nano-Drop_1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE).

NPM1^{mut} was routinely detected at diagnosis and relapse by high-resolution-melting curves or restriction fragment length polymorphisms (N=3), *RUNX1-RUNX1T1* and *CBFB-MYH11* CBF by standardized RT-PCR and *CEBPA* by Next Generation Sequencing. Relapses after allo-SCT were all from recipient origin as assessed by routine chimerism analysis. *FLT3-ITD* and *TKD* mutations were screened at diagnosis and relapse by Sanger Sequencing (N=3), NGS (N=6) or multiplex PCR and capillary electrophoresis assay (N=17).

1. Next Generation Sequencing (NGS)

Specific primers flanking positions of interest were designed. PCR reaction was done with 10 ng of DNA as follows: 94°C for 3 minutes, followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds; 60°C for 10 seconds; 72°C for 30 seconds and a final elongation step at 72°C for 30 seconds. PCR products were prepared for sequencing using the NEXTFlex™ Rapid DNA Sequencing Kit (Bio Scientific, Austin TX), following the manufacturer's instructions. Three independent PCR products of suspected cases and control samples were used for sequencing. The resulting libraries were sequenced on an Illumina Hi-Seq 1500 at 2 x 100. Primary analyses, including base calling, read filtering and demultiplexing were performed according to the standard Illumina processing pipeline (CASAVA 1.8.2). Sequence read pairs were mapped to the human genome assembly GRh37/hg19 (build 37.2, February 2009) with BWA (Untergasser *et al*, 2012). SAM tools were used to calculate read depth and nucleotide frequencies for

each position of the amplicons (Untergasser *et al*, 2012; Li H *et al*, 2009). Median coverage was 1361 (range 367-4000).

2. DNA sequencing analysis by Sanger

To perform Sanger sequencing method, we used 20 ng of total genomic DNA to perform PCR (AmpliTaqGold® with GeneAmp®. Applied Biosystems. Roche. New Jersey. USA). PCR products were visualized under UV light lamp to confirm the presence of the correct size of fragments. Then, amplicons were purified using QIAquick® PCR Purification/ Gel Extraction KIT (QIAGEN Valencia CA. USA) and DNA sequencing analysis was executed bidirectional by an internal sequencing primer (BigDye® terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Sequencing PCR protocol consisted of an initial cycle at 96°C for 1 minute followed by 40 cycles at 96°C for 10 seconds, 50°C for 5 minutes and 60°C for 4 seconds. Then, products were purified using Centri-SEP Spin Columns, Princeton Separation KIT (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Sequencing data were analyzed by Seq Scanner® V1.0 software (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA).

To analyze specified mutations in *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *DNMT3A*, *IDH1* and *IDH2* genes, we designed a pair of normal desalted primer sequences per gene using Internet-based software Primer3web version.4.0.0. (Li H *et al*, 2009) Then, we completed Basic Local Alignment Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/>) to address the optimal alignment of sequences. All primers sequences are described in the table below.

3. SNP and deletion analysis by pyrosequencing and homology modeling of *DNMT3A* new mutations.

To demonstrate the leukemic specificity of two new mutations found in *DNMT3A* gene, we analyzed by pyrosequencing normal BM cells from healthy donors and samples at complete remission from carrier patients. Primers for pyrosequencing

based allele quantification analysis were designed using the PyroMark Assay Design Software 2.0.1.15 (Qiagen), with the forward being 5' biotinylated. A 178 base pairs (bp) region was amplified on human genomic DNA. PCR reaction was performed in 30 μ L of 0.05 μ mol/L specific primers, 0.2 mmol/L dNTPs, 50 ng genomic DNA, 1.5 mmol/L magnesium chloride, 1 \times PCR buffer, 0.2 U of Immolase DNA polymerase (Bioline) for 45 cycles with annealing temperature of 56°C. PCR products were verified by electrophoresis on a 2% w/v agarose gel. Pyrosequencing was completed using a PyroMark Q24 pyrosequencer (Qiagen, Valencia CA) with 10 to 15 μ L of PCR product according to the manufacturer's instructions. The allele and deletion frequencies in the target region were analyzed by PyroMark Q24 software version 2.0.6.

4. Homology modeling

A three-dimensional model of mutated DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A was calculated using Swiss-Model, a semi-automated modeling server, and analysed with the Swiss-Pdb Viewer. The amino acid sequence of the mutated protein was compared with the sequences of the protein structures deposited in the Protein Data Bank. After analyzing structures of proteins that had the highest structural quality and significant sequence similarity with the mutated protein, we chose 3a1b.1.A and 4u7p.1.A as templates. The templates were superimposed and aligned structurally. The quality of the resulting models was verified manually with Swiss-Pdb Viewer. The figures were rendered with POV-Ray.

5. Phenotypic analysis by Multiparameter Flow cytometry

Immunophenotype analysis of leukemic cells was performed on erythrocyte-lysed bone marrow samples obtained at diagnosis and relapse by multiparametric flow cytometry (MFC)²². At least 1×10^6 cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridin-chlorophyll-protein (PerCP) or allophycocyanin (APC) conjugated Monoclonal-Antibodies combinations which included: anti-CD65 (clone 88H7), anti-CD15 (clone HI9), anti-HLADR (clone L243), anti-CD7 (clone 4H9), anti-CD2 (clone S5.2), anti-CD14 (clone M Φ P9), anti-CD19 (clone J3-119), anti-CD117 (clone 104D2), anti-CD56, anti-CD13 (clone L138), anti-CD11b (clone ICRF44), anti-CD38 (clone HB-7), anti-CD34 (clone 8G12) and anti-CD33 (clone WM53), mostly from Becton-Dickinson).

At least 30,000 leukemic events were acquired mostly in FACSCalibur or FACSCanto II dual-triple laser flow cytometers and list modes files were analyzed with CELLQUESTTM, FACSDIVATM or PAINT-A-GATE Software. (BD, Biosciences). Antigen expression was categorized considering mean value at Log-scale as "strong" (greater

than 10^4), “dim” (between 10^3 and 10^4) and “negative” (lower than 10^3 , as matched isotype controls). Multidimensional analyses of immunophenotypes obtained at diagnosis and relapse were performed using the File merge and Automatic Population Separator (APS) functions of the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain).

6. Statistical analysis

The Fisher exact test or chi-square test (with Yates’s correction for continuity when needed) was used to compare categorical data and quantitative data was compared with the Mann-Whitney U test. Overall survival (OS) from leukemia relapse was calculated using the Kaplan-Meier method including the 95% confidence interval (95% CI). Clinical status was updated in February 2017. The two-sided log-rank test was used for univariate comparisons. Multivariate analysis was performed by Cox regression forward stepwise method. Calculations were performed using IBM SPSS statistical for Windows version 17.0. (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

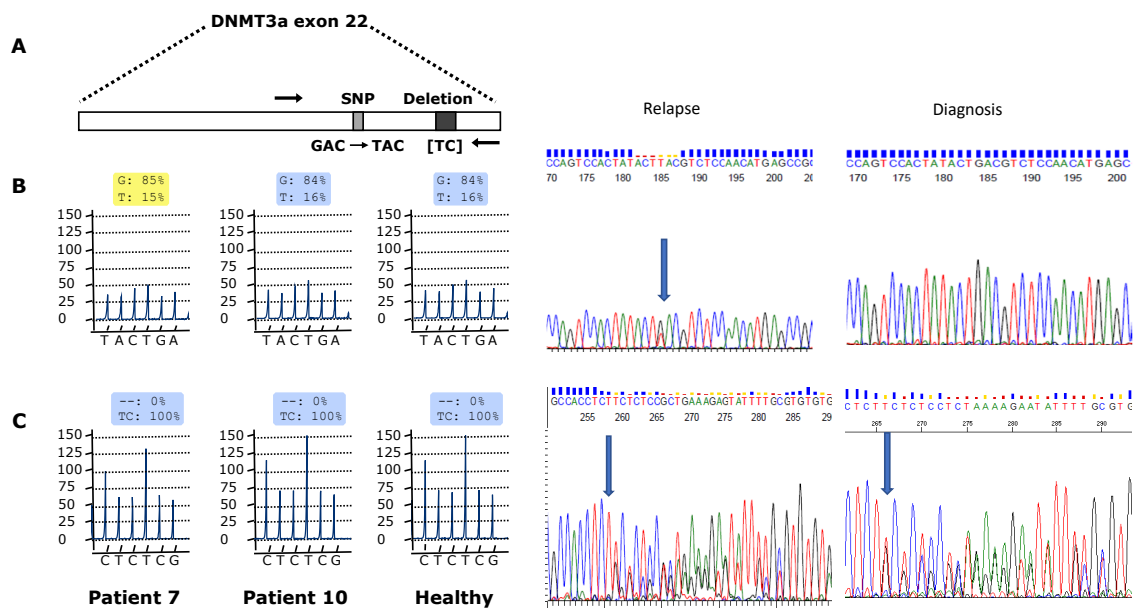
7.- Primer sequences

GENE	PRIMER NAME	SEQUENCE 5' - 3'
NRAS_exon1	Sequence amplification forward (FW)	CGGTGTTTTTGCCTTCTCTA
NRAS_exon1	Sequence amplification reverse (RV)	TTGCATAACTGAATGTATACCCAAA
NRAS_exon1	Internal sequencing FW	GATGTGGCTCGCCAATTAAC
NRAS_exon1	Internal sequencing RV	TGGGTAAAGATGATCCGACA
NRAS_exon2	Sequence amplification FW	CAATGTCAAACAACCTAAAACCA
NRAS_exon2	Sequence amplification RV	GGCAGAAATGGGCTTGAATA
NRAS_exon2	Internal sequencing FW	TTGCATTCCCTGTGGTTTTT
NRAS_exon2	Internal sequencing RV	TGTAACCTCATTCCCCATA
KRAS_exon1	Sequence amplification FW	CTTAAGCGTCGATGGAGGAG
KRAS_exon1	Sequence amplification RV	CCCTGACATACTCCAAGGA
KRAS_exon1	Internal sequencing FW	AAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGA
KRAS_exon1	Internal sequencing RV	AGAATGGTCCTGCACCAGTAA
KRAS_exon2	Sequence amplification FW	ATCCTAATGGGTATGTGGTAGCAT
KRAS_exon2	Sequence amplification RV	AAGAGTACAGAAGGCTGTGGAGTC
KRAS_exon2	Internal sequencing FW	GGTGCTTAGTGGCCATTTGT
KRAS_exon2	Internal sequencing RV	TGCATGGCATTAGCAAAGAC
TP53_exon4_5	Sequence amplification FW	AAAAAGAAAAGCTCCTGAGGTGAG
TP53_exon4_5	Sequence amplification RV	CCCATTTACTTTGCACATCTCA
TP53_exon4_5	Internal sequencing FW	GGAGGTGCTTACGCATGTTT
TP53_exon4_5	Internal sequencing RV	GGGAGGTCAAATAAGCAGCA
TP53_exon6	Sequence amplification FW	TGTGCAAAGTAAATGGGTTTAACTA
TP53_exon6	Sequence amplification RV	AAGAAAAGTGGTGGGAGCAGTAAG
TP53_exon6	Internal sequencing FW	AAAAAAGGCCTCCCCTGCTTGCCAC
TP53_exon6	Internal sequencing RV	GATGTGATGAGAGGTGGATGGGTA
TP53_exon7_8	Sequence amplification FW	ACTCAGTTTTCTTTCTCTGGCTTT
TP53_exon7_8	Sequence amplification RV	CAAATGCCCCAATTGCAGGTAAAACA
TP53_exon7_8	Internal sequencing FW	CTTAGGCTCCAGAAAGGACAAG
TP53_exon7_8	Internal sequencing RV	CAAATGCCCCAATTGCAGGTAAAACA
DNMT3A	Sequence amplification FW	TTTATAAAGGACAGAAGATTCGGCAGAA
DNMT3A	Sequence amplification RV	CCTTACACACACGCAAATACTCCTT
DNMT3A	Internal sequencing FW	TTTATAAAGGACAGAAGATTCGGCAGAA

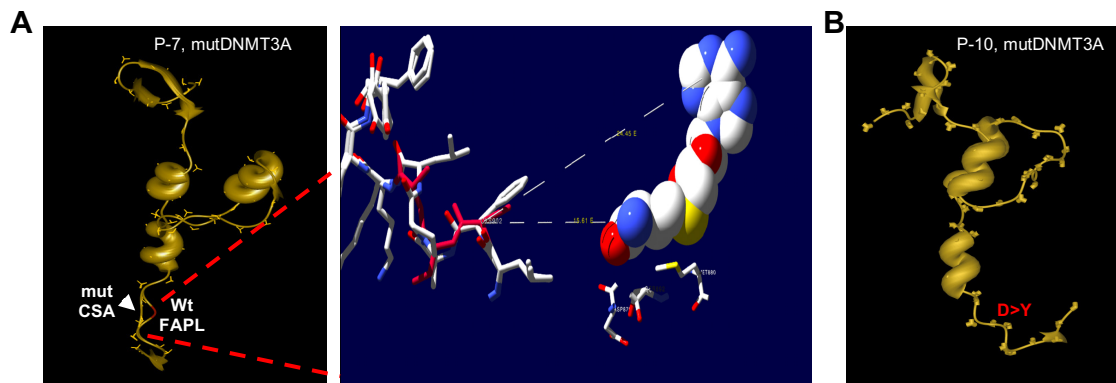
DNMT3A	Internal sequencing RV	CCTTACACACACGCAAAATACTCCTT
IDH_1	M13_Sequence amplification FW	TGTAAAACGACGGCCAGTTGAGAAGAGGGTTGAGGAGTT
IDH_1	M13_Sequence amplification RV	CAGGAAACAGCTATGACCAACATGCAAAATCACATTATTGCC
IDH_1	M13_Internal sequencing FW	TGTAAAACGACGGCCAGT
IDH_1	M13_Internal sequencing RV	CAGGAAACAGCTATGACC
IDH_2	M13_Sequence amplification FW	TGTAAAACGACGGCCAGTGGGTTCAAATTCTGGTTGAA
IDH_2	M13_Sequence amplification RV	CAGGAAACAGCTATGACCTAGGCGAGGAGCTCCAGT
IDH_2	M13_Internal sequencing FW	TGTAAAACGACGGCCAGT
IDH_2	M13_Internal sequencing RV	CAGGAAACAGCTATGACC

SUPPLEMENTAY FIGURES

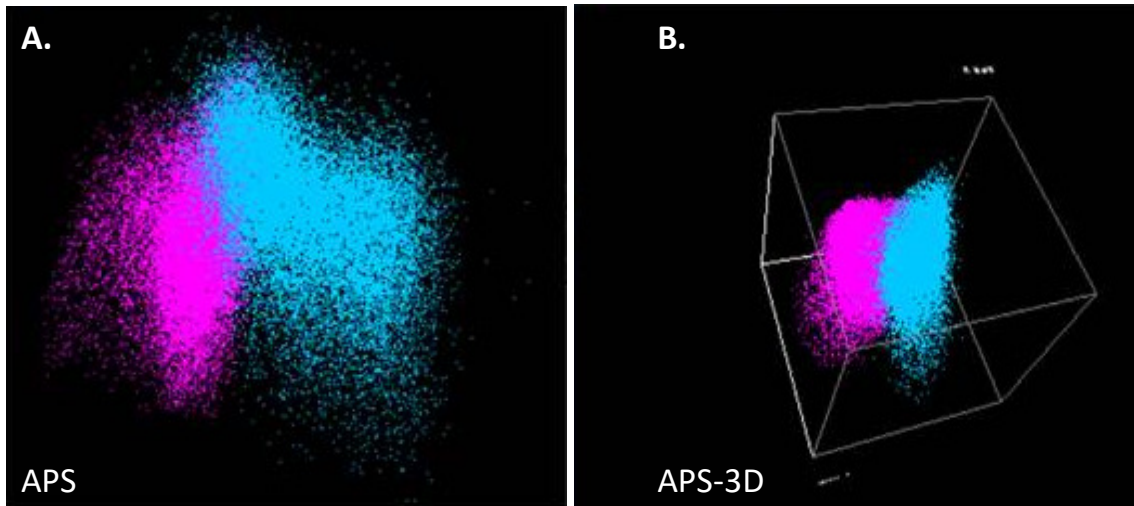
Supplementary Figure 1. Analysis of sequence variations in DNMT3a exon22 from patients 7 and 10 by pyrosequencing and Sanger sequencing. (A) Map of DNMT3a exon 22 showing the analyzed region (black arrows) for the substitution c.2626 G>T and the deletion c. 2705_2706delTC, respectively. (B) Left: Determination of allele frequency of single nucleotide polymorphism c.2626 G>T by pyrosequencing. Right: Determination of C.2626 G>T mutation by Sanger: the mutation is only found in the relapse sample. (C) Left: Deletion c.2705_2706delTC percentage analysis by pyrosequencing. Right: Determination of c.2705_2706delTC by Sanger: the mutation is found in the diagnosis and relapse samples. A healthy donor was included in the experiment.



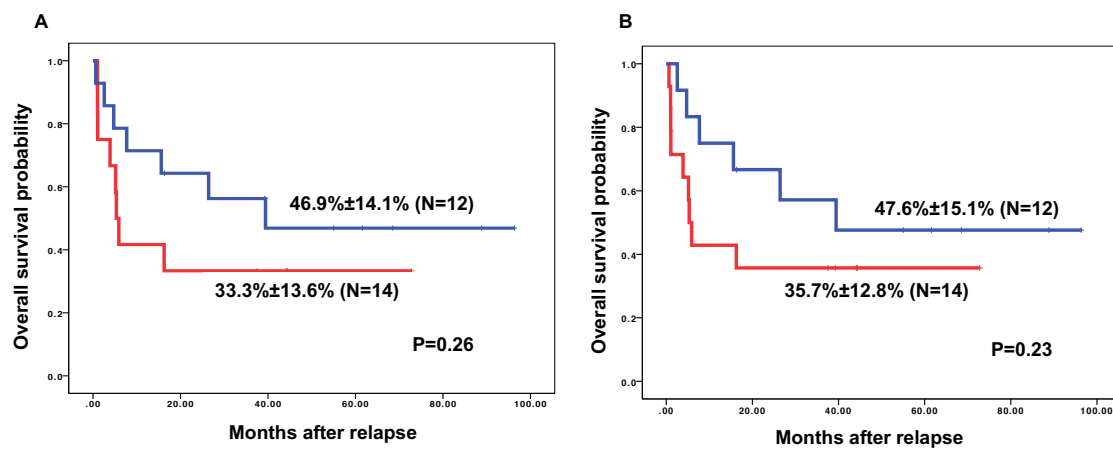
Supplementary figure 2. Three-dimensional models for DNMT3A mutants. The amino acid sequence of the mutated DNMT3A was compared with the wild type sequences from Protein Data Bank. (A) Deletion of two nucleobases in DNA introduced small changes in amino acid sequence (left) although far from active side (center). (B) Changes in one nucleobase produce an amino acid substitution and non-sequence alteration were found in 3D superposition.



Supplementary Figure 3. Representative case (Patient 10) of multidimensional analyses of complete immunophenotype profile using Automatic Population Separator (APS) function of Infinicyt software. Pink population corresponds to diagnosis and blue population corresponds to the relapse.



Supplementary Figure 4. Overall Survival. (A) patients with (red) or without (blue) phenotypic changes and (B) patients with (red) or without (blue) phenotypic and/or genetic changes.



SUPPLEMENTARY TABLES.

Supplementary Table 1.

Clinical and biological data comparing genetic patterns at relapse

	No clonal evolution N (%)	Clonal evolution N (%)	P Value
Number of patients	20	6	
Gender (Male)	11 (55)	2 (33,3)	NS
Median (range) WBC x10⁹/l	17 (1.49-149)	16.6 (4-145)	NS
Median (range) marrow blasts	63 (32-100)	71 (52-92)	NS
Cytogenetic / molecular group			
-NK-NPM1mut	10 (50)	6 (100)	NS
-t(8;21)	4 (20)	0	
-inv(16)	4 (20)	0	
-NK-CEBPAbi	2 (10)	0	
SCT before relapse			
-Allogeneic	6 (30)	4 (66,7)	NS
-Autologous	7 (35)	0	
Phenotypic changes	8 (40)	4 (66.7)	NS
Median months until relapse	18.5 (6-252)	12 (6-67)	NS
Allo-SCT after relapse	11 (55)	1(16.7)	NS
OS Probability	48.5±11.5%	16.7±17.9%	.003

WBC: White Blood cell; NK: normal karyotype; SCT: Stem cell transplantation;
OS: Overall Survival

Supplementary Table2.

Multivariate Cox regression analysis of variable influencing Overall Survival after leukemia relapse

Variable (categories and codes)	Overall survival		
	Beta coefficient (SE)	Hazard ratio (95% CI)	P value
Allo-SCT as treatment for relapse (Yes,No)	- 0.28 (.80)	0.06 (0.01 – 0.30)	0.001
Clonal evolution (Yes, No)	1.60 (.64)	4.99 (1.43 – 17.43)	0.01
Age at relapse, yr (Continuous)	-	-	0.907
Relapse Free Survival (Continuous)	-	-	0.339
Previous Allo-SCT at first CR (Yes,No)	-	-	0.236
Phenotypic shifts (Yes,No)	-	-	0.242
Genetic subgroup (<i>NPM1</i> ^{mut} , CBF/CEBPA)	-	-	0.483

Supplementary Table3.
Karyotype at diagnosis and relapse

Patient	Karyotype at diagnosis	Karyotype at relapse
1	46XY	46XY
2	46XX	NA
3	46XX	46XX
4	46XX	46XX
5	46XY, t(8;21)	46XY, t(8;21)
6	46XY,t (8;21)	NA
7	46XX	46XX
8	46XY	NA
9	46XY	NA
10	46XX	46XX
11	46XY	NA
12	46XY,inv16	46XY,inv16
13	46XY	46XY
14	46XX	46XX
15	46XY	46XY
16	46XX	46XX
17	46XX,t (8;21)	NA
18	46XY,t (8;21)	NA
19	46XX	NA
20	46,XX, inv16	46,XX, inv16
21	46XY	46XY
22	46XX	46XX
23	46XY,inv16	46XY,inv16
24	46XX,inv16	46XX,inv16
25	46XY	46XY
26	46XX	46XX

NA: Not available.