



# Impacto de las alteraciones moleculares en el pronóstico de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) "de novo"

Montserrat Hoyos Colell

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

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

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

IMPACTO DE LAS ALTERACIONES  
MOLECULARES EN EL PRONÓSTICO DE LA  
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA) “*de novo*”





Programa de doctorado de Genética. Universitat de Barcelona,  
Facultat de Biologia, Departament de Genètica.



Tesis doctoral realizada en el Hospital de la Santa Creu i Sant  
Pau. Servicio de Hematología.

# IMPACTO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN EL PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA) “de novo”

Memoria presentada por **Montserrat Hoyos Colell** para optar  
al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona.

Prof. Jordi Sierra	Dr. Josep F. Nomdedéu	Dr. Daniel-Raúl Grinberg
Co-director	Co-director	Tutor



Als meus pares  
i a l'Alberto.

“La estadística es una ciencia que demuestra  
que si mi vecino tiene dos coches y yo ninguno,  
los dos tenemos uno”  
*George Bernad Shaw*



# Agradecimientos

---





Esta tesis está escrita en castellano, pero para los agradecimientos voy utilizar mi lengua materna, el catalán, idioma con el cual me expreso mejor.

Per fi, després de molts esforços estic davant la primer pàgina de la tesi. Ha sigut un viatge llarg però ha valgut la pena. He tingut la sort de compartir-lo amb un munt de gent fantàstica que m'han ajudat i recolzat en tot moment. No m'agradaria descuidar-me a ningú, així que intentaré anar per ordre.

Primer agrair als meus directors al Prof. Sierra i al Dr. Nomdedeu sense els quals aquest projecte no hagués estat possible. Moltes gràcies per ajudar-me a créixer professionalment.

Tampoc em vull descuidar al Dr. Gallardo, que em va introduir en el món de la investigació de la leucèmia aguda.

Una de les persones de qui més he après es de la Salut (Dra. Brunet), tot el que sé d'estadística és gràcies a ella. Moltes gràcies per la teva paciència.

Si no fos perquè la Magui em va permetre formar part del grup de MO/SP ara mateix no estaria aquí. Moltíssimes gràcies a la Magui i als meus companys de GuantanaMO.

Gràcies a les meves companyes actuals de laboratori, a la Rosa amb qui ric moltíssim i amb qui comparteixo afició pel teatre, a la Laura, a la Patri i a la Carmen, que m'alegreu el dia.

Agrair al Ramon i la Isolda que em van deixar un raconet al seu laboratori. I sobretot als companys del laboratori que em van rebre amb els braços oberts. A la Mònica (la meva germana postissa), el Carlos, el Miquel Angel, la Marta (que faci tant esport es culpa teva...), la Maria José, la Rebeca, la Carme, la Patri, la Cris i la Irene. Moltes

gràcies per fer l'hora del dinar molt més divertida. També al Cristo i a la Mariona que se'ls troba a faltar.

Vull agrair a l'Ari que tant em va ajudar durant la primera part d'aquest projecte, pràcticament m'ho va ensenyar tot. Mai t'ho podré agrair prou.

Les amigues que vaig fer a la carrera son de les de tota la vida, moltes gràcies Míriam, Cris, Vane, MIM, Alba i Sílvia per tantes hores de pràctiques juntes, viatges en cotxe, cafès de primera hora i alguna que altra festa de l'autònoma. Tampoc em vull descuidar al Deivid, amb qui he compartit infinitat d'hores de pràctiques.

Les amigues de Manresa han sigut un recolzament molt important per mi, la Judit, la Vanesa, la Laura, l'Eva i l'Anahi. Moltes gràcies per estar sempre al meu costat.

Finalment agrair a la meva família.

Sobretot vull agrair i dedicar aquesta tesi als meus pares que m'han mostrat el seu recolzament en tot moment, fins i tot quan ho veia tot negre ells estaven allà per ajudar-me. Desde que vaig triar estudiar Biologia heu estat al meu costat en totes les decisions que he pres.

També a l'Alberto que està amb mi desde que vaig començar aquest projecte, sé que has patit amb mi, però al final crec que ha valgut la pena. Moltes gràcies per tot.

Por último agradacer a los integrantes del grupo CETLAM por su colaboración, a la Marató de TV3, la RTICC i la fundación CELLEX.

Motivación

---



Desde el principio de mis estudios pensé en dedicarme a la investigación. Hablando en broma a menudo comentaba que Dra. Hoyos sonaba bastante bien.

Que al final me dedicase a la leucemia fue una casualidad. Mi instinto me decía que debía dedicarme a la investigación en cáncer. Así que cuando se presentó la oportunidad, no lo dudé. Por aquel entonces yo trabajaba en el diagnóstico citogenético de pacientes con leucemia, así que la enfermedad no me era desconocida.

Con el tiempo fui aprendiendo bastante sobre esta enfermedad, sobre todo desde que se me encargó la recopilación de datos del grupo cooperativo CETLAM. En estos años he estudiado con profundidad los aspectos relacionas con el diagnóstico y el tratamiento de la leucemia aguda para poder llevar la base de datos lo mejor posible.

Este proyecto de tesis no solamente me ha permitido conocer más a fondo esta compleja enfermedad, sino que además me ha hecho crecer como investigadora. He podido ampliar mis conocimientos estadísticos y espero poder seguir aprendiendo mucho tiempo.

Me gusta mi trabajo, la estadística y dedicarme al cáncer. Desde que terminé la carrera afortunadamente no me ha faltado trabajo y siempre en aquello que me gusta. Me siento una persona con suerte.



# Contenido

---





Agradecimientos .....	I
Motivación .....	V
Contenido .....	IX
Figuras y tablas.....	XIII
Abreviaturas .....	XVII
Introducción general .....	29
Informe de los directores de tesis.....	93
Objetivos.....	97
Publicaciones.....	101
Discusión .....	99
Conclusiones .....	143
Índice .....	147
Apéndice.....	151
Bibliografía .....	155



## Figuras y tablas

---



**FIGURAS**

**Figura 1.** Esquema del proceso de hematopoyesis normal.....32

**Figura 2.** Transformación leucémica.....36

**Figura 3.** Distribución de las mutaciones en la LMA.....37

**Figura 4.** Función de RUNX1-RUNX1T1. Bloqueo de la diferenciación e induce su autorenovación. Adaptado de *Schuringa, J. and E. Vellenga, Mechanisms involved in HSC self-renewal and hematopoietic lineage commitment. web page, 2012*[3]. .....64

**Figura 5.** Estructura del reordenamiento *CBFB-MYH11* causado por la *inv(16)(p13.1q22)*. .....64

**Figura 6.** Funciones de *RUNX1*. *RUNX* activa la expansión mieloide activando genes supresores de tumores y reprimiendo genes de muerte celular. Inhibidores de *RUNX*, volverían a activar la muerte celular. Extraído de *Goyama, S et al. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. J Clin Invest. 2013*[51] .....65

**Figura 7.** Estructura de la glicoproteína *KIT* y sus mutaciones en la LMA.....67

**Figura 8.** Mutaciones en el gen *FLT3*. Izquierda: *FLT3* germinal. Centro: Duplicación interna en tándem. Derecha: Mutación puntual del gen *FLT3*.....69

**Figura 9.** Localización anómala de la nucleofosmina en LMA.....71

**Figura 10.** Mutaciones en *CEBPA*.....72

**Figura 11.** Gen *MLL*, gen de fusión *MLL* y *MLL-PTD*. .....74

**Figura 12.** Mecanismo de acción del gen *IDH*. .....75

**Figura 13.** Localización de las mutaciones en *TET2*.....76

**Figura 14.** Estructura de *NOTCH1*.....77

**Figura 15.** Asociaciones de las mutaciones en *DNMT3A*. .....79

**Figura 16.** Estructura del gen *WT1*. .....81

**Figura 17.** Mutaciones en *ASXL1* a lo largo de la proteína.....82

**Figura 18.** *MN1* unido al coactivador *p300/CBP* reclutan *RAR/RXR* y se inhibe la diferenciación vía represión transcripcional.....84

**Figura 19.** Frecuencia relativa y relaciones entre las diferentes mutaciones en pacientes con LMA “de novo”. .....88

**TABLAS**

**Tabla 1.** Clasificación de la LMA WHO y correspondencia con la FAB. ....46

**Tabla 2 .** Ponderación de las comorbilidades según el índice de Charlson.....55

**Tabla 3.** Comorbilidades: Definiciones y “pesos” según los HCT-CI...56

**Tabla 4.** Clasificación de las mutaciones.....62

**APÉNDICE**

**Apéndice 1.** Protocolos CETLAM. .... 153

**Apéndice 2.** Clasificación citogenética de los diferentes grupos cooperativos..... 154

# Abreviaturas

---





abn: anomalía

ADAC: altas dosis de citarabina (Ara-C)

AIR: acondicionamiento de intensidad reducida

AKT: serine/threonine protein-kinase Akt

Alo o Alo-TPH: alotrasplante de progenitores hematopoyéticos

ALT: alanina aminotransferasa

AML1: acute myeloid leukemia 1 (21q22.3) ver también RUNX1 \*

AML1-ETO: ver también RUNX1-RUNX1T1 \*

AMLCG: AML Cooperative Group

Amsa: amsacrina

AR: artritis reumatoide

ARA-C: citarabina

AST: aspartato aminotransferasa

ASXL1: additional sex combs like-1 (20q11) \*

Auto: autólogo

Auto-TPH: autotrasplante de progenitores hematopoyéticos

AZA: azacitidina

BAALC: brain and acute leukemia gene, cytoplasmatic (8q22.3) \*

bZIP: basic region leucine zipper family

CALGB: cancer and leukemia group B

CBF: core binding factor

CBFB: core binding factor-beta (16q22.1) \*

CBFB-MYH11: gen de fusión resultante de la inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13q22) \*

CCI: Charlson Comorbidity Index

CD: cluster differentiation

CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein A (19q13.1) \*

---

\* Genes

CETLAM: Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias.

CLP: progenitor linfoide común

CMF: citometría de flujo

CMP: progenitor mieloide común

DCE: daunorubicina-citarabina-etopósido

DEK-CAN/NUPM214: gen de fusión resultante de la t(6;9)(22.3;q34) \*  
del: delección

DLCO: capacidad de difusión del monóxido de carbono

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNE: donante no emparentado

DNMT3A: DNA methyltransferase 3A (2q23) \*

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EF: fracción de eyección

ELN: European Leukemia Net

ERG: ETS-related gene (21q22.3) \*

ERM: enfermedad residual mínima (equivalente en inglés: minimal residual disease, MRD)

ETO: RUNX1T1 runt-related transcription factor 1 (8q22) \*

ETS: erythroblastosis virus E26 transforming sequence (11q23.3) \*

EVI1: ecotropic viral integration site-1 (3q26.2) \*

FAB: French-American-British

FEV1: volumen expiratorio forzado en un segundo

FLT3: fms-related tyrosine kinase 3 (13q12)\*

G-CSF: factor estimulador de colonias granulocíticas

GIMEMA: Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto

GMP: progenitor granulocítico/monocítico

GO: gentuzumab ozogamicina

---

\* Genes

HSC: célula madre hematopoyética  
HCT-CI: hematopoietic cell transplantation comorbidity index  
HIF1-alpha: hypoxia induced factor 1, alpha subunit (14q23.2)\*  
HLA: antígeno leucocitario humano  
HOVON: Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland  
HSC: célula madre hematopoyética  
IAC: incidencia acumulada de recaída  
IC: idarubicina-citarabina  
ICE: idarubicina-citarabina-etopósido  
IDAC: dosis intermedias citarabina  
IDH1/IDH2: isocitrate dehydrogenase 1 y 2 (2q33.3 y 15q26.1)\*  
IDICE: idarubicina-dosis intermedias citarabina-etopósico  
IMC: índice de masa corporal  
inv: inversión  
ITD: duplicación interna en tándem  
JAK2: janus kinase 2 (9p24)\*  
KDM: kinase domain mutation (D385)\*  
KIT: CD117 (4q12)\*  
LCO: leucemia cell-of-origin  
LES: lupus eritomaso sistémico  
LMA: leucemia mieloide aguda  
LMMC: leucemia mielomonocítica crónica  
LMPP: lymphoid primed multipotent progenitor  
loop: dominio asa  
LSC: célula madre leucémica  
LSN: límite superior de lo normal  
LT-HSC: long-term hematopoietic stem cell  
MAPK: mitogen-activated protein kinase

---

\* Genes

- MDR-1: multidrug resistance 1 (7q21.1) \*
- MDS1: myelodysplastic syndrome 1 (3q26) \*
- MEP: progenitor megacariocítico/eritroide
- AIR: alotrasplante con acondicionamiento de intensidad reducida
- Mitox: mitoxantrone
- MkEP: megakaryocytic/eritroid progenitor
- MKL1: megakaryoblastic leukemia (translocation) 1 (22q13) \*
- MLL: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukaemia
- MLLT3: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to, 3 (9q22) \*
- MN1: meningioma 1 (22q12.1) \*
- MO: médula ósea
- MPP: progenitor multipotencial
- MRC: medical research council
- MYH11: myosin, heavy polypeptide 11 (16p13.11) \*
- NADPH: nicotinamin-adenin-dinucleótido fosfato reducido
- NPM1: nucleophosmin member 1 (5q35.1) \*
- NUP214: nucleoporin 215KDa (9q34.1) \*
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PF: pronóstico favorable
- PHSP: progenitores hematopoyéticos de sangre periférica
- PI: pronóstico intermedio
- PI3K: fosfatidil-inositol 3 kinase
- PML: promyelocytic leukemia (15q22) \*
- PML-RARA: transcrito de fusión resultante de la t(15;17)(q22;q12-21) \*
- PRAME: preferentially expressed antigen in melanoma (22q11.22) \*
- PTD: duplicación parcial en tándem

---

\* Genes

- QT: quimioterapia
- RAR: retinoic acid response
- RARA: retinoic acid receptor, alpha (17q12-21)\*
- RAS: retinoic acid syndrome
- RBM15: RNA binding motif protein 15 (1p13)
- RC: remisión completa
- RNA<sub>m</sub>: ácido ribonucleico mensajero
- RPN1: ribophorin 1 (3q21.3)
- RUNT: domain including RUNX1, RUNX2, RUNX3
- RUNX1: runt-related transcription factor 1 (21q22.3)
- RUNX1T1: RUNX1 translocated to, 1 (8q22)
- RXR: retinoid-X receptors
- SAKK: Schweizerisch Arbeitsgemeinschaft für Klinische  
Krebsforschung
- SCU: sangre de cordón umbilical
- SG: supervivencia global (tiempo desde el diagnóstico hasta la muerte  
del paciente)
- SLE: supervivencia libre de enfermedad (tiempo desde la RC hasta la  
recaída o muerte del paciente)
- SMD: síndrome mielodisplásico
- SP: sangre periférica
- ST-HSC: short-term hematopoietic stem cell
- SWOG: Southwest Oncology Group
- t: translocación
- TC: tejido conectivo.
- TEL: translocation ETS leukemia gene: ETV6
- TET2: tet methylcytosine dioxygenase 2 (ten-to-eleven-translocation  
member) (4q24)\*

---

\* Genes

TPH: trasplante de progenitores hemtopoyéticos

TR: tasa de recaída (tiempo hasta la recaída)

WHO/OMS: World Health Organization / Organización Mundial de la  
Salud

wt: wild-type (germinal)

WT1: Wilms tumor 1 (11q13)\*

---

\* Genes

# Introducción general

---





# 1- Hematopoyesis

## 1.1-Definición

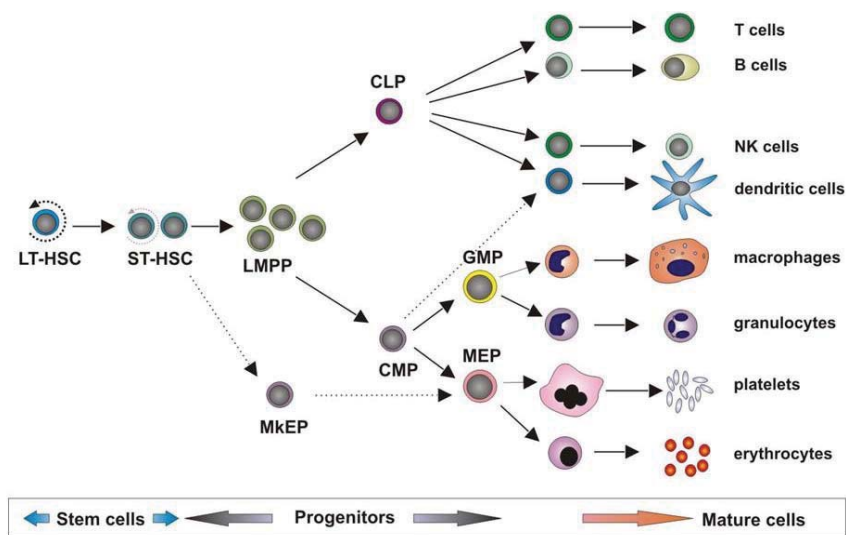
La hematopoyesis es el proceso fisiológico de generación de los diferentes linajes celulares de la sangre para garantizar la homeostasis y las diferentes funciones de las células maduras. Las células hematopoyéticas se localizan en la médula ósea de los huesos centrales. Se producen  $1.5 \times 10^6$  células sanguíneas por segundo[1]. Los linfocitos se forman en la médula ósea y maduran en los órganos linfoides. En determinadas circunstancias patológicas el hígado y el bazo pueden asumir funciones hematopoyéticas.

### 1.1.1- Generación de los linajes hematopoyéticos

La hematopoyesis normal es dinámica y está controlada por factores de crecimiento que estimulan la señalización y proliferación celular, así como por factores de transcripción que permiten la diferenciación en un sentido de línea y la formación de células totalmente diferenciadas y por tanto funcionales.

En condiciones normales, la médula ósea alberga las células madre hematopoyéticas (Hematopoietic stem cell, HSC) que tienen capacidad de auto-renovación y de diferenciación en células más maduras de cualquier linaje. En su división generan dos células, una con capacidad de diferenciarse y de proliferar pero que pierde la capacidad de auto-replicación (progenitor multipotencial, MPP) y otra que permanecerá como HSC (divisiones asimétricas). Las células MPP se caracterizan por pérdida de la capacidad de auto-renovación pero mantienen su capacidad de diferenciación en todas las líneas celulares mieloides. Estas células se caracterizan por la expresión de los marcadores de superficie como CD34, además de otros

marcadores de inmadurez como CD90 y CD117. Estas células se diferencian y generan un progenitor linfoide común o un progenitor mieloide común (CLP, CMP). El CMP continuará diferenciándose dando lugar a progenitores eritroides/megacariocíticos (MEP) o progenitores granulocíticos/monocíticos (GMP). Los MEP se irán diferenciando para acabar generando eritrocitos y plaquetas, y los GMP dan origen a macrófagos, basófilos, neutrófilos y eosinófilos (Figura 1). Existe un equilibrio entre la auto replicación y la diferenciación regulada por factores de crecimiento y de transcripción. Un gran número de estos factores están involucrados en translocaciones recurrentes identificadas en neoplasias. La leucemia se origina cuando se pierde este equilibrio entre proliferación y diferenciación.



**Figura 1.** Esquema del proceso de hematopoyesis normal.  
 Extraído de Schuringa, J. and E. Vellenga, *Mechanisms involved in HSC self-renewal and hematopoietic lineage commitment. web page, 2012*[2].

## **2- Leucemia mieloide aguda (LMA)**

### **2.1 -Descripción**

La Leucemia mieloide aguda (LMA) también conocida como leucemia mieloblástica aguda, mielógena aguda, granulocítica aguda y no linfocítica aguda, es la leucemia aguda más común en adultos. Representa un conjunto heterogéneo de enfermedades con un crecimiento descontrolado de progenitores hematopoyéticos del linaje mieloide.

Tiene una incidencia global de 4.5 por cada 100.000 personas por año. El 80% de las leucemias en adultos corresponde a LMA y se presenta con una ligera mayor frecuencia en hombres que en mujeres. Aunque puede aparecer a cualquier edad, su incidencia aumenta con los años.

Aproximadamente el 80% de los pacientes diagnosticados de LMA alcanzan la remisión completa (RC), pero aún hay un 60% de los pacientes que recae y muere debido a la enfermedad. Éste porcentaje es mayor cuando hablamos de pacientes de edad avanzada.

### **2.2 -Etiología**

La leucemia aguda es de etiología desconocida; la mayoría de casos de LMA aparece de forma esporádica, y sólo en un pequeño porcentaje de pacientes se puede identificar un factor predisponente. Por ejemplo:

- LMA secundaria: Los pacientes que han sido tratados con quimioterapia por otro tipo de cáncer tienen predisposición a padecer LMA secundaria a tratamiento. La radiación ionizante utilizada en el tratamiento también predispone a la LMA. El riesgo es mucho menor cuando la radiación se utiliza como

única estrategia terapéutica sin combinarla con quimioterapia. El riesgo asociado a las radiaciones ionizantes está relacionado con la edad del paciente y con la dosis administrada[3].

- Exposición a productos tóxicos tipo benceno: La exposición a benceno está relacionada con el riesgo de padecer LMA. La identificación de mutaciones en *RAS* en personas expuestas sugiere que el daño genético inducido promovería el desarrollo de LMA[4].
- Retrovirus: Se ha demostrado que los retrovirus juegan un papel importante en la leucemogénesis y que se asocia a linfoma T en adultos[5]. Sin embargo no se ha encontrado asociación con infecciones víricas en LMA[6].
- Leucemia familiar: La leucemia familiar puede ocurrir en el contexto de un síndrome hereditario asociado a defectos en la reparación del DNA o bien en el contexto de mutaciones en los factores de transcripción que participan en el desarrollo mieloide normal. Por ejemplo: síndrome de Li-Faumeni, mutaciones de línea germinal (p53) [7], síndromes de trombopenia hereditaria asociadas a mutaciones de *RUNX1*[8], familias con mutaciones génicas de *CEBPA* y otros síndromes más raros.
- Asociadas a alteraciones cromosómicas. Existe el síndrome de la trisomía 8 asociado a dimorfismo facial y a enfermedades hematológicas[9]. Los pacientes con trisomía del cromosoma 21 (Síndrome de Down) tienen un riesgo más elevado de padecer leucemia, más frecuentemente leucemia megacarioblástica [10].

## **2.3- Proceso de leucemogénesis**

La LMA se origina por una serie de cambios genéticos adquiridos (mutaciones en oncogenes y pérdida de función de genes supresores de tumores) en las células precursoras hematopoyéticas que alteran la hematopoyesis normal y se produce una proliferación clonal de precursores mieloides con baja capacidad de diferenciarse en elementos maduros.

Estos precursores se acumulan en la médula ósea, sangre periférica y otros tejidos, reduciendo el espacio para alojar células sanguíneas sanas e impidiendo también su maduración.

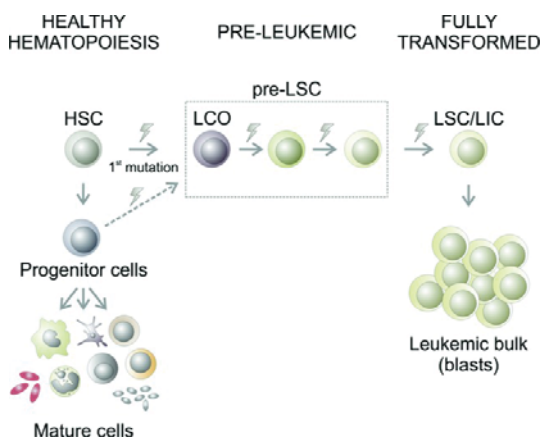
### **2.3.1-Transformación leucémica**

Se han descrito dos modelos para explicar la heterogeneidad molecular, citogenética, fenotípica y clínica de la leucemia mieloide aguda.

1- Cualquier célula hematopoyética independientemente de su grado de maduración puede ser susceptible de la transformación leucémica si adquiere las mutaciones necesarias (driver). El resultado de esta transformación es una expansión anormal de células inmaduras. La correlación entre anomalías citogenéticas y moleculares y la morfología de las células leucémicas sugiere que los eventos de transformación ocurren en diferentes puntos de la diferenciación mieloide. Esta hipótesis concuerda con la clasificación de la FAB, que distingue diferentes subtipos de LMA basándose en el grado de diferenciación.

2- Las mutaciones responsables de la transformación y progresión leucémica sólo aparecerían en las células madre multipotentes. La heterogeneidad resultaría de la capacidad de estas

células primitivas para diferenciarse y adquirir marcadores linaje-específicos. Las mutaciones en *AML1/ETO* apoyan este modelo, ya que este reordenamiento en las células normales hematopoyéticas está relacionado con la patogénesis de la LMA.



**Figura 2.** Transformación leucémica.

Extraído de Ashley, P et al. *Concise Review: Preleukemic Stem cells: Molecular biology and clinical implications of the precursor to leukaemia stem cells. Stem cells translational medicine, 2012.*[11]

### 2.3.2-Hipótesis "two-hits"

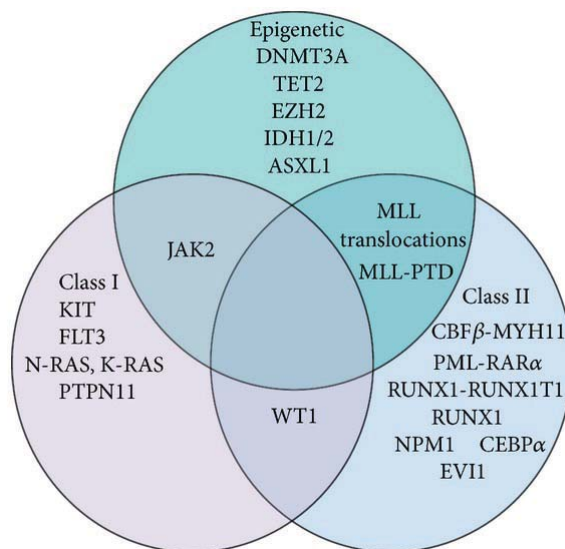
Se ha visto que reordenamientos cromosómicos que afectan a factores de transcripción son necesarios para el desarrollo de la enfermedad pero no son suficientes. Modelos murinos sugieren que son necesarias mutaciones adicionales para el desarrollo del fenotipo leucémico completo. Existe una hipótesis simplificada basada en el hecho de que la LMA sería causada por dos categorías de mutaciones.

- Mutaciones de Clase I: que confieren una ventaja proliferativa y de supervivencia a las células pero que no afecta a la diferenciación hematopoyética.

- Mutaciones de Clase II: confieren la capacidad de diferenciación hematopoyética y tienen poco efecto sobre la proliferación y supervivencia.

Los eventos mutacionales específicos para la progresión de la leucemia se explican según el modelo "two-hits" que implica que la LMA es consecuencia de al menos dos mutaciones para poder tener capacidad leucemogénica. (Figura 2)

Recientemente, se ha postulado que los modificadores epigenéticos podrían ser el tercer factor en el modelo de transformación leucémica. En estos modelos se basan en el reconocimiento de la baja carga mutacional de las LMA en comparación con otras neoplasias sólidas.



**Figura 3.** Distribución de las mutaciones en la LMA.

Extraído de O'Brien, EC, et al. *The epigenetic Landscape of acute Myleoid Leucemia. Advances in Hematology*[12].



## **2.4- Síntomas de la LMA**

Los pacientes con LMA presentan síntomas relacionados con la incapacidad de generar células sanguíneas, esto se traduce en fatiga, pancitopenia, fiebre (normalmente relacionada con alguna infección), dolor óseo, de articulaciones, dolor de cabeza, petequias, anemia, dificultad respiratoria y formación de hematomas y hemorragia, entre otras. En pacientes con un número muy elevado de leucocitos circulantes, se pueden dar trastornos neurológicos debido a la agregación de leucocitos en la microcirculación cerebral. Otra complicación al diagnóstico o al inicio del tratamiento puede ser el síndrome de lisis tumoral que se caracteriza por hiperuricemia, hipercalcemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia y fallo renal. En un 5% de los casos se pueden detectar cloromas (tumorações formadas por blastos).

## **2.5- Diagnóstico**

Los síntomas clínicos no son específicos de LMA. El diagnóstico de la enfermedad hasta los años 70 del siglo XX se basaba únicamente en el examen histológico y citológico de la médula ósea. No fue hasta los años 90 que se introdujeron las técnicas inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares. Éstas técnicas permiten el diagnóstico y la caracterización de la LMA para el desarrollo de estrategias terapéuticas adaptadas al riesgo. Se realiza un aspirado de médula ósea y se procede a realizar un recuento de células sanguíneas sanas y de blastos. Se requiere un porcentaje blástico superior al 20% en médula ósea para establecer el diagnóstico de la leucemia, excepto en aquellas leucemias con translocaciones específicas.

Para el diagnóstico se realizan los siguientes estudios:

1. Inmunofenotípicos: A partir de la expresión antigénica de diferentes proteínas expresadas por los blastos, podemos clasificar la leucemia. Así en LMA encontramos expresión de marcadores de células mieloides que establecen el linaje como CD117, CD13, CD33, CD34, MPO y HLA-DR entre otros.
2. Citogenéticos: El estudio del cariotipo celular a partir de tinción con Giemsa. Nos permite identificar diferentes anomalías cromosómicas.
3. Moleculares: La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o técnicas más específicas. Identifican tanto reordenamientos crípticos, como mutaciones específicas, sobre-expresión de diferentes genes o perfiles de metilación característicos para el diagnóstico y clasificación pronóstico del paciente.

Basándose en la técnica de PCR, actualmente se utilizan técnicas de NGS (next-generation sequencing) que se basan en la secuenciación al mismo tiempo de millones de fragmentos de DNA o RNA de una muestra en concreto.

### **2.6-Clasificación de las LMA**

En el 1976 se propuso la clasificación de la FAB (French-American-British)[13], un grupo cooperativo de hematólogos franceses, americanos y británicos. La clasificación de la FAB se basaba en el aspecto morfológico y el comportamiento citoquímico de las células blásticas antes de iniciar el tratamiento. Se han realizado varias modificaciones de esta clasificación a lo largo de los años [14-16] pero no diferencia todos los subtipos de LMA. La clasificación de la FAB

definía la LMA como la presencia de más del 30% de formas blásticas en la médula ósea y clasifica las LMA en 8 subtipos diferentes (M0-M7) (Tabla 1).

La clasificación actual de la WHO (Organización Mundial de la Salud; OMS) se basa en la combinación de factores clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y biológicos para clasificar las neoplasias mieloides. El requisito de blastos para diagnosticar la LMA es del 20% (Tabla 1).

- LMA con anomalías recurrentes: Corresponde aproximadamente al 11% de los casos con LMA e incluye variantes con anomalías citogenéticas y moleculares con significado pronóstico.
  - LMA con t(8;21)(q22;q21); *RUNX1-RUNX1T1*: Este grupo tiene una morfología de mieloblastos con núcleos no circulares, un citoplasma basófilo de color salmón, se identifican frecuentemente bastones de Auer y es común que la médula ósea presente eosinofilia. Como marcadores de superficie presenta CD19 y CD56.
  - LMA con inv(16)(p13,1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*: Se observa en un 7% de los pacientes con LMA. Se caracteriza por la presencia de mieloblastos, un componente monocítico y un número variable de eosinófilos inmaduros.
  - Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q21); *PML-RARA*: Leucemia promielocítica aguda, clasificada como M3 por la FAB, se caracteriza por la t(15;17) y la encontramos en un 17% de los pacientes con LMA. Se caracteriza por la infiltración de promielocitos en la médula ósea asociada a evidencia de coagulación

intravascular y fibrinólisis. También es común la presencia de múltiples bastones de Auer.

- LMA con  $t(9;11)(p22;q23)$ ; *MLLT3-MLL*: Se observan reordenamientos en 11q en aproximadamente el 6% de los pacientes con LMA y el 12% en niños. Los pacientes con  $t(9;11)$  pueden presentar coagulación intravascular diseminada, leucocitosis con infiltración gingival o de piel. Predominan los monoblastos y los promonocitos.
- LMA con  $t(6;9)(p23;q34)$ ; *DEK-NUP214*: Se ve en un 1% de los adultos y un 10% en niños. Típicamente presenta basofilia, pancitopenia y displasia multilineal. Las células tumorales expresan CD13, CD33, CD38, CD45 y HLA-DR. Existe una elevada incidencia de *FLT3-ITD*.
- LMA con  $inv(3)(q21q26.2)$  o  $t(3;3)(q21;q26.3)$ :*RPN1-EVI1*: Ambos reordenamientos se dan en un 1% de los casos con LMA. Se ha visto en LMA "de novo" y en leucemias secundarias a SMD. Se asocia frecuentemente a displasia. Las anomalías en 3q se asocian a un incremento de megacariocitos atípicos en médula ósea.
- LMA megacarioblástica con  $t(1;22)(p13;q13)$ ; *RBM15-MKL1*: Es un grupo poco frecuente (<0.5%). No se observa en pacientes con síndrome de Down. La mayoría de pacientes presentan hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia y un recuento leucocitario entre moderado y elevado. Morfológicamente las células a menudo presentan prolongaciones citoplasmáticas de tipo "blebs".
- LMA con mutaciones en *NPM1*: Se considera una entidad provisional. Se ha visto que confiere buen pronóstico en

ausencia de *FTL3-ITD*. Pacientes con mutaciones en *NPM1* y displasia multilineal tienen un pronóstico similar a aquellos que no presentan la displasia multilineal.

- LMA con mutaciones en *CEBPA*: También considerada una entidad provisional, la mayoría de casos presentan cariotipo normal. Confiere buen pronóstico si la mutación es de ambos alelos aunque la presencia de *FLT3-ITD* lo disminuye.
- LMA con cambios relacionados con mielodisplasia: Previamente denominado LMA con displasia multilineal, se definen por el criterio de más de un 20% de blastos al diagnóstico sin historia de tratamiento citotóxico anterior o con una o más de las siguientes características:
  - SMD previo documentado.
  - LMA con anomalías citogenéticas relacionadas con el SMD como monosomía del 5, del(5q), monosomía del 7, del(7q), isocromosoma 17p.
  - LMA con displasia multilineal definida como la presencia de más de un 50% de ambos linajes hematopoyéticos.
- LMA y SMD relacionadas con tratamiento de quimioterapia previo: Los agentes citotóxicos implicados serían los alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa II, antimetabolitos, agentes antitubulina y radiación ionizante en médula ósea.
- LMA no clasificable: Incluye los casos que no se pueden incluir en las categorías superiores. Estos pacientes siguen la clasificación de la FAB que no conlleva información sobre el pronóstico.
  - Leucemia mínimamente diferenciada (M0): Se presenta en menos de un 5% de los casos con leucemia. Los blastos

son redondos, con la cromatina dispersa y uno o dos nucleolos, no presentan gránulos citoplásmicos ni bastones de Auer. Presentan antígenos de hematopoyesis temprana, como CD34, CD38, HLA-DR, y antígenos mieloides como CD13, CD117 y CD33. En cambio carecen de antígenos de maduración CD15, CD11b y CD64.

- LMA sin maduración (M1): Con una frecuencia del 5-10%, se caracteriza por una elevada presencia de blastos (>90%). Los blastos son grandes con uno o dos nucleolos prominentes en el núcleo. Presentan antígenos de hematopoyesis temprana pero también uno o más antígenos mieloides (CD13, CD33, CD65, CD11b y CD15). No suelen presentar marcadores monocíticos (CD14, CD64).
- LMA con maduración (M2): Es un 10% de las LMA. Comúnmente presenta bastones de Auer. Expresa antígenos de superficie de hematopoyesis temprana (CD34, CD38, HLA-DR) y la mayoría de las células presentan también antígenos mieloides (CD13, CD33, CD65, CD11b y CD15).
- Leucemia mielomonocítica aguda (M4): La presentan un 5-10% de los pacientes. Presenta al menos un 20% de blastos, ya sean mieloblastos, monoblastos o promonocitos en médula ósea o sangre periférica. Tiene un componente monocítico importante que se puede observar morfológicamente o por la expresión de CD14, CD11c, CD64 y lisozima.
- Leucemia monoblástica y monocítica aguda (M5a y M5b): Con menos de un 5% de representación, la médula ósea

está compuesta de monoblastos, promocitos y monocitos con un bajo porcentaje de neutrófilos. Raramente presentan bastones de Auer. Prácticamente todos los casos presentan HLA-DR y al menos dos marcadores de diferenciación mieloide (CD14, CD4, CD11b, CD11c, CD64, CD68, CD36 y lisozima). En función del componente mayoritario se denomina monoblástica (>80% de monoblastos) o monocítica (<80% de monoblastos con predominio de monocitos maduros y promonocitos).

- LMA eritroide o eritroleucemia (M6): Los eritroblastos no siempre expresan marcadores clásicos de linaje mieloide, sino que a menudo muestran positividad de CD117, CD36 y glicoproteína A. Se diferencian dos tipos:
  - a. Tipo eritroide/mieloide: Con más de un 50% de elementos nucleados y un recuento de mieloblastos por encima del 20% en su forma no eritroides. La médula ósea está compuesta por precursores eritroides en todos los estados de maduración.
  - b. Tipo puro: Con más de un 80% de pronormoblastos. Puede presentar vacuolación del citoplasma alrededor del núcleo que no debe confundirse con las células vacuoladas del linfoma de Burkitt.
- Leucemia aguda megacarioblastica (M7): Con menos de un 5% de prevalencia presenta al menos un 20% de blastos con la mitad de ellos del linaje megacariocítico. Presentan marcadores CD41 o CD61. Los megacarioblastos con células con citoplasma granular y con núcleo redondo. En niños se asocia a la presencia de la

t(1;22) y síndrome de Down, ambas clasificadas en grupos separados.

- Leucemia basofílica aguda: Con una prevalencia menor del 1%, con blastos con el citoplasma moderadamente basofílico. El núcleo puede ser ovalado, redondo o bilobulado con la cromatina dispersa y de uno a tres nucleolos. Los blastos expresan CD13 y CD33 que son marcadores mieloides y CD123, CD203c y CD11b. Son negativos para CD117.
- Panmielosis aguda con mielofibrosis: es un subtipo raro de LMA. Es de naturaleza agresiva. La medula ósea es hiper celular y fibrótica con un incremento de precursores eritroides, granulocíticos y megacariocíticos.
- Sarcoma mieloide: Es una enfermedad extramedular de la línea granulocítica. Tiene una frecuencia del 2%. Puede presentarse al diagnóstico o en la recaída de otras enfermedades hematológicas.
- Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down: Los pacientes con síndrome de Down tienen predisposición a sufrir leucemia mieloide aguda, siendo el subtipo M7 el más frecuente. Se suele manifestar en el período neonatal y remite espontáneamente tras uno o tres meses. Los marcadores celulares de superficie suelen ser CD7, CD34, CD13, CD33 y CD61.
  - a. Mielopoyesis anormal transitoria: es un evento que ocurre en los neonatos con síndrome de Down. Se caracteriza por un elevado número de mieloblastos. Las características morfológicas y inmunofenotípicas son similares a las de la leucemia megacariocítica aguda (M7).



- b. Leucemia mieloide asociada a síndrome de Down:  
 Un 20-30% de los pacientes con mielopoyesis anormal transitoria sin resolver progresan a leucemia megacarioblastica en 1 a 3 años. También podemos encontrar pacientes con síndrome mielodisplásico.

**Tabla 1.** Clasificación de la LMA WHO y correspondencia con la FAB.

WHO	FAB
LMA con anomalías recurrentes LMA con t(8;21)(q22;q21); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> LMA con inv(16)(p13,1q22) o t(16;16)(p13,1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q21); <i>PML-RARA</i> LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> LMA con inv(3)(q21q26,2) o t(3;3)(q21;q26,2); <i>RPN1-EV11</i> LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> LMA con <i>NPM1</i> mutado (entidad provisional) LMA con <i>CEBPA</i> mutado (entidad provisional)	
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	
LMA i SMD relacionados con tratamiento quimioterápico previo	
LMA no clasificables	
LMA mínimamente diferenciada	M0
LMA sin maduración	M1
LMA con maduración	M2
Leucemia mielomonocítica aguda	M4
Leucemia monoblástica y monocítica aguda	M5a/M5b
Leucemia eritroide aguda	M6a/M6b
Leucemia megacarioblástica aguda	M7
Leucemia basofílica aguda	
Panmielosis aguda con mielofibrosis	
Sarcoma mieloide	

## **3-Tratamiento de la LMA**

### **3.1- Grupo CETLAM**

El Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM) tiene como misión el estudio de estas enfermedades y el diseño de protocolos terapéuticos adaptados al riesgo. Se fundó en 1988 y se constituyó como asociación jurídica en marzo de 2007. Desde su fundación ha promovido diferentes esquemas de tratamiento en el ámbito de los hospitales que tratan leucemias agudas y mielodisplasias de Cataluña, Baleares y en diferentes hospitales de la Comunidad Valenciana, Andalucía, Murcia, Madrid y Galicia.

### **3.2- Protocolos CETLAM**

Los protocolos del CETLAM se administran a los pacientes desde 1988 y estos protocolos se han ido adaptando a lo largo de los años en función de los nuevos hallazgos y de las nuevas técnicas. En el protocolo del 1988 el criterio de tratamiento era la disponibilidad de donante y actualmente en el protocolo del 2012 se incluyen criterios clínicos y biológicos para el ajuste de la terapia. Los protocolos LMA-88, LMA-94, LMA-99 y LMA-03 están cerrados. Actualmente el protocolo vigente que siguen los pacientes con LMA de novo es el LMA-12. Según el algoritmo terapéutico del grupo CETLAM (Apéndice 1), los pacientes reciben un tratamiento de inducción e intensificación con quimioterapia con la finalidad de eliminar las células blásticas leucémicas visibles en sangre y médula ósea.

El esquema de inducción e intensificación se ha modificado a lo largo de los años, en el protocolo del 1988 se daba DCE, en el del 1994 ICE en el del 1999 IDICE y en el del 2003 IDICE, con G-CSF en aquellos pacientes con menos de 30.000 leucocitos. En el protocolo actual, se administra G-CSF solamente tras la intensificación.

Los pacientes pueden recibir uno o dos ciclos de quimioterapia de inducción hasta llegar a la RC que se define como la presencia de menos de un 5% de blastos en sangre y la recuperación de los valores iniciales de neutrófilos y plaquetas en sangre.

Existe un porcentaje de pacientes que sufren una mortalidad precoz durante la inducción, en el protocolo LMA-88 fue del 11.2%, 8% en LMA-94, 11% en LMA-99 y 12% en LMA-03.

El porcentaje de pacientes que muestran resistencia a la quimioterapia de inducción fue del 14.2% en LMA-88, 20% en LMA-94, 17% en LMA-99 y sólo del 11% en LMA-03. Aproximadamente el 10% de los pacientes que alcanzan la RC, recaen precozmente. El resto de pacientes siguen con un tratamiento de quimioterapia de intensificación, que en el protocolo LMA-88 consistió en 2 ciclos, un primero de Mitox-ADAC y un segundo de Amsa-IDAC. En los protocolos LMA-94, LMA-99, LMA-03 y LMA-12 se administró un solo ciclo de Mitox-IDAC, con la particularidad que en el protocolo LMA-03 también se dio G-CSF en aquellos pacientes con menos de 30.000 leucocitos.

El tratamiento posterior ha evolucionado con los diferentes protocolos:

- LMA-88: en éste protocolo no hay una estratificación del tratamiento adaptado al riesgo, se realizaba un Alo-TPH o un Auto-TPH en función de la disponibilidad de donante

compatible. La fuente de precursores hematopoyéticos era la médula ósea.

- LMA-94: La estratificación al riesgo se basa en datos citogenéticos:
  - Pacientes con citogenética de buen pronóstico: Un ciclo de quimioterapia con ADAC.
  - Resto de pacientes: En función de la disponibilidad de donante se les hacia un Alo o un Auto-TPH. La fuente de progenitores en el caso del Auto-TPH fue la médula ósea y en los Alo-TPH la sangre periférica.
- LMA-99: La estratificación se basa en los datos citogenéticos y en los ciclos necesarios para la RC en la quimioterapia de inducción:
  - Pacientes con citogenética de buen pronóstico: Un ciclo de QT con ADAC
  - Pacientes con cariotipo normal y un ciclo en la inducción para la RC: Auto-TPH.
  - Resto de pacientes: en función de la disponibilidad de donante, un Alo o un Auto-TPH de sangre periférica.
- LMA-03: La estratificación al riesgo es en función de los datos citogenéticos, y por primera vez en los datos moleculares (*FLT3* y *MLL*), biológicos (índice leucocitario), la determinación de enfermedad residual mínima, y los ciclos de QT de inducción para la RC.
  - Pacientes con citogenética de buen pronóstico: Según el índice leucocitario, aquellos pacientes con un índice menor a 20 se les administra un ciclo de QT (ADAC) y aquellos con índice mayor a 20, Auto-TPH de SP.

- Pacientes con cariotipo normal, un ciclo para la RC, menos de 50.000 leucocitos, *FLT3* no mutado, sin enfermedad residual mínima (ERM<0.1%): Auto-TPH de SP.
- Resto de pacientes:
  - Con donante emparentado HLA-idéntico: menores de 50 años, Alo-TPH con selección CD34+, y de 51-70 años, Alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida.
  - Sin donante emparentado HLA-idéntico: Pacientes con menos de 60 años, auto-TPH de SP con anti-CD33 y a los pacientes de 60-70, auto-TPH convencional.
- LMA-12: La estratificación al riesgo se establece en función de los datos citogenéticos (según la clasificación del MRC refinada[17]), moleculares (*FLT3*, *MLL*, *NPM1* y *CEBPA*), otros biológicos (leucocitos) y la determinación de la ERM.
  - Pronóstico favorable: Pacientes con citogenética de buen pronóstico o con mutaciones en *NPM1* sin *FLT3-ITD* o con ratio *FLT3-ITD/FLT3wt* baja (<0.5) o con mutación bialélica de *CEBPA*: Se administran dos ciclos más de ADAC. Posteriormente se evalúa la ERM.
    - ERM negativa: No se administra más tratamiento.
    - ERM positiva: Pasa a seguir la estrategia terapéutica de los pacientes con riesgo adverso.
  - Pronóstico intermedio: Pacientes con cariotipo intermedio según el MRC revisado y con ausencia de

mutaciones en *NPM1*, de duplicación en tándem del gen *FLT3*, y de mutación bialélica de *CEBPA*:

- Con donante emparentado HLA-idéntico: Alo-TPH directo tras 1º ciclo de consolidación.
- Sin donante emparentado HLA-idéntico:
  - Con DNE o SCU: Alo-TPH.
  - Sin donante o con donante gemelo univitelino: Se administra un segundo ciclo de ADAC y Auto-TPH o TPH singénico.
  
- Pronóstico desfavorable: Pacientes con citogenética desfavorable según el MRC, incluido cariotipo monosómico, y/o detección de *FLT3-ITD* con alta carga alélica a nivel molecular. Además de los pacientes de PF que tras el 3º ciclo de ADAC muestran ERM y PI que tras la quimioterapia de consolidación muestran persistencia de la ERM.
  - Con donante: Alo-TPH de donante HLA-Id, DNE, SCU o haploidéntico
  - Sin donante o no elegible para alo-TPH:
    - Mantenimiento con AZA.
    - Estrategia terapéutica a decisión de cada centro.



## **4-Factores Pronóstico para la LMA**

### **4.1-LMA secundaria**

Aquellos pacientes que se diagnostican de LMA posterior a una mielodisplasia, a una citopenia de origen desconocido, otro tipo de alteración hematológica, o un antecedente de quimioterapia antineoplásica, tienen una menor tasa de RC, así como una menor SG y SLE a causa de una mayor TR [18].

### **4.2-Edad**

La edad es uno de los factores pronósticos adversos más importantes, que afecta tanto a la capacidad de obtención de la RC en la inducción como al riesgo de recaída [19, 20]. El pronóstico de los pacientes empeora con la edad. En aquellos pacientes menores de 60 años, la tasa de RC es del 75%, y en los mayores de 60 años del 45-50%. Esta diferencia también se observa en la supervivencia global que es del 35-40% en pacientes menores de 60 años e inferior al 15% en pacientes mayores de 60 años.

Se sugiere que la LMA en pacientes jóvenes resulta de un número limitado de eventos mutacionales que restringen la diversidad de los subclones leucémicos y que conservan la mayoría de las funciones. La leucemia en pacientes mayores resulta de una sucesión de mutaciones que generan múltiples subclones leucémicos con múltiples mecanismos de quimiorresistencia. Existe otra hipótesis que dice que la naturaleza de la LMA se determina por la edad de las células madre hematopoyéticas, los genomas se vuelven inestables



con la edad y los telómeros se acortan. Por lo tanto, estas células madre envejecidas generan una enfermedad con gran inestabilidad genética y una gran diversidad clonal. La dificultad de los pacientes de elevada edad para tolerar la quimioterapia se explicaría por la presencia de pocas células madre normales para repoblar la médula tras el tratamiento. Los pacientes mayores presentan una elevada frecuencia de células CD34 positivas y una elevada expresión de *MDR-1*.

Los buenos resultados del tratamiento obtenidos en los pacientes jóvenes no se han reproducido en pacientes mayores.

La edad no es una variable única para definir qué grupo de pacientes son candidatos a quimioterapia intensiva, ya que también se deben considerar otros aspectos que limitan la probabilidad de alcanzar la RC como las citogenéticas adversas y la presencia de comorbilidades [20].

### **4.3-Comorbilidades**

Las comorbilidad se define como la presencia de condiciones debilitantes o enfermedades asociadas que podrían complicar el curso de la leucemia.

Las comorbilidades se asocian a una mala tolerancia al tratamiento y un elevado riesgo de complicaciones.

Para evaluar las comorbilidades, se ha descrito un sistema de clasificación, el "Charlson Comorbidity Index" (CCI)[21-24] que asigna un "peso" (ponderación) diferente a 19 antecedentes patológicos o enfermedades asociadas. De esta forma se establece una ratio entre el

riesgo de mortalidad en presencia y en ausencia de la comorbilidad.  
(Tabla 2)

**Tabla 2 .** Ponderación de las comorbilidades según el índice de Charlson.

<b>“peso”</b>	<b>Comorbilidad</b>
1	Infarto agudo de miocardio
1	Insuficiencia cardíaca congestiva
1	Enfermedad vascular periférica (aneurisma aórtico $\geq 6$ cm)
1	Enfermedad cerebro vascular
1	Demencia
1	Enfermedad pulmonar crónica
1	Enfermedad reumática
1	Úlcera péptica
1	Enfermedad hepática leve (sin hipertensión portal, incluye hepatitis crónica)
1	Diabetes leve a moderada
1	Diabetes con complicaciones crónicas
2	Hemiplejia o paraplejia
2	Enfermedad renal
2	Tumores malignos no metastatizados (excluir >5años del diagnóstico)
3	Enfermedad hepática moderada o grave
6	Tumor sólido metastático
6	SIDA

Nota: En pacientes mayores de 40 años se añade 1 punto por cada década.

Estudios más recientes han demostrado que las comorbilidades predicen el resultado post-trasplante [25]. En base a estos estudios se generó un índice de comorbilidad específico HCT-CI (Hematopoietic cell transplantation comorbidity index)[26] que incluye enfermedades asociadas y aspectos biológicos (Tabla 3). Este índice ha sido validado en pacientes con LMA que recibieron un TPH y se demostró que el HCT-CI es importante para la toma de decisiones terapéuticas [27].

**Tabla 3.** Comorbilidades: Definiciones y “pesos” según los HCT-CI.

<b>Comorbilidades</b>	<b>Definiciones</b>	<b>“Peso”</b>
Arritmia	Fibrilación arterial o Flutter, síndrome de sick sinus o arritmias ventriculares	1
Cardíacas	Enfermedad arterial coronaria*, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio <u>o</u> FE>50%	1
Enfermedad inflamatoria intestinal	Enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa	1
Diabetes	Requerimiento de tratamiento con insulina o hipoglucemia oral, sin control solamente con la dieta	1
Enfermedades vasculares cerebrales	Isquemia transitoria o accidentes cerebro-vasculares	1
Alteración psiquiátrica	Depresión/ansiedad que requiere de consulta o tratamiento psiquiátrico al HCT	1
Hepáticas	Hepatitis crónica, bilirrubina >LSN a 1,5xLSN, o AST/ALT >LSN a 2,5 LSN	1
Obesidad	Pacientes con IMC>35 en adultos o un percentil de IMC de edad >95 en niños	1
Infección	Infección documentada o fiebre de etiología desconocida que requiere tratamiento con antimicrobianos antes, durante y después del régimen de acondicionamiento	1
Reumatología	LES, AR, enfermedad mixta TC, polimialgia reumática	2
Úlcera petética	Requiere tratamiento	2
Renal severa/moderada	Creatinina en sérum >2mg/dL, en diálisis, o antes del trasplante renal	2
Pulmonar moderada	DLCO i/o FEV <sub>1</sub> 66%-80% o disnea con actividad ligera	2
Tumor sólido previo	Tratado, excluyendo el cáncer de piel no-melanoma	3
Enfermedad valvular cardíaca	Excepto prolapso de válvula mitral asintomático	3
Pulmonar severa	DLCO i/o FEV <sub>1</sub> ≤65% o disnea a resto o requerimiento de oxígeno	3
Hemática moderada/severa	Cirrosis hepática, bilirrubina A1,5 LSN o AST/ALT>2,5xLSN	3

\* Una o más arterias coronarias estenosadas que requieren tratamiento con stnet o bypass

#### **4.4-Recuento leucocitario**

Un recuento leucocitario elevado se asocia a un incremento de la mortalidad en la inducción y a una mayor tasa de recaídas [28].

La hiperleucocitosis se ha relacionado con otros factores, como la duplicación en tándem de *FLT3*. Su valor pronóstico ha sido descrito por varios autores, pero no se ha llegado a un consenso para establecer el valor umbral por encima del cual el pronóstico empeora, aunque el más utilizado es el de  $50 \times 10^9$ /L. Algunos autores en cambio utilizan valores de 20, 30 y  $100 \times 10^9$ /L.

#### **4.5-Enfermedad residual mínima o medible (ERM)**

La enfermedad residual mínima o medible[29] se define como aquellas células leucémicas que permanecen indetectables a los métodos convencionales (morfológicos) de estudio.

El estudio de la persistencia o desaparición de células leucémicas durante la inducción, tras ella, después de la consolidación y durante el seguimiento posterior ha permitido establecer proyecciones pronósticas y estudiar la dinámica de las recaídas. Se ha visto que la persistencia de células leucémicas incrementa la probabilidad de recaída de la enfermedad y por consiguiente el pronóstico adverso en pacientes sin otros factores de riesgo conocidos[30]. Se considera que un paciente está en RC morfológica cuando presenta menos de un 5% de blastos en médula ósea.

Una de las técnicas más utilizadas actualmente para la detección de la ERM es la citometría de flujo (CMF), que utiliza la expresión aberrante de antígenos de superficie de las células leucémicas para identificar

células residuales en posteriores análisis. Esta técnica nos permite identificar fenotipos aberrantes en un 70-80% de los pacientes con LMA. Es un método fácil y rápido aunque requiere individualización para cada paciente y depende de los paneles utilizados y la experiencia.

Existe la CMF multiparamétrica que es útil prácticamente en todos los casos de LMA, su limitación es la sensibilidad subóptima en algunos casos.

Para incrementar la sensibilidad, la mejor opción a la detección de ERM por técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es capaz de detectar una célula leucémica entre un millón de células normales. Además, nos permite estandarizar la técnica para que sea reproducible y comparable entre laboratorios. Sin embargo la ERM por técnicas de PCR se ve limitada por la necesidad de disponer de una diana molecular como *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* o *DEK-CAN* o bien de la expresión aberrante de genes como la nucleofosmina (*NPM1*), el gen del Tumor de Wilms (*WT1*) o el gen *PRAME*.

La determinación de la ERM a lo largo de la enfermedad, ya sea durante la fase de aplasia, tras la inducción, la consolidación, el trasplante o en posteriores evaluaciones, nos ayuda a determinar tanto la respuesta al tratamiento como a diferenciar entre aquellos pacientes que van a recaer de aquellos que están potencialmente curados. Asimismo, es también una herramienta para decidir la estrategia terapéutica a seguir [31, 32].

## 4.6-Citogenética

Aproximadamente el 60% de los pacientes diagnosticados de LMA presentan anomalías citogenéticas. Está ampliamente demostrado que la presencia de ciertas alteraciones cromosómicas se asocian con diferentes probabilidades de obtención de la RC, presentan diferente supervivencia y probabilidad de recaída. [33-35]. Estas anomalías son marcadores de lesiones moleculares relacionadas con factores que participan en el desarrollo y homeostasis de la hematopoyesis. La producción de proteínas aberrantes de los genes de fusión desregulan la proliferación, diferenciación o muerte programada de los precursores hematopoyéticos.

Se pueden diferenciar tres grupos de riesgo: Favorable, Intermedio y Adverso, con distinta supervivencia y tasa de recaída [33, 34]. Existe un grupo de anomalías citogenéticas con significado pronóstico incierto y esto genera discrepancias en las clasificaciones de los diferentes grupos. Aunque todos coinciden con las alteraciones que confieren pronóstico favorable, las diferencias se observan en el pronóstico intermedio y adverso. Existen diferencias en el impacto pronóstico de las alteraciones asociadas a la  $t(8;21)$ , las translocaciones que involucran 11q23 y el número de alteraciones a partir del cual se considera cariotipo complejo que va de 3 a 5 anomalías[17].

Aunque la clasificación más utilizada sea la del MRC, otros grupos como SWOG/ECOG, CALGB, GIMEMA, AMLSG y HOVON/SAKK han propuesto su propia clasificación. (Apéndice 2)

- Pronóstico favorable:  $t(8;21)$ /  $inv(16)$ / $t(16;16)$  y  $t(15;17)$   
Aproximadamente el 25% de los pacientes presenta citogenética favorable, en el grupo CETLAM es del 14% (LMA-

88: 18%, LMA-94: 17%, LMA-99: 17%, LMA-03: 14%). Se da principalmente en pacientes jóvenes con LMA “de novo”, la tasa de remisiones completas es de aproximadamente el 90% y la supervivencia global a los 5 años es de alrededor del 65%. Se pueden encontrar anomalías asociadas, como la pérdida de un cromosoma sexual (-X,-Y), trisomía del 8 (+8), trisomía del 22 (+22) y deleciones en 9q[36]. Existen además otros factores con pronóstico adverso como un elevado recuento leucocitario [37], las mutaciones en *c-KIT* y presencia de deleciones en 9q [38]. En este tipo de pacientes, debido a su pronóstico favorable y su buena respuesta a la quimioterapia intensiva, el trasplante alogénico no supondría un beneficio.

- **Pronóstico Adverso:** Las alteraciones citogenéticas más frecuentes suelen ser monosomía del 7 (-7), deleciones en 7q, monosomía del 5 (-5), deleciones en 5q, anomalías en 3q21-q23 o cariotipo complejo[33, 34]. La mayoría de grupos definen el cariotipo complejo como 3 o mas alteraciones citogenéticas, aunque la revisión del MRC del 2010 lo define como 4 o mas alteraciones. El cariotipo complejo no suele incluir reordenamientos equilibrados, sino que predominan alteraciones no balanceadas descritas anteriormente y las ganancias en 8q, 11q y 21q[39-41]. Estos pacientes con citogenética de pronóstico adverso suelen tener una edad mas avanzada, y no superan el 10-20% de los pacientes con LMA. La supervivencia a los cinco años de este grupo es del 5%. Este tipo de pacientes con un pronóstico tan malo serían candidatos a trasplante alogénico o ensayos clínicos.
- **Pronóstico Intermedio:** El resto de pacientes. Este grupo incluye pacientes con cariotipo normal, o con anomalías citogenéticas

identificables por banda G y sin un pronóstico definido. La supervivencia global a los 5 años es del 30-40%.

En 2008 el grupo de HOVON-SAKK postuló que lo que confiere un pronóstico adverso, más que el cariotipo complejo, es la presencia de monosomías, definiendo un grupo de pacientes con cariotipo monosómico [42], que se caracteriza por la presencia de dos o más monosomías autosómicas o una monosomía con presencia de una o más anomalías estructurales (excluyendo aquellas de pronóstico favorable). El pronóstico de este grupo de pacientes es infausto. Conviene señalar también que se estableció el umbral en 4 anomalías para definir el cariotipo complejo.

### **4.7-Alteraciones moleculares**

Existen limitaciones en el uso del análisis citogenético para la estratificación en grupos pronóstico debido a la imposibilidad de obtener mitosis, la presencia de reordenamientos crípticos invisibles y el hecho que un 40% de los pacientes presenten citogenética normal. Es por eso que se han descrito alteraciones moleculares que aportan más información a la proporcionada por los datos clínicos, biológicos y citogenéticos (Tabla 4).



**Tabla 4.** Clasificación de las mutaciones.

<b>Función</b>	<b>Gen</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Grupo</b>
Tirosin-kinasa	<i>FLT3</i>	ITD: 20–28 %	Clase-I
		KDM: 5–10 % (D8365)	
	<i>KIT</i>	25–30 % en <i>CBF-LMA</i>	
Ruta RAS	<i>NRAS</i>	9–14 %	
	<i>KRAS</i>	5–17 %	
Fosfoproteína de intercambio núcleo-citoplasma	<i>NPM1</i>	25–35 %	Clase-II
Factores de transcripción	<i>CEBPA</i>	10–20 %	
	<i>RUNX1</i>	5–13 %	
	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	10–15 %	
	<i>CBFB-MYH11</i>	3–8 %	
	<i>MLL fusión</i>	5–9 %	
Hidroximetilación del DNA	<i>TET2</i>	8–27 %	Clase-III? (mutaciones en modificadores epigenéticos)
	<i>IDH1</i>	6–9 %	
	<i>IDH2</i>	9–12 %	
Metilación del DNA	<i>DNMT3A</i>	18–23 %	
Metilación Histona 3 K4	<i>ASXL1</i>	10–13 %	Clase II-III?
	<i>ASXL1</i>	5–6 %	
		PTD: 5–13 %	
Mutación	<i>WT1</i>	10-13%	Clase I-II-III?

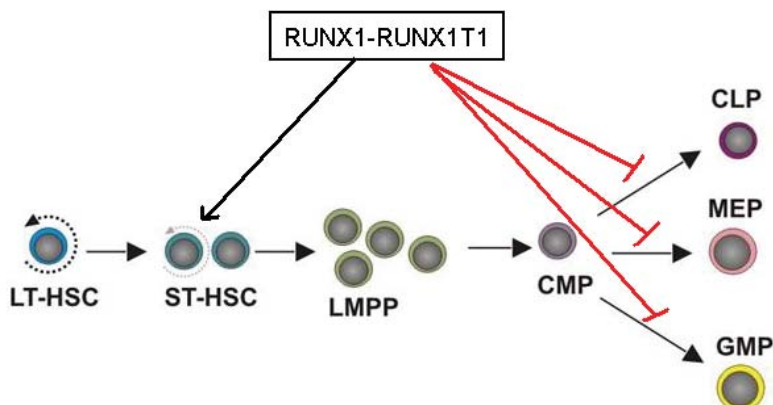
#### 4.7.1-Core Binding factor

El complejo core binding factor es un factor de transcripción heterodimérico involucrado en la regulación de la hematopoyesis. Está formado por tres subunidades CBFalfa que se unen al DNA, RUNX1, RUNX2 y RUNX3, y por una sub-unidad CBFbeta. Estos genes

están involucrados en más de 20 translocaciones implicando los genes *RUNX1* (*AML1*) y *CBF-beta*. Las reordenaciones más comunes son la t(8;21)(q22;q22) generando el gen de fusión *RUNX1-RUNX1T1* y la inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) que generan el gen de fusión *CBFbeta-MYH11*. Ambas son mutaciones de Clase II.

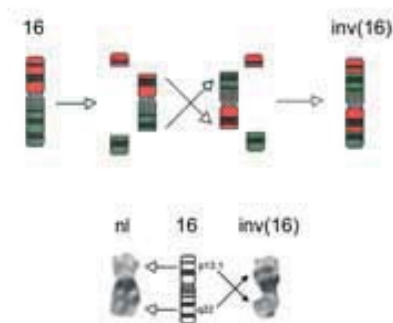
Son pacientes de relativo buen pronóstico debido a su capacidad de responder a la quimioterapia y su elevada tasa de remisiones completas. Estos pacientes se beneficiarían de terapias menos agresivas.

- *RUNX1-RUNX1T1/AML1-ETO*: (Runx-related transcription factor 1) Se detecta en pacientes con t(8;21). La afinidad de *RUNX1* para unirse al DNA se ve incrementada por la proximidad de *RUNX1* con *CBFbeta*. Se trata de un reordenamiento que implica el gen *RUNX1* (*AML1*) localizado en el cromosoma 21 y el gen *RUNX1T1* (*ETO*) en el cromosoma 8. El gen *AML1-ETO* bloquea la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos e induce su auto-renovación (Figura 4). Se postula que la expresión de *AML1-ETO* no sería suficiente para iniciar el proceso de leucemogénesis, y sería necesaria la inactivación de otros genes como *JAK2*, *PI3K*, *AKT* y *KIT*[43, 44]. El 20% de los pacientes con LMA presentan este reordenamiento y se suelen asociar al subtipo M2 de la FAB. Se ha descrito que en estos pacientes, el recuento leucocitario al diagnóstico es un factor pronóstico independiente[37]. Además de la t(8;21) los pacientes pueden presentar otras anomalías asociadas como la pérdida de un cromosoma sexual que conjuntamente con la leucocitosis y la positividad de CD56 serían factores de pronóstico adverso.



**Figura 4.** Función de RUNX1-RUNX1T1. Bloqueo de la diferenciación e induce su autorenovación. Adaptado de Schuringa, J. and E. Vellenga, *Mechanisms involved in HSC self-renewal and hematopoietic lineage commitment. web page, 2012*[2].

- *CBFbeta-MYH11*: El reordenamiento implica la fusión de *CBFB* en 16q22 con el gen *MYH11* (*myosin heavy-chain-11*) en 16q13. Se asocia al subtipo M4 con Eosinofilia de la FAB y en raras ocasiones se asocia a M2 y M5. El recuento leucocitario y la edad son factores de riesgo para este grupo de pacientes[45, 46]. Los pacientes con *inv(16)/t(16;16)* pueden presentar trisomía 8, 21 y 22 que les confiere un menor riesgo de recaída[47].



**Figura 5.** Estructura del reordenamiento *CBFB-MYH11* causado por la *inv(16)(p13.1q22)*.

Extraído de <http://atlasgeneticsoncology.org/>.

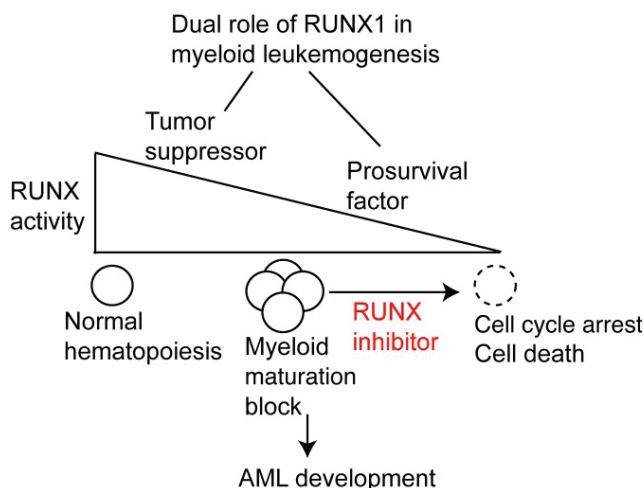
#### 4.7.2-Mutaciones en *RUNX1*

Localizado en 21q22, el gen *RUNX1* está formado por una parte N-terminal que contiene un dominio RUNT CBFbeta y media la unión al DNA y la interacción con el CBFbeta y un extremo C-terminal con un dominio transactivador[48]. Puede actuar como activador o represor en función de los genes con los que interactúa[49].

Encontramos mutaciones en *RUNX1* en pacientes no clasificables en los diferentes subgrupos de buen pronóstico de la WHO (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFbeta-MYH11*, *PML-RARA*, *NPM1* o *CEBPA*) [50].

Se han descrito mutaciones en el gen *RUNX1* en un 6-8% de pacientes.

Podemos encontrar mutaciones sin sentido en la parte N-terminal, y mutaciones que truncan la parte C-terminal. Estas mutaciones se asocian a mal pronóstico tanto en cohortes citogenéticamente heterogéneas[50], como en pacientes de cariotipo normal[48].



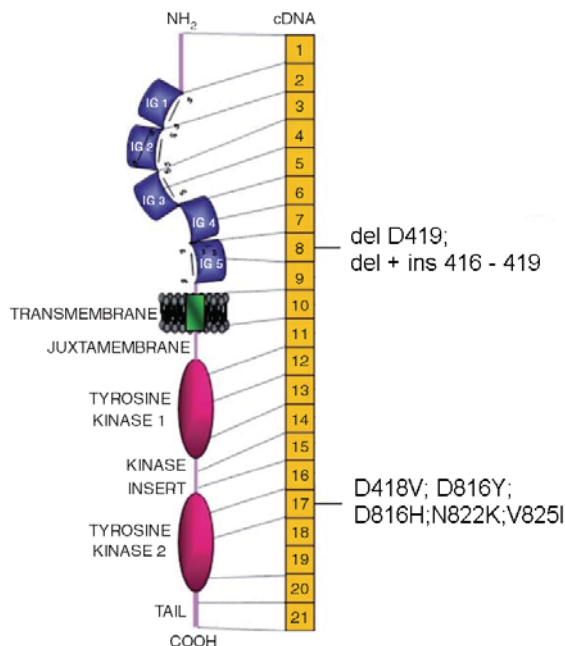
**Figura 6.** Funciones de *RUNX1*. *RUNX* activa la expansión mieloide activando genes supresores de tumores y reprimiendo genes de muerte celular. Inhibidores de *RUNX*, volverían a activar la muerte celular. Extraído de Goyama, S et al. *Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. J Clin Invest. 2013*[51]

#### 4.7.3-Mutaciones *C-KIT*

Localizado en 4q11-q12, codifica para un glicoproteína transmembrana de 145kD miembro de la familia de receptores tirosin-kinasa tipo III y juega un papel importante en la hematopoyesis. Las mutaciones de la familia de la tirosin-kinasas confieren una ventaja proliferativa o de supervivencia a las células blásticas y cooperarían con mutaciones del complejo CBF, RARalfa y MLL en el proceso de la leucemogénesis.

La estructura de *C-KIT* consiste en tres dominios: extracelular, transmembrana y intracelular con el dominio tirosin-kinasa. Cuando se activa el receptor de *C-KIT*, este se dimeriza y fosforila. Las mutaciones en *C-KIT* se encuentran principalmente en el exón 17 que codifica para el “loop” activador del dominio kinasa y presenta mutaciones puntuales en el codón 816 y 822, y en el exón 8 que codifica para el dominio extracelular del receptor inserciones/deleciones en el codón 417 y 419 (Figura 7).

Encontramos mutaciones en *C-KIT* en pacientes con *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFb-MYH11*. Aproximadamente el 20-30% de los pacientes con leucemias CBF presentan mutaciones en el gen *KIT* y se asocian con un elevado recuento leucocitario y los pacientes con mutación en el exón 17 se asocia a un elevada incidencia de recaída. La relevancia de las mutaciones en el exón 8 en los pacientes con *inv(16)* es controvertida. Así mismo, algunos autores sugieren que el valor pronóstico de las mutaciones en *C-KIT* varía también en función de la edad del paciente.



**Figura 7.** Estructura de la glicoproteína KIT y sus mutaciones en la LMA.

Adaptado de Goyama, S et al. *Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells.* *J Clin Invest*, 2013[51]

#### 4.7.4-Mutaciones *FLT3*

El gen *FLT3* (*FMS-Like Tirosin-quinase 3*), se localiza en 13q12, es un receptor tirosin-quinasa tipo III, está formado por cinco dominios inmunoglobulin-like, uno trans-membrana, uno juxtamembrana y un dominio intracelular con dos dominios protein-quinasa. Está implicado en la hematopoyesis normal, y participa en la supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas. Se expresa en una proporción muy importante de blastos leucémicos.

Una de las alteraciones mas frecuentes en LMA (15-30% casos con LMA) es la duplicación interna en tándem (ITD) de los exones 14-15, con lo que se origina un fragmento anormal: una prolongación del

segmento yuxtamembrana. Esta forma de *FLT3* determina una activación constitutiva del receptor con estimulación de las rutas de señalización tipo *AKT*, *MAPK* y *JAK2* que conllevan un aumento de la proliferación y supervivencia celular [52]. La longitud de la duplicación del DNA varía entre 15 y más de 300 pares de bases.

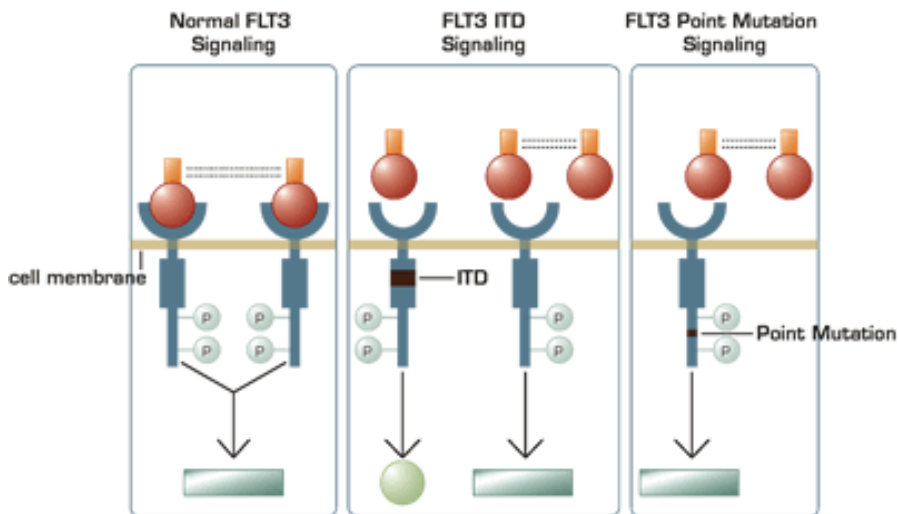
La ITD se observa en mayor frecuencia en pacientes con citogenética de riesgo intermedio. En la actualidad es un factor pronóstico adverso dentro de este grupo asociado a una mayor probabilidad de recaída y una disminución de la supervivencia. También se ha visto que se asocia a leucocitosis y blastosis.

Se está discutiendo si es la simple presencia de la mutación la que confiere mal pronóstico, o si está relacionado con la medida de la ITD[53] o con la relación entre los alelos mutados y germinales en términos de ratio *FLT3-ITD*/germinal [54, 55]. Algunos autores sugieren que los pacientes con una baja ratio alélica presentan una supervivencia similar a aquellos pacientes sin la ITD del *FLT3*. Pacientes con la duplicación interna en tándem menor de 40 pb, y aquéllos en los que la ITD se inserta en dirección 3' del dominio yuxtamembrana tienen un pronóstico aún más infausto.

Además de la ITD, el gen *FLT3* puede presentar mutaciones que afectan al codón 835 y 836 (D835/I836) en el dominio tirosin-kinasa que determina una hiperfunción de este dominio. Estas mutaciones se presentan en un porcentaje muy bajo de pacientes (7-8%) y su significado pronóstico es controvertido [56]. Estas mutaciones se asocian a hiperleucocitosis.

También existe una mutación en el dominio yuxtamembrana, en el codón 20 que se ha encontrado en un 2% de los pacientes con LMA (*FLT3-840GS*)[57], y una mutación en la porción N-terminal del dominio tirosin-kinasa (*K663Q*)[58]. Las mutaciones de *FLT3*

representan una posible diana terapéutica para el tratamiento con inhibidores tirosin-kinasa.



**Figura 8.** Mutaciones en el gen *FLT3*. Izquierda: *FLT3* germinal. Centro: Duplicación interna en tándem. Derecha: Mutación puntual del gen *FLT3*.

Extraído de Polge, E., *Mutations Forming Subgroups in AML: Just Like Cells, They Are Constantly Dividing and Interacting. American Society of Hematology. The hematologist, 2007.*[59].

#### 4.7.5-Mutaciones *NPM*

El gen *NPM1* (*Nucleophosmin Member 1*) se localiza en 5q32, codifica por una fosfo-proteína lanzadera núcleo-citoplasma implicada en varias funciones celulares como el control de la formación y exportación del complejo ribosomal, la estabilización de oncosupresores (p14-arf) y la regulación de la duplicación del centrosoma. En su forma germinal se localiza en el núcleo. Su forma aberrante se localiza en el citoplasma, este cambio de localización lo provoca una duplicación de 4 a 6 pares de bases en el exón 12[60] y



es un evento crítico para la leucemogénesis ya que afecta a múltiples rutas celulares (Figura 9).

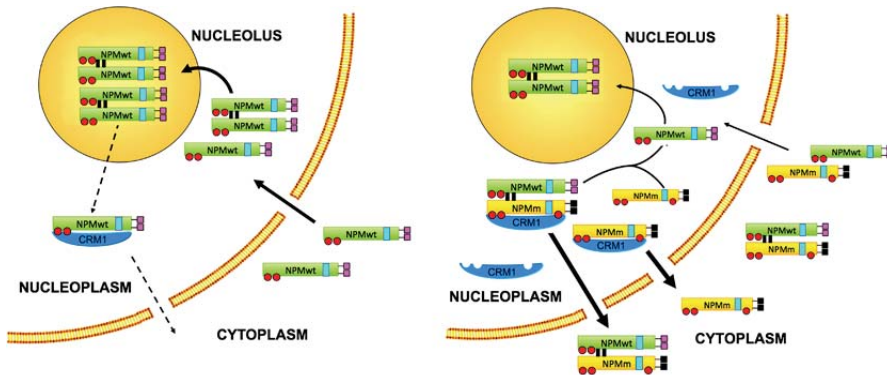
Las mutaciones en *NPM1* se asocian al sexo femenino, leucocitosis, un elevado recuento de plaquetas y blastosis.

Se han detectado en un 30% de los pacientes con LMA y aproximadamente en el 50% de los pacientes con cariotipo normal. Las mutaciones de *NPM1* se correlacionan con una buena respuesta a la quimioterapia de inducción y una elevada supervivencia, incluso en pacientes de edad avanzada[61].

Las mutaciones en *NPM1* suelen ser estables, aunque no siempre, a lo largo de la enfermedad y podemos detectar niveles ascendentes de *NPM1* mutado en pacientes en recaída, e incluso años después del diagnóstico. Esta característica hace de esta mutación una diana susceptible de ser analizada en los estudios de enfermedad residual mínima mediante la evaluación del número de copias mutantes de *NPM1* en diferentes momentos del tratamiento. La detección de la ERM se realiza mediante técnicas de PCR.

La mutación *NPM1* se asocia a *FLT3-ITD*, con un 40% de los pacientes que presentan ambas mutaciones. En ausencia *FLT3-ITD* o cuando la ratio alélica *FLT3-ITD/FLT3wt* es baja [55] la mutación del gen *NPM1* confiere pronóstico favorable, en términos de mejora de la respuesta a la quimioterapia[62]. Estos pacientes tienen una entidad diferenciada en la nueva clasificación de la WHO (Tabla 1) y presentan un perfil de expresión génica distinto. El tratamiento de estos pacientes se asemeja más al tratamiento de la LMA con alteraciones en los genes *CBF*.

Algunos autores han sugerido que las mutaciones en *IDH1* modularían el efecto pronóstico de los pacientes *NPM1* mutado sin la *FLT3-ITD*[44].



**Figura 9.** Localización anómala de la nucleofosmina en LMA. Izquierda: mecanismo de transporte núcleo-citoplasma de *NPM1* germinal. La importación domina vs. la exportación. Derecha; Mecanismo aberrante de la expresión citoplasmática de *NPM1* en LMA con mutación en *NPM1*. La exportación nuclear predomina sobre la importación nuclear.

Extraído de *Falini, B., et al., Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. Leukemia, 2009. [63]*

#### 4.7.6-Mutaciones de CEBPA

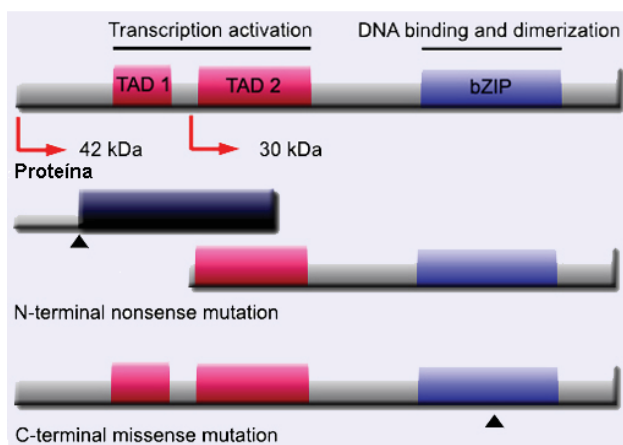
El gen *CEBPA* (*CCAAT enhancer binding protein alpha*) se localiza en 19q13.1 y codifica para un miembro de la familia *bZIP* (*Basic region leucine zipper family*). Está implicado en la diferenciación mieloide y el stop en el ciclo celular y su disrupción resulta en un bloqueo selectivo y temprano de la maduración granulocítica.

Aproximadamente el 8-10% de los pacientes con LMA presentan mutaciones en *CEBPA*. Se suelen asociar a LMA de cariotipo normal y adoptan una morfología de M1 o M2 de la FAB. En pacientes sin *FLT3-ITD*, se han asociado a pronóstico favorable[64]. No se han encontrado mutaciones en *CEBPA* en pacientes con cariotipo de buen pronóstico (t(8;21) e inv(16)/t(16;16)).

Las mutaciones se pueden dar tanto en la parte N-Terminal, lo que se traduce en la sobre expresión de una proteína más corta, (30kDa) o en C-Terminal (42kDa) que origina una proteína truncada que afecta a la región de unión al DNA y a la homodimerización y heterodimerización (Figura 10).

La mayoría de pacientes presentan las dos mutaciones en alelos separados. Se ha demostrado que sólo las mutaciones bialélicas confieren pronóstico favorable[65].

Un pequeño porcentaje de pacientes presentan mutación en *CEBPA* y en *NPM1* (4%) o *FLT3-ITD*. Diferentes estudios han visto que estas dobles mutaciones se encuentran en casos con mutaciones monoalélicas de *CEBPA*[66].



**Figura 10.** Mutaciones en *CEBPA*. La mutación N-terminal genera una proteína más corta, y la mutación C-terminal una proteína truncada. Adaptado de <http://atlasgeneticsoncology.org/>

#### 4.7.7-Alteraciones gen *MLL*

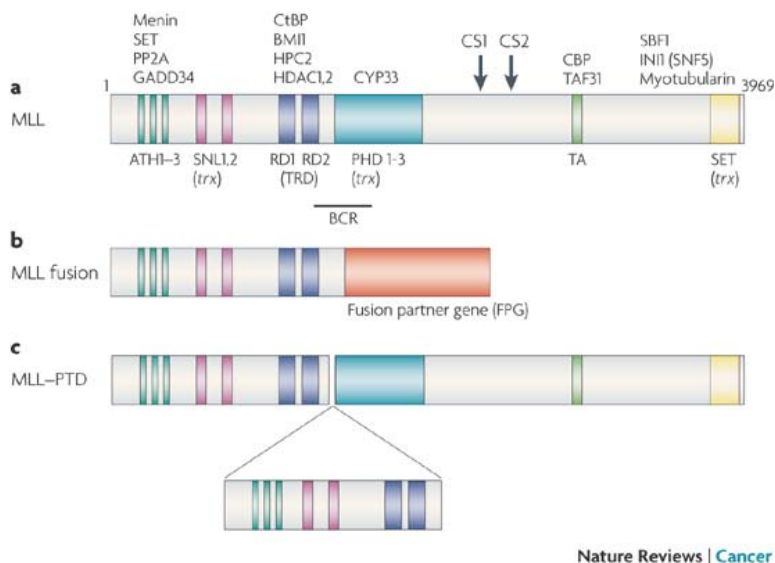
El gen *MLL* se altera como consecuencia de translocaciones cromosómicas recíprocas y por duplicaciones intragénicas en tándem (*MLL-PTD*) La lista de genes “partner” es muy extensa (más de 50

genes). En las translocaciones que afectan a *MLL* (11q23) se origina una proteína quimérica entre la parte terminal 5' del gen *MLL* y la parte terminal 3' del gen "partner". Entre un 10-15% de los pacientes presentan esta anomalía que confiere pronóstico intermedio o adverso. Aunque se puede presentar en todos los subtipos de la FAB, hay una mayor incidencia en M4 y M5. Algunas clasificaciones incluyen todos los reordenamientos que involucran 11q23 cómo pronóstico adverso, mientras que otros grupos excluyen de este grupo a la t(9;11)(p21-22;q23) y t(11;19)(q23;p13). (Tabla 2)

De forma característica *MLL* presenta también una duplicación intragénica (*MLL-PTD*) en tándem. Esta lesión es típica de LMA con cariotipo normal o bien con trisomía 11[67, 68], así como a la presencia de *FLT3-ITD*. Asociada a pacientes de edad avanzada, la mayoría de pacientes corresponden a los subtipos M1 y M2 de la FAB. Con una incidencia entre el 5-7%, se asocia a una menor duración de la remisión completa [69-71].

La presencia de *MLL-PTD* está asociada al silenciamiento del gen *MLL* normal por mecanismos epigenéticos. Inhibidores de las histonas deacetilasas podrían reactivar la transcripción del gen *MLL* germinal silenciado incrementando la muerte celular[72].

Tanto en las translocaciones como en *MLL-PTD* dan lugar a una proteína más larga de lo normal que mantiene el dominio SET C-terminal con actividad metiltransferasa[70, 71].



**Figura 11.** Gen MLL, gen de fusión MLL y MLL-PTD.

Extraído de Andrei V. Krivtsov & Scott A. Armstrong. *MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. Nature Reviews Cancer 2007*[73].

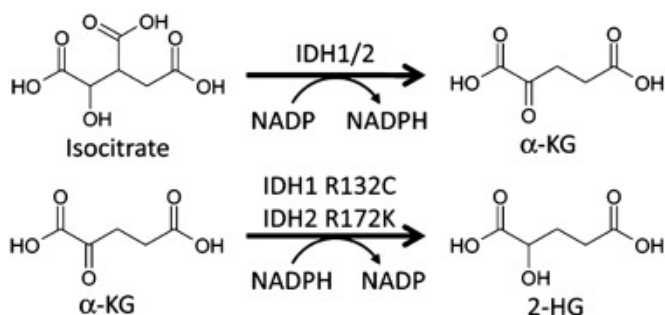
#### 4.7.8-Mutaciones de *IDH1* e *IDH2*

A partir los trabajos de secuenciación del genoma de LMAs, se ha podido identificar la presencia de mutaciones recurrentes en el gen *IDH1* (*Isocitrate deshidrogenase-1*) en la posición R132. Posteriores análisis permitieron la identificación de mutaciones en *IDH2* (posición R140 y R172) que se encuentran mutados en aproximadamente el 20% de los pacientes con citogenética normal. Ambas mutaciones son auto excluyentes, con un porcentaje muy pequeño de pacientes que presentan ambas mutaciones (0.3%).

Estas mutaciones reducen la afinidad de *IDH1* e *IDH2* al isocitrato e incrementa la afinidad para alfa-ketoglutarato y NADPH con lo que se genera un neomeabolito (2-hydroxyglutarato) cuyo acumulo en exceso se ha observado en pacientes con LMA y mutaciones en *IDH1* e *IDH2*. El neometabolito 2-hidroxioglutarato inhibe la actividad

enzimática de *TET2* y estimula *HIF1-alfa*, lo que permite la iniciación y promoción de la leucemia. (Figura 12).

El efecto pronóstico de las mutaciones *IDH1* e *IDH2* se restringe a los pacientes con cariotipo normal, *NPM* mutado y *FLT3* germinal. Aquellos pacientes que presentan mutaciones en *NPM1* sin la *FLT3*-ITD y con mutaciones en *IDH*, forman un grupo de riesgo favorable, diferenciado de aquellos que no presentan mutaciones en *IDH* [74]. Mutaciones de *IDH2* en la posición R172 presentan un fenotipo más agresivo.



**Figura 12.** Mecanismo de acción del gen IDH.

Adaptado de Gross, S et al. *Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations.* *J Exp Med*, 2010.[75]

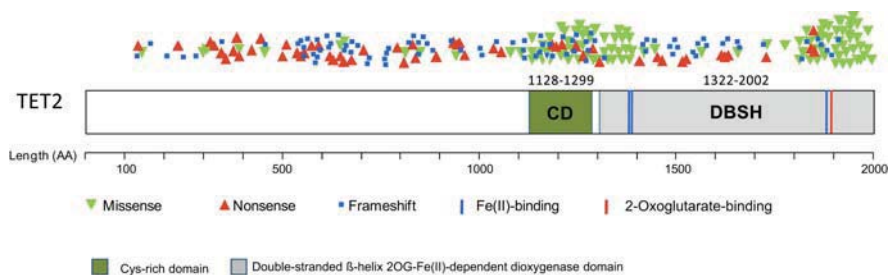
#### 4.7.9-Mutaciones en *TET2*

El gen *TET2* (tet methylcytosine dioxygenase 2) se localiza en 4q24. *TET2* es un enzima que cataliza la conversión de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina. La 5-hidroximetilcitosina se ha visto recientemente que es un marcador epigenético y un metabolito intermediario durante la demetilación de las citosinas. Se ha sugerido que está asociada a la regulación transcripción al para funciones de promotor y potenciador.

Las mutaciones en *TET2* son auto-excluyentes con las mutaciones de *IDH1* e *IDH2*, lo que sugiere un defecto epigenético similar [76]. *TET2* es un gen que regula el desarrollo hematopoyético en las fases embrionarias mediante mecanismos epigenéticos. Las mutaciones en *TET2* repercuten en las funciones de las células precursoras hematopoyéticas vía modificaciones epigenéticas [77]. Se han descrito mutaciones en diferentes neoplasias mieloides, incluido la LMA con una incidencia 12-17%. En los pacientes con SMD, las mutaciones en *TET2* confieren un pronóstico favorable, mientras que en LMMC las mutaciones en *TET2* se asocian a un pronóstico desfavorable[78].

El valor pronóstico en LMA es controvertido. Algunos autores sugieren que no se existe relación entre las mutaciones de *TET2* y la tasa de remisiones completas, mientras que otros autores han observado un efecto desfavorable en pacientes con cariotipo normal [79, 80].

El efecto negativo de las mutaciones en *TET2* se relaciona con la presencia de *FLT3-ITD* y la ausencia de mutaciones de *NPM1* y *CEBPA*.



**Figura 13.** Localización de las mutaciones en *TET2*.

Extraído de *Mohr, F., et al., TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. Exp Hematol, 2011 [81]*

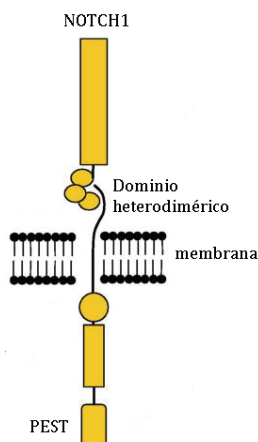
#### 4.7.10-Alteraciones en *NOTCH*

El gen *Notch* está altamente conservado a lo largo de la evolución y está implicado en la proliferación, diferenciación y apoptosis. Puede funcionar como oncogén o como gen supresor de tumores, dependiendo del tipo celular.

Existen 4 genes *Notch* (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3* y *Notch4*), que codifican para receptores de superficie. Cuando se unen al ligando, el dominio intracelular de Notch se transloca al núcleo e interacciona con factores de transcripción como genes de la familia *Hes* y *Herp*, que pertenecen a una familia de represores transcripcionales.

Cuando *Notch* está mutado, se da una activación constitutiva de su ruta de señalización en la leucemia linfoblástica aguda de células T.

Una elevada expresión de *Notch1* en LMA acorta la supervivencia e incrementa la probabilidad de recaída [59]. La relevancia de la expresión anormal de *Notch1* en LMA es motivo de estudios actualmente en curso.



**Figura 14.** Estructura de *NOTCH1*.

Extraído de Palomero, T et al. *Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-ALL. Clin Lymphoma Myeloma. 2009.* [82]

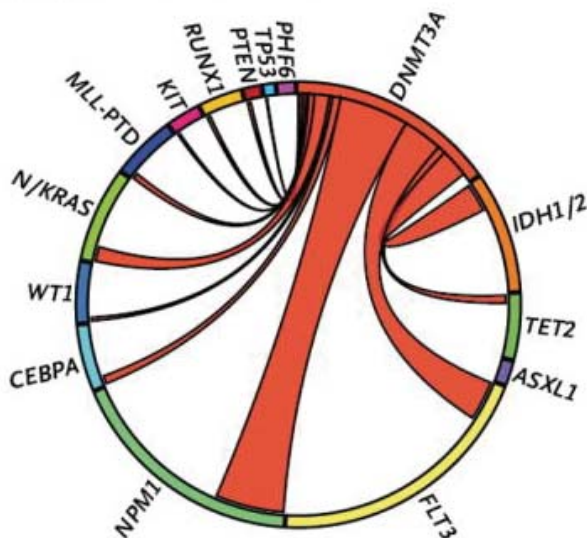


#### **4.7.11-Mutaciones en *DNMT3A***

Aproximadamente el 20% los pacientes con LMA presentan mutaciones en el gen *DNMT3A* (*DNA metiltransferasa 3A*). Los genes *DNMT* catalizan la conversión de citosina en 5-metilcitosina. *DNMT3A* conjuntamente con *DNMT3B* son responsables de la metilación del DNA y su mantenimiento, y funcionan independientemente de la replicación. La metilación de la citosina es una modificación epigenética involucrada en el control de la regulación de la expresión génica. Una metilación anormal tendría un efecto en la iniciación, progresión y mantenimiento de la leucemogénesis.

Se han descrito mutaciones en *DNMT3A* en un 18-23% de los pacientes con LMA y en un 20-35% de pacientes con cariotipo normal. Se describen varias mutaciones de pérdida de función en todos los exones de *DNMT3A*, aunque la mutación más frecuente es una mutación puntual sinsentido en posición R882 que disminuye la actividad catalítica y la afinidad de la unión al DNA. Los perfiles de metilación aberrantes inducidos por la mutación podrían estar asociados a la progresión leucémica [76].

Se ha sugerido que las mutaciones en el gen *DNMT3A* podrían tener un efecto pronóstico adverso [74, 83], y que estarían asociadas a mutaciones en *NPM1* y *FLT3* (Figura 15)



**Figura 15.** Asociaciones de las mutaciones en *DNMT3A*.

Extraído de Patel, JP et al. *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*, *N Engl J Med*, 2012[74]

#### 4.7.12-Mutaciones en el gen *RAS*

La familia de *RAS* incluye a diversas proteínas asociadas a la membrana que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis. Encontramos 3 genes *RAS* funcionales que contienen 4 exones cada uno: *N-RAS*, *K-RAS* y *H-RAS*. Mutaciones en los codones 12, 13 y 16 confieren una activación constitutiva de la proteína *RAS*[84].

Las mutaciones más frecuentes son las que se dan en *NRAS* y se ha visto que un 10-30% de los pacientes con LMA.

El efecto pronóstico de estas mutaciones es controvertido. En algunos estudios se ha observado que *NRAS* tiene un impacto negativo en el pronóstico de la enfermedad[85], mientras que en otros estudios este impacto negativo se limita a pacientes con citogenética de pronóstico favorable[86]. En otros trabajos no se observa ninguna asociación con el pronóstico favorable [87]. De tal forma, aquellos pacientes con

mutaciones en *RAS*, tratados con quimioterapia intensiva tendrían menor probabilidad de recaída [88].

#### **4.7.13-Alteraciones en *WT1***

El gen del tumor de Wilms (*WT1*) está localizado en 11p13 y codifica para una proteína de unión al DNA en forma de dedos de zinc. Puede actuar como represor o activador en función del contexto celular y cromosómico y juega un papel esencial en la leucemogénesis y la oncogénesis de progenitores hematopoyéticos.

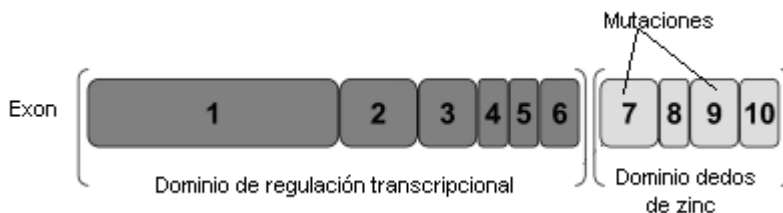
Se sobre-expresa en más del 90% de las células leucémicas con lo que se ha utilizado como marcador de enfermedad residual mínima para aquellos pacientes que no presentan ninguna anomalía molecular o cromosómica[89].

Existen discrepancias sobre la relación sobre-expresión de *WT1* al diagnóstico y el pronóstico. Un incremento de los niveles de *WT1* sería un predictor de la recaída. También podrían utilizarse los niveles elevados de *WT1* para identificar pacientes con alta probabilidad de recaída tras un trasplante alogénico.

El hecho de que *WT1* se sobre-exprese en la mayoría de pacientes lo hace un buen candidato para el seguimiento de la enfermedad residual mínima.

En un 10% de los pacientes con leucemia aguda, *WT1* esta mutado, las mutaciones se dan principalmente en los exones 7 y 9, y se han asociado a una menor incidencia de remisiones completas y a una elevada tasa de quimiorresistencia[90]. Las mutaciones del exón 7 generan una proteína truncada con pérdida de la función de regulación de la transcripción. Las mutaciones del exón 9 son menos frecuentes que las del exón 7; estas mutaciones afectan a la estructura

de dedos de zinc con lo que se altera la capacidad de unión al DNA[91] (Figura 16).



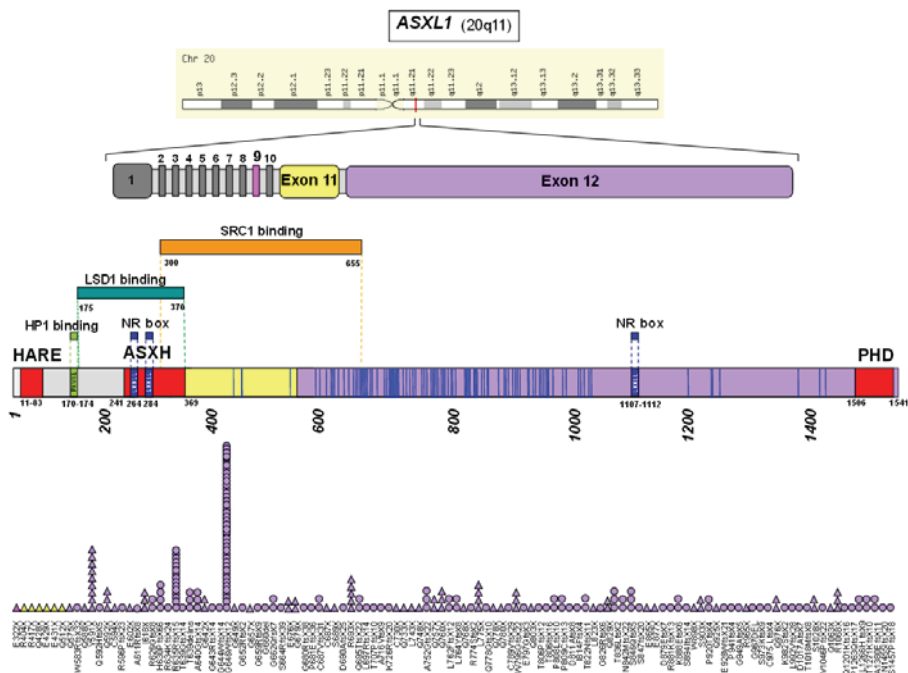
**Figura 16.** Estructura del gen *WT1*.

Adaptado de Ho, PA et al. *Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. Blood, 2010.*[92]

#### 4.7.14- Alteraciones en *ASXL1*

El gen *ASXL1* (additional sex combs like-1) se localiza en 20q11 y está involucrado en la dic(9;20)(p13;q11), un reordenamiento recurrente en leucemia linfoblástica. Actúa como coactivador ligando-dependiente para el receptor del ácido retinoico y está involucrado en la regulación de la metilación de las histonas.

Se han descrito mutaciones en el exón 12 en pacientes con síndromes mielodisplásicos, neoplasias mieloproliferativas y leucemia mieloide aguda. Este gen se presenta mutado en un 5-30% de los pacientes con LMA y mas frecuentemente en pacientes con leucemia secundaria. En línea con los estudios de *TET2*, *ASXL1* confiere mal pronóstico en pacientes con cariotipo normal[93] y en el grupo de citogenética de pronóstico intermedio [94]. También se ha visto que la presencia de mutaciones en *ASXL1* disminuye la probabilidad de alcanzar la remisión completa[95].



**Figura 17.** Mutaciones en *ASXL1* a lo largo de la proteína.  
 Extraído de Véronique Gelsi-Boyer, et al. *Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. J Hematol Oncol.* 2012[70].

#### 4.8- Expresión aberrante

Existen una serie de genes que su expresión aberrante (sobre o infra-expresión) con valor pronóstico en LMA.

##### 4.8.1-Expresión de *BAALC*

El gen *BAALC* (*Brain and Acute Leukemia, cytoplasmatic*) se localiza en 8q22.3 y codificada para una proteína de función desconocida muy conservada a lo largo de la evolución, que podría estar implicada en el bloqueo de la diferenciación mieloide.

*BAALC* es un marcador de células progenitoras, ya que no se encuentra expresión en médula ósea madura ni en leucocitos circulantes.

La elevada expresión de *BAALC* se describió por primera vez en un paciente con trisomía 8 sin ninguna alteración asociada. En la LMA la trisomía 8 se ha asociado a pronóstico intermedio o desfavorable. Por ese motivo se investigó si la sobre-expresión de *BAALC* tendría efecto pronóstico adverso incluso en pacientes con cariotipo normal. En ese sentido, la sobre-expresión de *BAALC* se ha asociado a mal pronóstico, tanto en pacientes con cariotipo normal [96] como en los que presentan alteraciones citogenéticas[97]. Esta relación se da en ausencia de mutaciones en *CEBPA* o *FLT3-ITD*[98].

Debido a que la expresión de *BAALC* está restringida al compartimiento de las células progenitoras y que se observa una elevada expresión de *BAALC* en blastos leucémicos, *BAALC* podría ser un marcador estadio específico, regulado durante la hematopoyesis y expresado de forma aberrante durante la leucemogénesis.

### **4.8.2-Expresión de *MN1***

El gen *MN1* (*Meningioma 1*) se localiza en 22q11 y codifica para un complejo co-activador de la transcripción. Se identificó como diana de la t(4;22) en un paciente con meningioma y también se ha visto en pacientes con neoplasias mieloides que presentan t(12;22).

Codifica para una proteína nuclear de 150kDa altamente conservada que participa en un complejo de regulación génica con el receptor nuclear RAR-RXR o el receptor de la vitamina D (Figura 18) [99].

Se ha visto que *TEL* (un factor de transcripción *ETS*) se fusiona con el gen *MN1* en pacientes con leucemia aguda con la t(12;33)(p13;q11). La proteína de fusión MN1-TEL, actúa como un factor de

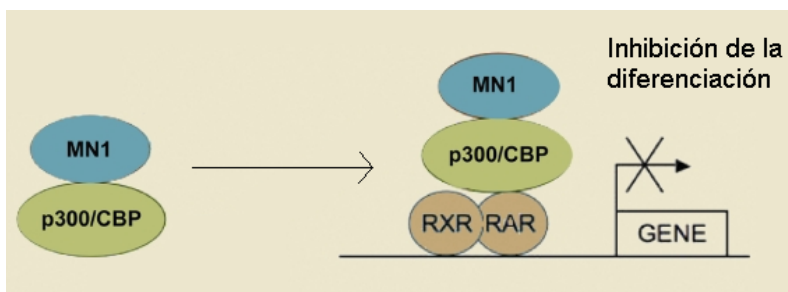
transcripción desregulado. MN1-TEL promueve la proliferación de progenitores mieloides y linfoides y bloquea su diferenciación.

La sobre-expresión de *MN1* es un factor pronóstico independiente en pacientes con LMA y citogenética normal, asociado a una baja respuesta a la quimioterapia de inducción y a una SLE y SG más corta.

*MN1* jugaría un papel importante en la hematopoyesis normal y en la leucemogénesis, ya que se ha visto que se expresa en poblaciones de células hematopoyéticas primitivas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda y que está reprimido durante la diferenciación.

La sobre-expresión de *MN1* se asocia a leucemias con inv(16)/t(16;16) y esta sobre-expresión sería un evento cooperativo con *CBFB-MYH11* para inducir la leucemogénesis. En este grupo de pacientes, la sobre-expresión de *MN1* también tiene efecto pronóstico adverso[100].

Así pues, la sobre-expresión de *MN1* es un evento secundario en el proceso de la leucemogénesis[101].



**Figura 18.** MN1 unido al coactivador p300/CBP reclutan RAR/RXR y se inhibe la diferenciación vía represión transcripcional.

Adaptado de Grosveld, GC. *MN1* inhibe la diferenciación vía RAR/RXR. Adaptado de *Treating AML with ATRA? Beware MN1. Blood, 2007*[43].

#### **4.8.3-Expresión de *ERG***

Esta localizado en 21q22. En pacientes con LMA encontramos reordenamientos que involucran el gen *ERG* (*ETS-related gene*).

Este gen pertenece a la familia de proteínas de unión al DNA ETS que regulan las interacciones mesenquima-epitelio y con la matriz extracelular.

*ERG* actúa como oncogen y esta sobre-expresado en pacientes con leucemia. Regula la trasducción de señales, promueve la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis[102].

Encontramos sobre-expresión de *ERG* en pacientes con cariotipo complejo, amplificaciones crípticas del cromosoma 21 y pacientes con citogenética normal. Su sobre-expresión nos ayuda a identificar pacientes con una mayor incidencia acumulada de recaída y una peor supervivencia. Inicialmente se pensó que este efecto pronóstico adverso de la sobre-expresión de *ERG* se daba únicamente cuando los niveles de expresión de *BAALC* eran bajos y en pacientes de edad avanzada[103]. Actualmente se ha visto que ambos genes son factores pronóstico independientes[104].

#### **4.8.4-Expresión de *EV11***

Localizado en 3q26.2, codifica para una proteína nuclear que interactúa con correpresores y coactivadores. Contiene 2 dominios, uno N-Terminal que contiene 7 motivos dominios tipo dedos de zinc y otro más cercano al dominio C-Terminal y que contiene 3 motivos tipo dedos de zinc que se unen al DNA. *EV11* reprime la transcripción con lo que afecta a la diferenciación hematopoyética[105].

Se describió una expresión aberrante del gen *EV11* (*Ecotropic viral integration site 1*) en leucemias con  $inv(3)(q21q26.2)$  o  $t(3;3)(q21;q26.2)$ . Aunque estas alteraciones en el cromosoma 3 son



más frecuentes en pacientes son síndrome mielodisplásico, los pacientes con LMA que las presentan suelen ser malos respondedores a la terapia y tienen muy mala evolución[106].

La sobre-expresión de *EV1* se observa en un 8% de los pacientes con LMA de novo y se asocia a una menor tasa de RC [107] y a menor supervivencia. *EV11* no se encuentra sobre-expresado en pacientes de citogenética de riesgo favorable o que presentan mutaciones en *NPM1*[108].

Se ha visto que el gen *EV1* forma un transcrito de fusión con el gen *MDS1*. Por splicing, el exón 2 de *MDS1* se une al segundo exón de *EV1* formando el transcrito de fusión *MDS1-EV11*. Esto ocurre tanto en tejido normal como en la leucemia mieloide. *MDS1-EV11* codifica para una proteína más larga que contiene la proteína *EV1* entera y una extensión en la parte N-terminal. Se ha visto que *EV1* y *MDS1-EV11* pueden tener propiedades opuestas [109].

### **4.9- Estado actual**

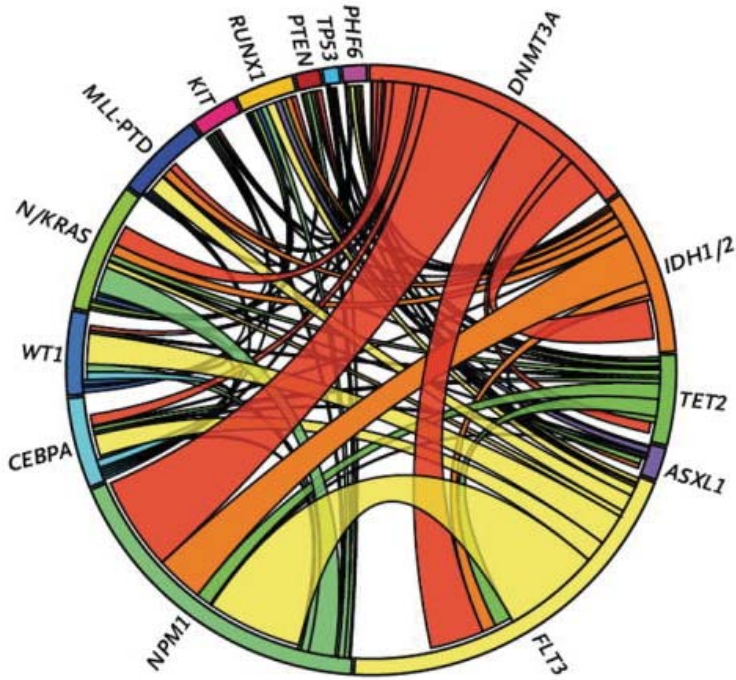
Las técnicas moleculares de secuenciación masiva nos han permitido identificar una serie de marcadores moleculares en pacientes con leucemia mieloide aguda que son de gran utilidad para la estratificación al riesgo de los pacientes.

En un estudio publicado por el Cancer Genome Atlas Research Network, demuestran que las mutaciones *DNMT3A*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2* y *RUNX1* no coexisten con fusiones génicas que involucran factores de transcripción. Además, aquellos pacientes que presentan mutaciones en *NPM1*, *FLT3* y *DNMT3A* comparten el mismo perfil de

expresión génica, y sugieren que podría considerarse como una entidad diferenciada de los pacientes de riesgo intermedio[110].

Otro estudio reciente de Patel, et al, en el que analizan perfiles mutacionales, demuestran las mutaciones en *IDH* confieren pronóstico favorable en pacientes que presentan *FLT3*-ITD y el gen *NPM1* mutado. Este efecto favorable, disminuye en aquellos pacientes que solamente presentan el gen *NPM1* mutado. Además, observan que el grupo de pacientes que presentan mutaciones tanto en *NPM1* como en *DNMT3A* y *FLT3* se asocian a un patrón de expresión de mRNA y miRNA específico, sugiriendo que los pacientes con la triple mutación deberían considerarse como un grupo diferenciado del pronóstico intermedio.

Demuestran que las mutaciones en *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A* y *MLL*-PTD confieren pronóstico adverso. También identifican combinaciones mutacionales que ocurren de forma frecuente en pacientes con LMA como se puede observar en la figura 19.



**Figura 19.** Frecuencia relativa y relaciones entre las diferentes mutaciones en pacientes con LMA “de novo”.

Extraído de *Patel, JP et al, Prognostic Relevance of integrated genetic profiling in Acute Myeloid Leukemia, N Engl J Med, 2013*[74].

## 5. Presentación publicaciones

Tal y como hemos descrito, existen diversos marcadores moleculares que predicen la evolución de la Leucemia mieloide aguda. Aún así, la mayor parte de ellos no se usan de forma habitual en la práctica clínica.

Desde 1999, el grupo cooperativo CETLAM ha tenido en cuenta las alteraciones genéticas para estratificar el riesgo de los pacientes, y adaptar el tratamiento postremisión en base a ello. En el protocolo actual (LMA-12) se utiliza la información del status mutacional de *FLT3*, *NPM*, *CEBPA* y *MLL* y se analiza de forma prospectiva la ERM mediante citometría de flujo y análisis de la expresión de *WT1*.

Con la introducción de las técnicas de secuenciación masiva, aparecen cada vez mas marcadores pronóstico, por eso es tan importante evaluar su impacto pronóstico futura aplicación en la clínica.

Los trabajos que configuran esta tesis son un reflejo de los estudios en los que el grupo CETLAM ha relacionado las alteraciones moleculares y el pronóstico de los pacientes con LMA de nuevo diagnóstico. En una primera fase se estudiaron los pacientes con citogenética normal del protocolo LMA-03. Este grupo se ha clasificado clásicamente como de riesgo intermedio pero en los últimos años se ha puesto de relieve que las mutaciones en *FLT3*, *NPM* y *CEBPA* identifican pacientes con distinta evolución. Datos recientes sobre las mutaciones en *IDH*[111] nos indujeron a estudiarlas en nuestro grupo de pacientes, lo que constituye la primera publicación de esta tesis.

Debido a que *TET2* e *IDH* son mutaciones auto-excluyentes[112], también se estudió el efecto de las mutaciones de *TET2* en pacientes *IDH* negativos.

Estos datos aparecieron en la revista “Leukemia Research” en el 2012: *Adverse impact of IDH1 and IDH2 mutations in primary AML: experience of the Spanish CETLAM group*. Nomdedeu, J.F., Hoyos, M. et al[113].

Seguidamente, seleccionamos los pacientes con citogenética favorable tanto del protocolo LMA-99 cómo del LMA-03. Éste grupo de pacientes tienen un relativo buen pronóstico, aunque hay una parte de éstos que no siguen la misma dinámica de supervivencia prolongada en remisión.

El segundo trabajo de tesis estudió los factores clínicos y biológicos (incluidas las mutaciones, sobre-expresión de genes y ERM) para identificar los casos con peor pronóstico. En esta línea, basándonos en estudios previos que identificaron la sobre-expresión de *BAALC* [96, 97, 104] y *MN1*[100, 101] en el grupo de pronóstico intermedio como factor pronóstico adverso, investigamos su impacto en el grupo de pacientes de citogenética favorable.

Este estudio analizó también factores pronóstico clásicos como la edad, leucocitosis, mutaciones en *C-KIT*, anomalías asociadas al reordenamiento *CBF* y número de copias de transcrito al diagnóstico y después del tratamiento, entre otras para generar un índice pronóstico.

Todo ello se tradujo en una publicación en la revista “European Journal of Haematology” en 2013: *Core binding factor acute myeloid leukemia: The impact of age, leukocyte count, molecular findings, and minimal residual disease*. Hoyos, M., Nomdedeu, J. F. et al [36].

Finalmente, el tercer trabajo de tesis incluyó toda la cohorte de pacientes del protocolo LMA-03 para analizar la relación entre expresión del gen *WT1* y evolución en términos de incidencia de recaídas y supervivencia. *WT1* es un marcador de enfermedad residual mínima, ya que prácticamente todos los pacientes con LMA expresan *WT1*[89], pero aún no se utiliza en la clínica de forma habitual. Se estudió la expresión de *WT1* en tres momentos; al diagnóstico, tras la quimioterapia de inducción y tras la de intensificación.

También se han descrito mutaciones en *WT1* en la LMA pero su efecto pronóstico es controvertido[91], así que también estudiamos su efecto en nuestro grupo de pacientes.

Este tercer trabajo de tesis se publicó en 2013 en la revista "Leukemia": *Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML*. Nomdedeu, J.F., Hoyos, M. et al [114].



Informe de los  
directores de tesis

---





Barcelona, 22 de julio de 2014

Como co-directores de los trabajos para la obtención del grado de Doctor de MONTSERRAT HOYOS COLELL, hacemos constar:

1. Que la doctoranda ha tenido un papel predominante en el diseño de los estudios, en su realización, en el análisis de los resultados, su interpretación y en la redacción de los manuscritos.
2. Que ninguno de los artículos se ha utilizado en otra tesis doctoral.
3. Que el factor de impacto de las revistas donde se han publicado los trabajos es (2013):

Trabajo 1: Leukemia Research, factor de impacto: 2.764

Trabajo 2: European Journal of Hematology, factor de impacto: 2.548

Trabajo 3: Leukemia , factor de impacto: 10.164

En consecuencia, la tesis esta a punto para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Firmado:

Prof. Jordi Sierra  
Co-director

Dr. Josep Nomdedeu  
Co-director



# Objetivos

---



General: Analizar el impacto pronóstico de ciertas alteraciones moleculares en los pacientes diagnosticados de LMA "de novo" tratados según el protocolo del grupo CETLAM, específicamente:

- En pacientes con cariotipo normal tratados según el protocolo LMA-03:
  1. Determinar la frecuencia de las mutaciones de *IDH1* e *IDH2*.
  2. Investigar la asociación de mutaciones *IDH1* e *IDH2* con factores clínico-biológicos y su impacto pronóstico.
  3. Analizar el valor clínico y pronóstico de las mutaciones de *TET2*.
  
- En pacientes con citogenética favorable (t(8;21) e inv(16)/t(16;16)) tratados según los protocolos LMA-99 y LMA-03:
  1. Establecer "scores" pronóstico que tengan en cuenta los parámetros clínico-biológicos más utilizados en la práctica clínica.
  2. Estudiar el valor de la sobre-expresión de *MN1* y *BAALC*.
  3. Analizar el valor pronóstico de la determinación de número de copias de *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11* tras la quimioterapia de inducción.
  
- En toda la serie de pacientes del protocolo LMA-03:
  1. Determinar la utilidad clínica y pronóstica de los niveles de RNAm de *WT1* determinados mediante PCR cuantitativa a tiempo real en LMA en el momento del diagnóstico, post-inducción y post-consolidación.
  2. Analizar la frecuencia y el valor pronóstico de las mutaciones de *WT1* en LMA "de novo".



Publicaciones

---







## Adverse impact of IDH1 and IDH2 mutations in primary AML: Experience of the Spanish CETLAM group

J. Nomdedéu<sup>a,\*</sup>, M. Hoyos<sup>a</sup>, M. Carricondo<sup>a</sup>, J. Esteve<sup>b</sup>, E. Bussaglia<sup>a</sup>, C. Estivill<sup>a</sup>, J.M. Ribera<sup>c</sup>, R. Duarte<sup>d</sup>, O. Salamero<sup>e</sup>, D. Gallardo<sup>f</sup>, C. Pedro<sup>g</sup>, A. Aventin<sup>a</sup>, S. Brunet<sup>a</sup>, J. Sierra<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Hematology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>d</sup> Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>e</sup> Hematology Department, Hospital de la Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Hematology Department, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain

<sup>g</sup> Hematology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 December 2011

Received in revised form 13 March 2012

Accepted 23 March 2012

Available online 19 April 2012

#### Keywords:

Acute myeloid leukemia

Genetics

Prognosis

IDH1

IDH2

Molecular biology

### ABSTRACT

The study of genetic lesions in AML cells is helpful to define the prognosis of patients with this disease. This study analyzed the frequency and clinical impact of recently described gene alterations, isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) and isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) mutations, in a series of homogeneously treated patients with primary (de novo) AML.

Two-hundred and seventy-five patients enrolled in the CETLAM 2003 protocol were analyzed. IDH1 and IDH2 mutations were investigated by well-established melting curve-analysis and direct sequencing (R140 IDH2 mutations). To establish the percentage of the mutated allele a pyrosequencing method was used. Patients were also studied for NPM, FLT3, MLL, CEBPA, TET2 and WT1 mutations.

IDH1 or IDH2 mutations were identified in 23.3% AML cases and in 22.5% of those with a normal karyotype. In this latter group, mutations were associated with short overall survival. This adverse effect was even more evident in patients with the NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt genotype. In all the cases analyzed, the normal allele was detected, suggesting that both mutations act as dominant oncogenes. No adverse clinical impact was observed in cases with TET2 mutations.

IDH1 and IDH2 mutations are common genetic alterations in normal karyotype AML. Favourable genotype NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt can be further categorized according to the IDH1 and IDH2 mutational status.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is caused by somatic mutations in genes that control normal cell proliferation and differentiation. Characterization of these genes has allowed a more refined classification of AML, enabling the identification of potential therapeutic targets and the definition of prognostic subgroups [1].

Genetic lesions of isocitrate dehydrogenases 1 (IDH1) and 2 (IDH2) have been identified as early steps in the progression of gliomas to high-grade tumors [2,3]. Whole DNA genome sequencing has revealed that IDH1 and IDH2 may also be mutated in acute myeloid leukemia (AML) samples [4]. Additional studies in

large AML cohorts have confirmed this finding and have demonstrated that these lesions may also be present in myelodysplastic and myeloproliferative disorders. In the AML setting, and in sharp contrast with findings in gliomas, IDH1 and IDH2 mutations are frequently associated with blastic transformation or aggressive forms [5–8].

Ongoing studies indicate that the mechanisms of leukemogenesis associated with IDH1 and IDH2 mutations involve functional shifts in metabolic pathways with generation of 2-hydroxyglutarate [9–11], increases in the production of reactive oxygen species (ROS), cooperation with other oncogenes [12] and hypermethylation that disrupts TET2 function [13,14]. Findings about the possible adverse prognosis of these mutations in normal karyotype AML have aroused great interest because they could provide additional prognostic stratification and guide post-remission treatment.

In this study, the Spanish CETLAM group analyzed the frequency and clinical impact of IDH1, IDH2 and TET2 mutations in a large series of adults with primary AML.

\* Corresponding author at: Servei de Laboratori d'Hematologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Mas Casanovas 90, 08041 Barcelona, Spain.  
Tel.: +34 93 5537378; fax: +34 93 5537373.

E-mail address: [jnomdedeu@santpau.es](mailto:jnomdedeu@santpau.es) (J. Nomdedéu).

**Table 1**  
Characteristics of the whole series.

	Whole (n = 275)		IDHwt (n = 211)		IDHmut (n = 64)		P
	No.	%	No.	%	No.	%	
	Sex						
Male	120	56.9%	41	43.1%	55	64.1%	
Female	91	43.1%	23	17–71	23	35.9%	
Age, median (range)		52 (18–73)				58 (17–71)	0.149
<50 years	103	48.8%	21		21	32.8%	0.024
>50 years	108	51.2%	43		43	67.2%	
WBC × 10 <sup>9</sup> /L, median (range)		19.85 (0.7–289)				23.05 (0.8–408)	0.508
≤20 × 10 <sup>9</sup> /L	109	51.7%	31		31	48.4%	0.652
>20 × 10 <sup>9</sup> /L	102	48.3%	33		33	51.6%	
Blood blasts %, median (range)		67.8 (0–100)				78.5 (12–100)	0.539
<90%	152	72.4%	43		43	67.2%	0.422
≥90%	58	27.6%	21		21	32.8%	
Platelet, median (range)		69 (4–23000)				57 (8–2369)	0.456
LDH, median (range)		785 (2–13460)				665.5 (3–7219)	0.713
FAB 4/5							0.002
FAB4/5	109	51.7%	47		47	73.4%	
Others	102	48.3%	17		17	26.6%	
Cytogenetics							0.640
Normal karyotype	92	49.2%	27		27	45.3%	
Others	95	50.8%	29		29	54.7%	
Cytogenetic risk group							0.184
Favorable	22	11.8%	3		3	5.8%	
Intermediate	135	72.2%	44		44	84.6%	
Adverse	30	16%	5		5	9.6%	
FLT3-ITD							0.231
Wild-type	157	73.4%	49		49	80.3%	
ITD	57	26.6%	12		12	19.7%	
NPM1							0.324
Wild-type	98	62.4%	25		25	54.3%	
Mutated	59	37.6%	21		21	45.7%	
CEBPA							0.322
Wild-type	183	95.3%	56		56	98.2%	
Mutated	9	4.7%	1		1	1.8%	
MLL							0.105
Wild-type	193	95.5%	54		54	90.0%	
Mutated	9	4.5%	6		6	10.0%	
WT1 mutations							0.004
Wild-type	166	87.4%	58		58	100.0%	
Mutated	24	12.6%	0		0	0.0%	
CR							0.985
Yes	158	74.9%	48		48	75.0%	
No	53	25.1%	16		16	25.0%	
Exitus							0.954
Alive	75	35.5%	23		23	35.9%	
Exitus	136	64.5%	41		41	64.1%	
Relapse							0.864
Non-relapsed	135	64.0%	42		42	65.6%	
Relapsed	76	36.0%	22		22	34.4%	

## 2. Materials and methods

Patients included were between 17 and 73 years of age. They were all treated according to the CETLAM-03 protocol and had a stored DNA sample for molecular study.

Induction therapy consisted of 1 or 2 courses of idarubicin 12 mg/m<sup>2</sup> IV days 1,3,5, cytarabine 500 mg/m<sup>2</sup>/12 h over 2 h IV days 1,3,5,7 and etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> IV on days 1, 2 and 3. This was followed by a consolidation phase with mitoxantrone 12 mg/m<sup>2</sup> IV from days 4 to 6, and cytarabine 500 mg/m<sup>2</sup>/12 h IV from days 1 to 6. Patients also received G-CSF priming, consisting of 150 mg/m<sup>2</sup> administered subcutaneously (SC) from day 0 to the last day of induction and/consolidation CT. Post-consolidation treatment was risk-adapted: high-dose cytarabine 3 g/m<sup>2</sup> IV on days 1, 3, 5 was administered to patients with CBF AML; autologous stem cell transplant (SCT) was performed in patients with a normal karyotype, leukocyte count below than 50 × 10<sup>9</sup>/L and FLT3 wt; and allogeneic SCT (either myeloblastic or reduced intensity conditioning) was given in patients with adverse cytogenetics, FLT3/ITD or MLL rearrangements. Informed consent was obtained from all patients, both for therapy and for storing samples.

The main clinical and laboratory variables were recorded at diagnosis and during follow-up, and stored at the Spanish CETLAM data center.

### 2.1. Molecular studies

Diagnostic samples from all patients were analyzed for mutations in the NPM1, FLT3, CEBPA, MLL and WT1 genes using well established protocols [15–17]. FLT3 results were indicated as positive or negative without detailing the allelic ratio calculated between mutated/wt. FLT3 mutational studies detected allelic ratios of 0.05, as established by dilution experiments.

For mutational analysis of IDH1, IDH2 and TET2 genes, genomic DNA was extracted from BM cells at diagnosis by standard methods. IDH1 and R172 IDH2 mutations were investigated using a fluorescence melting curve analysis as previously described [18] with minor modifications. For R140 IDH2 mutational analysis, we carried out PCR amplification of the involved region followed by direct sequencing using an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Mutations were confirmed in two separate reactions using forward and reverse primers.

In order to assess the amount of the mutant allele, we performed pyrosequencing reactions in cases with IDH1 and IDH2 mutations. Pyrosequencing analysis was carried out on a PyroMark® Q24 system (Qiagen, Hilden, GE) according to the manufacturer's protocol. The PCR reaction was carried out in a 50 µl reaction with 100 ng of DNA containing Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM, 10× buffer, 200 nM dNTP Mix, 10 µM of each primer and 1 U Taq polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reaction

**Table 2**

Grouped categories according to cytogenetics in the current series and in the entire CETLAM study population.

MRC groups	All CETLAM patients		Current series	
	n	%	n	%
Good (GP)	73	11%	25	9%
Intermediate (I)	432	63%	179	65%
Adverse (AP)	95	14%	35	13%
Not done	85	12%	36	13%
Total	685	100%	274	100%
Karyotype				
Normal	292	43%	120	44%
Other	300	44%	118	43%
Not done	93	14%	37	13%
Total	685	100%	275	100%

conditions were 95 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s for 35 cycles.

For IDH1 mutation detection, the primers used were: IDH1Biotynilated: CATAATGTTGGCGTCAAATGTC, IDH1ACATGCAAAATCATTATTGCC and IDH1 pyrosequencing primer: TGACTTACTTGATCCCC.

For IDH2 mutational analysis the primers used were: IDH2 GTTCAAGCTGAA-GAAGATGTGG, IDH2Biotynilated

TGTGGCCCTGTACTGCAGAG in association with IDH2 pyrosequencing primer AAGCCCATCACCATT for the R172K mutation and IDH2 pyrosequencing primer AAGTCCCAATGGAACATA for R140Q.

TET2 mutations were investigated using primers and conditions previously reported [19]. Amplimers were directly sequenced using forward and reverse primers (exons 3–11).

## 2.2. Statistical analyses

For descriptive statistics, we calculated median, mean, ranges and percentage of cases. Proportions were compared using the Chi Square test. Differences between continuous variables were analyzed using Student-*t* test. Overall survival was measured from the date of enrolment until the date of death. Disease free survival (DFS) for patients who achieved a CR was estimated from date of CR to relapse or death. Probability of relapse (PR) was calculated from date of CR to relapse. Survival probabilities were estimated using the Kaplan–Meier curves and differences between groups were analyzed by the log-rank test. Covariates included in the multivariate analysis were those with  $\leq 0.15$  significance in univariate comparisons. Multivariate analysis was performed applying the COX regression model with *P*-values  $< 0.05$  considered significant. All computations were performed with SPSS for Windows (Version18.0, Chicago, IL).

## 3. Results

### 3.1. IDH1 and IDH2 mutations are commonly found in de novo AML

From a cohort of 685 consecutive cases enrolled in the CETLAM protocol between 2004 and 2010, the present series included the 275 AML patients for whom a DNA sample was available. Patients' characteristics are summarized in Table 1. There were 161 (59%) males and 114 (41%) women. Cytogenetic groups according to the MRC classification were: favorable, 25; intermediate, 179; and adverse, 35. No cytogenetic study was available in 36 patients. A normal karyotype was identified in 120 (43%) patients, a proportion similar to that observed in the group without IDH analysis (Table 2).

IDH mutations were present in 64 (23.3%) cases: 36 had IDH1 mutations and 28 had IDH2 mutations. Nineteen of the 36 IDH1 cases had R132C while 18 of the IDH2 cases had R140Q and 10 had R172K. IDH1 and IDH2 mutations were absent in the remaining 210 cases. (Suppl Fig. 1). Pyrosequencing reactions were performed on 51 out of 64 cases with IDH1 or IDH2 mutation (79.6%). According to the percentage of the mutated allele, all cases had mutations in a heterozygous state. The allelic ratio ranged between 8% and 58% percent. The cases with the lowest values corresponded to the R172K mutation of the IDH2 gene (Supplementary Fig. 2).

**Table 3**

Cytogenetic and molecular findings associated with the IDH1 and IDH2 mutations.

UPN	IDH1	IDH2	Molecular <sup>a</sup>	Cytogenetics
24	R132G		FLT3-ITD	add11q23
28	R132C		None	-7
31	R132H		NPM1	Normal
33		R172K	None	+11,i17q,del10,der12
34		R172Q	FLT3-ITD and MLL	Normal
49		R140Q	None	ND
50		R172K	None	+8
56		R172K	None	Normal
86	R132P		None	Complex
94	R132S		None	Normal
95	R132H		None	ND
106		R140Q	FLT3-ITD and NPM1	Normal
126		R140Q	CEBPA	Normal
136	R132C		None	del 13q
141		R140Q	NPM1	Normal
147		R140Q	None	del 9q
153	R132C		None	Inv (16)
156		R140Q	None	ND
157		R172K	None	+11
161	R132G		None	ND
162	R132C		FLT3-ITD	del 9q21
163	R132S		None	Normal
166	R132C		None	del5q
172	R132H		NPM1	ND
188		R172K	None	Normal
203		R172K	NPM1	-2,del 8q,+mar
219		R140Q	None	Normal
220	R132H		None	Normal
233	R132C		FLT3-ITD and NPM1	Normal
257		R140Q	NPM1	Normal
276	R132H		NPM1	Normal
279		R172K	None	Normal
291		R140Q	None	ND
292		R172K	None	ND
300	R132C		None	t(12;22)
305	R132C		NPM1	del 13q14
314	R132S		MLL	Inv (9)
321	R132S		FLT3-ITD and NPM1	ND
323		R140Q	FLT3-ITD and NPM1	Normal
324	R132C		None	t(8;21)
331	R132C		None	+11
348	R132C		MLL	+8
349	R132S		NPM1	Normal
352		R140Q	FLT3-ITD and MLL	+11
364		R140Q	MLL	+11,i11q10
367		R140Q	None	Complex
368		R140Q	ND	Complex
384	R132C		MLL	Normal
398	R132C		NPM1	Normal
423	R132L		FLT3-ITD and NPM1	ND
425		R172K	NPM1	+8
428		R140Q	NPM1	Normal
432	R132C		FLT3-ITD	Normal
443	R132C		None	Normal
460		R140Q	None	Normal
470	R132H		NPM1	del 9q21
471	R132H		NPM1	ND
474	R132H		NPM1	Normal
480	R132C		None	del 5q31 20q21
488		R172K	None	7q+,del 3
491	R132C		FLT3-ITD	Normal
495	R132C		FLT3-ITD and NPM1	Normal
496		R140Q	NPM1	Normal
502	R132C		None	Normal

<sup>a</sup> NPM1 molecular analysis was lacking in 17 cases.

CEBPA mutation study was not available in 6 cases.

MLL was not performed in 3 cases and FLT3 was not investigated in one case.

In this series 80 (29%) of the 275 samples had NPM mutations and 65 (25%) had FLT3-ITD mutations. IDH mutations were thus the third most frequent mutation after NPM and FLT3-ITD. IDH mutations were associated with NPM mutations in 21 cases, with

**Table 4**  
Induction results in this study group.

	Whole		P
	IDHwt	IDHmut	
CR	157 (74%)	48 (75%)	0.718
Refract	23 (11%)	5 (8%)	
Exitus	31 (15%)	11 (17%)	
Normal Karyotype			
CR	74 (80%)	17 (63%)	0.086
Refract	7 (8%)	2 (7%)	
Exitus	11 (12%)	8 (30%)	
Normal Karyotype NPM or CEBPA+/FLT3-			
CR	21 (95%)	6 (67%)	0.030
Exitus	1 (5%)	3 (33%)	

FLT3-ITD in 12, with MLL-PTD in six and with CEBPa in one case. We did not find any cases of IDH1/2 and WT-1 mutations (Table 3).

Table 4 shows the induction results according to IDH status in the whole series, in the normal karyotype and in the favorable genotype (NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt)

The OS, DFS, PR and CI in the whole series, in the normal karyotype, and in the favourable genotype (NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt) were matched with demographic and biologic factors. These results are shown in Supplementary Tables 1–3.

**3.2. IDH1 and IDH2 mutations were associated with poor prognosis in normal karyotype AML**

In the entire series there were no differences in survival or relapse between IDH1/2 mutated and non-mutated cases (Supplementary Fig. 3). In contrast, when analysis was restricted to AML patients with a normal karyotype we observed a significantly adverse OS and DFS in patients with IDH mutations (Fig. 1).

**3.3. IDH1 and IDH2 mutations abrogated the good prognosis associated with the NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt genotype in normal karyotype AML**

Based on the results in normal karyotype AML, we focused our analysis on the intermediate prognosis cytogenetic group which included normal karyotype and represents the most common subgroup with IDH mutations (179 cases, with 44 mutations, see Table 1).

The favourable genotype (NPM or CEBPA mutated/FLT3 wild-type) was detected in 31 patients. The induction CR was also significantly different in IDH mutated and the IDH wt group (Table 4).

The presence of IDH mutations led to unfavorable OS and DFS in this subgroup (Fig. 2 and Table 4). Table 5 shows the causes of treatment failure associated with the presence of IDH mutations.

Multivariate analysis performed on the whole series showed that sex and leukocyte/blast cells were independent prognostic

**Table 5**  
Mortality causes in normal karyotype AML with the NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt genotype and IDH mutations.

UPN	Induction results	Status	OS (months)	EXITUS
31	CR	Died	2.135	Septic Shock <i>E. Coli</i>
141	CR	Died	13.338	Disease progression
257	CR	Alive	58.541	
276	CR	Alive	62.911	
349	Exitus	Died	0.329	Multiorganic failure
398	RCR	Died	10.512	Septic shock GVDH
428	CR	Died	6.472	Implant failure after BMT
474	Exitus	Died	0.394	Septic shock
496	Exitus	Died	0.230	Septic shock

factors regarding overall survival (OR(95% CI): 1.8(1.1–2.3),  $P = .013$  and 1.5(0.7–2.2),  $P = 0.028$  respectively. Patients with NPM mutations had fewer relapses (OR(95% CI): 2.6(1.5–4.5),  $P = .004$ ). Older patients had approximately twice the probability of relapse and worse outcome than younger patients. When COX regression analysis was applied to normal karyotype AML the significant variables were: age, leukocyte number, FLT3-ITD status regarding OS (OR(95% CI): 1.8(1.1–3),  $P.015$ , and 1.5(1–2.6),  $P = .052$  and 1.7(1–2.7),  $P = .042$ , respectively. NPM mutations were independent prognostic factor for relapse rate and DRS (OR(95% CI): 1.8(1–3.2),  $P = .039$  and 2.9(1.5–5.7),  $P = .002$  respectively. IDH mutational status predicted that patient harbouring mutations had twice the probability of relapse and worse outcome than patients without these mutations (Table 6). Genetic analysis of normal karyotype AML including IDH genes provided valuable information in terms of survival projection (Supplementary Fig. 4).

No differences were detected in survival based on the number of mutated IDH1 or IDH2 alleles (data not shown).

**3.4. TET2 mutations were common in AML and were devoid of adverse prognostic impact**

Based on the overlapping function of IDH and TET2 mutations, we focused our analysis on cases without IDH mutations. In 158 samples, the entire coding sequence (exons 3–11) was analyzed by direct sequencing. We found 15 mutations in 14 cases (6.3%) (see Table 7). Germ-line DNA was also analyzed to rule out TET2 polymorphisms.

We found statistically significant associations between TET2 mutations, older age and number of cycles of chemotherapy required to achieve CR (Supplementary Table 4a). All the cases showed a heterozygote pattern of mutation.

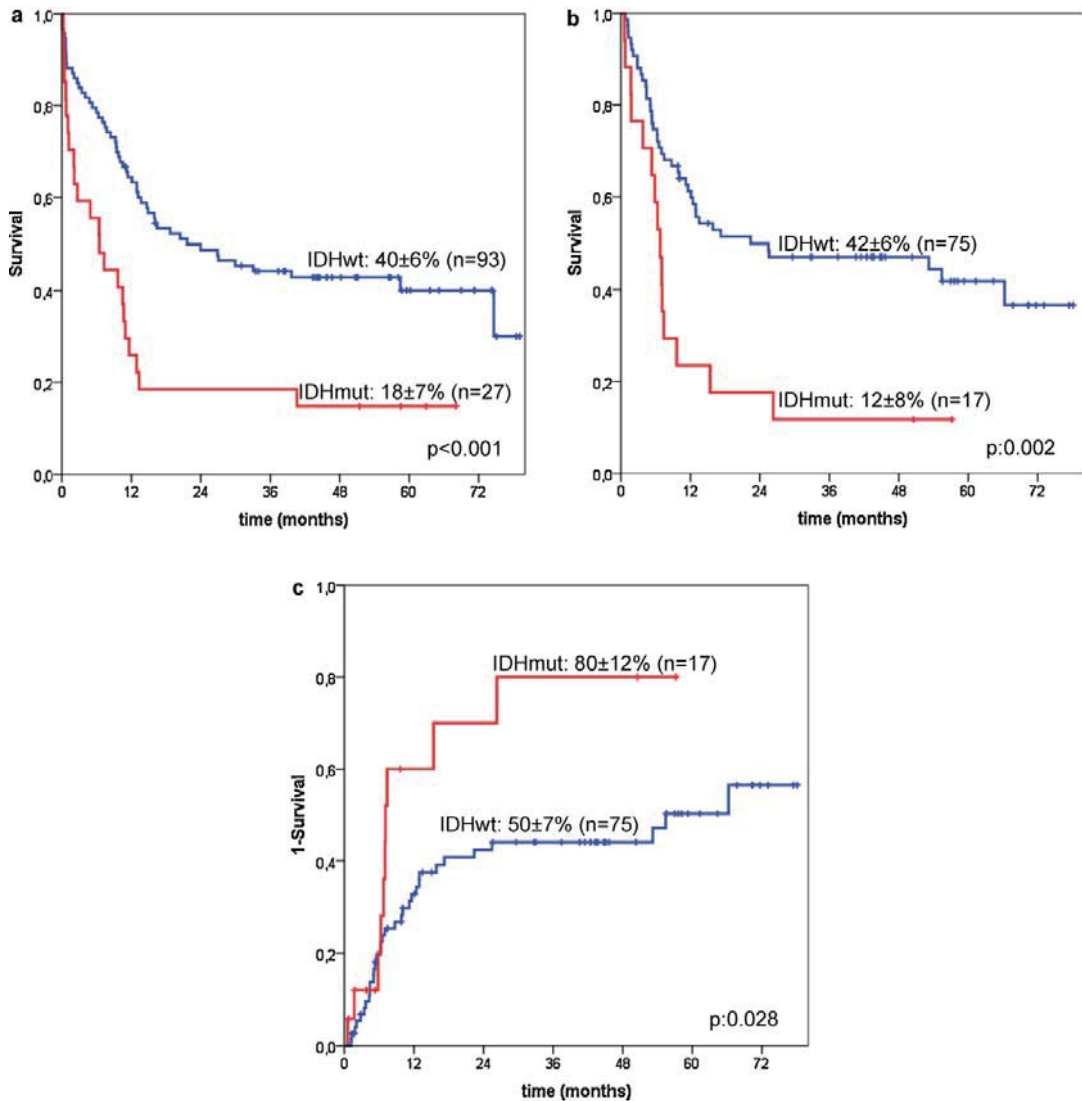
TET2 did not have an adverse prognostic impact on OS, DFS or PR in any the analyzed groups (whole series, normal karyotype and patients with a normal karyotype with a favorable genotype) (Supplementary Table 4b).

**4. Discussion**

In this multicentric study in the Spanish population we found that IDH mutations are common in AML, since they are present in 22.5% of patients with a normal karyotype. Outcome was poor in patients with IDH mutations and normal karyotype and also in those with IDH mutations and the favourable genotype (NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt genotype). This is a relevant finding because these patients with the favourable genotype are usually treated less intensively sparing BMT. Significantly, most patients with IDH mutations in this report died in a relatively early phase after induction therapy. Four patients with the NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt genotype died from septic shock while only one died from progressive leukemia.

Leukemias with IDH or TET2 mutations are characterized by a marked DNA hypermethylation. Promoter involvement by this process determines a transcriptional silencing of pivotal myeloid factors. We found a frequency of 6.3% of cases with TET2 mutations. These results are in line with previously reported series [20–22]. In our patients, TET2 mutations did not have an adverse prognostic impact but were associated with older patients [20,22].

Improvements in therapy for AML require a better understanding of the cells that proliferate and maintain this malignancy. These are the leukemic stem cells (LSC) [23,24] which remain after treatment and give rise to the regrowth of the neoplasm, leading to clinical relapses. For this reason, the number, immunophenotype and molecular pathways of LSC in normal karyotype AML are currently being investigated. IDH mutations provide a LSC functional

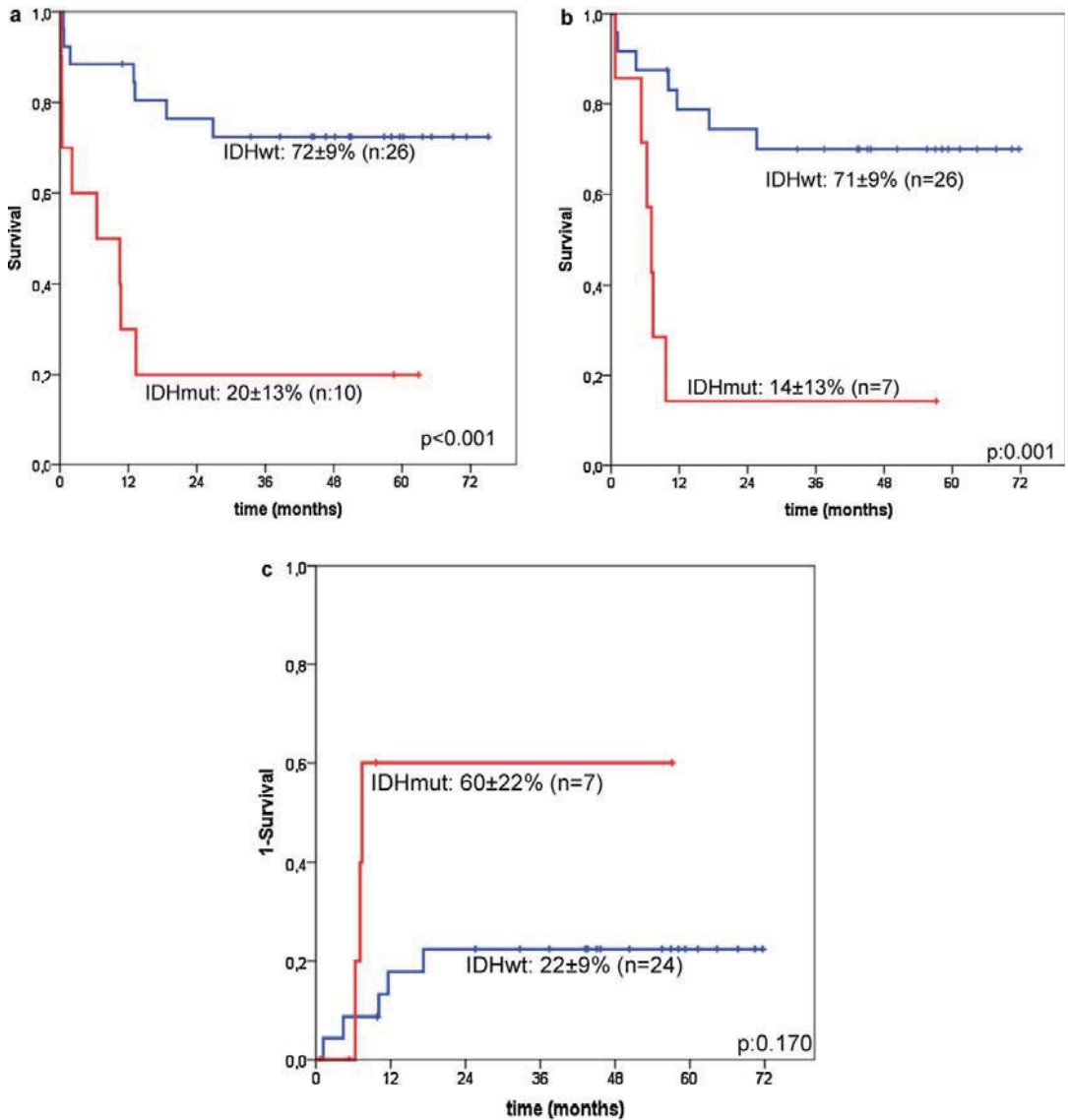


**Fig. 1.** IDH1 and IDH2 mutations prognostic impact in normal karyotype AML. (a) Survival analysis (OS). (b) Disease free survival (DFS). (c) Probability of relapse (PR). Curves corresponding to IDH mutated (red) and non-mutated (blue) normal karyotype AML cases. Survival time in months.

phenotype, and consequently, the associated poor prognosis could be attributed to a larger leukemic compartment. Leukemias with more aggressive behaviors would likely have a greater number of LSC [25]. However, our findings suggest that the mechanisms of therapeutic failure associated with IDH mutations could be more complex than chemoresistance alone. Remarkably, in line with the pyrosequencing quantitation results, IDH1 and IDH2 mutations act with a dominant pattern and the behavior of each mutant may be different [26].

Marcucci et al. [27] analyzed 358 patients with de novo AML and a normal karyotype and found IDH mutations in 33% of cases. In agreement with our findings, these mutations were associated with a poor outcome, especially in cases with the NPM mutated/FLT3 wt genotype. In Marcucci's series, 199 patients were aged >60 years.

Oki et al. [28] recently found that IDH mutations are extremely rare in pediatric patients. These studies suggest that the frequency of IDH mutations in AML is dependent on age of the patients. Green et al. [29] reported a series of younger patients with de novo AML and they found that the prognosis of IDH1 mutations was associated with FLT3 status. Abbas et al. [30] also demonstrated the association of IDH mutations with normal karyotype AML and reported the association with JAK2 mutated MPN. In two separate works Chou et al. [31,32] published their experience in Chinese AML patients. IDH1 mutations did not have an adverse prognostic impact but they were associated with a normal karyotype and the mutation was stable when analyzed at relapses. In their study, IDH2 mutations were also devoid of adverse prognosis. The stability of the mutation was also demonstrated for IDH2. Like Chou et al. [31,32] we



**Fig. 2.** IDH1 and IDH2 mutations help to stratify favorable genotype AML. (a) Survival analysis (OS). (b) Disease free survival (DFS). (c) Probability of relapse (PR). Curves corresponding to IDH mutated (red) and non-mutated (blue) normal karyotype AML cases. Survival time in months.

also found that IDH2 mutations were rarely associated with WT1 mutations.

Boissel et al. [33] reported their experience in 937 patients whose ages ranged from 15 to 70, and again found a poor outcome in patients with a favourable genotype and normal karyotype AML. The importance of evaluating IDH status was also seen in a German study [34]. In a series of 805 adults, Paschka et al. [34] found IDH mutations in 129 (16%) patients. In line with our results, the molecular refinement provided by IDH mutations could identify two prognostic groups in the NPM or CEBPA mutated/FLT3 wt genotype patients. However, Green et al. [35] findings suggested that the adverse prognostic impact of IDH2 mutations could be attributed

to the aggressive behavior of R172 mutated cases. These results are in line with earlier experimental data and the low allelic burden found in our AML samples with the R172 mutation.

TET2 analysis did not help to refine the adverse prognostic impact provided by IDH mutational study. It remains to be investigated whether its identification in clinical samples, especially in older patients, can provide successful therapeutic options.

In summary, the clinical relevance of the IDH mutations needs to be tested in prospective trials of de novo AML. The combination of melting curve analysis and rapid sequencing protocols such as those provided by pyrosequencing devices could be appropriate in this setting [35,36].



**Table 6**  
Cox analysis of the whole series and in the normal karyotype (NK) AML.

	Whole		DFS	PR	P
	OS	P			
Male vs. Female	1.6 (1.1–2.3)	0.015			
>50 years vs. <50 years	2.3 (1.6–3.3)	<0.001	2.3 (1.6–3.3)	0.007	2.3 (1.6–3.3)
>90%Bl vs. <90%Bl	1.5 (1.5–2.2)	0.028			0.040
NPMwt vs. NPMmut			1.9 (1.2–3.)	0.004	2.6 81.5–4.4)
			Normal Karyotype		
>50 years vs. <50 years	1.8 (1.1–3)	0.015			
>90%Bl vs. <90%Bl	1.6 (1–2.6)	0.052			
FLT3-ITD vs. FLT3wt	1.7 (1–2.7)	0.034			
NPMwt vs. NPMmut			1.8 81–3.2)	0.039	2.9 (1.5–5.7)
IDHmut vs. IDHwt	2.1 (1.2–3.5)	0.006	2.7 (1.4–5.2)	0.004	2.5 (1.1–5.6)

**Table 7**  
TET2 mutations in the whole series.

UPN	DNA mutation	Protein mutation
053-03	c.1326.1327delCA	p.T443NfsX11
058-03	c.4600C>T	p.Q1534X
060-03	c.3818A>G	p.T1270A
105-03	c.2477GT>TA	p.S826I
108-03	c.452.453delGTG	p.V151EfsX10
294-03	c.4537>2T>C	Splice Disruption
318-03	c.2428C>T	p.Q810X
344-03	c.4393C>T	p.R1465X
344-03	c.4532T>A	p.L1511X
346-03	C.4679.4680insA	p.Y1560X
373-03	c.1669C>T	p.Q575X
415-03	c.2362G>A	p.E788L
440-03	c.4527delA	p.K1509SfsX8
486-03	c.4138C>T	p.H1380Y
492-03	c.4935T>G	p.Y1645X

### Conflict of interest statement

There is no conflict of interest to disclose.

### Acknowledgments

This work was supported by the following grants: Fundación Mutua Madrileña to JN 08/FMMA, PI 10/0173 and JS FMMA 2006-168; ISCIII PI052312, PI 080672, RD06/0020/0101 and EC07/90065, 2009-SGR-168 from Pla de Recerca de Catalunya, Marató de TV3 (100830/31/32) and a grant from Fundació Cellex, Spain. We are grateful to the CETLAM participating hospitals.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.leukres.2012.03.019.

### References

- Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358(May (18)):1909–18.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321(September (5897)):1807–12.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2009;174(April (4)):1149–53.
- Mardis ER, Ding L, Doelling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361(September (11)):1058–66.
- Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2010;362(January (4)):369–70.
- Pardanani A, Patnaik MM, Lasho TL, Mai M, Knudson RA, Finke C, et al. Recurrent IDH mutations in high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia with isolated del(5q). *Leukemia* 2010;24(July (7)): 1370–2.
- Soverini S, Score J, Iacobucci I, Poerio A, Lonetti A, Gnani A, et al. IDH2 somatic mutations in chronic myeloid leukemia patients in blast crisis. *Leukemia* 2010;25(January (1)):178–81.
- Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 2010;24(July (7)):1302–9.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009;462(December (7274)):739–44.
- Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 2010;207(February (2)):339–44.
- Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, 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(March (3)):225–34.
- Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki N. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J Pathol* 2011;178(March (3)):1395–402.
- Figuerola ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2007;18(December (6)):553–67.
- Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19(January (1)):17–30.
- Carnicer MJ, Lasa A, Buschbeck M, Serrano E, Carricondo M, Brunet S, et al. K313dup is a recurrent CEBPA mutation in de novo acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol* 2008;87(October (10)):819–27.
- Munoz L, Nomdedeu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM, et al. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 2003;17(January (1)):76–82.
- Nomdedeu J, Bussaglia E, Villamor N, Martinez C, Esteve J, Tormo M, et al. Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: prognostic impact of the leukemic compartment size. *Leuk Res* 2010;35(February (2)):163–8.
- Horbinski C, Kelly L, Nikiforov YE, Durso MB, Nikiforova MN. Detection of IDH1 and IDH2 mutations by fluorescence melting curve analysis as a diagnostic tool for brain biopsies. *J Mol Diagn* 2010;12(July (4)):487–92.
- Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009;41(July (7)):838–42.
- Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360(May (22)): 2289–301.
- Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, Becker H, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2011;29(April (10)):1373–81.
- Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, Boissel N, Renneville A, Philippe N, et al. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood* 2010;116(August (7)): 1132–5.
- Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2002;16(April (4)):559–62.



- [24] Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000;14(October (10)): 1777–84.
- [25] Abdel-Wahab O, Levine RL. Metabolism and the leukemic stem cell. *J Exp Med* 2010;207(April (4)):677–80.
- [26] Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Huchette P, Dombret H, Preudhomme C. Differential prognosis impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;117(March (13)):3696–7.
- [27] Marcucci G, Mahary K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28(May (14)):2348–55.
- [28] Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, et al. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia* 2011;25(February (2)):382–4.
- [29] Green CL, Evans CM, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* 2010;116(October (15)):2779–82.
- [30] Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, 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(September (12)):2122–6.
- [31] Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* 2010;116(November (20)): 4086–94.
- [32] Chou WC, Lei WC, Ko BS, Hou HA, Chen CY, Tang JL, et al. The prognostic impact and stability of isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010;25(February (2)): 246–53.
- [33] Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, et al. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 2010;28(August (23)):3717–23.
- [34] Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Kronke J, Bullinger L, 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(August (22)):3636–43.
- [35] Green CL, Evans CM, Zhao L, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, et al. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood* 2011;118(July (2)):409–12.
- [36] Noordmeer SM, Tonnisson E, Vissers I, van der Heijden A, van de Locht LT, Deutz-Terlouw PP, et al. Rapid identification of IDH1 and IDH2 mutations in acute myeloid leukaemia using high resolution melting curve analysis. *Br J Hematol* 2010;152(February (4)):493–6.

## ORIGINAL ARTICLE

**Core binding factor acute myeloid leukemia: the impact of age, leukocyte count, molecular findings, and minimal residual disease**

Montserrat Hoyos<sup>1,2</sup>, Josep F. Nomdedeu<sup>1</sup>, Jordi Esteve<sup>1</sup>, Rafael Duarte<sup>1</sup>, Josep M. Ribera<sup>1</sup>, Andreu Llorente<sup>1,\*</sup>, Lourdes Escoda<sup>1</sup>, Javier Bueno<sup>1</sup>, Mar Tormo<sup>1</sup>, David Gallardo<sup>1</sup>, Maria Paz Queipo de Llano<sup>1</sup>, Josep M. Martí<sup>1</sup>, Anna Aventín<sup>1</sup>, Ramón Mangues<sup>3</sup>, Salut Brunet<sup>1</sup>, Jorge Sierra<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Spanish CETLAM Group Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona Spanish Cancer Network (RTICC), Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Networking Research Center on Bioengineering Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN MICINN ISCIII), Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Banc de Sang i Teixits de Catalunya, Barcelona, Spain

**Abstract**

*Purpose:* Most patients with acute myeloid leukemia (AML) and genetic rearrangements involving the core binding factor (CBF) have favorable prognosis. In contrast, a minority of them still have a high risk of leukemia recurrence. This study investigated the adverse features of CBF AML that could justify investigational therapeutic approaches. *Patients and methods:* One hundred and fifty patients (median age 42 yr, range 16–69) with CBF AML (*RUNX1-RUNX1T1*  $n = 74$ ; *CBFB-MYH11*  $n = 76$ ) were prospectively enrolled into two consecutive CETLAM protocols at 19 Spanish institutions. Main clinic and biologic parameters were analyzed in the whole series. In non-selected cases with available DNA samples, the impact of molecular characterization and minimal residual disease (MRD) was also studied. *Results:* Overall, complete remission (CR) rate was 89% (94% in  $\leq 50$  yr old and 72% in  $> 50$  yr,  $P = 0.002$ ). At 5 yr, cumulative incidence of relapse (CIR) was  $26 \pm 1\%$ , disease-free survival (DFS)  $62 \pm 6\%$ , and overall survival (OS)  $66 \pm 4\%$ . In multivariate analyses, leukocyte count above  $20 \times 10^9/L$ , *BAALC* over-expression, and high copy numbers of *RUNX1-RUNX1T1* or *CBFB-MYH11* after induction chemotherapy (CT) led to increased relapse rate. Regarding OS, age  $> 50$  yr, leukocyte count above  $20 \times 10^9/L$ , and increased *MN1* expression were adverse features. *Conclusion:* Age, leukocyte counts, *BAALC*, and *MN1* gene expressions as well as high copy numbers of *RUNX1-RUNX1T1* or *CBFB-MYH11* after induction chemotherapy are useful tools to predict the outcome and should be considered for risk-adapted therapy.

**Key words** acute myeloid leukemia; core binding factors; biologic and molecular prognostic factors

**Correspondence** Jorge Sierra, Hematology Service, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Mas Casanovas 90, 08041 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 5565649; Fax: +34 93 5565601; e-mail: jsierra@santpau.cat

\*Deceased.

Accepted for publication 1 May 2013

doi:10.1111/ejh.12130

**Introduction**

A well-defined group of acute myeloid leukemias (AMLs) harbors chromosomal abnormalities involving the core binding factor (CBF). Core binding factor AML group includes cases with  $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1$  and AML with  $inv(16)(p13q22)$  or  $t(16;16)(p13;q22)/CBFB-MYH11$ .

Intensive chemotherapy allows 60% of these patients becoming long-term survivors (1–3). This is consequence of the high proportion of complete remissions (CR) and the relapse incidence of approximately 30% (4).

Some patients with CBF AML have less favorable outcome. High white blood cell counts (WBC) at diagnosis, mutations in the *C-KIT* gene, and high copy number of transcripts at

diagnosis and/or after chemotherapy are considered adverse factors in this group of AML. Herein, the Spanish CETLAM group reports 150 consecutively treated patients with *CBF* AML and evaluate the impact of these prognostic factors and of other less extensively studied molecular features.

The aim of the study was identifying patients with high relapse incidence and decreased survival who may be candidates for investigational approaches.

## Patients and methods

### Patients and treatment

Patients studied were adults 16–69 yr old with ‘de novo’ AML with t(8;21)(q22;q22) *RUNX1-RUNX1T1* or inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22) *CBFB-MYH11* following the 2008 WHO classification (5) and confirmed by FISH and/or RT-PCR. Treatment was administered between 1999 and 2012 at 19 institutions according to the AML-99 and AML-03 protocols. These trials were approved by the institutional review boards of participating centers, registered in www.clinicaltrials.gov (NCT01716793 for AML-99 and NCT01723657 for AML-03), and informed consent was obtained from each patient. The study and analyses were conducted according to the Helsinki declaration. In brief, induction CT included one or two courses of idarubicin 12 mg/m<sup>2</sup> intravenously (IV) days 1,3,5, cytarabine 500 mg/m<sup>2</sup>/12 h over 2 h IV infusion days 1,3,5,7, and etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> IV days 1,2,3. This was followed by one consolidation with mitoxantrone 12 mg/m<sup>2</sup> IV from day 4 to 6, and cytarabine 500 mg/m<sup>2</sup>/12 h IV from day 1–6 in the two protocols. Of note, in the AML-03 trial, patients also received G-CSF priming, 150 mg/m<sup>2</sup> subcutaneously (SC) from day 0 to the last day of induction and consolidation CT. Subsequently, the patients went on chemotherapy courses with high-dose cytarabine as in the Cancer and Leukemia Group B trial (6). In addition, in the AML-03 protocol, patients with a leukocyte count above 20 × 10<sup>9</sup>/L were intended to receive autologous stem cell transplantation instead of the high-dose cytarabine CT. If the patients experienced a leukemia relapse, an autologous or allogeneic transplantation was proposed, depending on prior therapy and availability of an human leukocyte antigen-identical sibling or a matched unrelated donor.

### Samples

At diagnosis, DNA and RNA were extracted following the established BIOMED protocols (7). *C-KIT* D816 mutations were screened (in patients with available samples) on a Light Cycler<sup>®</sup> using a melting curve based assay with locked nucleic acid (LNA) and mutation specific fluorogenic hybridization probes. An LNA probe was used to suppress the amplification of the wild-type target, possibly allowing

detection of the mutant allele when this allele represented only a minor fraction of all cells. Data were analyzed using the Light Cycler 4.0<sup>®</sup> software (Roche Diagnostics<sup>®</sup>, Mannheim, Germany) and the second derivative maximum method. Exon 8 mutations were investigated by direct sequencing using forward and reverse primers.

*MNI* and *BAALC* were determined by real-time PCR using the platform ABI Prism 7000 Sequence Detections System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in patients with RNA available. Each sample was performed in triplicate using the TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay (Applied Biosystems). The comparative cycle threshold (DDCt) method was used to determine relative expression levels, expressed as a ratio between target gene (*MNI* or *BAALC*) and control gene. The control gene used was *ABL* using the FAM fluorochrome (Applied Biosystems). The reference values used were bone marrow samples from healthy donors. Quantitative methods for *CBFB-MYH11* and *RUNX1-RUNX1T1* analyses were detailed in previous reports also using *ABL* as control gene (8). The standard chromosome banding analysis used was G-banding.

### Statistical methods

Independent variables analyzed were age, gender, type of *CBF* AML, additional cytogenetic abnormalities, FAB category, white blood cell count (WBC) at diagnosis, treatment protocol (AML-99 or AML-03) and in the patients with available samples, molecular characterization, and minimal residual disease (MRD) data. The threshold values for mRNA levels (*BAALC* and *MNI* genes), and for *RUNX1-RUNX1T1* or *CBFB-MYH11*, were established by selecting the most accurate values by a nonparametric receiver-operating characteristics (ROC) analysis, taking into account the maximum ratio sensitivity–specificity. The endpoint for the threshold was death and relapse. This approach has also been reported by others authors (9, 10) and was applied following the REMARK guidelines(11, 12). Threshold values for *RUNX1-RUNX1T1* patients were as follows: *MNI* expression ratio of 3.15, *BAALC* expression ratio of 8.031, 31018 transcript copies for MRD at diagnosis, 183 copies after induction chemotherapy, and 33 after consolidation CT. Threshold values for *CBFB-MYH11* were as follows: *MNI* expression ratio of 77.8, *BAALC* expression ratio of 46.63, 14442 transcript copies for MRD at diagnosis, 100 copies after induction chemotherapy, and 82 after consolidation CT.

High gene expression and copy numbers at diagnosis, after induction and after consolidation, were defined as above the threshold. Dependent variables were CR achievement, cumulative incidence of relapse (CIR), disease-free survival (DFS), and overall survival (OS). Proportions were compared using the chi-square test. Differences between continuous variables were analyzed with the Student’s t-test. Time-dependent outcomes were calculated using Gray’s test

(CIR), Kaplan–Meier curves (DFS or OS), and the log-rank test was used for comparisons (13). After exploratory univariate comparisons, multivariate analyses were performed including variables with a *P*-value below 0.15 as well as treatment protocol. This analysis was performed in the whole series and on each *CBF* AML per separate. In those patients with molecular studies available the multivariate analysis was only performed in the whole series due to the limited sample size. The regression model used was COX and Fine and Gray's test (13). The statistical packages used were the IBM® SPSS® Statistics (Release 19.0.0, New York, NY, USA), and the open source integrated development environment GNU Emacs 23.4.1 (i386-mingw-nt5.1.2600) of 2012-02-04 on MARVIN Studio version 0.94-110 (2009–2011 RStudio, Inc., Boston, MA, USA) using the Rversion 2.14.0 (2011, The R Foundation for Statistical computing).

## Results

### Descriptive analysis

The main characteristics of the 150 patients appear in Table 1. The subgroup of patients with additional molecular analyses available had similar characteristics to those without this additional information. Information on transcript copy numbers was available in 114 patients at diagnosis, in 78 after induction chemotherapy, and in 77 after consolidation. RNA samples for the gene expression analysis of *MNI* and *BAALC* were available in 72 patients, and multivariate analyses on the impact of MRD and gene expression were performed in this latter subgroup with full information. In summary, patients with molecular studies had a distribution of *RUNX1-RUNXIT1/CBFB-MYH11* of 48%/52%, a median age of 42 yr (72% younger than 50 yr), a median leukocyte count of  $16 \times 10^9/L$ , 28% of patients relapsed and 11% died; in cases without additional molecular studies, the distribution *RUNX1-RUNXIT1/CBFB-MYH11* was 56%/44%, median age was 43 yr old (79% younger than 50 yr), median leukocyte count was  $13 \times 10^9/L$ , 33% of patients relapsed and 24% died. The values in the two groups were not significantly different.

When comparing the two *CBF* AML categories, *RUNX1-RUNXIT1* AML at diagnosis had lower WBC counts at diagnosis, more frequent additional cytogenetic abnormalities and higher fusion transcript copy numbers than the *CBFB-MYH11* AML group (Table 1). Patients with *CBFB-MYH11* AML more frequently had high WBC counts at diagnosis, *C-KIT* mutations, and high expression of the *MNI* gene (Table 1).

### Induction and consolidation results

Complete remission was achieved in 133 of the 150 patients (89%; Table 1). Chemoresistance was observed in only three

patients (2%, one patient with *RUNX1-RUNXIT1*, and two with *CBFB-MYH11*) and death during induction in 14 (9%) cases. The results of induction were comparable in the two groups of *CBF* AML; 69 (93%) CR in *RUNX1-RUNXIT1* and 69 (84%) CR in *CBFB-MYH11* AML. The only factor associated with decreased probability of CR was an age over 50 yr: CR rate was 72% in patients >50 yr old vs. 94% in those ≤50 yr ( $P < 0.001$ ).

All 133 patients in CR received the first consolidation course with mitoxantrone and intermediate-dose cytarabine. Death during this treatment was observed in three patients (2%). Following, 103 patients were allocated to receive HDAC per protocol; among them, four patients (3%) did not receive additional treatment due to contraindication, 11 patients (11%) relapsed before CT, 77 (75%) received the HDAC consolidation, and 10 (10%) patients received an autologous transplant (protocol deviation). Twenty-seven patients with high WBC at diagnosis and belonging to the AML-03 protocol were allocated to autologous transplantation, which was performed in only 10 (37%) patients due to early relapse in 5 (19%) or mobilization failure 12 (44%); the latter five patients subsequently received HDAC.

### Relapse incidence

After a median follow-up of 31 months (range, 1–128 months), 34 of 133 patients developed leukemia relapse. Cumulative incidence of relapse at 5 yr was  $26 \pm 1\%$ . There were no statistical differences between *RUNX1-RUNXIT1* and *CBFB-MYH11*,  $23 \pm 5\%$  and  $29 \pm 6\%$ , respectively ( $P = 0.354$ ; Table 2).

Patients with a WBC at diagnosis above  $20 \times 10^9/L$  had a relapse incidence at 5 yr of  $40 \pm 7\%$  compared with  $16 \pm 5\%$  in those with  $\leq 20 \times 10^9/L$  ( $P = 0.001$ ; Fig. 1A). In multivariate analysis, the adverse impact of higher WBC was confirmed as well as the treatment protocol (Table 2).

Table 3 shows the univariate impact of extended molecular characterization and MRD assessment in the two *CBF* AML groups per separate. *C-KIT* mutations in *RUNX1-RUNXIT1* AML, *MNI*, and/or *BAALC* over-expression in *CBFB-MYH11* cases associated with high incidence of leukemia recurrence.

Multivariate analysis in patients with molecular studies, high *BAALC* expression (Fig. 1B), and/or high fusion transcript copy numbers after induction chemotherapy were identified as independent prognostic factors (Table 4).

### Disease-free survival

After a median follow-up for alive and CR patients of 31 months (1–128), 34 of the 133 patients relapsed and 10 died in remission, resulting in a DFS of  $62 \pm 6\%$ . High WBC at diagnosis ( $>20 \times 10^9/L$ ) was associated with decreased DFS in the multivariate analyses of the whole

**Table 1** Main characteristics of the series

	Whole series	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	<i>CBFB-MYH11</i>	<i>P</i>
Patients	150	74 (49%)	76 (51%)	
Protocol				
AML-99	54 (36%)	25 (34%)	29 (38%)	0.577
AML-03	96 (64%)	49 (66%)	47 (62%)	
Cohorts				
1998–2001	37 (25%)	16 (43%)	21 (57%)	0.534
2002–2005	48 (32%)	25 (52%)	23 (48%)	
2006–2009	44 (29%)	20 (45%)	24 (55%)	
2010–2012	21 (17%)	13 (62%)	8 (38%)	
Age, mean/median (range), yr	41/42 (16–69)	41/41 (16–69)	41/42 (18–68)	0.887
≤50 yr	110 (73%)	56 (76%)	54 (71%)	0.522
>50 yr	40 (27%)	18 (24%)	22 (29%)	
Gender				
Male	84 (56%)	45 (61%)	39 (51%)	0.241
Female	66 (44%)	29 (39%)	37 (49%)	
FAB type				
M2	72 (48%)	64 (86%)	8 (11%)	≤0.001
M4	21 (14%)	5 (7%)	16 (21%)	
M4 Eos	45 (30%)		45 (59%)	
Others	12 (8%)	5 (7%)	7 (9%)	
WBC count (×10 <sup>9</sup> /L)				
Median (range)	31/16 (1–242)	17.47/13.9 (1.4–86)	44.3/44.3 (2.3–242)	<0.001
≤20 × 10 <sup>9</sup> /L	88 (59%)	54 (73%)	34 (45%)	<0.001
>20 × 10 <sup>9</sup> /L	61 (41%)	20 (27%)	41 (55%)	
Associated abnormalities				
No	81 (58%)	31 (46%)	50 (69%)	0.006
Yes	58 (42%)	36 (54%)	22 (31%)	
<i>C-KIT</i> mutations	(n = 95)	(n = 56)	(n = 39)	0.003
No	65 (68%)	45 (80%)	20 (51%)	
Yes	30 (32%)	11 (20%)	19 (49%)	
<i>MN1</i> expression (threshold)	(n = 72) (3.15/77.8)	(n = 34) (3.15)	(n = 38) (77.8)	0.001
Mean/median (range)	29.6/4.2 (0.3–424.6%)	6.1/2 (0.03–119.6%)	50.59/26.6 (0.5–424.6)	
Low	53 (74%)	21 (62%)	32 (84%)	
High	19 (26%)	13 (38%)	6 (16%)	
<i>BAALC</i> expression (threshold)	(n = 72) (8.031/46.6)	(n = 34) (8.031)	(n = 38) (46.6)	0.582
Mean/median (range)	35.8/20.9 (0.19–205.1)	33.12/21.6 (0.2–135.1)	38.2/20.9 (0.5–205.1)	
Low	30 (42%)	8 (24%)	27 (71%)	
High	42 (58%)	26 (76%)	11 (29%)	
Induction results				
Complete remission	133 (89%)	69 (93%)	64 (84%)	0.216
After 1 course	116 (87%)	61 (88%)	55 (86%)	
After 2 courses	17 (13%)	8 (12%)	9 (14%)	
Death during induction	14 (9%)	4 (6%)	10 (13%)	
Refractory	3 (2%)	1 (1%)	2 (3%)	
Copy number at Dx, <sup>1</sup> n:114 (threshold)		31018 copies	14442 copies	
Mean/median (range)	25773/15000 (8.4–225806)	24137/39582 (3631–22580)	12901/110300 (8.4–58862)	0.510
Few copies	78 (68%)	36 (65%)	42 (72%)	
High copies	36 (31%)	19 (35%)	17 (28%)	
MRD after induction, n:78 (threshold)		183 copies	100 copies	0.676
Mean/median (range)	431.9/19.05 (0–2700)	691/20 (0.01–20 700)	38/18 (0–148)	
Few copies	67 (86%)	41 (87%)	26 (84%)	
High copies	11 (14%)	6 (13%)	5 (15%)	
MRD post consolidation, n:77 (threshold)		33 copies	82 copies	0.609
Mean/median (range)	55.1/4.87 (0–1727)	43/4 (0–680)	69/5.41 (0–1727)	
Few copies	65 (12%)	33 (81%)	32 (88%)	
High copies	12 (16%)	8 (19%)	4 (11%)	

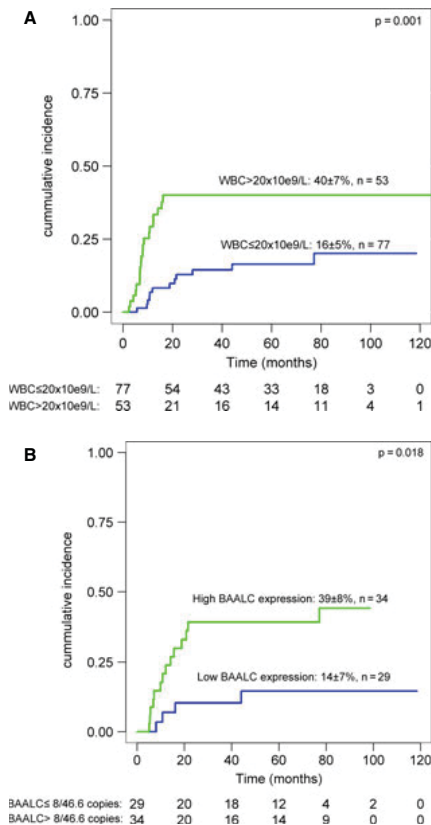
<sup>1</sup>Specific transcript copy number. Bold values: *P*-value < 0.050.

AML, acute myeloid leukemia; Dx, diagnosis; FAB, French-American-British; MRD, minimal residual disease; WBC, white blood cell counts.

**Table 2** Univariate and multivariate analysis of time-dependent endpoints. Results at 5 yr

Univariate (patients)	Whole series			RUNX1-RUNX1T1			CBFB-MYH11		
	CIR (n = 131) 26 ± 1	DFS (n = 131) 62 ± 6	OS (n = 150) 66 ± 4	CIR (n = 68) 23 ± 5	DFS (n = 68) 69 ± 6	OS (n = 74) 69 ± 6	CIR (n = 63) 29 ± 6	DFS (n = 63) 58 ± 7	OS (n = 76) 64 ± 6
Protocol	<b>P = 0.025</b>	<b>P = 0.160</b>	<b>P = 0.201</b>	<b>P = 0.011</b>	<b>P = 0.226</b>	<b>P = 0.521</b>	<b>P = 0.533</b>	<b>P = 0.471</b>	<b>P = 0.300</b>
AML-99	37 ± 7	58 ± 7	56 ± 7	42 ± 11	58 ± 11	61 ± 10	32 ± 10	60 ± 10	53 ± 10
AML-03	20 ± 5	70 ± 6	72 ± 5	12 ± 6	76 ± 6	74 ± 6	28 ± 7	64 ± 8	72 ± 17
Age	<b>P = 0.714</b>	<b>P = 0.650</b>	<b>P = 0.070</b>	<b>P = 0.360</b>	<b>P = 0.546</b>	<b>P = 0.219</b>	<b>P = 0.765</b>	<b>P = 0.988</b>	<b>P = 0.210</b>
≤50 yr	27 ± 5	66 ± 5	70 ± 5	24 ± 6	72 ± 6	71 ± 6	31 ± 7	60 ± 8	69 ± 7
>50 yr	21 ± 8	64 ± 9	55 ± 8	16 ± 10	63 ± 13	61 ± 11	27 ± 11	66 ± 12	52 ± 11
Gender	<b>P = 0.076</b>	<b>P = 0.058</b>	<b>P = 0.233</b>	<b>P = 0.126</b>	<b>P = 0.166</b>	<b>P = 0.232</b>	<b>P = 0.264</b>	<b>P = 0.153</b>	<b>P = 0.517</b>
Male	32 ± 6	59 ± 6	61 ± 6	30 ± 8	62 ± 8	64 ± 7	35 ± 9	55 ± 9	58 ± 8
Female	18 ± 5	75 ± 6	73 ± 6	12 ± 6	81 ± 8	77 ± 8	23 ± 8	69 ± 9	70 ± 8
WBC ( $\times 10^9/L$ )	<b>P = 0.001</b>	<b>P = 0.001</b>	<b>P = 0.011</b>	<b>P = 0.001</b>	<b>P = 0.006</b>	<b>P = 0.001</b>	<b>P = 0.217</b>	<b>P = 0.067</b>	<b>P = 0.563</b>
≤20	16 ± 5	77 ± 6	75 ± 5	14 ± 5	78 ± 6	80 ± 6	21 ± 8	75 ± 9	69 ± 8
>20	40 ± 7	49 ± 7	53 ± 7	47 ± 12	47 ± 12	38 ± 12	36 ± 8	51 ± 9	59 ± 8
Cytogenetics	<b>P = 0.354</b>	<b>P = 0.411</b>	<b>P = 0.451</b>						
t(8;21)	23 ± 5	70 ± 5	69 ± 6						
inv(16)	29 ± 6	62 ± 6	64 ± 6						
Assoc. Cytogenetic Abn.	<b>P = 0.437</b>	<b>P = 0.063</b>	<b>P = 0.136</b>	<b>P = 0.958</b>	<b>P = 0.485</b>	<b>P = 0.229</b>	<b>P = 0.331</b>	<b>P = 0.070</b>	<b>P = 0.398</b>
No	27 ± 5	60 ± 6	60 ± 6	22 ± 8	69 ± 9	63 ± 9	32 ± 8	55 ± 8	58 ± 8
Yes	24 ± 6	73 ± 7	74 ± 6	24 ± 8	73 ± 8	74 ± 8	24 ± 10	76 ± 10	73 ± 9
Multivariate	<b>P = 0.049</b>	<b>P = 0.255</b>	<b>P = 0.272</b>	<b>P = 0.140</b>	<b>P = 0.496</b>	<b>P = 0.919</b>	<b>P = 0.451</b>	<b>P = 0.451</b>	<b>P = 0.451</b>
AML-99 vs. AML-03	0.5 (0.2-1)	0.7 (0.4-1.3)	0.7 (0.4-1.3)	0.4 (0.1-1.3)	0.7 (1.3-1.8)	1 (0.4-2.6)		0.7 (0.3-1.7)	
OR (95%CI)	NI	NI	<b>P = 0.019</b>	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Age >60 yr vs. ≤50 yr			2 (1.1-3.7)						
OR (95%CI)	<b>P = 0.120</b>	<b>P = 0.058</b>	<b>P = 0.286</b>	<b>P = 0.120</b>	<b>P = 0.120</b>	<b>P = 0.120</b>	<b>P = 0.120</b>	<b>P = 0.120</b>	<b>P = 0.120</b>
Male vs. Female	1.9 (0.8-4)	1.9 (1-3.6)	1.4 (0.8-2.5)	2.9 (0.7-11.3)					
OR (95%CI)	<b>P = 0.002</b>	<b>P = 0.004</b>	<b>P = 0.017</b>	<b>P = 0.002</b>	<b>P = 0.016</b>	<b>P = 0.002</b>	<b>P = 0.118</b>	<b>P = 0.118</b>	<b>P = 0.118</b>
WBC >20 × 10 <sup>9</sup> /L vs. ≤20	3 (1.5-6)	2.5 (1.3-4.7)	2.1 (1.1-3.7)	4.6 (1.7-12.4)	3.1 (1.25-7.9)	4 (1.6-9.7)		2.1 (0.8-5.2)	
OR (95%CI)	NI	<b>P = 0.063</b>	<b>P = 0.140</b>	NI	NI	NI	NI	<b>P = 0.148</b>	<b>P = 0.148</b>
Assoc. Cyt. Abn. No vs. yes		0.5 (0.3-1)	0.6 (0.3-1.2)					0.4 (0.1-1.3)	
OR (95%CI)									

CIR, cumulative incidence of relapse; DFS, disease-free survival; OS, overall survival; abn: abnormalities; NI, variables not introduced in the multivariate analysis (P-value in univariate analyses > 0.150; AML, acute myeloid leukemia; WBC, white blood cell count; Assoc. Cyt. Abn., associated cytogenetic abnormalities. Bold values: P-value < 0.050.



**Figure 1** (A) Cumulative incidence of relapse (CIR) (n: 130) depending on WBC at diagnosis in the whole series (threshold:  $20 \times 10^9/L$ ). Green: WBC  $\leq 20 \times 10^9/L$ ; Blue:  $>20 \times 10^9/L$ . (B) CIR depending on BAALC expression (n: 63). (threshold ratio: *RUNX1-RUNX1T1/ABL*, 8; *CBFB-MYH11/ABL*, 46.6). Green: BAALC expression ratio (BAALC/*ABL*)  $\leq 8$  in *RUNX1-RUNX1T1* or  $\leq 46.6$  in *CBFB-MYH11*; Blue: BAALC expression ratio  $>8$  or  $>46.6$ .

series (Table 2). Regarding increased levels of biomarkers (Table 3), the multivariate analysis (Table 4) showed that high MRD after induction treatment had independent negative impact on DFS (Fig. 2).

### Overall survival

After a median follow-up for alive patients of 55 months (range 1.7–38 months), OS for the whole series was  $66 \pm 4\%$  at 5 yr,  $69 \pm 6\%$  for patients with *RUNX1-RUNX1T1*, and  $64 \pm 6\%$  in those with *CBFB-MYH11* ( $P = \text{n.s.}$ ). Factors associated with decreased OS in multivariate analysis were age  $>50$  yr, WBC  $>20 \times 10^9/L$ , and high *MNI* expression (Tables 2 and 4). Because *MNI* was not available in all patients, we used age and WBC to separate

three groups of patients with significantly different survival. Sixty-one patients without adverse factors had a  $80 \pm 5\%$  probability of OS at 5 yr, 75 patients with one factor had a OS of  $61 \pm 6\%$ , and 13 with two factors had poor outcome, with overall survival of  $36 \pm 14\%$ ,  $P = 0.002$  (Fig. 3). This separation in three categories was reproducible in the smaller subset of patients with studies on *MNI* expression. Of note, there is a statistical trend supporting that *MNI* over-expression may add prognostic significance in patients with 0–1 adverse factors (Fig. 4); in this group, OS at 5 yr was  $76 \pm 6\%$  in patients with low *MNI* expression vs.  $50 \pm 12\%$  in those with high expression ( $P = 0.082$ ). When analyzing categories with 0 and 1 adverse factors per separate, survival at 2 yr was lower in patients with *MNI* over-expression, although the differences did not reach statistical significance ( $67 \pm 16\%$  vs.  $88 \pm 6\%$  in group 0,  $29 \pm 17\%$  vs.  $71 \pm 10\%$  in group 1).

### Discussion

The series reported here confirms the high CR rate, the infrequent chemoresistance, and the prognostic value of age and WBC at diagnosis in *CBF* AML. As in other reports, patients older than 50 yr had lower probability of achieving CR due to higher induction death rate and worse survival than younger patients (14–17). Despite this, the 5-yr OS in this series of older age group was 50%, substantially higher than the observed in other AML subtypes.

A high WBC at diagnosis is a classical adverse feature in *CBF* AML (18, 19). We also observed this negative impact in our report with the best cut-off value being  $20 \times 10^9/L$ , in line with other authors (19–21). Low compliance of autologous transplantation in this series, mostly due to poor stem cell harvest, makes unclear whether this procedure had an impact of decreasing relapses on patients with high WBC. This decrease could also be the consequence of administering intermediate-dose cytarabine during induction or the use of G-CSF priming in our more recent protocol. Additional prospective investigation on the role of hematopoietic transplantation, either allogeneic or autologous, in patients with *CBF* AML and high WBC is mandatory.

Despite the limitation of the sample size, we confirmed that *C-KIT* mutations conferred adverse outcome (22–24) in patients with *RUNX1-RUNX1T1* AML but not in *CBFB-MYH11* leukemia. The same finding was observed by other authors (24–26). Therefore, patients with *RUNX1-RUNX1T1* AML and *C-KIT* mutations could be considered for intensified consolidation approaches and/or targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (26).

A key finding from our study was that over-expression of genes with prognostic impact in normal karyotype AML also had adverse influence on the outcome of *CBF* AML. As descriptive finding, we and others observed that patients with *CBFB-MYH11* had higher *MNI* expression levels than

**Table 3** Impact of molecular findings and MRD on CIR, DFS, and OS in univariate analysis

Group	Whole subset			RUNX1-RUNX1T1			CBFB-MYH11		
	CIR	DFS	OS	CIR	DFS	OS	CIR	DFS	OS
No. patients	75	75	85	41	41	46	33	33	39
<i>cKIT</i> mutations	$P = 0.576$	$P = 0.694$	$P = 0.979$	<b><math>P = 0.049</math></b>	$P = 0.171$	$P = 0.058$	$P = 0.127$	$P = 0.240$	$P = 0.055$
Wild-type	28 ± 6	66 ± 6	68 ± 7	19 ± 6	74 ± 7	76 ± 6	53 ± 13	47 ± 7	51 ± 12
Mutated	28 ± 9	67 ± 12	68 ± 10	44 ± 16	56 ± 10	41 ± 10	19 ± 33	74 ± 9	84 ± 10
No. patients	63	63	72	28	29	34	35	35	38
<i>MN1</i> expression	$P = 0.141$	$P = 0.078$	<b><math>P = 0.048</math></b>	$P = 0.475$	$P = 0.561$	$P = 0.174$	<b><math>P = 0.031</math></b>	<b><math>P = 0.003</math></b>	$P = 0.098$
Low	24 ± 6	65 ± 7	71 ± 6	21 ± 9	68 ± 11	71 ± 10	25 ± 8	63 ± 9	71 ± 8
High	38 ± 12	49 ± 13	45 ± 12	30 ± 15	60 ± 15	46 ± 14	58 ± 23	25 ± 10	42 ± 22
<i>BAALC</i> expression	<b><math>P = 0.019</math></b>	$P = 0.220$	$P = 0.619$	$P = 0.200$	$P = 0.544$	<b><math>P = 0.019</math></b>	<b><math>P = 0.001</math></b>	<b><math>P = 0.001</math></b>	$P = 0.377$
Low	15 ± 7	68 ± 7	65 ± 7	0	60 ± 22	37 ± 17	18 ± 8	69 ± 10	73 ± 9
High	39 ± 8	55 ± 9	64 ± 8	29 ± 9	67 ± 10	69 ± 10	67 ± 16	23 ± 14	51 ± 16
No. patients	98	98	114	50	50	55	48	48	59
Copies at diagnosis	<b><math>P = 0.001</math></b>	<b><math>P = 0.007</math></b>	$P = 0.123$	<b><math>P = 0.007</math></b>	$P = 0.077$	<b><math>P = 0.036</math></b>	$P = 0.153$	<b><math>P = 0.049</math></b>	$P = 0.810$
Few copies	18 ± 5	75 ± 5	74 ± 5	9 ± 5	83 ± 6	79 ± 6	27 ± 8	66 ± 9	70 ± 7
High copies	50 ± 10	49 ± 10	54 ± 9	46 ± 14	54 ± 114	56 ± 11	57 ± 14	34 ± 13	54 ± 13
No. patients	73	73	78	45	45	47	28	28	31
MRD after induction	<b><math>P = 0.001</math></b>	<b><math>P = 0.001</math></b>	<b><math>P = 0.003</math></b>	<b><math>P = 0.012</math></b>	<b><math>P = 0.020</math></b>	<b><math>P = 0.040</math></b>	$P = 0.153$	<b><math>P = 0.050</math></b>	<b><math>P = 0.006</math></b>
Few copies	24 ± 6	71 ± 6	83 ± 5	17 ± 6	78 ± 7	79 ± 6	27 ± 8	66 ± 9	82 ± 10
High copies	73 ± 16	27 ± 16	27 ± 16	60 ± 22	40 ± 2	40 ± 2	57 ± 13	34 ± 13	33 ± 23
No. patients	75	75	77	41	41	41	34	34	36
MRD after consolidation	<b><math>P = 0.001</math></b>	<b><math>P = 0.001</math></b>	<b><math>P = 0.002</math></b>	<b><math>P = 0.025</math></b>	$P = 0.063$	<b><math>P = 0.046</math></b>	<b><math>P &lt; 0.001</math></b>	<b><math>P &lt; 0.001</math></b>	<b><math>P = 0.020</math></b>
Few copies	24 ± 6	71 ± 6	85 ± 5	16 ± 7	77 ± 8	84 ± 6	32 ± 9	64 ± 9	86 ± 7
High copies	67 ± 14	33 ± 14	39 ± 15	50 ± 18	50 ± 18	50 ± 18	75 ± 22	25 ± 21	25 ± 22

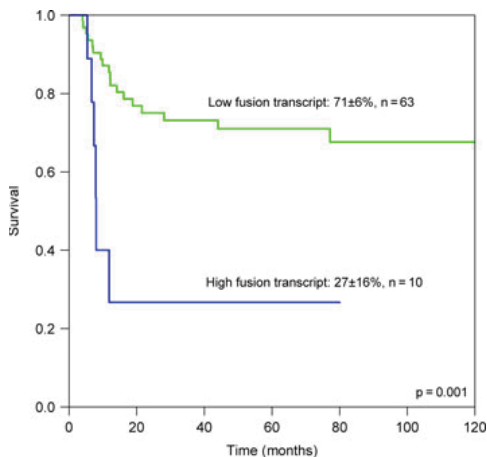
CIR, cumulative incidence of relapse; consolidat, consolidation; DFS, disease-free survival; MRD, minimal residual disease; OS, overall survival. Bold values:  $P$ -value <0.050.



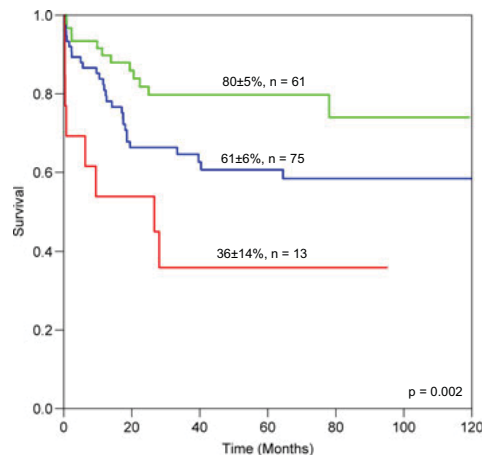
**Table 4** Multivariate analysis of the group of patients with molecular studies ( $n = 72$ )

Multivariate	Outcome		
	CIR	DFS	OS
AML-99 vs. AML-03	$P = 0.610$	$P = 0.363$	$P = 0.398$
OR (95% CI)	1.3 (0.4–4.1)	1.6 (0.6–4.6)	1.1 (0.4–3)
Age >50 yr vs. ≤50 yr	NI	NI	$P = 0.091$
OR (95% CI)			1.8 (0.5–7.8)
Leuc >20 × 10 <sup>9</sup> /L vs. ≤20 × 10 <sup>9</sup> /L	$P = 0.076$	$P = 0.260$	$P = 0.350$
OR (95% CI)	2.6 (0.9–7.8)	1.6 (0.7–3.9)	1.6 (0.6–4.7)
Assoc. Cyt. Abn. No vs. yes		$P = 0.103$	$P = 0.076$
OR (95% CI)		0.4 (0.1–1.2)	0.3 (0.1–1.1)
<i>MNI</i> high vs. low exp.	$P = 0.540$	$P = 0.152$	<b><math>P = 0.040</math></b>
OR (95% CI)	1.5 (0.4–5.9)	2 (0.8–5.3)	3.4 (1–11)
<i>BAALC</i> high vs. low exp.	<b><math>P = 0.045</math></b>	NI	NI
OR (95% CI)	3.7 (1–13.5)		
Copy number at Dx high vs. low copies	$P = 0.120$	$P = 0.350$	$P = 0.873$
OR (95% CI)	3 (0.7–12.4)	1.7 (0.6–5)	1.1 (0.2–3.5)
MRD post induction high vs. low	<b><math>P = 0.048</math></b>	<b><math>P = 0.029</math></b>	<b><math>P = 0.022</math></b>
OR (95% CI)	15.2 (0.7–348.6)	17.3 (1.4–217.1)	38.6 (1.7–890.6)
MRD post consolidation CT high vs. low	$P = 0.720$	$P = 0.303$	$P = 0.188$
OR (95% CI)	0.6 (0–9.1)	0.2 (0–4)	1.1 (0.2–5.1)

AML, acute myeloid leukemia; CIR, cumulative incidence of relapse; DFS, disease-free survival; NI, variables not introduced in the multivariate analysis ( $P$ -value in univariate analyses >0.15); OS, overall survival; WBC, white blood cell counts. Bold values:  $P$ -value <0.050.



**Figure 2** Disease-free survival depending on minimal residual disease after induction treatment in patients with molecular studies ( $n = 73$ ). (threshold ratio: *RUNX1-RUNX1T1*, 183 copies; *CBFB-MYH11*, 100 copies). Green: MRD post induction CT *RUNX1-RUNX1T1* ≤183 copies or *CBFBMYH11* ≤100 copies; Blue: >183 copies or >100 copies.

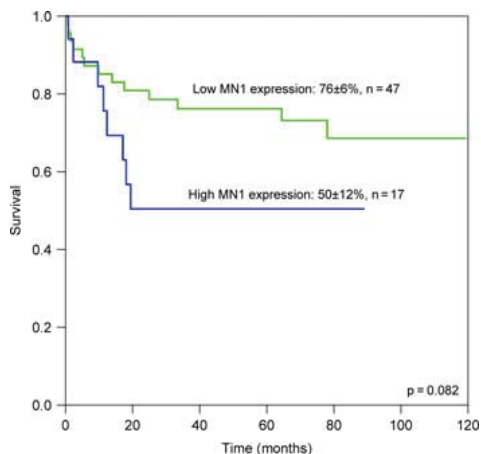


**Figure 3** Overall survival depending on the number of adverse factors (age >50 yr and WBC > 20 × 10<sup>9</sup>/L). Red: 0 adverse factors; Green: 1 adv factor; Blue: 2 adv factors, regarding age > 50 yr and WBC > 20 × 10<sup>9</sup>/L.

patients with *RUNX1-RUNX1T1* (27). Our observation on the prognostic impact of *BAALC* on CBF AML is consistent with the observed in other AML subgroups. Higher relapse rate, lower DFS or OS for patients with *BAALC* (28, 29), or *MNI* (30, 31) high expressions have been observed in patients with AML and normal or other intermediate-risk cytogenetics; we show here the same negative

impact on CBF AMLs remarkably; we found that *MNI* expression could add valuable prognostic information to age and WBC.

High copy numbers of the rearranged genes after induction chemotherapy were predictive for relapse. The relevance of MRD assessment after treatment has also been emphasized by other authors and is becoming a useful tool for risk-adapted postremission treatment in AML.



**Figure 4** Impact of *MN1* expression on overall survival of patients with 0–1 adverse factor. Blue: *MN1* expression ratio (*MN1/ABL*)  $\leq 3.15$  in *RUNX1-RUNX1T1* or  $\leq 77.8$  in *CBFB-MYH11*; Green: *MN1* expression ratio  $> 3.15$  or  $> 77.8$ .

In summary, from the series of patients with CBF AML reported here becomes clear that the current treatment approach is adequate for patients younger than 50 yr with  $\leq 20 \times 10^9/L$  leukocytes at diagnosis. In contrast, results are unsatisfactory in patients above 50 yr with high leukocytes. In our experience, over-expression of *BAALC* and *MN1* at diagnosis, as well as transcript copy numbers after induction provided additional prognostic information. Therefore, there is room for improvement in patients with these adverse molecular features. In these cases, tailored postremission approaches including allogeneic transplantation and targeted therapy deserve investigation, preferably into clinical trials of international collaboration.

## Acknowledgements

This work was supported by the following grants: Fundació Mutua Madrileña 08/FMMA PI 10/0173 to JN and FMMA 2006-168, ISCIII PI052312, PI080672, PI1100872, RD12/0036/0071, EC07/90065, 2009-SGR-168 (Plà de Recerca de Catalunya), 100830/31/32 (Marató de TV3) and a grant from Fundació Cellex, Spain, to JS. We are grateful to the CETLAM participating hospitals.

## References

- Byrd JC, Ruppert AS, Mrozek K, et al. Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and *inv(16)(p13q22)* or *t(16;16)(p13;q22)*: results from CALGB 8461. *J Clin Oncol* 2004;**22**:1087–94.
- Byrd JC, Dodge RK, Carroll A, et al. Patients with *t(8;21)(q22;q22)* and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. *J Clin Oncol* 1999;**17**:3767–75.
- Dombret H, Preudhomme C, Boissel N. Core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML): is high-dose Ara-C (HDAC) consolidation as effective as you think? *Curr Opin Hematol* 2009;**16**:92–7.
- Hart SM, Foroni L. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica* 2002;**87**:1307–23.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;**100**:2292–302.
- Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E 3rd. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med* 1994;**331**:896–903.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;**13**:1901–28.
- Perea G, Lasa A, Aventin A, et al. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [*t(8;21)* and *inv(16)*]. *Leukemia* 2006;**20**:87–94.
- Arellano M, Bernal-Mizrachi L, Pan L, et al. Prognostic significance of leukopenia at the time of diagnosis in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;**11**:427–32.
- Medd PG, Clark N, Leyden K, Turner S, Strefford JA, Butler C, Collins GP, Roberts DJ, Atoyebi W, Hatton CS. A novel scoring system combining expression of CD23, CD20, and CD38 with platelet count predicts for the presence of the *t(11;14)* translocation of mantle cell lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;**80**:230–7.
- Mallett S, Timmer A, Sauerbrei W, Altman DG (2010) Reporting of prognostic studies of tumour markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines. *Br J Cancer* **102**:173–80.
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* 2005;**93**:387–91.
- Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;**21**:4642–9.
- Grimwade D, Hills RK (2009) Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2009**:385–95.
- Klepin HD, Balducci L. Acute myelogenous leukemia in older adults. *Oncologist* 2009;**14**:222–32.
- Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006;**368**:1894–907.

17. Prebet T, Boissel N, Reutenauer S, *et al.* Acute myeloid leukemia with translocation (8;21) or inversion (16) in elderly patients treated with conventional chemotherapy: a collaborative study of the French CBF-AML intergroup. *J Clin Oncol* 2009;**27**:4747–53.
18. Martin G, Barragan E, Bolufer P, Chillon C, Garcia-Sanz R, Gomez T, Brunet S, Gonzalez M, Sanz MA. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica* 2000;**85**:699–703.
19. Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, *et al.* A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2002;**99**:3517–23.
20. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, *et al.* Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998;**58**:4173–9.
21. 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.
22. Lasa A, Carricondo MT, Carnicer MJ, Perea G, Aventin A, Nomdedeu JF. A new D816 c-KIT gene mutation in refractory AML1-ETO leukemia. *Haematologica* 2006;**91**:1283–4.
23. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, *et al.* Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006;**107**:3463–8.
24. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood* 2006;**107**:1791–9.
25. Jiao B, Wu CF, Liang Y, *et al.* AML1-ETO9a is correlated with C-KIT overexpression/mutations and indicates poor disease outcome in t(8;21) acute myeloid leukemia-M2. *Leukemia* 2009;**23**:1598–604.
26. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002;**20**:1692–703.
27. Carella C, Bonten J, Sirma S, *et al.* MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia* 2007;**21**:1679–90.
28. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, *et al.* High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood* 2008;**111**:5371–9.
29. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, *et al.* BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 2003;**102**:1613–8.
30. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Dohner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Ganser A. High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* 2006;**108**:3898–905.
31. Baldus CD, Martus P, Burmeister T, Schwartz S, Gokbuget N, Bloomfield CD, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. *J Clin Oncol* 2007;**25**:3739–45.

## ORIGINAL ARTICLE

Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult *de novo* AML

JF Nomdedéu<sup>1</sup>, M Hoyos<sup>2,3</sup>, M Carricondo<sup>1</sup>, E Bussaglia<sup>1</sup>, C Estivill<sup>1</sup>, J Esteve<sup>4</sup>, M Tormo<sup>5</sup>, R Duarte<sup>6</sup>, O Salameo<sup>7</sup>, MPQ de Llano<sup>8</sup>, A García<sup>9</sup>, J Bargay<sup>10</sup>, I Heras<sup>11</sup>, JM Martí-Tutusaús<sup>12</sup>, A Llorente<sup>13,\*</sup>, JM Ribera<sup>14</sup>, D Gallardo<sup>15</sup>, A Aventin<sup>1</sup>, S Brunet<sup>3</sup> and J Sierra<sup>3</sup> On behalf of the CETLAM Group

We retrospectively assessed whether normalized bone marrow WT1 levels could be used for risk stratification in a consecutive series of 584 acute myeloid leukemia (AML) patients. A cutoff value of 5065 copies at diagnosis identified two prognostic groups (overall survival (OS):  $44 \pm 3$  vs  $36 \pm 3\%$ ,  $P = 0.023$ ; leukemia-free survival (LFS):  $47 \pm 3$  vs  $36 \pm 4\%$ ,  $P = 0.038$ ; and cumulative incidence of relapse (CIR):  $37 \pm 3$  vs  $47 \pm 4\%$ ,  $P = 0.043$ ). Three groups were identified on the basis of WT1 levels post-induction: Group 0 (WT1 between 0 and 17.5 copies, 134 patients, OS:  $59 \pm 4\%$ , LFS:  $59 \pm 4\%$  and CIR:  $26 \pm 4\%$ ); Group 1 (WT1 between 17.6 and 170.5 copies, 160 patients, OS:  $48 \pm 5\%$ , LFS:  $41 \pm 4\%$  and CIR:  $45 \pm 4\%$ ); and Group 2 (WT1 > 170.5 copies, 71 patients, OS:  $23 \pm 6\%$ , LFS:  $19 \pm 7\%$  and CIR:  $68 \pm 8\%$ ) ( $P < 0.001$ ). Post-intensification samples distinguished three groups: patients with WT1 > 100 copies (47 patients, 16%); an intermediate group of patients with WT1 between 10 and 100 copies (148 patients, 52%); and a third group with WT1 < 10 copies (92 patients, 32%). Outcomes differed significantly in terms of OS ( $30 \pm 7\%$ ,  $59 \pm 4\%$ ,  $72 \pm 5\%$ ), LFS ( $24 \pm 7\%$ ,  $46 \pm 4\%$ ,  $65 \pm 5\%$ ) and relapse probability (CIR  $72 \pm 7\%$ ,  $45 \pm 4\%$ ,  $25 \pm 5\%$ ), all  $P < 0.001$ . WT1 levels in bone marrow assayed using the standardized ELN method provide relevant prognostic information in *de novo* AML.

Leukemia advance online publication, 7 May 2013; doi:10.1038/leu.2013.111

**Keywords:** WT1; molecular diagnostics; minimal residual disease

## INTRODUCTION

Minimal residual disease (MRD) analysis based on quantitative PCR of common fusion or mutated genes is gaining acceptance as a risk stratification tool and as a measure of impending relapse in acute myeloid leukemia (AML). Knowledge of the genetic mechanisms underlying leukemic transformation has markedly enlarged the available lesions which could be used to follow AML. However, most AML cases lack validated and standardized genetic targets and should be followed by multiparametric flow cytometry (MPFC), which is technically demanding.<sup>1</sup>

WT1 is a transcription factor that is overexpressed in most *de novo* AML cases and in other myeloproliferative neoplasms.<sup>2–4</sup> It is essential in mesenchymal tissue maintenance through the Wnt4 pathway,<sup>5</sup> and it is expressed in a small percentage of bone marrow CD34+ cells. It is upregulated in early myeloid progenitors, and is downregulated at later stages of differentiation.<sup>6</sup> Studies in mice have shown that WT1 overexpression is required for leukemogenesis.<sup>6–8</sup> In human leukemias, WT1 is mutated in 10% of AML and in 12–13% of T-cell lineage ALL.<sup>9,10</sup> Despite these findings, it is not fully understood how WT1 overexpression and mutations contribute to the leukemic phenotype.

WT1 expression monitoring is becoming an almost universal target to follow *de novo* AML.<sup>11–16</sup> Its expression in myeloid malignancies is upregulated in parallel with the blast percentage. WT1 determination has recently been standardized as a result of a European Leukemia Net initiative.<sup>12</sup> Raised WT1 levels at diagnosis and post-induction have been associated with a poor outcome in *de novo* adult and pediatric AML. WT1 levels have also been used recently as a leukemia relapse predictor in bone marrow-transplanted patients.<sup>17</sup> WT1 levels in peripheral blood are much lower than those in bone marrow. In line with this finding, earlier reports have shown that best results in establishing clinical predictions are obtained when post-induction peripheral blood is used.<sup>18</sup> Most currently applied MRD studies, however, are based on routinely obtained bone marrow samples. As there is no consensus on clinically relevant thresholds to guide clinical decisions and to determine the optimal time-point of WT1 assessment in large multi-center trials, WT1 quantitation has not yet gained widespread use, despite all its potential advantages. The fact that some AML show normal WT1 levels at diagnosis could also be partly responsible.<sup>2–4,12</sup>

To investigate the prognostic impact of the normalized bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and

<sup>1</sup>Laboratori d'Hematologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, Valencia, Spain; <sup>6</sup>Hematology Department, ICO Hospitalet, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; <sup>7</sup>Hematology Department, Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; <sup>8</sup>Hematology Department, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; <sup>9</sup>Hematology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; <sup>10</sup>Hematology Department, Hospital de Son Llatzer, Palma de Mallorca, Spain; <sup>11</sup>Hematology Department, Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; <sup>12</sup>Hematology Department, Hospital de la Mutua de Terrassa, Terrassa, Spain; <sup>13</sup>Hematology Department, Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain; <sup>14</sup>Hematology Department, ICO Badalona, Badalona, Spain and <sup>15</sup>Hematology Department, ICO Girona, Girona, Spain. Correspondence: Dr JF Nomdedéu, Laboratori d'Hematologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Mas Casanovas, 90, 08041 Barcelona, Spain.

E-mail: jnomdedeu@santpau.cat

These results were partially presented at the 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 8–11 December 2012, Atlanta.

\*Deceased

Received 26 January 2013; revised 25 March 2013; accepted 10 April 2013; accepted article preview online 15 April 2013

post-intensification, we analyzed a consecutive series of *de novo* AML patients from CETLAM group trials using the standardized ELN method. At the same time, we investigated whether the mutational status of WT1 had some influence on WT1 levels or on the clinical outcome.

## PATIENTS AND METHODS

### Molecular methods

Available bone marrow samples at diagnosis (584 patients), post-induction (365 patients) and post-consolidation (287 patients) were obtained in each participating institution and sent to the CETLAM repository center at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona for complete immunophenotype and molecular analyses. Diagnostic samples from all patients were analyzed for mutations in the NPM1, FLT3, CEBPA, MLL and WT1 genes using well-established protocols.<sup>13,19</sup> Mononuclear cells were separated using Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) and lysed with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse transcribed to cDNA in a total reaction volume of 20  $\mu$ l containing Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM, 10  $\times$  Buffer, DTT 10 mM, dNTP's 10 mM each, random hexamers 15  $\mu$ M, RNAsin 20 units (Promega, Fitchburg, MA, USA) and 200 units of MMLV enzyme (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples were incubated for 10 min at 20 °C, 45 min at 42 °C and 3 min at 99 °C, followed by 10 min at 4 °C. WT1 expression levels were determined by real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in an ABI PRISM 7500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), using the primers and conditions described by the ELN group.<sup>12</sup> For WT1 copy-number titration, the Ipsongen (Marseilles, France) plasmid was used. Abl was used as control gene. Results were expressed as copies and four normal bone marrow samples were used as test controls.

### Treatment protocol

Patients were treated between 2004 and 2011 according to the CETLAM AML-03 protocol trial.<sup>19</sup> Informed consent was obtained from each patient. Adults up to 70 years of age received induction chemotherapy with idarubicin, intermediate-dose cytarabine and etoposide, followed by consolidation with mitoxantrone and intermediate-dose ara-C. Subsequently, patients with favorable cytogenetics at diagnosis received one cycle of high-dose cytarabine. Those with a normal karyotype and needing a single course to achieve complete remission (CR) were treated with autologous transplantation. G-CSF priming was used during induction and consolidation. Patients with favorable cytogenetics and high leukocyte counts at diagnosis were treated with autologous transplantation instead of high-dose cytarabine. A favorable genotype was defined as the presence of NPM1 or biallelic CEBPA mutations associated with no FLT3 mutations. Patients with a normal karyotype but an adverse molecular profile (FLT3 mutations or MLL rearrangements including partial tandem duplications assessed by long-distance PCR) were allocated to the treatment for unfavorable cases; this included allogeneic transplantation from an HLA-identical donor (related or unrelated) or autologous transplant after *in vivo* purging with 3 mg/m<sup>2</sup> IV of Mylotarg (Pfizer, New York, NY, USA). Of note, patients  $\geq$ 50 years old with an allogeneic donor received reduced-intensity conditioning with fludarabine and busulfan.

### Statistical methods

Overall survival (OS) was measured from the date of enrollment until the date of death. Leukemia-free survival (LFS) for patients who achieved a CR was calculated from the date of CR to that of relapse or death. OS and LFS were plotted by the Kaplan–Meier method; differences between curves were analyzed by the log-rank test. The probability of relapse was calculated using cumulative incidence estimates and taking into account the competing risk of death in remission. After exploratory univariate comparisons, multivariate analyses were performed, including the variables with *P*-value  $<$ 0.15. The regression models used were COX and Fine and Gray test.

The threshold values were established by selecting the most accurate values by a nonparametric receiver-operating characteristics analysis, taking into account the maximum ratio sensitivity-specificity. The end point for the threshold was death and relapse. This approach was applied following the REMARK guidelines.<sup>20</sup>

The statistical packages used were: the IBM SPSS Statistics (Release 19.0.0, IBM, Armonk, NY, USA); the open source integrated development

environment (IDE) GNU Emacs 23.4.1; the RStudio Version 0.94–110 (2009–2011, RStudio, Inc., Wein, Austria) and the Rversion 2.14.0 from the R Foundation for Statistical Computing.

## RESULTS

WT1 levels in *de novo* AML samples at diagnosis

A bone marrow RNA sample at diagnosis to perform WT1 quantitation was available in 584 *de novo* AML cases enrolled in the CETLAM protocol. The characteristics of this group were equivalent to the whole CETLAM series (Table 1). The WT1 RNA results were expressed as copies. The receiver-operating characteristics analysis revealed a 5065 cutoff value at diagnosis, which was statistically significant in terms of sensitivity and specificity. Using this value, cases with WT1 levels above 5065 copies had a significantly worse outcome in terms of OS, LFS and probability of relapse (OS:  $44 \pm 3$  vs  $36 \pm 3\%$ , *P* = 0.023; LFS:  $47 \pm 3$  vs  $36 \pm 4\%$ , *P* = 0.038 and CIR  $37 \pm 3$  vs  $47 \pm 4\%$ , *P* = 0.043; Figure 1). When investigating whether the adverse prognosis was linked to any clinical and/or biological variable, we found a statistically significant association between raised WT1 levels and marked leukocytosis. The median leukocyte count in cases with WT1 levels below 5065 was  $9.4 \times 10^6$  (0.23–400), whereas in those with more than 5065 WT1 copies, it was  $49.81 \times 10^6$  (0.7–325; *P*  $<$  0.001).

Normal bone marrow samples had a mean WT1 value of 200 copies. One hundred and six (18%) AML patients had WT1 levels below 200 copies at diagnosis. When these cases are excluded, the observed OS, LFS and CIR at diagnosis were similar to the whole series (Supplementary Figure 1). Based on these findings, we assumed that cases with the highest leukemic burden assessed by WT1 copy-number quantitation had more leukocytes and, accordingly, a bad prognosis.

### Post-induction WT1 levels

WT1 post-induction levels were obtained in 365 patients. The characteristics of these cases are detailed in Table 1.

As regards the post-induction results, three groups were established: Group 0 (134 patients) with WT1 levels between 0 and 17.5 copies, Group 1 (160 patients) with WT1 values ranging from 17.6 to 170.5 copies, and Group 2 (71 patients) with WT1 levels after induction greater than 170.5 copies. These groups showed statistically significant differences (*P*  $<$  0.001) in terms of OS: Group 0:  $59 \pm 4$  months, Group 1:  $48 \pm 5$  months and Group 2:  $23 \pm 6$  months. LFS was also statistically different: Group 0:  $59 \pm 4$ , Group 1:  $41 \pm 4$  and Group 2:  $19 \pm 7$  (all *P*  $<$  0.001). Lastly, CIR was markedly different between the three groups: Group 0:  $26 \pm 4$ , Group 1:  $45 \pm 4$ , and Group 2:  $68 \pm 8$  (*P*  $<$  0.001) (Figure 2). Twenty-six out of the 35 cases failing to achieve CR after induction were in the Group 2 (WT1  $>$  170.5 copies) (*P*  $<$  0.001).

Based on these results, we concluded that patients with WT1 post-induction levels greater than 170.5 corresponded to induction failures or patients with a very high risk of relapse. These results were even more evident when cases with WT1 levels below 200 copies at diagnosis were excluded from the analysis (Supplementary Figure 2).

### Post-intensification WT1 levels

Post-intensification WT1 levels were available from 287 patients. Table 1 shows the clinical and biological characteristics of this subgroup compared with the whole CETLAM series.

Receiver-operating characteristics studies performed on the available data identified three prognostically relevant groups: cases with WT1 levels greater than 100 copies (*n*: 47 patients, 16%), an intermediate group with WT1 levels between 10 and 100 copies (*n*: 148 patients, 52%), and a third group with WT1 levels of  $<$ 10 copies (*n*: 92 patients, 32%). Outcomes in these three

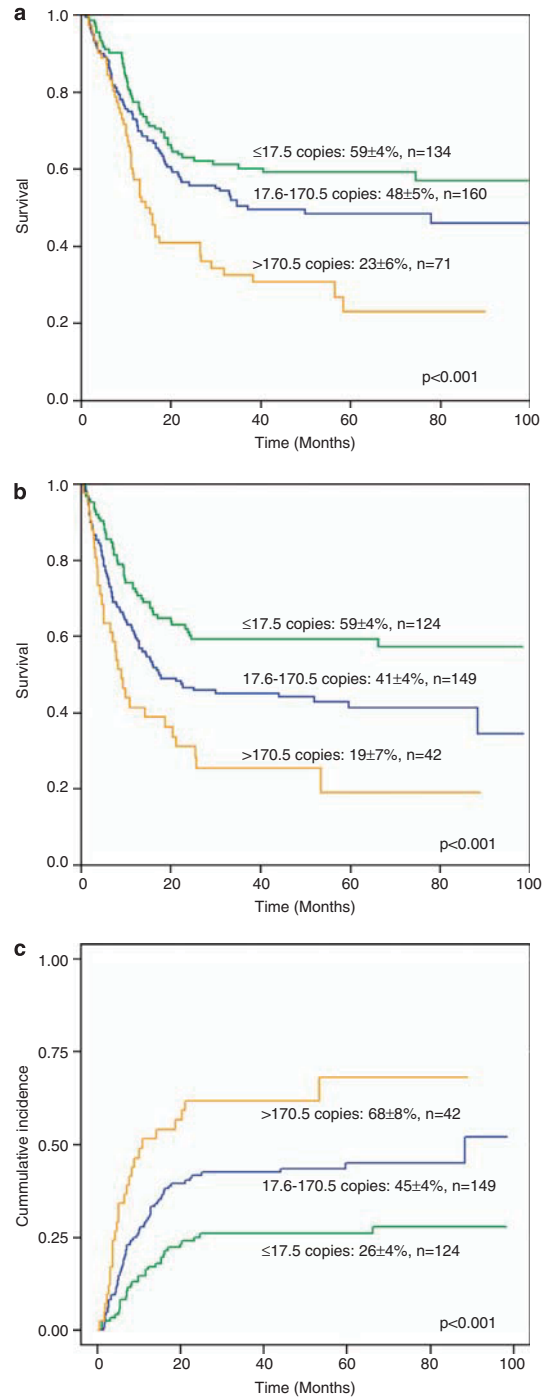
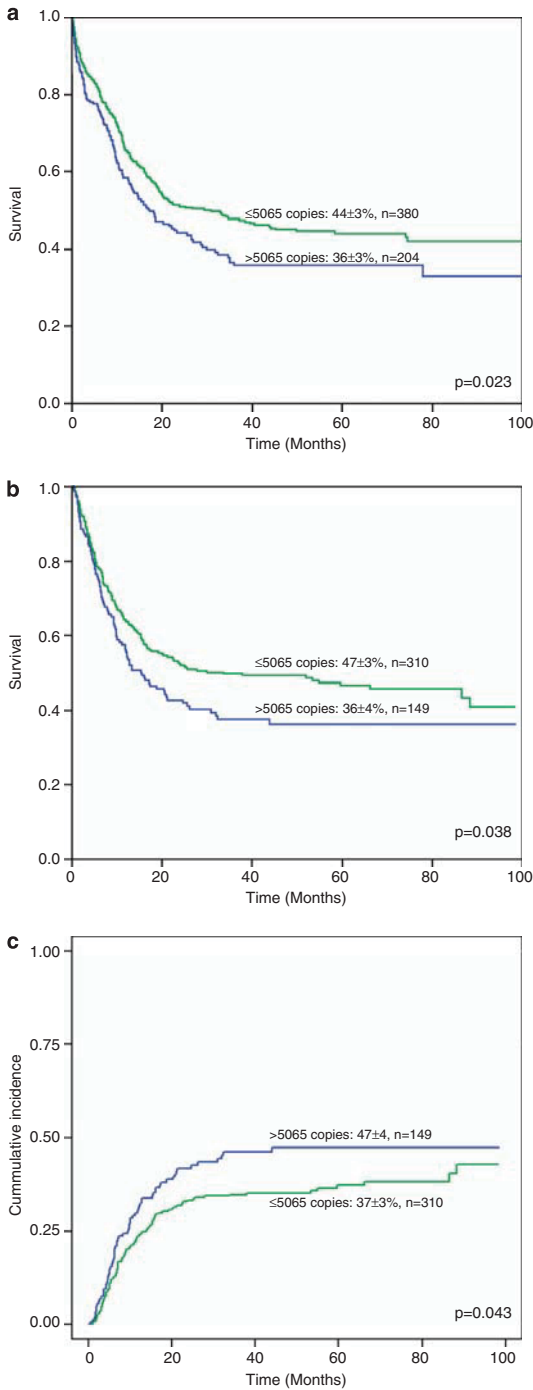
**Table 1.** Patients' characteristics: Whole series and cases analyzed at each time-point

	Whole series (n = 664)	WT1 diagnosis (n = 584)	WT1 post-induction (n = 365)	WT1 post-intensification (n = 287)
<i>Age, median (range, years)</i>	53 (16–70)	53 (16–70)	52 (17–70)	51 (17–70)
≤ 50	282 (42%)	250 (43%)	163 (45%)	141 (49%)
> 50	382 (58%)	334 (57%)	202 (55%)	146 (51%)
<i>Gender (%)</i>				
Male	366 (55%)	330 (56%)	202 (55%)	154 (54%)
Female	298 (45%)	254 (44%)	163 (45%)	133 (46%)
<i>WBC (<math>\times 10^9/l</math>)</i>				
Median (range)	13 (0.23–408)	12 (0.23–400)	12 (0.23–400)	15(0.23–300)
<i>FAB classification (%)</i>				
M0	45 (7%)	44 (8%)	24 (7%)	19 (7%)
M1	124 (19%)	107 (18%)	62 (17%)	54 (19%)
M2	142 (21%)	126 (22%)	93 (26%)	73 (26%)
M4	134 (20%)	113 (20%)	84 (23%)	55 (19%)
M4Eo	14 (2%)	13 (2%)	5 (1%)	5 (2%)
M5	124 (19%)	112 (19%)	54 (15%)	50 (17%)
M6	30 (5%)	25 (4%)	16 (4%)	10 (3%)
M7	7 (1%)	7 (1%)	4 (1%)	4 (1%)
AML + dysplasia	27 (4%)	22 (4%)	15 (4%)	10 (4%)
Not classified	14 (2%)	13 (2%)	6 (2%)	5 (2%)
<i>Cytogenetics (%)</i>	637/664 (96%)	563/584 (96%)	356/365 (97%)	283/287 (99%)
Normal	293 (46%)	255 (45%)	164 (46%)	132 (47%)
t(8;21)	40 (6%)	39 (7%)	30 (7%)	30 (8%)
inv(16)/t(16;16)	34 (5%)	31 (5%)	20 (6%)	20 (6%)
Complex karyotype	73 (11%)	60 (11%)	38 (11%)	38 (11%)
Trisomy 8	21 (4%)	20 (4%)	13 (4%)	13 (4%)
Other abnormalities	147 (23%)	134 (24%)	82 (23%)	61 (21%)
Absence of mitosis	29 (5%)	24 (4%)	10 (3%)	10(3%)
<i>FLT3 (%)</i>	624/664 (94%)	553/584 (95%)	343/365 (94%)	273/287 (95%)
Wild type	483 (77%)	442 (80%)	270 (79%)	221 (81%)
Internal tandem duplication	141 (23%)	111 (20%)	73 (21%)	52 (19%)
<i>MLL (%)</i>	660/664 (90%)	534/584 (91%)	338/365 (93%)	265/287 (92%)
Wild type	568 (95%)	506 (95%)	319 (94%)	248 (93%)
Rearranged	32 (5%)	28 (5%)	19 (6%)	17 (6%)
<i>NPM (%)</i>	504/664 (76%)	454/584 (78%)	292/365 (80%)	234/287 (81%)
Wild type	334(66%)	309 (68%)	204 (70%)	152 (65%)
Mutated	172 (34%)	145 (32%)	88 (30%)	82 (35%)
<i>CEBPA (%)</i>	532/664 (80%)	477/584 (82%)	298/365 (82%)	238/287 (83%)
Wild type	504 (95%)	453 (95%)	282 (95%)	227 (95%)
Biallelic mutation	28 (5%)	24 (5%)	16 (5%)	11 (5%)
<i>WT1</i>	420/664 (63%)	366/584 (63%)	230/365 (63%)	175/287 (61%)
Wild type	379 (90%)	331 (90%)	203 (88%)	159 (91%)
Mutated	41 (10%)	35 (10%)	27 (12%)	16 (9%)
<i>Genotype</i>	498/664 (75%)	442/584 (76%)	284/365 (78%)	228/287 (79)
Favorable	121 (24%)	106 (24%)	64 (22%)	58 (25%)
Unfavorable	377 (76%)	336 (76%)	220 (78%)	170 (75%)
<i>Outcome (%)</i>				
Complete remission	509 (77%)	461 (80%)	318 (88%)	287 (100%)
Refractoriness	68 (10%)	54 (9%)	35 (10%)	—
Death	82 (13%)	64 (11%)	10 (2%)	—
<i>OS (months) (median, range)</i>	17,3 (0,03–99,6)	17 (0,03–100)	22 (0,9–100)	33 (3,2–100)
<i>LFS (months) (median, range)</i>	16,7 (0,03–98)	17 (0,03–98)	18 (0,03–98)	23 (0,6–98)

groups showed statistically significant differences in terms of OS ( $72 \pm 5$ ,  $59 \pm 4$ ,  $30 \pm 7$ ,  $P < 0.001$ ), LFS ( $65 \pm 5$ ,  $46 \pm 4$ ,  $24 \pm 7$ ,  $P < 0.001$ ) and relapse probability (CIR  $25 \pm 5$ ,  $45 \pm 4$ ,  $72 \pm 7$ ,

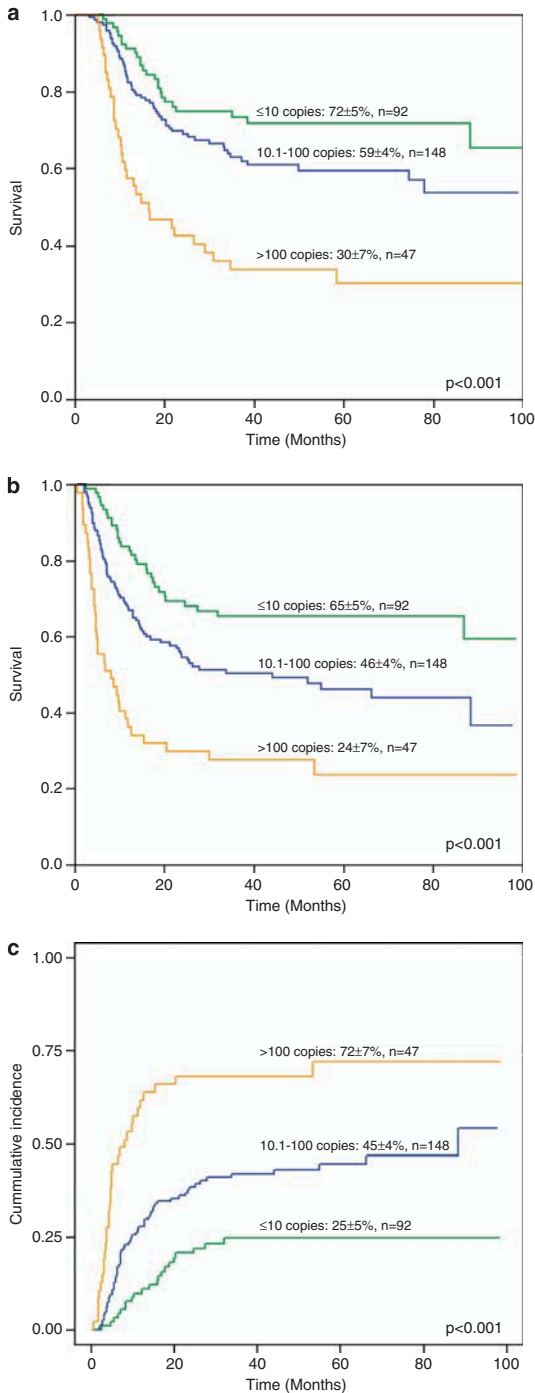
$P < 0.001$ ) (Figure 3). Cases with the lowest WT1 level had a very good prognosis, making WT1 reduction to values of  $< 10$  after intensification a good end-point target to assess the efficacy of





**Figure 1.** Prognostic impact of WT1 levels at diagnosis: a 5065 copies threshold identified two relevant groups. Survival analysis (OS) (a), LFS (b) and CIR (c) curves corresponding to high WT1 (blue) and low WT1 (green). Survival time in months (OS, LFS and CIR).

**Figure 2.** Prognostic impact of post-induction WT1 levels. Each group was identified based on WT1 copy number in post-induction bone marrow samples. Survival analysis (OS) (a), LFS (b) and CIR (c) curves corresponding to WT1 groups. Survival time in months (OS, LFS and CIR).



**Figure 3.** Prognostic impact of WT1 expression in post-intensification samples. Each group was identified based on WT1 copy number in post-intensification bone marrow samples. Survival analysis (OS) (a), LFS (b) and CIR (c) curves corresponding to WT1 groups. Survival time in months (OS, LFS and CIR).

chemotherapeutic regimens in *de novo* AML. Again, when the subgroup of patients with WT1 levels <200 copies at diagnosis was excluded from the analysis, differences between the groups in OS, LFS and CIR were more evident (Supplementary Figure 3).

Multivariate analysis revealed an independent prognostic value of post-induction and post-consolidation WT1 levels

Univariate analysis disclosed statistically significant association in terms of OS, LFS and CIR with age, cytogenetic classification according to the MRC criteria, absence of favorable genotype defined by FLT3 germ line + NPM or biallelic CEBPA mutation, WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification (Table 2). When multivariate analysis was performed, age, favorable genotype and WT1 levels post-intensification remained as independent prognostic factors in terms of LFS and CIR (Table 2). The entire database was randomly split into two groups and the currently employed thresholds, post-induction and post-intensification, retained its statistical significance in both groups. These results imply that age and a relatively simple genetic characterization (NPM, CEBPA mutations and post-intensification WT1 levels) could provide relevant prognostic stratification in AML trials<sup>21</sup> (Supplementary Tables 1, 2, 3 and 4).

#### WT1 expression in WT1-mutated AML

Mutations in exons 7 and 9 of WT1 were investigated in 420 samples with DNA available at diagnosis. We detected 41 cases with a WT1 mutation (10%). Cases with mutated WT1 had WT1 mean levels of 5732.71 copies compared with 9274.34 copies for cases with non-mutated WT1 ( $P = ns$ ). There were no statistically significant differences between cases with mutation and wild-type WT1 in terms of WT1 levels at diagnosis (fewer or more than 5065 copies) (Table 3). We did not find any prognostic impact in terms of OS, LFS or CIR based on WT1 mutations. WT1 mutations were significantly associated with age, FLT3-ITD and CEBPA mutations (Table 3).

#### DISCUSSION

In this manuscript we have shown that bone marrow WT1 levels provide prognostically relevant information at diagnosis, post-induction and post-intensification time-points in *de novo* AML cases. These results were obtained using a well-standardized protocol that takes advantage of commercially available plasmid reagents (Ipsogen).<sup>12</sup> Furthermore, the most favorable WT1 level after intensification (10 copies) was in the same range as those obtained using chimeric targets in core-binding factor AML.<sup>22</sup> This subgroup of patients with very low WT1 levels had an excellent outcome. This could make AML monitoring much easier and provide a common theoretical target of MRD for all AML cases enrolled in clinical protocols. Based on our findings, we hypothesize that normal WT1 values may not be the same in normal bone marrow as in bone marrow of patients with acute leukemia treated with chemotherapy or BMT.<sup>23,24</sup> In the latter cases, the physiologic levels may be lower than in non-treated normal bone marrow. This should be taken into consideration when analyzing AML cohorts, given that there are ~200 copies of WT1 in normal bone marrow. These values may be even higher in younger cases.<sup>13</sup> The main limitation of this study is therefore that our findings need to be confirmed in other series, specially with regard to the clinically relevant post-intensification thresholds in bone marrow or in peripheral blood. It should also be confirmed whether other standardized methods of WT1 quantitation are useful in clinical prediction and whether our findings can be reproduced in pediatric patients.

Current AML treatment includes induction chemotherapy and intensive consolidation. Depending on multiple genetic and biologic data at diagnosis, patients receive additional treatment,



**Table 2.** Univariate and multivariate analysis revealed the prognostic impact of post-intensification WT1 levels

Univariate	OS			LFS			CIR	
	n		P-value	n		P-value		P-value
<b>Age</b>								
≤50years	282	54 ± 3%	<0.001	229	56 ± 3%	<0.001	33 ± 3%	<0.001
>50years	382	28 ± 2%	—	278	32 ± 3%	—	48 ± 3%	—
<b>Gender</b>								
Male	366	36 ± 3%	0.049	275	39 ± 3%	0.023	43 ± 3%	0.239
Female	298	44 ± 3%	—	232	47 ± 3%	—	39 ± 3%	—
<b>Leukocyte count</b>								
≤50 × 10 <sup>9</sup> /l	490	40 ± 2%	0.126	389	42 ± 3%	0.787	40 ± 3%	0.337
>50 × 10 <sup>9</sup> /l	171	36 ± 4%	—	118	42 ± 5%	—	43 ± 4%	—
<b>MRC classification</b>								
Favorable	74	70 ± 5%	<0.001	67	68 ± 6%	<0.001	22 ± 5%	0.001
Intermediate	433	40 ± 2%	—	339	41 ± 3%	—	44 ± 3%	—
Adverse	100	16 ± 4	—	64	25 ± 6%	—	50 ± 6%	—
<b>Favorable genotype (FG)<sup>a</sup></b>								
FG	121	64 ± 4%	<0.001	109	61 ± 5%	<0.001	24 ± 4%	<0.001
Absence of FG	377	35 ± 3%	—	283	37 ± 3%	—	49 ± 3%	—
<b>WT1 at diagnosis</b>								
≤5065	380	43 ± 3%	0.023	310	46 ± 3%	0.038	37 ± 3%	0.037
>5065	204	36 ± 3%	—	149	36 ± 4%	—	47 ± 4%	—
<b>WT1 after induction CT</b>								
0-17.5	134	59 ± 4%	<0.001	124	59 ± 4%	<0.001	25 ± 4%	<0.001
17.6-170.5	160	48 ± 4%	—	149	41 ± 4%	—	46 ± 7%	—
>170.5	71	23 ± 6%	—	42	19 ± 7%	—	68 ± 8%	—
<b>WT1 after intensification CT</b>								
<10	92	72 ± 5%	<0.001	92	65 ± 5%	<0.001	25 ± 5%	<0.001
10-100	148	59 ± 5%	—	148	46 ± 4%	—	45 ± 4%	—
>100	47	30 ± 7%	—	47	24 ± 7%	—	72 ± 7%	—
<b>Multivariate</b>								
	—	OR (CI 95%)	—	—	OR (CI 95%)	—	OR (CI 95%)	—
>50 years vs ≤50 years	—	2.3 (1.3-3.9)	0.002	—	2 (1.3-3.2)	0.002	1.8 (1.1-2.8)	0.013
Absence of FG vs presence	—	4 (1.8-8.9)	0.001	—	2.4 (1.3-4.7)	0.008	2.6 (1.3-5)	0.004
High WT1 expression after intensification CT vs low	—	—	—	—	1.6 (1.1-2.3)	0.006	1.5 (1-2.1)	0.050

<sup>a</sup>CEBPAmut or NPMmut without FLT3-ITD.

ranging from allogeneic BMT to less-intensive chemotherapy. The goal of these treatments is to kill leukemic cells, specially those with stem-cell behavior. The probability of relapse in a given patient is directly proportional to the amount of MRD for each time-point analyzed. The need to detect small amounts of neoplastic cells and/or leukemic nucleic acids mixed in a non-neoplastic background has prompted the development of sensitive techniques to pinpoint leukemic remnants. The two most commonly used techniques are MPFC and RT-PCR based methods (real-time PCR).<sup>1,25</sup> The main advantages of MPFC are speed, high sensitivity and potential application to most AML cases. However, MPFC standardization has not been fully developed,<sup>26</sup> and it is highly dependent on an accurate antigenic characterization at diagnosis. MPFC also requires optimized acquisition protocols and some degree of expertise to analyze the results. In contrast, RQ-PCR methods are very sensitive, rapid and well standardized. However, they are dependent on a suitable target such as those provided by the chimeric gene fusions that are common in some types of leukemias. In this respect, WT1 levels are becoming a universal surrogate marker of leukemic persistence.

Using a competitive PCR, Bergmann *et al.*<sup>27</sup> showed an association of WT1 levels at diagnosis with age, FAB subtype, immunophenotype (CD34 and CD33 expression), karyotype, and long-term survival. In line with these findings, Barragan *et al.*<sup>28</sup> found an association between bone marrow WT1 levels at diagnosis and prognosis in adult AML patients. High GATA2 and WT1 levels at diagnosis have also been associated with an adverse outcome in pediatric AML.<sup>29</sup> These findings are in agreement with the report by Furuhashi *et al.*<sup>30</sup> who demonstrated that GATA1 and GATA2 binding to 3'enhancer regions of WT1 is essential for its transcription. Gaur *et al.*<sup>31</sup> analyzed WT1 levels in APL and found an association between polymorphisms at the SNP rs16754 and WT1 levels.<sup>31</sup> Shimada *et al.*<sup>32</sup> did not detect prognostic relevant correlations between WT1 levels at diagnosis in 158 pediatric AML cases. In contrast, these authors found an adverse prognostic impact of raised WT1 levels in 74 post-induction samples. Lapillone *et al.*<sup>33</sup> analyzed 92 pediatric AML patients at diagnosis and follow-up. WT1 at diagnosis was higher in favorable cytogenetics and lower in the M5-FAB subtype, 11q23 rearrangements and infant leukemias. They also found that

**Table 3.** Clinical and biologic characteristics of WT1 mutated and wild-type cases

	WT1 wild type	WT1 mutated	P-value
Age, years (median, range)	53 (17–71)	44 (17–68)	
Mean (Student's t-test)	50	45	0.015
≤50	165 (44%)	22 (54%)	0.215
>50	214 (56%)	19 (46%)	
WBC ( $\times 10^9/l$ , median (range))	15.3 (0.23–408)	16.4 (0.9–200)	
Mean (Student's t-test)	43.73	46.07	0.819
≤20 $\times 10^9/l$	208 (55%)	21 (51%)	0.642
>20 $\times 10^9/l$	170 (45%)	20 (49%)	
Gender			
Male	207 (55%)	24 (59%)	0.632
Female	172 (45%)	17 (20%)	
MRC			
Favorable	45 (13%)	3 (8%)	0.524
Intermediate	248 (73%)	30 (75%)	—
Adverse	47 (13%)	7 (17%)	—
FAB			
M0	25 (7%)	2 (5%)	0.565
M1	73 (19%)	12 (29%)	—
M2	73 (19%)	8 (19%)	—
M4	82 (22%)	4 (10%)	—
M4Eo	10 (3%)	1 (2%)	—
M5	76 (20%)	9 (23%)	—
M6	17 (4%)	4 (10%)	—
M7	1 (0.3%)	0	—
AML with displasia	14 (3.7%)	1 (2%)	—
Unknown	7 (2%)	0	—
Favorable genotype			
NPM1/CEBPA mut and FLT3-wt	76 (25%)	10 (28%)	0.692
FLT3-ITD or no mutations	231 (75%)	26 (72%)	—
CEBPA			
Wild type	334 (96%)	33 (85%)	0.001
Mutated	13 (4%)	6 (15%)	—
MLL			
Wild type	342 (94%)	38 (93%)	0.639
MLL-PTD	20 (6%)	3 (7%)	—
FLT3-ITD			
Wild type	293 (78%)	25 (62%)	0.032
FLT3-ITD	84 (22%)	15 (38%)	—
NPM1			
Wild type	195 (64%)	27 (71%)	0.373
Mutated	111 (36%)	11 (29%)	—
AML1-ETO			
Wild type	318 (93%)	39 (98%)	0.254
Rearranged	25 (7%)	1 (2%)	—
CBFB-MYH11			
Wild type	323 (94%)	38 (95%)	0.830
Rearranged	20 (6%)	2 (5%)	—
WT1 diagnosis median (range)	5662.05 (0–582 089)	4576 (2–26 829)	—
Mean (Student's t-test)	9274.34	5732.71	0.538
≤5065.2	214 (65%)	19 (54%)	0.225
>5065.2	117 (35%)	10 (46%)	—
WT1 post-induction median (range)	31 (0–68421)	21 (3–1125)	—
Mean (Student's t-test)	918.95	114.04	0.427
≤17.5	75 (37%)	11 (41%)	0.289
17.6–170.5	60 (30%)	9 (33%)	—
76.1–170.5	23 (11%)	5 (19%)	—
>170.5	45 (22%)	2 (7%)	—
WT1 post-intensification median (range)	19 (0.01–6444)	23.5 (0.01–960)	—
Mean (Student's t-test)	122.57	85.81	0.795
≤10	54 (34%)	5 (31%)	0.548
10.1–100	81 (51%)	10 (63%)	—
>100	24 (15%)	1 (6%)	—
Allogeneic PBST			
No	113 (51%)	11 (34%)	0.084
Yes	110 (49%)	21 (66%)	—
Overall survival	38 ± 3% (n = 379)	30 ± 7% (n = 41)	0.675
Disease-free survival	44 ± 3% (n = 279)	40 ± 9% (n = 32)	0.735
Cumulative incident of relapse	40 ± 3% (n = 279)	44 ± 9% (n = 32)	0.592

raised post-induction WT1 levels had an adverse prognostic impact. Based on our results, the adverse prognostic impact of raised WT1 levels at diagnosis may be attributed to an association with higher leukocyte counts. Using a competitive RT-PCR with Abl as control gene, Garg *et al.*<sup>34</sup> found a link between increased post-induction in bone marrow and peripheral blood WT1 levels and outcome. Cilloni *et al.*<sup>18</sup> reported findings similar to ours. When these authors analyzed the peripheral blood of post-induction AML samples, those cases with >20 copies relapsed. However, these authors pointed out that approximately half of the patients who reached normal WT1 levels relapsed, suggesting that the post-induction thresholds, also in peripheral blood, should be refined. These findings are in line with our results. We were able to establish prognostic subgroups even in cases with WT1 levels considered normal until now. Pozzi *et al.*<sup>17</sup> analyzed the prognostic value of bone marrow WT1 levels using the ELN protocol in the bone marrow transplantation setting. They found that patients with WT1 levels exceeding 100 copies had higher probabilities of relapse than those with levels below this value. They also took clinical decisions (donor lymphocyte infusions or immunosuppression discontinuation) when the patients reached 180 copies. However, using this threshold the probability of leukemia relapse did not decrease, suggesting that the clinically relevant threshold should be much lower. Rossi *et al.*<sup>35</sup> performed MRD studies using both flow cytometry and WT1 quantitation in a small series of AML patients. These authors found that WT1 levels greater than 90 copies were associated with a poor prognosis. However, all the available information on the prognostic value of WT1 quantitation in AML was obtained from small cohorts of patients or by using a non-standardized method.

The ELN is not the only standardization initiative. Recently, Willasch *et al.*<sup>36</sup> reported another standardized WT1 assay. Using this method, these authors showed that pediatric AML with WT1 mutations had significantly higher WT1 levels than non-mutated cases. We were unable to find this association in our adult AML cases.

In this work, we found a 10% frequency of WT1 mutations and these cases did not have an adverse outcome. This may be explained by the counterbalanced effects of FLT3-ITD and CEBPA mutations which were significantly associated with WT1 mutations. Other groups have reported that WT1 mutations were associated with FLT3 mutations and a poor prognosis, linked to a failure to achieve CR.<sup>9,10</sup> Somatic WT1 mutations are typically located in exons 7 and 9 (zinc-finger regions). Frameshift mutations in exon 7 result in a truncation of the WT1 protein, excluding the four zinc-finger domains, and cause a loss in the DNA-binding capacity. Furthermore, WT1-mutated cases did not show different WT1 levels compared with those cases without WT1 mutation.

In conclusion, raised post-induction and post-intensification WT1 levels are powerful stratification markers in adult *de novo* AML patients. We were able to identify induction failures based on bone marrow WT1 levels (>170.5 copies). Patients with very low WT1 levels post-intensification (<10 copies) had an excellent outcome, specially if they had also a favorable genotype. Bone marrow WT1 quantitation using the ELN method is a useful MRD tool that can be easily applied to all AML cases.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the following grants: Fundación Mutua Madrileña to JN 08/FMMA, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI 10/0173 and ISCIII PI052312, PI 080672, RD06/0020/0101 and EC07/90065, 2009-SGR-168 from Pla de Recerca de

Catalunya, Marató de TV3 (100830/31/32) and a grant from Fundació Cellex, Spain. We are grateful to the CETLAM participating hospitals and to all the European Leukemia Net members (Workpackage 12, MRD).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JN designed the study, analyzed the data and wrote the paper. MH analyzed the data and wrote the manuscript. MC, EB, CE, JE, MT, RD, OS, MPQLL, AG, JB, IH, JMMT, ALI, JMR, DG, AA and SB analyzed the data. JS designed the study and wrote the paper.

## REFERENCES

- 1 Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F *et al*. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; **119**: 332–341.
- 2 Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F *et al*. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 2002; **16**: 2115–2121.
- 3 Cilloni D, Gottardi E, Messa F, Fava M, Scaravaglio P, Bertini M *et al*. Significant correlation between the degree of WT1 expression and the International Prognostic Scoring System Score in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 1988–1995.
- 4 Cilloni D, Messa F, Martinelli G, Gottardi E, Arruga F, Defilippi I *et al*. WT1 transcript amount discriminates secondary or reactive eosinophilia from idiopathic hyper-eosinophilic syndrome or chronic eosinophilic leukemia. *Leukemia* 2007; **21**: 1442–1450.
- 5 Chau YY, Hastie ND. The role of Wt1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet* 2012; **28**: 515–524.
- 6 Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Yanagihara M, Tsuboi A, Kawakami M *et al*. The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia* 2007; **21**: 1783–1791.
- 7 Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: (Spec No 2) R196–R201.
- 8 Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 111–121.
- 9 Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P. The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematol Oncol* 2010; **28**: 13–19.
- 10 Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J *et al*. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 5429–5435.
- 11 Cilloni D, Gottardi E, Fava M, Messa F, Carturan S, Busca A *et al*. Usefulness of quantitative assessment of the WT1 gene transcript as a marker for minimal residual disease detection. *Blood* 2003; **102**: 773–774 (author reply 774).
- 12 Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV *et al*. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5195–5201.
- 13 Lasa A, Carricondo M, Estivill C, Bussaglia E, Gich I, Brunet S *et al*. WT1 monitoring in core binding factor AML: comparison with specific chimeric products. *Leuk Res* 2009; **33**: 1643–1649.
- 14 Ommen HB, Nyvold CG, Braendstrup K, Andersen BL, Ommen IB, Hasle H *et al*. Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. *Br J Haematol* 2008; **141**: 782–791.
- 15 Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004; **125**: 590–600.
- 16 Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T *et al*. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 1416–1423.

- 17 Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, Luchetti S, Grasso R, Colombo N *et al*. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol* 2013; **160**: 503–509.
- 18 Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Gottardi E, Fava M *et al*. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica* 2008; **93**: 921–924.
- 19 Nomdedeu J, Bussaglia E, Villamor N, Martinez C, Esteve J, Tormo M *et al*. Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: prognostic impact of the leukemic compartment size. *Leuk Res* 2010; **35**: 163–168.
- 20 Mallett S, Timmer A, Sauerbrei W, Altman DG. Reporting of prognostic studies of tumour markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines. *Br J Cancer* 2009; **102**: 173–180.
- 21 Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F *et al*. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood* 2012; **120**: 2963–2972.
- 22 Perea G, Lasa A, Aventin A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano MP *et al*. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia* 2006; **20**: 87–94.
- 23 Ogawa H, Tamaki H. The background level of WT1 expression following allogeneic stem cell transplantation is significantly decreased. *Blood* 2003; **102**: 774.
- 24 Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A *et al*. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003; **101**: 1698–1704.
- 25 Maurillo L, Buccisano F, Del Principe MI, Del Poeta G, Spagnoli A, Panetta P *et al*. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 4944–4951.
- 26 van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J *et al*. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012; **26**: 1908–1975.
- 27 Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E *et al*. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997; **90**: 1217–1225.
- 28 Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martín G, Fernández P *et al*. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with *de novo* acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; **89**: 926–933.
- 29 Luesink M, Hollink IH, van der Velden VH, Knops RH, Boezeman JB, de Haas V *et al*. High GATA2 expression is a poor prognostic marker in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; **120**: 2064–2075.
- 30 Furuhashi A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Sobue S *et al*. GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines. *Leukemia* 2009; **23**: 1270–1277.
- 31 Gaur GC, Ramadan SM, Cicconi L, Noguera NI, Luna I, Such E *et al*. Analysis of mutational status, SNP rs16754, and expression levels of Wilms tumor 1 (WT1) gene in acute promyelocytic leukemia. *Ann Hematol* 2012; **91**: 1855–1860.
- 32 Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R *et al*. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 2012; **96**: 469–476.
- 33 Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C *et al*. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 1507–1515.
- 34 Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **123**: 49–59.
- 35 Rossi G, Minervini MM, Carella AM, de Waure C, di Nardo F, Melillo L *et al*. Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leuk Res* 2011; **36**: 401–406.
- 36 Willasch AM, Gruhn B, Coliva T, Kalinova M, Schneider G, Kreyenberg H *et al*. Standardization of WT1 mRNA quantification for minimal residual disease monitoring in childhood AML and implications of WT1 gene mutations: a European multicenter study. *Leukemia* 2009; **23**: 1472–1479.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

# Discusión

---



## 1- Trabajo sobre el impacto de las mutaciones IDH1 e IDH2 en LMA “de novo”.

Los pacientes con LMA de "novo" y cariotipo normal son un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas con diferente evolución clínica y pronóstico. La supervivencia es sólo del 50% en este grupo y es importante encontrar marcadores moleculares que nos ayuden a estratificar mejor estas LMA en grupos de riesgo. En los últimos años y gracias a la disponibilidad de las plataformas de secuenciación masiva, se han podido identificar mutaciones en *IDH1* e *IDH2*. [115]

En trabajos previos se ha encontrado que las mutaciones en *IDH1* e *IDH2* se presentan con una frecuencia del 30% de los pacientes con LMA y se asocian a peor pronóstico, especialmente en pacientes con *NPM1* mutado y *FLT3*wt. En nuestro estudio multicéntrico las mutaciones en *IDH* representaban el 22,5% de los pacientes con cariotipo normal. En la misma línea, en nuestra serie de pacientes de cariotipo normal tratados según el protocolo LMA-03, las mutaciones en *IDH* también se asociaron a un pronóstico adverso, sobre todo en aquellos pacientes que tenían un genotipo favorable, definido por la presencia de mutaciones en *NPM1* o *CEBPA* en ausencia de *FLT3-ITD*.

En un trabajo reciente de Patel, *et al*, [74] las mutaciones en *IDH* confieren buen pronóstico en los pacientes que presentan *NPM1* mutado y *FLT3-ITD*.

De todas formas estos hallazgos necesitarían de estudios más amplios antes de trasladarlos a la práctica clínica. En el protocolo CETLAM más reciente LMA-12 se estratifica el cariotipo normal según la presencia de mutaciones *NPM*, *CEBPA*, *FLT3* y *MLL*. Probablemente en el futuro las mutaciones *DNMT3A*, *RUNX1*, *IDH1*, *IDH2* y *ASXL1*

podrían contribuir a refinar la clasificación molecular de este amplio grupo de pacientes.

Se ha postulado que las mutaciones en *IDH*, conferirían a las células madre leucémicas capacidad de quimiorresistencia, por lo tanto estas células serían menos sensibles al tratamiento con quimioterapia y responsables de las recaídas. En nuestro estudio, la mayoría de pacientes con mutaciones en *IDH* fallecieron tras el tratamiento de inducción y por causas diferentes a la recaída. Cuatro pacientes con genotipo favorable desarrollaron un shock séptico que les condujo a la muerte y solamente en un caso la causa de la muerte se debió a la progresión de la enfermedad.

La agresividad y la capacidad transformante de las mutaciones podrían variar entre las distintas mutaciones de *IDH1* e *IDH2*. Los resultados en pirosecuenciación, sugerirían que la ratio alélica de cada mutante podría ser diferente y comportarse como mutaciones dominantes. En este sentido, estudios “in vitro” sugieren que la mutación R172 del gen *IDH2* es capaz de generar mayor cantidad del oncometabolito 2-Hidroxyglutarato. En esta línea se ha sugerido que las mutaciones en R172 tendrían un comportamiento más agresivo, basándonos en que los pacientes que presentaban esta mutación tenían una carga alélica menor. Algunos autores sugieren que el efecto adverso de las mutaciones en *IDH2* sería causado solamente por la agresividad de los niveles de H-hidroxiglutarato y la capacidad de inhibir los enzimas que participan en el ciclo de la 5-hidroximetilcitosina (*TET2*).

La asociación de las mutaciones de *IDH1* e *IDH2* con otros factores pronóstico es controvertido. En el estudio de Marcucci *et al*, más de la mitad de los pacientes que presentaban mutaciones en *IDH1* o *IDH2* tenían más de 60 años [111]. Oki *et al* vieron que las mutaciones en

*IDH* eran muy poco frecuentes en niños [116]. Según estos resultados, se postula que las mutaciones en *IDH* serían más frecuentes en pacientes de avanzada edad y con historias mutacionales más prolongadas.

En un análisis de Green *et al* en una serie de pacientes jóvenes se observó que las mutaciones en *IDH1* se asociaban a mutaciones en el gen *FLT3* [117]. Otros autores, como Abbas *et al*, demostraron que en pacientes con cariotipo normal, las mutaciones en *IDH1* estaban relacionadas con mutaciones en *JAK2* [118].

Por otra parte, en dos publicaciones de Chou *et al* en pacientes con LMA en China, las mutaciones en *IDH1* se asociaron a citogenética normal, y la mutación permaneció estable tras la recaída, incluso las mutaciones en *IDH2* [95, 119]. Este grupo, no observó un efecto pronóstico de las mutaciones en *IDH*. Estos autores también encontraron que las mutaciones de *IDH2* raramente se asociaban a mutaciones en el gen *WT1*. Estos datos coinciden con nuestros hallazgos.

Se ha visto que las mutaciones en *IDH* son autoexcluyentes con las mutaciones de *TET2* en LMA, ambas caracterizadas por la hipermetilación del DNA. En nuestra serie, el 6,3% de los pacientes sin mutaciones en *IDH* presentaban mutaciones en *TET2*, tal como se ha descrito en la literatura. Por el contrario, nosotros no hemos observado un impacto pronóstico adverso en estos pacientes, aunque sí hemos visto que las mutaciones en *TET2* se asociaban a pacientes de avanzada edad.

Por lo tanto, nuestros datos sugieren que las mutaciones en *IDH* ayudarían a identificar dos grupos pronóstico en los pacientes de genotipo favorable y cariotipo normal, identificando así un grupo de



pacientes que se podrían beneficiar de terapias más agresivas o dirigidas (tratamientos de base epigenética).

## **2-Análisis de las leucemias CBF. Impacto pronóstico de la edad, leucocitosis, enfermedad residual mínima y sobre-expresión de BAALC y MN1.**

Las leucemias mieloides agudas con lesiones en el complejo core binding factor se caracterizan por tener buen pronóstico con los tratamientos habituales. Estos pacientes presentan los reordenamientos *RUNX1-RUNX1T1* causado por el t(8;21)(q22;q22) y *CBFB-MYH11* originado por la inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22). A pesar de tener una probabilidad de supervivencia del 60% y una tasa de remisiones completas entre el 80% y el 90%, el 30% de estos pacientes recaen y mueren debido a la enfermedad.

En este trabajo se han analizado de forma retrospectiva los resultados de dos protocolos del grupo CETLAM, el protocolo LMA-99 y LMA-03 (explicados anteriormente).

Dada la diversa evolución de los pacientes con leucemias CBF, se pretendió determinar los factores pronóstico que influían en la evolución de estos pacientes.

Como ya era conocido, en nuestra serie se observó una elevada tasa de RC (90%).

Pudimos identificar que la edad también era un factor pronóstico muy importante. Los pacientes de edad avanzada tenían una probabilidad de supervivencia del 55% mientras que en los jóvenes era del 70%. Aun así, la probabilidad de supervivencia de los pacientes de edad avanzada era mayor que en otros subtipos de LMA.

En nuestra serie, los pacientes mayores de 50 años tuvieron una probabilidad muy baja de alcanzar la RC, debido a la tasa de muerte en inducción. Además estos pacientes también presentaron una peor supervivencia.

Otro factor pronóstico descrito en varios subtipos de LMA es la cifra de leucocitos al diagnóstico. Martin *et al* y Nguyen *et al* describieron que la hiperleucocitosis al diagnóstico en pacientes con leucemia *CBF* era un factor pronóstico adverso [37, 46]. En nuestra serie, también se observó este efecto negativo y en línea con Nguyen *et al* se utilizó el valor umbral de  $20 \times 10^9/L$ .

En nuestro estudio, aquellos pacientes con más de  $20 \times 10^9/L$  que entraron en el protocolo LMA-03, tenían como estrategia terapéutica el auto-trasplante. No se pudo determinar si el trasplante autólogo rescató aquellos pacientes que tenían una mayor probabilidad de recaída. Al igual que en el trabajo de Schnittger *et al* y Giao *et al* pudimos demostrar que las mutaciones en *C-KIT* conferían un pronóstico adverso en los pacientes con *RUNX1-RUNX1T1* pero no en aquellos que presentaban un reordenamiento *CBFB-MYH11* [120, 121]. Por lo tanto, parece razonable sugerir que los pacientes con reordenamiento *RUNX1-RUNX1T1* y mutaciones en *C-KIT* podrían ser candidatos a un tratamiento de consolidación más intenso o bien plantear el uso de inhibidores de la tirosin-kinasa.

También se ha estudiado la expresión de genes con valor pronóstico en pacientes con LMA y cariotipo normal, como *BAALC* y *MN1*.

La elevada expresión de *BAALC* confería peor pronóstico en los pacientes con leucemia *CBF*.

Los pacientes con *CBFB-MYH11* presentaban una expresión aumentada del gen *MN1* en relación con los pacientes con *RUNX1-RUNX1T1*. Este hallazgo ya fue descrito por Carella *et al* [101].

Los pacientes con elevada expresión de *MN1* tenían un peor pronóstico y una elevada tasa de recaída. Una vez más, los niveles de *MN1*, la edad y la cifra de leucocitos, podrían ser utilizados para identificar aquellos pacientes con un peor pronóstico.

Al analizar la enfermedad residual mínima en estos pacientes, observamos que aquellos que tenían un elevado número de copias tras la inducción, presentaban una elevada probabilidad de recaída.

Por lo tanto, podríamos concluir que la edad, la cifra de leucocitos, los niveles de *BAALC* y *MN1* junto con el estudio de la ERM son factores pronóstico en el grupo de las leucemias *CBF*.

Además, la edad y la cifra de leucocitos fueron útiles para estratificar los pacientes en grupos de riesgo. Aquellos pacientes sin ninguno de los dos factores de riesgo tuvieron una supervivencia global del 80%, en los pacientes con un factor fue del 61% y en los pacientes con dos factores del 36%. La expresión del gen *MN1* sería, por lo tanto, de utilidad para identificar dos grupos pronóstico entre aquellos pacientes que con uno o ninguno de los factores de riesgo anteriores (edad y leucocitos).

Las opciones terapéuticas actuales serían adecuadas para el tratamiento los pacientes jóvenes, con cifras de leucocitos bajas y una baja expresión del gen *MN1*. En los pacientes con tres factores pronóstico adverso (edad avanzada, hiperleucocitosis y elevada expresión *MN1*) sería razonable el estudio de nuevas aproximaciones terapéuticas para mejorar su resultado.



### **3- Análisis de los niveles de WT1 al diagnóstico, post inducción y post intensificación en la LMA de novo.**

Los pacientes diagnosticados de LMA en hospitales del CETLAM reciben al diagnóstico quimioterapia de inducción seguida de un ciclo de quimioterapia de consolidación. Al acabar el tratamiento de consolidación de adoptan diferentes estrategias terapéuticas según criterios biológicos, citogenéticos, moleculares y de respuesta al tratamiento. Los pacientes reciben un tratamiento adaptado al riesgo que va desde el trasplante alogénico hasta un tercer ciclo de quimioterapia. El objetivo del tratamiento es erradicar las células leucémicas, en especial las células madre leucémicas con capacidad de repoblar la médula ósea e inducir la recaída. El seguimiento de la enfermedad residual mínima nos permitiría predecir la recaída. Habitualmente se han utilizado dos técnicas para el análisis de la ERM, la citometría de flujo y la RT-PCR. La citometría de flujo se puede emplear en todos los pacientes, es una técnica rápida y muy sensible, pero se necesita de personal experto para la caracterización de fenotipos aberrantes, y es complicado estandarizar la técnica. Las técnicas de RT-PCR son muy sensibles, rápidas y muy fácilmente se pueden replicar en otros laboratorios, pero dependen de la existencia de genes de fusión para realizar un seguimiento a lo largo de la enfermedad. Solamente un porcentaje de LMA presenta anomalías moleculares susceptibles de ser estudiadas mediante técnicas moleculares estandarizadas.

La expresión del gen *WT1* se ha utilizado como marcador para el seguimiento de la ERM, ya que aproximadamente el 80% de los pacientes con LMA sobre-expresan *WT1* al diagnóstico.

En este trabajo se estudió la expresión de *WT1* al diagnóstico, tras la primera inducción y tras la intensificación, de forma retrospectiva en pacientes tratados según el protocolo LMA-03. Para el estudio de la expresión de *WT1* se utilizó un protocolo normalizado que utiliza como referencia diluciones conocidas de un plásmido de *WT1* comercial (Ipsogen). La utilización de estos plásmidos permite que los resultados sean reproducibles.

Tras el tratamiento, los niveles basales de expresión de *WT1* eran inferiores a los de la población sana, siendo alrededor de 200 copias de *WT1* el valor basal de la población sana. En esta línea, se postula que los valores basales de *WT1* en MO de personas sanas no serían iguales a los valores de los pacientes con LMA y tratados con quimioterapia o trasplante. Gang *et al*, vieron que un incremento de la expresión de *WT1* post-inducción tanto en sangre periférica como en médula ósea, tenía impacto pronóstico en la supervivencia global [122]. Cilloni *et al*, también obtuvieron resultados similares a los nuestros. Establecieron que menos de 20 copias tras la inducción en sangre periférica, aumentaba la probabilidad de recaída [123]. Pero tanto en los estudios de Gang *et al* como de Cilloni *et al*, aproximadamente el 50% de los pacientes con niveles normales de *WT1* tras la inducción recaían, por lo tanto, el umbral de >20 copias debía ser revisado.

Nuestro grupo estableció diferentes grupos pronóstico incluso en aquellos pacientes con niveles de expresión de *WT1* que se consideraban normales.

Pozzi *et al*, analizaron un grupo de pacientes con LMA sometidos a trasplante de médula ósea y establecieron que aquellos pacientes con mas de 100 copias tras el trasplante tenían una mayor probabilidad de recaída [124]. Además, este grupo tomó decisiones terapéuticas en

función de los niveles de *WT1* al administrar linfocitos de donante y/o retirar la inmunosupresión cuando los pacientes sobrepasaban la cifra de 180 copias. Sin embargo, tanto con el umbral de 100 copias como en el de 180, la probabilidad de recaída no disminuía. Estos datos sugieren que el umbral empleado era demasiado elevado. En la misma línea, Rossi *et al* establecieron que aquellos pacientes con LMA y mas de 90 copias de *WT1* tenían peor pronóstico [125].

Se han postulado muchas asociaciones de la expresión del *WT1* con características clínicas y biológicas.

Bergmann *et al*, asociaron la expresión de *WT1* con la edad, la clasificación de la FAB, el inmunofenotipo, el cariotipo y la probabilidad de supervivencia [126]. Barragán *et al*, observaron que la expresión de *WT1* al diagnóstico tenía valor pronóstico [127].

Luesink *et al*, establecieron que aquellos pacientes pediátricos con una elevada expresión de *GATA2* y *WT1* al diagnóstico, tenían un pronóstico adverso [128]. Además, Furuhashi *et al*, observó que *GATA1* y *GATA2* se unían a la región 3' del gen *WT1*. Esta unión determinaba una activación de la transcripción de *WT1*[129].

Shimada *et al*, en un análisis en pacientes pediátricos observaron que la expresión de *WT1* al diagnóstico no tenía valor pronóstico, pero sí que vieron una asociación con los valores de expresión de *WT1* post-inducción [130]. En línea con estos resultados, Lapilloni *et al* observaron que en pacientes pediátricos la expresión de *WT1* post inducción tenía efecto pronóstico adverso, además, vieron que los pacientes con citogenética de buen pronóstico tenían una elevada expresión de *WT1*, y que pacientes del grupo M5 de la FAB o con anomalías en 11q23 tenían una baja expresión de *WT1* [131].

Según nuestra experiencia, los pacientes con niveles elevados de *WT1* al diagnóstico presentaron un peor pronóstico. Así pues, el análisis de



expresión de *WT1* tras la inducción y tras la intensificación parece ser un potente marcador para estratificar los pacientes en grupos pronóstico. Podríamos identificar aquellos pacientes que no responderían a la quimioterapia de inducción basándonos en los niveles de *WT1* (>170.5 copias en nuestra serie). Por el contrario, aquellos pacientes con niveles de *WT1* muy bajos tras la intensificación (<10copias) tendrían un pronóstico muy favorable especialmente en presencia de genotipo favorable (*NPM1*mutado o *CEBPA*mutado y *FLT3*wt). Por lo tanto, la cuantificación de *WT1* según el protocolo de ELN sería una herramienta muy potente para la determinación de la ERM.

A parte de la expresión de *WT1*, este gen presenta mutaciones somáticas puntuales, localizadas en el exón 7 y el exón 9. En nuestra serie, el 10% de los pacientes presentaron mutaciones en *WT1* y no encontramos asociación con los niveles de expresión. Las mutaciones en *WT1* no mostraron impacto pronóstico, lo que podría ser debido al hecho de que se asociaban con mutaciones de *FLT3* y *CEBPA*. Otros autores también describen una relación entre las mutaciones de *FLT3* y *WT1* y estos pacientes tendrían un peor pronóstico y una baja tasa de RC.

# Conclusiones

---



Sobre la frecuencia e impacto pronóstico de las mutaciones de *IDH*, *TET2* y *WT1* en el conjunto de LMA:

1. Las mutaciones en *IDH1* e *IDH2* se presentan en un 22,5 % de los pacientes con LMA “de novo”.
2. Ambas mutaciones confieren mal pronóstico en pacientes con cariotipo normal, especialmente en aquéllos con marcadores moleculares favorables (*NPM1* o *CEBPA* mutados en ausencia de la *FLT3-ITD*).
3. En nuestra serie, el 6,3% de pacientes presentó mutaciones en *TET2*. No se ha observado una relación entre las mutaciones de *TET2* y el pronóstico.
4. El 10% de los pacientes analizados presentó mutaciones en *WT1*. No se observó relación con el pronóstico.

Sobre los factores pronósticos moleculares en las leucemias CBF:

5. En las leucemias *CBF*, la edad avanzada conjuntamente con un elevado recuento leucocitaria permiten diferenciar un subgrupo de pacientes de muy mal pronóstico.
6. Los pacientes con *CBFB-MYH11* presentan una elevada expresión de *MN1*.
7. La sobre-expresión de *BAALC* y *MN1* al diagnóstico conjuntamente con un elevado número de copias tras la inducción en pacientes de citogenética favorable ayudan a identificar un grupo con pronóstico adverso.

Sobre el valor predictivo de la cuantificación de la expresión de *WT1*:

8. La determinación de los niveles de RNAm de *WT1* al diagnóstico, tras la inducción, y tras la consolidación tiene impacto en el pronóstico de la leucemia.
9. La determinación tras la intensificación se identificó como factor pronóstico independiente.
10. La determinación de los niveles de RNAm de *WT1* sería una buena herramienta para el estudio de la ERM en todos los casos de LMA.

# Índice

---



Agradecimientos .....	I
Motivación .....	V
Contenido .....	IX
Figuras y tablas.....	XIII
Abreviaturas .....	XVII
Introducción general .....	29
1- Hematopoyesis .....	31
1.1-Definición.....	31
1.1.1- Generación de los linajes hematopoyéticos .....	31
2- Leucemia mieloide aguda (LMA) .....	33
2.1 –Descripción .....	33
2.2 –Etiología .....	33
2.3- Proceso de leucemogénesis .....	35
2.3.1-Transformación leucémica.....	35
2.3.2-Hipótesis "two-hits" .....	36
2.4- Síntomas de la LMA .....	38
2.5- Diagnóstico.....	38
2.6-Clasificación de las LMA .....	39
3-Tratamiento de la LMA.....	47
3.1- Grupo CETLAM.....	47
3.2- Protocolos CETLAM.....	47
4-Factores Pronóstico para la LMA.....	53
4.1-LMA secundaria.....	53
4.2-Edad .....	53
4.3-Comorbilidades .....	54
4.4-Recuento leucocitario.....	57
4.5-Enfermedad residual mínima o medible (ERM).....	57
4.6-Citogenética .....	59
4.7-Alteraciones moleculares.....	61
4.7.1-Core Binding factor.....	62
4.7.2-Mutaciones en <i>RUNX1</i> .....	65
4.7.3-Mutaciones <i>C-KIT</i> .....	66
4.7.4-Mutaciones <i>FLT3</i> .....	67
4.7.5-Mutaciones <i>NPM</i> .....	69
4.7.6-Mutaciones de CEBPA.....	71
4.7.7-Alteraciones gen <i>MLL</i> .....	72
4.7.8-Mutaciones de <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> .....	74
4.7.9-Mutaciones en <i>TET2</i> .....	75
4.7.10-Alteraciones en <i>NOTCH</i> .....	77
4.7.11-Mutaciones en <i>DNMT3A</i> .....	78
4.7.12-Mutaciones en el gen <i>RAS</i> .....	79
4.7.13-Alteraciones en <i>WT1</i> .....	80
4.7.14- Alteraciones en <i>ASXL1</i> .....	81
4.8- Expresión aberrante .....	82
Existen una serie de genes que su expresión aberrante (sobre o infra- expresión) con valor pronóstico en LMA .....	82
4.8.1-Expresión de <i>BAALC</i> .....	82
4.8.2-Expresión de <i>MN1</i> .....	83
4.8.3-Expresión de <i>ERG</i> .....	85
4.8.4-Expresión de <i>EV11</i> .....	85
4.9- Estado actual .....	86
5. Presentación publicaciones.....	89



---

Informe de los .....	93
directores de tesis .....	93
Objetivos.....	97
Publicaciones.....	101
Discusión .....	99
1- Trabajo sobre el impacto de las mutaciones IDH1 e IDH2 en LMA “de novo”. .....	131
2-Análisis de las leucemias CBF. Impacto pronóstico de la edad, leucocitosis, enfermedad residual mínima y sobre-expresión de BAALC y MN1.....	135
3- Análisis de los niveles de WT1 al diagnóstico, post inducción y post intensificación en la LMA de novo.....	139
Conclusiones .....	143
Índice .....	147
Apéndice.....	151
Bibliografía .....	155

# Apéndice

---



**Apéndice 1. Protocolos CETLAM.**

	<b>AML-88</b>	<b>AML-94</b>	<b>AML-99</b>	<b>AML-03</b>	<b>AML-12</b>
<b>Estado</b>	Cerrado	Cerrado	Cerrado	Cerrado	Abierto
<b>Pacientes</b>		200	347	861	150
<b>Edad máxima</b>	50	60	60	70	70
<b>Inducción</b>	DCE	ICE	IDICE	IDICE + G-CSF	IC + G-CSF
<b>Consolidación</b>	Mitox-ADAC Amsa-IDAC	Mitox-IDAC	Mitox-IDAC	Mixox-IDAC + G-CSF	ADAC
<b>Estratificación según el riesgo</b>	no aplica	citogenética	citogenética ciclos para la RC	citogenética ciclos para la RC Índice leucocitario, FLT3, MLL o ERM	citogenética FLT3, NPM, CEBPA o MLL
<b>Pronóstico Favorable</b>		ADAC	ADAC	ADAC ± Auto-TPH	ADAC
<b>Pronóstico intermedio</b>	Asignación biológica	Auto o Alo TPH (asignación biológica)	Auto-TPH  Alo-Auto (asignación biológica)	Auto-TPH  Auto o Alo	Alo Auto (asignación biológica)  Alo-TPH
<b>Pronóstico desfavorable</b>		Auto: MO Alo de DE SP	Auto: PHSP Alo-DE: SP CD34+	Auto: PHSP ± GO Alo-DE: SP CD34+	Auto: PHSP Alo: SP
<b>Trasplante</b>	MO			Alo-DNE (mieioablatoivo, AIR)	Alo-DNE (mieioablatoivo, AIR)

Apéndice 2. Clasificación citogenética de los diferentes grupos cooperativos.									
	Original MRC	SWOG-ECOG	CALGB	GIMEMA/AML10	German AMLSG	HOVON/SAKK	Refined MRC 2010	CETLAM	
<b>Favorable</b>	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(18;21) sin del(9q) ni cariotipo complejo (>3abn) inv(16)/ t(16;16)/ del(16q)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) sola inv/del(16) y ausencia de anomalías desfav	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)	
<b>Intermedio</b>	Normal otras anomalías*	Normal trisomías 6, 8 del(12p), -Y	Normal Otras anomalías*	Normal Pérdida cr Y	Normal Otras anomalías*	Normal Otras anomalías*	Normal Otras anomalías*	Normal	
<b>Adverso</b>	abn(3q) monosomía 5, del(5q) monosomía 7 Complejo (>5 abn)**	abn(3q),(9q),(11q),(21q) abn(17p) monosomía 5, del(5q) monosomía 7, del(7q) t(6;9) t(9;22) complejo (>3bn)	inv(3)/t(3;3) monosomía 7 t(6;9) t(6;11) t(1;19) trisomía 8 complejo (>3abn)**	Resto de anomalías*	inv(3)/t(3;3) monosomía 5, del(5q) monosomía 7, del(7q) abn(11q23) del(12p) abn(17p) complejo (>3abn)	abn(3q) monosomía 5, del(5q) monosomía 7, del(7q) abn(11q23) t(6;9) t(9;22) complejo (>3abn)	abn(3q) excluyendo t(3;5) inv(3)/t(3;3) monosomía 5, del(5q), add(5q) monosomía 7, add(7q), del(q9) t(6;11) t(10;11) excluyendo t(9;11) y t(11;19) t(9;22) monosomía 17, abn(17p) complejo (>4abn)	Resto de anomalías	

\*No clasificables como favorables o adversas

\*\* Excluyendo aquellas anomalías de pronóstico favorable

Adaptado de Grimwade, D and Hills, RK. Hematology, 2009[17].

# Bibliografía

---



1. Bryder, D., D.J. Rossi, and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell*. Am J Pathol, 2006. **169**(2): p. 338-46.
2. Schuringa, J. and E. Vellenga, *Mechanisms involved in HSC self-renewal and hematopoietic lineage commitment*. <http://www.rug.nl/research/internal-medicine/hematologie/researchlines/res1>, 2012.
3. Levine, E.G. and C.D. Bloomfield, *Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure*. Semin Oncol, 1992. **19**(1): p. 47-84.
4. Austin, H., E. Delzell, and P. Cole, *Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment*. Am J Epidemiol, 1988. **127**(3): p. 419-39.
5. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
6. Gallo, R.C., *Cellular and virological studies directed to the pathogenesis of the human myelogenous leukemias*. Haematol Blood Transfus, 1979. **23**: p. 7-24.
7. Dockhorn-Dworniczak, B., et al., *A new germline TP53 gene mutation in a family with Li-Fraumeni syndrome*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(8): p. 1359-65.
8. Appelmann, I., et al., *Hereditary thrombocytopenia and acute myeloid leukemia: a common link due to a germline mutation in the AML1 gene*. Ann Hematol, 2009. **88**(10): p. 1037-8.
9. Secker-Walker, L.M. and M. Fitchett, *Constitutional and acquired trisomy 8*. Leuk Res, 1995. **19**(10): p. 737-40.
10. Gurbuxani, S., P. Vyas, and J.D. Crispino, *Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome*. Blood, 2004. **103**(2): p. 399-406.
11. Pandolfi, A., L. Barreyro, and U. Steidl, *Concise review: preleukemic stem cells: molecular biology and clinical implications of the precursors to leukemia stem cells*. Stem Cells Transl Med, 2012. **2**(2): p. 143-50.
12. Conway O'Brien, E., S. Prideaux, and T. Chevassut, *The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia*. Adv Hematol, 2014. **2014**: p. 103175.
13. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
14. Bennett, J.M., et al., *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-*



- American-British Cooperative Group. Ann Intern Med, 1985. 103(4): p. 620-5.*
15. Bennett, J.M., et al., *Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO)*. Br J Haematol, 1991. **78**(3): p. 325-9.
  16. Bennett, P.H., *Basis of the present classification of diabetes*. Adv Exp Med Biol, 1985. **189**: p. 17-29.
  17. Grimwade, D. and R.K. Hills, *Independent prognostic factors for AML outcome*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 385-95.
  18. Larson, R.A., *Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia?* Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(1): p. 29-37.
  19. Appelbaum, F.R., et al., *Age and acute myeloid leukemia*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3481-5.
  20. Juliusson, G., et al., *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4179-87.
  21. Charlson, M.E., et al., *A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation*. J Chronic Dis, 1987. **40**(5): p. 373-83.
  22. Lubke, T., et al., *[Does Charlson-comorbidity index correlate with short-term outcome in patients with gastric cancer?]*. Zentralbl Chir, 2003. **128**(11): p. 970-6.
  23. Sabin, S.L., et al., *The impact of comorbidity and age on survival with laryngeal cancer*. Ear Nose Throat J, 1999. **78**(8): p. 578, 581-4.
  24. Singh, B., et al., *Validation of the Charlson comorbidity index in patients with head and neck cancer: a multi-institutional study*. Laryngoscope, 1997. **107**(11 Pt 1): p. 1469-75.
  25. Zipperer, E., et al., *The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 729-32.
  26. Sorrow, M.L., et al., *Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2912-9.
  27. Sorrow, M.L., et al., *Hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index as an outcome predictor for patients with acute myeloid leukemia in first remission: combined FHCRC and MDACC experiences*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4606-13.

28. Greenwood, M.J., et al., *Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2006. **47**(7): p. 1245-52.
29. Goldman, J.M. and R.P. Gale, *What does MRD in leukemia really mean?* *Leukemia*, 2013. **28**(5): p. 1131.
30. Loken, M.R., et al., *Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group*. *Blood*, 2012. **120**(8): p. 1581-8.
31. Walter, R.B., et al., *Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(9): p. 1190-7.
32. Yin, J.A., et al., *Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial*. *Blood*, 2012. **120**(14): p. 2826-35.
33. Grimwade, D., 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**(5): p. 1312-20.
34. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. *Blood*, 1998. **92**(7): p. 2322-33.
35. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, *Cytogenetics in acute leukemia*. *Blood Rev*, 2004. **18**(2): p. 115-36.
36. Hoyos, M., et al., *Core binding factor acute myeloid leukemia: The impact of age, leukocyte count, molecular findings, and minimal residual disease*. *Eur J Haematol*, 2013: p. 209-18.
37. Nguyen, S., et al., *A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3517-23.
38. Schoch, C., et al., *Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor*. *Leukemia*, 1996. **10**(8): p. 1288-95.

39. Mrozek, K., *Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype*. *Semin Oncol*, 2008. **35**(4): p. 365-77.
40. Rucker, F.G., et al., *Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(24): p. 3887-94.
41. Schoch, C., et al., *Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **35**(1): p. 20-9.
42. Breems, D.A., et al., *Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(29): p. 4791-7.
43. Grosveld, G.C., *Treating AML with ATRA? Beware MN1!*, ed. G.C. Grosveld. Vol. 110. 2007. 1401-1402.
44. Chotirat, S., et al., *Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients*. *J Hematol Oncol*, 2012. **5**: p. 5.
45. Delaunay, J., et al., *Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup*. *Blood*, 2003. **102**(2): p. 462-9.
46. Martin, G., et al., *Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement*. *Haematologica*, 2000. **85**(7): p. 699-703.
47. Marcucci, G., et al., *Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(24): p. 5705-17.
48. Whitman, S.P., et al., *FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1552-9.
49. Gaidzik, V.I., et al., *RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(10): p. 1364-72.

50. Schnittger, S., et al., *RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis*. Blood, 2011. **117**(8): p. 2348-57.
51. Goyama, S., et al., *Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells*. J Clin Invest, 2013. **123**(9): p. 3876-88.
52. Yokota, S., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines*. Leukemia, 1997. **11**(10): p. 1605-9.
53. Kusec, R., et al., *More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML)*. Blood, 2006. **108**(1): p. 405-6; author reply 406.
54. Gale, R.E., et al., *The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2776-84.
55. Pratcorona, M., et al., *Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy*. Blood, 2013. **121**(14): p. 2734-8.
56. Yamamoto, Y., et al., *Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2434-9.
57. Spiekermann, K., et al., *A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3423-5.
58. Schittenhelm, M.M., et al., *FLT3 K663Q is a novel AML-associated oncogenic kinase: Determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248)*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 2008-14.
59. Polge, E., *Mutations Forming Subgroups in AML: Just Like Cells, They Are Constantly Dividing and Interacting*. American Society of Hematology. The hematologist, 2007.
60. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
61. Schlenk, R.F., et al., *Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B*. Haematologica, 2009. **94**(1): p. 54-60.

62. Falini, B., et al., *Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias*. Haematologica, 2007. **92**(4): p. 519-32.
63. Falini, B., et al., *Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications*. Leukemia, 2009. **23**(10): p. 1731-43.
64. Renneville, A., et al., *The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication*. Blood, 2009. **113**(21): p. 5090-3.
65. Dufour, A., et al., *Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome*. J Clin Oncol, 2009. **28**(4): p. 570-7.
66. Wouters, B.J., et al., *Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome*. Blood, 2009. **113**(13): p. 3088-91.
67. Meyer, C., et al., *The MLL recombinome of acute leukemias in 2013*. Leukemia, 2013.
68. Heinonen, K., et al., *Clinical characteristics of patients with de novo acute myeloid leukaemia and isolated trisomy 11: a Cancer and Leukemia Group B study*. Br J Haematol, 1998. **101**(3): p. 513-20.
69. Basecke, J., et al., *The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2006. **135**(4): p. 438-49.
70. Gelsi-Boyer, V., et al., *Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 12.
71. Whitman, S.P., et al., *Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5164-7.
72. Whitman, S.P., et al., *DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication*. Blood, 2008. **112**(5): p. 2013-6.
73. Krivtsov, A.V. and S.A. Armstrong, *MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 823-33.

74. Patel, J.P., et al., *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. 1079-89.
75. Gross, S., et al., *Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations*. J Exp Med, 2010. **207**(2): p. 339-44.
76. Naoe, T. and H. Kiyoi, *Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era*. Int J Hematol, 2013. **97**(2): p. 165-74.
77. Weissmann, S., et al., *Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2012. **26**(5): p. 934-42.
78. Abdel-Wahab, O., et al., *Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies*. Blood, 2009. **114**(1): p. 144-7.
79. Schmitt, A., et al., *Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8+ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Transfusion, 2008. **51**(3): p. 591-9.
80. Nibourel, O., et al., *Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission*. Blood, 2010. **116**(7): p. 1132-5.
81. Mohr, F., et al., *TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness*. Exp Hematol, 2011. **39**(3): p. 272-81.
82. Palomero, T. and A. Ferrando, *Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Clin Lymphoma Myeloma, 2009. **9 Suppl 3**: p. S205-10.
83. Renneville, A., et al., *Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association*. Leukemia, 2012. **26**(6): p. 1247-54.
84. Bowen, D.T., et al., *RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2113-9.
85. Paquette, R.L., et al., *N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome*. Blood, 1993. **82**(2): p. 590-9.
86. Kiyoi, H., et al., *Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3074-80.



87. Bacher, U., et al., *Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3847-53.
88. Neubauer, A., et al., *Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(28): p. 4603-9.
89. Cilloni, D. and G. Saglio, *WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome*. Acta Haematol, 2004. **112**(1-2): p. 79-84.
90. Virappane, P., et al., *Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party*. J Clin Oncol, 2008. **26**(33): p. 5429-35.
91. Owen, C., J. Fitzgibbon, and P. Paschka, *The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia*. Hematol Oncol, 2010. **28**(1): p. 13-9.
92. Ho, P.A., et al., *Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group*. Blood, 2010. **116**(5): p. 702-10.
93. Metzeler, K.H., et al., *ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6920-9.
94. Pratcorona, M., et al., *Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value*. Haematologica, 2012. **97**(3): p. 388-92.
95. Chou, W.C., et al., *Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4086-94.
96. Baldus, C.D., et al., *BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1613-8.
97. Damiani, D., et al., *BAALC overexpression retains its negative prognostic role across all cytogenetic risk groups in acute myeloid leukemia patients*. Am J Hematol, 2013: p. 848-52.
98. Baldus, C.D., et al., *BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications*. J Clin Oncol, 2006. **24**(5): p. 790-7.

99. Langer, C., et al., *Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study.* J Clin Oncol, 2009. **27**(19): p. 3198-204.
100. Heuser, M., et al., *High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics.* Blood, 2006. **108**(12): p. 3898-905.
101. Carella, C., et al., *MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML.* Leukemia, 2007. **21**(8): p. 1679-90.
102. Marcucci, G., et al., *High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study.* J Clin Oncol, 2007. **25**(22): p. 3337-43.
103. Schwind, S., et al., *BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study.* Blood, 2010. **116**(25): p. 5660-9.
104. Metzeler, K.H., et al., *ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays.* J Clin Oncol, 2009. **27**(30): p. 5031-8.
105. Buonamici, S., et al., *EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice.* J Clin Invest, 2004. **114**(5): p. 713-9.
106. Lugthart, S., et al., *High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated.* Blood, 2008. **111**(8): p. 4329-37.
107. Groschel, S., et al., *High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities.* J Clin Oncol, 2010. **28**(12): p. 2101-7.
108. Ghanem, H., N. Tank, and I.A. Tabbara, *Prognostic implications of genetic aberrations in acute myelogenous leukemia with normal cytogenetics.* Am J Hematol, 2012. **87**(1): p. 69-77.
109. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., et al., *High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid*



- leukemia: a study of 319 de novo AML patients.* Blood, 2003. **101**(3): p. 837-45.
110. Ley, T.J., et al., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
  111. Marcucci, G., et al., *IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study.* J Clin Oncol, 2010. **28**(14): p. 2348-55.
  112. Weissmann, S., et al., *Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2011. **26**(5): p. 934-42.
  113. Nomdedeu, J., et al., *Adverse impact of IDH1 and IDH2 mutations in primary AML: experience of the Spanish CETLAM group.* Leuk Res, 2012. **36**(8): p. 990-7.
  114. Nomdedeu, J.F., et al., *Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML.* Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2157-64.
  115. Mardis, E.R., et al., *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome.* N Engl J Med, 2009. **361**(11): p. 1058-66.
  116. Oki, K., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies.* Leukemia, 2011. **25**(2): p. 382-4.
  117. Green, C.L., et al., *The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status.* Blood, 2010. **116**(15): p. 2779-82.
  118. Abbas, S., 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**(12): p. 2122-6.
  119. Chou, W.C., et al., *The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2011. **25**(2): p. 246-53.
  120. Jiao, B., et al., *AML1-ETO9a is correlated with C-KIT overexpression/mutations and indicates poor disease outcome in t(8;21) acute myeloid leukemia-M2.* Leukemia, 2009. **23**(9): p. 1598-604.
  121. Schnittger, S., et al., *KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival.* Blood, 2006. **107**(5): p. 1791-9.
  122. Garg, M., et al., *Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription*

- polymerase chain reaction in acute leukaemia*. Br J Haematol, 2003. **123**(1): p. 49-59.
123. Cilloni, D., et al., *Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy*. Haematologica, 2008. **93**(6): p. 921-4.
124. Pozzi, S., et al., *Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of WT1 expression*. Br J Haematol, 2013. **160**(4): p. 503-9.
125. Rossi, G., et al., *Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets*. Leuk Res, 2012. **36**(4): p. 401-6.
126. Bergmann, L., et al., *High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome*. Blood, 1997. **90**(3): p. 1217-25.
127. Barragan, E., et al., *Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2004. **89**(8): p. 926-33.
128. Luesink, M., et al., *High GATA2 expression is a poor prognostic marker in pediatric acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(10): p. 2064-75.
129. Furuhata, A., et al., *GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines*. Leukemia, 2009. **23**(7): p. 1270-7.
130. Shimada, A., et al., *High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group*. Int J Hematol, 2012. **96**(4): p. 469-76.
131. Lapillonne, H., et al., *High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2006. **24**(10): p. 1507-15.



*Al final ha resultat que el “barco”  
tenia la mida justa.....*

