

DEPARTAMENT DE MEDICINA

INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA-TIROSINA FOSFATASA  
SHP-1 Y LA PROTEÍNA-TIROSINA KINASA FLT3  
CONSTITUTIVAMENTE ACTIVADA EN LAS  
ENFERMEDADES MALIGNAS MIELOIDES: UN NUEVO  
FACTOR PRONÓSTICO

ARMANDO V. MENA DURÁN

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18  
d'abril de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Jorge Sierra Gil
- D. José María Moraleda Jiménez
- D<sup>a</sup>. Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán
- D. José Luis Bello López
- D. Félix Carbonell Ramón

Va ser dirigida per:  
D. Miguel Angel Sanz Alonso

©Copyright: Servei de Publicacions  
Armando V. Mena Durán

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7231-9

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



**Universitat de València**

Departament de Medicina

# INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA-TIROSINA FOSFATASA SHP-1 Y LA PROTEÍNA-TIROSINA KINASA FLT3 CONSTITUTIVAMENTE ACTIVADA EN LAS ENFERMEDADES MALIGNAS MIELOIDES: UN NUEVO FACTOR PRONÓSTICO

TESIS DOCTORAL  
Curso 2006-2007

Autor: Armando V. Mena Durán  
Directores: Dr. Miguel A Sanz Alonso  
Dr. Tomas Mustelin



MIGUEL A. SANZ ALONSO, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia,

CERTIFICO que la tesis doctoral titulada "INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA-TIROSINA FOSFATASA SHP-1 Y LA PROTEÍNA-TIROSINA KINASA FLT3 CONSTITUTIVAMENTE ACTIVADA EN LAS ENFERMEDADES MALIGNAS MIELOIDES: UN NUEVO FACTOR PRONÓSTICO", presentada por D. Armando V. Mena Durán, ha sido realizada bajo mi dirección y considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendida frente al Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

En Valencia, a 15 de julio de 2007

Dr Miguel A Sanz Alonso

MIGUEL A. SANZ ALONSO, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia,

TOMAS MUSTELIN, Professor and Director of the Inflammatory and Infectious Disease Center, The Burnham Institute, La Jolla, California, EE.UU.,

Hereby, we certify that this work entitled "INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA-TIROSINA FOSFATASA SHP-1 Y LA PROTEÍNA-TIROSINA KINASA FLT3 CONSTITUTIVAMENTE ACTIVADA EN LAS ENFERMEDADES MALIGNAS MIELOIDES: UN NUEVO FACTOR PRONÓSTICO" has been written and presented by Armando V. Mena Durán under our supervision, direction and advise. We firmly believe that this thesis will fulfill the requirements, after his defense against a suitable Tribunal, to attain the Doctorate degree (PhD).

March 30<sup>th</sup>, 2007.

La Jolla, CA, USA

Tomas Mustelin, MD, PhD

Miguel A Sanz Alonso, MD, PhD

*A Marisol,*

*A mi familia,*

*Y a todos los que alguna vez habéis apostado por mí.*

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo expuesto en esta Tesis Doctoral fue realizado entre febrero de 2003 y agosto de 2006 en el Burnham Institute de La Jolla, California, EE.UU. y en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario La Fe de Valencia, España. Deseo expresar mi absoluto agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este proyecto y que me han ayudado tanto a crecer como científico, si merezco este calificativo, y como persona. A los doctores Miguel A Sanz, Tomas Mustelin, Guillermo F Sanz y Mariano Linares a los que debo todo lo que soy como hematólogo y aprendiz de investigador. Los doctores Miguel A Sanz y Guillermo F Sanz me han conducido por la ruta de la excelencia en la práctica de la hematología clínica y me han permitido “dar alas” a mis inquietudes, curiosidades e iniciativas de carácter científico. A mi amigo y compañero el Dr Mariano Linares por su sosegado juicio y profesionalidad en una etapa turbulenta de mi vida profesional. El doctor Tomas Mustelin creyó ciegamente en mi potencial, me aceptó en su laboratorio de la Jolla, a pesar de mi escasa experiencia, y me descubrió el intrincado y apasionante mundo de las proteína-fosfatasas. A mis compañeros en la Jolla: Scott Williams, Lucy Musumeci, Nunzio Bottini, Tikha Hayes, Lutz Tautz, Andrés Alonso, Torkel Vang, Dina Nika, Huong Huynh, Shane Bruckner, Souad Rahmouni, Christine Louis-dit-Sully; y especialmente al Dr Summanuna H Togo, por sus enseñanzas para moverme en el banco de laboratorio, su entusiasmo como científicos y por su valiosa amistad lejos de casa. A mis compañeros en la Fe de Valencia: Juan Carlos Pajuelo, Luís Benlloch, Zaida García Casado, Ana Valencia, y la Dra Eva Barragán, por enseñarme la



necesaria colaboración entre biólogos y médicos en la medicina del siglo XXI, y a los Dres José Cervera, Isidro Jarque, Guillermo Martín, Federico Moscardó, Gemma Plumé y Rafa Andreu por sus enseñanzas y ayuda en el manejo clínico de los pacientes día a día. Es inexcusable aquí agradecer a las dos entidades que me han apoyado inmerecidamente como becario estos años: La Comisión Fulbright (España-EE.UU.), que me dio mi primera oportunidad como investigador en EE.UU., y la Fundació Internacional Josep Carreras per a la Lluita contra la Leucemia (España), por permitirme traer a España lo aprendido fuera.

Por último deseo expresar mi eterno agradecimiento a todos los pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides y que han participado en estos estudios. Sin ellos y el clamor de su sufrimiento, nuestro trabajo carecería de sentido.

# ÍNDICE

<b>A. PARTE TEÓRICA</b>	<b>9</b>
I. INTRODUCCIÓN	9
II. LMA: FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS. GENÉTICA MOLECULAR	11 26
<b>B. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
I. HIPÓTESIS DE TRABAJO.	42
II. OBJETIVOS.	43
<b>C. MÉTODOS DE ESTUDIO</b>	<b>44</b>
ESTUDIOS CLÍNICOS	44
ESTUDIOS CITOGENÉTICOS	45
ESTUDIOS MOLECULARES	46
ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	52
ESTUDIOS ESTADÍSTICOS	54
CONSIDERACIONES ÉTICAS	54
<b>D. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES DE FLT3	55
ALTERACIONES DE FLT3 Y CARACTERÍSTICAS AL DIAGNÓSTICO DE AML <i>DE NOVO</i>	56
INFLUENCIA DEL ESTADO MUTACIONAL DE FLT3 EN LA EFICACIA TERAPÉUTICA EN PACIENTES DE LMA NO PROMIELOCÍTICA	58
CORRELATO CLÍNICO DE LA EXPRESIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEINA TIROSINA FOSFATASA SHP-1 EN BIOPSIAS DE MÉDULA OSEA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE SMD	61
IMPACTO PRONÓSTICO DE LA COEXISTENCIA DE MUTACIONES ACTIVADORAS DE FLT3 Y SUPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN PTPN6 EN PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOIDES.	67
<b>E. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>74</b>
<b>F. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>G. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>81</b>

## A. PARTE TEÓRICA

### I. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de la leucemia aguda mieloblástica (LMA) y los síndromes mielodisplásicos (SMD) está sufriendo cambios dramáticos debido al crecimiento exponencial del conocimiento que estamos adquiriendo de los mecanismos de leucemogénesis. Tras casi tres décadas de tratamiento estándar de inducción en la leucemia aguda mieloblástica, es decir, una antraciclina (daunorrubicina, la primera disponible) durante tres días y arabinósido de citosina (Ara-C) (100-200 mg/m<sup>2</sup>) durante 7 días<sup>1</sup>, sabemos que la tasa esperable de remisión completa (RC) en adultos se sitúa entre 60-70%<sup>2</sup>, siendo más pobre en casos de LMA secundaria a síndrome mielodisplásico<sup>3</sup>, aunque notables avances se han obtenido con otros regímenes<sup>4</sup>. Si esta terapia no va seguida de una terapia post-remisión efectiva estas respuestas no son sostenidas en el tiempo (mediana 4-5 meses)<sup>5</sup>. Alcanzar RC se ha convertido en una condición *sine qua non* para una supervivencia libre de enfermedad prolongada. En las últimas dos décadas se ha intentado, a través de múltiples ensayos clínicos, introducir regímenes quimioterápicos más agresivos que mejorasen estas tasas de RC y su duración con resultados dispares. La mejor estrategia antileucémica, una vez alcanzada la RC, es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH) particularmente en aquellos pacientes con cariotipo desfavorable, como veremos posteriormente, aunque solo en términos de

supervivencia libre de enfermedad (SLE)<sup>6</sup>. Sin embargo ni la introducción de nuevos fármacos, ni cambios en dosis y frecuencia de los esquemas quimioterápicos, ni la adopción de estrategias de intensificación seguidas de trasplante de progenitores hematopoyéticos nos ha permitido rayar los límites de la ansiada curación de estas entidades y los pacientes terminan falleciendo debido a su neoplasia mieloide en un número aún significativo. Esta situación es especialmente dramática en los pacientes de edad avanzada, los más incidentes<sup>7</sup>. Sin duda podemos y debemos mejorar estos resultados. El camino se llama "terapia adaptada al riesgo"<sup>8</sup> y "tratamiento contra dianas moleculares"<sup>9</sup>. Estos dos conceptos nacen en las dos últimas décadas y hacen referencia, en el primer caso, a la definición de estrategias terapéuticas individualizadas en base a conocidos marcadores clínico-biológicos pronósticos, y en el segundo caso, y muy intrincado con el anterior, al desarrollo de fármacos específicos frente a alteraciones moleculares primordiales en el desarrollo del fenotipo maligno. La aplicación de estos conceptos en la clínica ya ha dado exitosos ejemplos como el desarrollo del Índice Pronóstico Internacional (IPSS) para el manejo de los SMD<sup>10</sup> o el tratamiento diferenciador con ácido holo-trans-retinoico (ATRA) de la LMA promielocítica (LPA) o FAB-M3<sup>11</sup>.

A continuación se describe el estado actual del conocimiento de los principales marcadores pronósticos biológicos en la LMA y los SMD, excepción hecha de de la leucemia promielocítica, así como las bases teóricas de nuestra hipótesis de trabajo.

## II. LMA: FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS.

### ***CITOGENÉTICA CONVENCIONAL***

El primer estudio prospectivo y multicéntrico que estableció el cariotipo previo al tratamiento como factor pronóstico independiente para la LMA, y que incluyó numerosos pacientes, fue el del 4º International Workshop on Chromosomes and Leukemia (4IWCL)<sup>12</sup>. Los autores encontraron diferencias significativas en tasas de RC, duración de la RC y supervivencia global (SG) en 716 pacientes que fueron segregados según la presencia de t(8;21); t(15;17); -5 o del(5q); -7 o del(7q); concurrencia de -5 o del(5q) y -7 o del(7q); y otras anomalías que afectasen a 11q, +8 y +21. El modelo retuvo su capacidad discriminatoria para la duración de la RC y la SG en el subgrupo de 305 pacientes tratados. Estudios posteriores de este grupo distinguió como categoría independiente 16q22, los casos con anomalías de 5 y 7 fueron agrupados, y los pacientes con +8 y +21 se incluyeron en el grupo hiperdiploide<sup>13,14</sup>. El análisis multivariante realizado en el artículo correspondiente al tercer seguimiento de la cohorte del 4IWCL incluyó 628 casos de LMA *de novo*, con una mediana de seguimiento de 14,7 años, y confirmó que el cariotipo es un factor pronóstico independiente de supervivencia para todos los pacientes y también para los 291 pacientes tratados con el estándar "3+7"<sup>14</sup>. Diversos estudios posteriores han confirmado que el cariotipo constituye un factor pronóstico independiente para la obtención de RC, la duración de la RC, el riesgo de recaída y la supervivencia<sup>15,16</sup>. Sin embargo existen notables diferencias entre los distintos

sistemas de clasificación pronóstica propuestos posteriormente [South-West Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group (SWOG/ECOG), Cancer And Leukemia Group B (CALGB), Medical Research Council(MRC)]<sup>15,16,17</sup> respecto a anomalías cromosómicas concretas y su clasificación como favorable, adversa o de riesgo intermedio (Tabla 1). En general, para el MRC cualquier anomalía no clasificable como favorable o adversa y que no va acompañada de otra anomalía que sea encasillable como favorable o adversa, se clasificaría como riesgo intermedio. Sin embargo, tanto el SWOG/ECOG como el CALGB categorizan de una forma sistemática todas las anomalías concretas en los diversos grupos de riesgo y solo dejan como no clasificadas las anomalías más infrecuentes.

En general se podrían distinguir claramente dos grandes grupos de LMAs en base a la citogenética: un grupo que representa aproximadamente 55% de los pacientes diagnosticados de LMA *de novo* que presenta anomalías cromosómicas recurrentes y un segundo grupo de pacientes, el restante 45% aproximadamente, en el que no es detectable ninguna anomalía cromosómica mediante cariotipo convencional o *hibridación in situ fluorescente* (FISH). Dentro del primer grupo podemos, a su vez, distinguir otros dos subgrupos. El primero englobaría el conjunto de las traslocaciones balanceadas: t(8;21), t(15;17) e inv(16). El segundo grupo incluye las llamadas alteraciones no balanceadas como 5q-, 7q-, -5, -7 y los cariotipos complejos. Esta separación en subgrupos citogenéticos tiene una relevancia clínica muy importante. Las LMAs que presentan aberraciones balanceadas se consideran, en general, de buen pronóstico, tienen una larga supervivencia y un potencial de curación del 60-80% de casos<sup>12</sup>. Por otra parte, las LMAs con alteraciones no

balanceadas tienen un pronóstico infausto sobreviviendo a largo plazo solo un 10-15% de pacientes. Además si analizamos en este grupo los cariotipos complejos, el pronóstico es incluso peor<sup>18</sup>. Los pacientes diagnosticados de LMA y que no presentan anomalías cromosómicas detectables u otras anomalías cromosómicas no incluidas en los grupos anteriores son calificados como pacientes de riesgo intermedio con supervivencias a largo plazo del 25-30%<sup>19,20</sup>.

Hay evidencias suficientes para poder afirmar que las traslocaciones balanceadas conducen a una desregulación de los factores de transcripción, elemento clave en la leucemogénesis de estos pacientes. Esta afirmación se ha substanciado con la clonación y caracterización funcional de genes involucrados en anomalías específicas como t(15;17) (*PML/RAR-α*)<sup>21</sup> en la leucemia aguda promielocítica o la t(8;21)(*AML1/ETO*)<sup>22</sup> característica de la LMA (FAB-M2). El caso de la LPA es paradigmático. La fusión de los genes *PML* y *RAR-α* produce una inhibición en la transcripción del DNA al reclutar co-represores a la hebra de DNA<sup>23</sup>. El tratamiento con ácido holo-*trans* retinoico (ATRA) es capaz de revertir este proceso y reestablece la actividad transcripcional del promotor de ácido retinoico lo que conduce a la diferenciación de las células de la línea granulocitaria<sup>24</sup>. Esta terapia diferenciadora ha permitido diseñar esquemas terapéuticos que obtienen tasas superiores al 90% de SLE a los 5 años<sup>25</sup>.

En el caso de la LMA con t(8;21), que representa el 10% de casos de LMA, la proteína aberrante resultante de la fusión *AML1/ETO* conduce a una disminución en la expresión de CEBP- $\alpha$  y PU.1, considerados reguladores de la diferenciación de la línea mielocítica y mielomonocítica<sup>26</sup>. Este mecanismo

conduce a un bloqueo de la diferenciación de los precursores hematopoyéticos lo que se consideraría el "primer impacto" en la patogénesis. Se considera que el "segundo impacto" vendría dado por la estimulación de la proliferación vía *JNK1/C-jun* por parte de *AML1/ETO*<sup>27</sup>. *t(8;21)* junto con *inv(16)* y *t(16;16)* constituyen las anomalías citogenéticas definitorias de la LMA *core-binding factor* (CBF) y todos los sistemas de calificación pronóstica las califican como riesgo favorable. Sin embargo, el grupo SWOG/ECOG también califica como favorable la anomalía del(16q) mientras que el MRC y el CALGB no. Diversos autores ahora abogan por que del(16q) no sea considerada como favorable porque no se ha asociado al pronóstico favorable propio de *inv(16)/t(16;16)*<sup>28,29</sup>. Respecto a *t(8;21)* también existen diferencias entre los modelos de riesgo propuestos. Así mientras el MRC y el CALGB consideran que *t(8;21)* debe ser clasificada como favorable incluso si está acompañada de otras anomalías, el SWOG/ECOG sólo considera esta anomalía favorable si no coexiste con un cariotipo complejo con tres o más anomalías o con del(9q). Esta propuesta no parece haberse substanciado al haberse publicado distintas series en las que la presencia de anomalías secundarias o incluso cariotipo complejo no parece conferir un peor pronóstico a *t(8;21)*<sup>15,17,30</sup>. Sin embargo, los pacientes que presentaban *t(8;21)* e importante leucocitosis, número alto de granulocitos, sarcomas granulocitarios y la expresión de CD56 en pacientes con un alto índice leucocitario sí han confirmado un peor pronóstico<sup>31</sup>.

También la presencia de *t(8;21)* tiene un correlato muy interesante respecto a la estrategia terapéutica. Se ha visto superioridad en términos de SLE a los 5 años y SG en aquellos pacientes que han recibido en inducción varios ciclos



de altas dosis de Ara-C comparado con los que han recibido sólo un ciclo<sup>32,33</sup>. Byrd *et al.* ha visto el mismo comportamiento para los pacientes que presentan inv(16)/t(16;16)<sup>34</sup>.

Otra anomalía cromosómica balanceada con implicaciones pronósticas es la que afecta a 11q23. El grupo SWOG/ECOG la califican como de riesgo adverso mientras que el grupo MRC la califica de riesgo intermedio. Actualmente hay suficientes pruebas para afirmar que este riesgo va a depender fundamentalmente del cromosoma implicado en el intercambio de material genético, por ejemplo, t(9;11)(p22;q23) tiene un mejor pronóstico, lo que permite clasificar a dichos pacientes como riesgo intermedio<sup>17</sup>. Un estudio en 298 pacientes en edad pediátrica demostró que la t(9;11) era el factor pronóstico favorable más importante<sup>35</sup>. Sin embargo en el estudio del CALGB se demuestra que la supervivencia de los adultos que presentaban t(6;11) y t(11;19)(q23;p13.1) era significativamente más corta que la de aquellos pacientes con citogenética normal<sup>17</sup>.

Son menos conocidos los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones citogenéticas no balanceadas aunque son globalmente las más numerosas. Los cromosomas más frecuentemente afectados por pérdidas de material genético son 5, 7 y 17. La forma más frecuente de ganancia de material genético afecta al cromosoma 8<sup>36</sup>. Las tasas de RC de los pacientes con +8 varía ampliamente, 29-91%, y de la misma forma la duración de la remisión completa y la supervivencia, lo que ha hecho que esta anomalía se califique indistintamente como riesgo intermedio o adverso<sup>20,37</sup>. Parece muy importante el hecho de que +8 sea una anomalía única o ésta esté acompañada de otra anomalía<sup>15,17</sup>. De nuevo, +8 no afecta negativamente al

pronóstico de aquellos pacientes con t(15;17), inv(16)/t(16;16) y t(8;21)<sup>38, 39</sup>.

Sin embargo hay publicaciones conflictivas con estas afirmaciones, por ejemplo, un reciente estudio indica que los pacientes con +8 y anomalías cariotípicas adversas presenta una SG significativamente menor que aquellos con cariotipo adverso sin +8.<sup>40</sup>

Un detalle muy interesante es el hecho de que la frecuencia de LMAs con alteraciones cromosómicas balanceadas se incrementa consistentemente con la edad en todos los subgrupos de edad. Por el contrario, las LMAs con traslocaciones no balanceadas raras veces ocurren en sujetos menores de 40 años y se produce un pico de incidencia en edades superiores<sup>41</sup>.

Los tres grandes sistemas pronósticos de riesgo citogenético coinciden en asignar como de riesgo desfavorable las anomalías inv(3)(q21q26) o t(3;3)(q21;q26), -7 y los cariotipos complejos. La definición de cariotipo complejo varía de una clasificación a otra. Mientras para el MRC es la presencia de un clon con, al menos, cinco anomalías citogenéticas no relacionadas, para el SWOG/ECOG, el CALGB y para el grupo alemán de LMA basta con tres<sup>18</sup>. En un trabajo de Byrd *et al* se estudió el pronóstico a largo plazo de los pacientes con tres o cuatro anomalías frente aquéllos que tenían cinco o más<sup>17</sup>. Aunque en el primer grupo había pacientes más jóvenes con mejor incidencia acumulada para recaída (IAR) y SG a los 5 años, la tasa de RC y la SG fue significativamente menor que la de los pacientes con citogenética normal. Por ello los autores proponen que todos los pacientes con tres o más anomalías cromosómicas deben considerarse cariotipo complejo. Las anomalías de 7 merecen un análisis aparte. En la serie del CALGB todos los pacientes con -5, del(7q), -17/17p-, -18 y -20 se

presentaban en el marco de un cariotipo complejo<sup>17</sup>. En el estudio del MRC, la presencia de del(7q) no era peyorativa para el pronóstico y éste era idéntico al del cariotipo normal si no iba acompañado por -5/del(5q) o abn(3q)<sup>15</sup>. Los estudios de funcionalidad de los genes implicados en las anomalías cromosómicas balanceadas demuestran un incremento en la capacidad proliferativa de los blastos procedentes de estos pacientes respecto de los pacientes con alteraciones no balanceadas o sin alteraciones citogenéticas. Estas diferencias parecen deberse a una respuesta incrementada a factores de crecimiento como GM-CSF y G-CSF e incluso su producción auto- paracrina a raíz de esas traslocaciones balanceadas<sup>42</sup>. Este hecho puede explicar las mejores respuestas, en términos de RC, en el grupo de cariotipo favorable a esquema quimioterápicos basados en ara-C, efectivo solo en células que están en ciclo<sup>43</sup>.

Otra cuestión de interés ha sido analizar en que momento de la hematopoyesis se producen estos cambios estructurales que conducen a la leucemogénesis. Para ello diversos investigadores han combinado la citogenética y FISH mostrando que las aberraciones no balanceadas pueden ocurrir en células muy inmaduras pluripotentes mientras que las balanceadas tiene su origen en células más maduras ya comprometidas a una línea progenitora hematopoyética<sup>44</sup>. En consecuencia, las LMAs que presentan aberraciones cromosómicas balanceadas deben originarse de células más maduras, restringidas a una línea hematopoyética y cuyo mecanismo de leucemogénesis se debe principalmente a pérdida de la regulación por parte de factores de transcripción que conducen a la no diferenciación. En los casos de LMA con aberraciones no balanceadas, el error se da en células más

inmaduras pluripotentes y se caracteriza por la pérdida funcional de genes involucrados en el control del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis. Los pacientes con cariotipo normal son el grupo más numeroso entre los adultos diagnosticados de LMA. Los distintos sistemas pronósticos los califican como pacientes de "riesgo intermedio" dado que sus tasas de RC, duración de la RC y probabilidades de supervivencia son normalmente peores que las de los pacientes tratados con anomalías cromosómicas de buen pronóstico pero son mejores que las de los pacientes con anomalías desfavorables. Este grupo es muy heterogéneo desde un punto de vista molecular y muy probablemente está compuesto por varios subgrupos de pronóstico variable. Más adelante analizaremos aquellos marcadores moleculares con interés pronóstico hasta ahora descritos en pacientes con cariotipo normal.

Es innegable el peso pronóstico que en la clínica diaria representa la citogenética en los síndromes mielodisplásicos. Sin embargo, en ocasiones, los problemas técnicos pueden limitar la disponibilidad de metafases para el estudio e incluso algunas anomalías citogenéticas pueden pasar desapercibidas debido a una inadecuada selección de las metafases a estudiar, por ejemplo, los cariotipos abigarrados pueden enmascarar algunas aberraciones al solaparse los cromosomas. La mayoría de las series publicadas señala que entre 30-50% de los pacientes diagnosticados con SMD primarios presentan alteraciones cromosómicas clonales y ninguna de ellas está asociada a un determinado subtipo FAB, aunque algunas de ellas, como del(5q) o del(17p) definen síndromes clínicos que incluso han sido incorporados como una nueva categoría en la clasificación de los síndromes mielodisplásicos la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>45, 46, 47, 48</sup>. Estas

anomalías son predominantemente pérdidas de cromosomas parciales/totales o ganancias. Los cromosomas más frecuentemente afectados por las pérdidas totales son 5, 7 e Y. Los cromosomas más afectados por las pérdidas parciales son 5 [ del(5q)], 7 [del(7q)], 11 [del(11q)], 12 [del(12q)] y el 20 [del(20q)]. La trisomía 8 representa la ganancia cromosómica más frecuente. La mayoría de estas anomalías recurrentes conducen a la pérdida de material genético, especialmente genes supresores de tumores, impidiendo su función de control del crecimiento celular, inducción de muerte celular o apoptosis y regulación del ciclo en respuesta al daño al DNA<sup>49</sup>.

Dada la heterogeneidad en el comportamiento clínico de los SMD ha habido esfuerzos ya históricos para generar sistemas de puntuación pronóstica que permitieran un manejo más racional del paciente en base a su riesgo de transformación a LMA pero hasta 1993 no se había incorporado la citogenética a ninguno de estos modelos<sup>50</sup>. Posteriormente un grupo internacional liderado por Greenberg creó, con modificaciones, un sistema pronóstico internacional, más conocido por sus siglas IPSS, que basa sus predicciones en tres pilares: número de blastos en MO, citogenética y número de citopenias al diagnóstico<sup>33</sup>. Este grupo consideró como citogenética de bajo riesgo a los cariotipos normales, y aquellos con pérdidas solitarias de cromosoma Y [-Y], del(5q) y del(20q); citogenética de alto riesgo: alteraciones del cromosoma 7 o cariotipo complejo ( $\geq 3$  alteraciones cromosómicas); y citogenética de riesgo intermedio: todas las demás anomalías incluyendo +8 (Tabla 2). De acuerdo con este modelo el tiempo proyectado de transformación a LMA del 25% de los pacientes de cada grupo era de 5,6 años para el grupo de bajo riesgo y de 1,6 y 0,9 años para los

grupos de riesgo intermedio y alto respectivamente. Este sistema pronóstico es actualmente el más aceptado internacionalmente y ha sido validado independientemente por diversos grupos<sup>51, 52, 53</sup>. Sin embargo una crítica común a los grupos de riesgo citogenético del IPSS es el "cajón de sastre" que constituye el riesgo intermedio que incluye la mayoría de las anomalías cromosómicas simples o dobles. Algunas aberraciones que afectan a un sólo par de cromosomas son capaces por si solas de conferir un pronóstico distinto en grandes series de pacientes. Así por ejemplo, Solé *et al* proponen que los pacientes con del(12p) deben considerarse como grupo de bajo riesgo ya que tienen una supervivencia similar a los pacientes con cariotipo normal<sup>56</sup>. En este mismo estudio y otros se sugiere que la trisomía 8 (+8) sea separada del grupo de riesgo intermedio al presentar dichos casos un incremento significativo de transformación leucémica.<sup>38,54</sup>

En general, los pacientes con cariotipo normal tienen mejor pronóstico que los pacientes con alteraciones cromosómicas y constituyen la referencia al comparar los resultados terapéuticos de las distintas series<sup>10</sup>. Por el contrario, los pacientes con cariotipos complejos, es decir  $\geq 3$  anomalías cromosómicas, se consideran de mal pronóstico. La inmensa mayoría de estos casos albergan aberraciones no balanceadas con pérdida de material genético. Es frecuente encontrar pérdidas de los cromosoma 5 y 7 en los cariotipos complejos<sup>55, 56</sup>. Entre 10-20% de pacientes diagnosticados de SMD primario presentan un cariotipo complejo y este porcentaje alcanza el 90% en los casos de SMD secundario a terapias antineoplásicas<sup>57</sup>.

La detección de anomalías citogenéticas puede resultar útil en casos de difícil diagnóstico o para distinguir entre hiperplasia mieloide y una proliferación

monoclonal maligna. También la evaluación seriada del cariotipo puede resultar muy informativa si hay algún cambio clínico llamativo. La aparición de nuevas alteraciones o de alguna aberración en un paciente con cariotipo normal previo es un indicador de cambio en la evolución de la enfermedad habitualmente a una forma más agresiva e incluso a leucemia franca<sup>58</sup>.

También se puede emplear la citogenética como método indirecto para valorar la "masa tumoral" o el tamaño del clon maligno en respuesta a la terapia<sup>59</sup>. Por otra parte, Estey et al. consideran que las anomalías citogenéticas son el factor que mejor predice la respuesta tras tratamiento quimioterápico intensivo<sup>60</sup>.

A pesar de la importancia clínica y la fiabilidad contrastada del IPSS no se ha podido definir que anomalías citogenéticas son finalmente la responsables de la transformación a LMA. La razón principal es el número escaso de series que incluyan estudios citogenéticos secuenciales en la evolución de los pacientes y además éstas comprometen un número bajo de pacientes con corto seguimiento<sup>61</sup>.

La citogenética de los pacientes diagnosticados de SMD ayuda a tomar decisiones terapéuticas. Los pacientes con anomalías cromosómicas que pueden presumir una larga supervivencia recibirán estrategias terapéuticas más conservadoras (p.ej. inmunomoduladores, factores de crecimiento) mientras que los pacientes con alto riesgo citogenético deberán tratarse con estrategias más agresivas. Por tanto los pacientes calificados por el IPSS como riesgo bajo o intermedio-I tienen un pronóstico relativamente bueno y se les deben ofertar estrategias como tratamiento de soporte, factores hematopoyéticos o quimioterapia de baja intensidad. Por el contrario, aquellos

pacientes clasificados como de riesgo intermedio-II o alto tendrán un mal pronóstico y alta frecuencia de transformación a LMA. Distintos ensayos han permitido tasas de RC cercanas al 70% en estos pacientes de alto riesgo, incluida la experiencia de nuestro propio grupo<sup>4</sup>. Como en la LMA, el objetivo de la terapia debe ser erradicar el clon maligno y eso solo se puede lograr con terapias de intensificación y trasplante de progenitores hematopoyéticos. Por todo ello, y si condiciones como disponibilidad de donante, la edad y el estado general (*performance status*) del paciente lo permiten, el tratamiento de elección del paciente diagnosticado de SMD de alto riesgo es el trasplante alogénico. Cerca del 40% de los pacientes se "curarán" con este procedimiento. Pero recordemos que precisamente los pacientes con citogenética de alto riesgo tienen un mayor riesgo de recaída y menor SLE tras un procedimiento alogénico en comparación con pacientes con riesgo bajo o intermedio del IPSS<sup>62</sup>. Además, en una serie publicada de pacientes trasplantados por SMD la presencia de enfermedad avanzada con citogenética desfavorable suponía un riesgo significativo tanto de muerte como de recaída temprana tras trasplante alogénico<sup>63</sup>. Sin embargo, los pacientes con riesgo intermedio o alto que se habían trasplantado mostraban un SLE mejor que si no se habían sometido a trasplante. Un análisis retrospectivo realizado por Cermak *et al*/ sugiere que la combinación de la clasificación morfológica de la OMS y los criterios citogenéticos del IPSS puede ayudar a identificar un grupo de pacientes diagnosticados de anemia refractaria (AR) de alto riesgo que se podrían beneficiar de una terapia agresiva temprana, es decir, un trasplante alogénico, a pesar de la morbi-mortalidad asociada al procedimiento<sup>64</sup>. Se trataba de 11 pacientes no sometidos a trasplante hematopoyético que fueron



reclasificados como citopenia refractaria con displasia multilineal (CRDM), al aplicar los criterios de la OMS, con citogenética desfavorable, con una mediana de supervivencia de 9.2 meses frente a aquellos pacientes que con el mismo diagnóstico fueron trasplantados (supervivencia mediana = 89.3 meses).

Recientemente, los resultados obtenidos por nuevas moléculas con actividad sobresaliente en SMD demuestran estar condicionados por la citogenética de los pacientes al diagnóstico. Particularmente importante para la lenalidomida es la presencia de del(5q), en concreto la delección intersticial de 5q31.1. En un ensayo clínico con lenalidomida publicado por List *et al* en 43 pacientes con SMD con anemia sintomática o dependientes de transfusiones, 56% respondieron: 20 pacientes se tornaron independientes de transfusiones, 1 paciente incrementó su cifra de hemoglobina más de 2 g/dL y 3 pacientes redujeron su necesidad transfusional más del 50%<sup>65</sup>. La tasa de respuestas llegó al 83% entre aquellos pacientes que presentaban delección intersticial de 5q31.1 frente a un 57% en pacientes con cariotipo normal y sólo del 11% en aquellos pacientes con otras anomalías cariotípicas.

Tabla 1. Sistemas de Clasificación Citogenética Usados para Definir Grupos de Riesgo en Pacientes Jóvenes Diagnosticados de LMA.

Riesgo	MRC	SWOG/ECOG	CALGB* $\diamond$
Favorable	t(8;21) inv(16)/t(16;16) t(15;17)	t(8;21) sin del(9q) o cariotipo complejo inv(16)/t(16;16)/del(16q) t(15;17)	t(8;21) inv(16)/t(16;16) del(9q)
Intermedio	Normal del(7q) +8 del(9q) abn(11q23) +21 +22 El resto	Normal -Y +6 +8 del(12p)	Normal -Y del(5q) del(7q) t(9;11) +11 del(11q) abn(12p) +13 del(20q) +21
Desfavorable	abn(3q) -5/del(5q) -7 $\geq 5$ anomalías	abn(3q) -5/del(5q) t(6;9) -7/del(7q) t(9;22) abn(9q) abn(11q) abn(17p) abn(20q) abn(21q) $\geq 3$ anomalías	inv(3)/t(3;3) t(6;9) t(6;11) -7 +8 en solitario o con 1 anomalía adicional. t(11;19) $\geq 3$ anomalías

\*Se muestran las categorías de riesgo para SG.

$\diamond$  No se incluyeron en este análisis los pacientes con t(15;17).

Tabla 2. Clasificación del riesgo pronóstico de los síndromes mielodisplásicos según el IPSS.

Variable Pronóstica	Puntuación				
	0	0.5	1	1.5	2
Blastos MO (%)	<5	5-10	-	11-20	21-30
Cariotipo $\alpha$	Bueno	Intermed.	Malo		
Citopenias*	0/1	2/3			

$\alpha$ Bueno: normal, -Y, del(5q), del(20q); Malo: complejo (>3 anomalías) o anomalías cromosoma 7; Intermedio: Otras anomalías.

\*Hemoglobina <100 g/l, Neutrófilos <1.5 x10<sup>9</sup>/L, plaquetas <100 x10<sup>9</sup>/L.

## GENÉTICA MOLECULAR

### ***Complejo de transcripción CBF***

El complejo transcriptor CBF, constituido por dos proteínas que interactúan RUNX1 y CEBF- $\beta$ , es esencial para la hematopoyesis normal y su disrupción se ha visto implicada en la leucemogénesis. Esta disrupción es fruto de un reordenamiento cromosómico balanceado<sup>66</sup>. Se han identificado también mutaciones que afectan al gen *RUNX1* en pacientes con LMA<sup>67</sup> y mutaciones congénitas del mismo gen en pacientes con trastorno familiar plaquetario con propensión a LMA<sup>68</sup>. Como ya hemos señalado la mutación más extensamente estudiada de CBF es la t(8;21). Gracias a esta traslocación, los primeros cinco exones de *RUNX1* se encuentran fusionados al casi intacto gen *CBFA2T1*<sup>69</sup>. La proteína resultante, RUNX1-CBFA2T1 contiene el dominio homólogo runt de RNX1 que media la unión de promotores para distintos genes específicos de la hematopoyesis<sup>70,71</sup> y dominios de CBFA2T1 que interaccionan con estructuras nucleares correpressoras que median la represión de la transcripción al deacetilar histonas a través de histona deacetilasas (HDAs) y crear cambios estructurales en la cromatina<sup>72</sup>. El complejo RUNX1-CBFA2T1 carece del extremo carboxiterminal de RUNX1 con actividad intrínseca acetil-transferasa (ATH) de histonas que interaccione con factores de transcripción<sup>73</sup>. En consecuencia RUNX1-CBFA2T1 recluta deacetilasas de histonas y no ATHs a las regiones promotoras de los genes controlados por RUNX1 lo que conduce a represión de la transcripción. En el caso de inv(16) o t(16;16) se produce el mismo mecanismo al ser el complejo

CBFB-MYH11 también responsable de reclutar deacetilasas de histonas y no ATHs con la consiguiente represión de la expresión génica<sup>74</sup>. Además la proteína aberrante CBFB-MYH11 es capaz, en el dominio MYH11, de secuestrar RUNX1 e interferir la unión del ADN con CBF<sup>75</sup>.

El factor de transcripción CEBPA puede presentar, aisladamente, dos formas principales de mutaciones heterocigotas según estudios en formas familiares y esporádicas de LMA. La primera de ellas es una mutación sin sentido, *non-sense*, que alteran la región aminoterminal de la molécula creando una proteína truncada con pérdida de función. La segunda forma afecta el patrón de lectura de la transcripción del dominio carboxiterminal, en concreto de la región básica rica en leucina con función "cremallera", *zipper*, impidiendo la interacción de la proteína CEBPA con el ADN o su actividad de dimerización<sup>76</sup>.

Desde un punto de vista pronóstico y, como ya hemos comentado, estos pacientes se benefician de tratamientos de inducción y consolidación con altas dosis de Ara-C<sup>32,33</sup>. Por otra parte, hasta en cuatro estudios, se ha descrito que los pacientes jóvenes diagnosticados de LMA con riesgo citogenético intermedio tienen mejor pronóstico si existen mutaciones de *CEBPA*<sup>77,78,79,80</sup>.

Desde el punto de vista terapéutico, el reclutamiento de HDAs por en la patogénesis de las LMA con CBF mutado sugiere el uso de inhibidores de HDAs para reestablecer la transcripción, algo experimentalmente ya probado<sup>81</sup>.

Este abordaje ya se está probando en ensayos clínicos<sup>82</sup>.

Los reordenamientos de AML1 parecen jugar un papel importante en la leucemogénesis de la LMA y los SMD secundarios a radiación y a terapia antineoplásica<sup>83</sup>. Algunos autores han encontrado asociación con la presencia de del(7q)<sup>84</sup>.

Recientemente, varios grupos ha publicado estudios describiendo una alta incidencia de mutaciones puntuales somáticas de RUNX1 en pacientes con SMD especialmente AREB, AREB-t y LMA secundarias<sup>85,86,87</sup>. Estos pacientes presentan un pronóstico peor que los que no tienen las mutaciones. Un reciente estudio muestra que los pacientes con SMD/LMA y mutaciones puntuales de RUNX1 también presentan más frecuentemente mutaciones en los genes FLT3, N-RAS, PTPN11 y NF1 y consecuentemente activación de la ruta tirosina-kinasa (PTK) dependiente de RAS<sup>88</sup>. Por todo ello sugieren la creación de una nueva categoría llamada SMD/LMA con mutación AML1.

### ***Mutaciones de RAS***

KRAS, NRAS y HRAS constituyen una familia de proteínas acopladoras de nucleótidos guanina y sus rutas de transcripción de señales son activadas por múltiples receptores de citoquinas hematopoyéticas al unirse su ligando. Todo ello le confiere a esta familia un papel destacado en la proliferación y supervivencia de los progenitores hematopoyéticos<sup>89</sup>.

Las mutaciones oncogénicas de *NRAS* y *KRAS* están presentes en aproximadamente el 25% y el 15% de los pacientes diagnosticados de LMA, respectivamente. Se trata de mutaciones de nucleótido simple (*SNPs*) que suponen sustituciones de aminoácidos en los codones 12, 13 y 61 inhabilitando la actividad intrínseca GTPasa de RAS y logrando su activación intrínseca<sup>90</sup>. En ausencia de mutaciones, RAS también puede ser activado por la hiperactividad de rutas como las de KIT o FLT3<sup>91</sup>.

El papel pronóstico que puedan jugar las mutaciones de *RAS* en la LMA no es concluyente en la literatura<sup>92,93,94</sup> pero resulta una diana atractiva desde el punto de vista terapéutico. *RAS* requiere una serie de modificaciones post-traducción que incluye la adición de un residuo lipídico farnesilo que le permitirá la traslocación a la membrana plasmática para ejercer su función. Varios inhibidores de la farnesil-transferasa, responsable de este cambio post-traducción, se están probando en ensayos clínicos con diversa fortuna<sup>95</sup>.

Como ya hemos señalado, los pacientes con SMD/LMA y mutaciones de puntuales de *RUNX1* también presentan más frecuentemente mutaciones en los genes *N-RAS*. Algunos autores señalan que la adquisición de mutaciones en *RAS* está frecuentemente asociada a la progresión desde SMD a LMA<sup>96</sup>. Esto parece demostrado en un estudio de Shih *et al* en 70 muestras pareadas al diagnóstico de SMD y en el momento de transformación a LMA al incrementarse significativamente la frecuencia de estas mutaciones, y las activadoras de *FLT3*, en el momento de transformación<sup>97</sup>. La experiencia publicada en SMD señala que la presencia de mutaciones de *RAS* en SMD primarios y las LMAs secundarias a SMD confiere un peor pronóstico<sup>95,98</sup>. De forma complementaria, algunos autores han encontrado un incremento en la expresión del gen *RAB20*, de la familia de *RAS* kinasas, en pacientes con SMD *de novo* mediante *chips* de DNA<sup>99,100</sup>. La experiencia clínica en SMD con inhibidores de la farnesil-transferasa tampoco ha resultado demasiado brillante objetivándose sólo un 11% de respuestas en un estudio phase II con Zarnestra®<sup>101</sup>.

## ***Mutaciones de KIT***

El 80%, aproximadamente, de los blastos de cualquier paciente con LMA o SMD expresa KIT, un receptor con actividad tirosina-kinasa (TK) para el ligando *stem cell factor* (SCF)<sup>102,103</sup>. Las mutaciones del exón 8 de *KIT*, que se localizan en su porción extracelular, o aquéllas que afectan al codón 816 del dominio de activación del sitio activo se detectan en el 20-30% de los pacientes con t(8;21) o inv(16)/t(16;16)<sup>104,105</sup>. Experimentos *in vitro* han demostrado que las mutaciones de la porción extracelular de KIT provocan una dimerización espontánea del receptor y su activación lo que provoca una cascada de activación de efectores como proteína-kinasa activadas por mitogenos (MAPK) y PIK3 en respuesta al estímulo de SCF<sup>106</sup>. Por otra parte, las mutaciones del codón 816 inducen la activación constitutiva de STAT3 (transductor de señales y activación de la transcripción 3) y un aumento en la expresión de dianas de STAT3 como BCL-XL y MYC. Esta mutación también activaría la ruta PIK3/AKT pero no MAPK<sup>107</sup>.

La presencia de mutaciones en el exón 8 de KIT en pacientes con t(8;21) o inv(16)/t(16;16) impacta negativamente en el pronóstico al incrementar la tasa de recaídas<sup>90</sup>. Estudios recientes sugieren que la asociación de inhibidores de tirosina-kinasas competitivos del ATP como imatinib o dasatinib podría ser ventajosa para este subgrupo de pacientes<sup>108</sup>. Hasta el momento la presencia de mutaciones de c-KIT en los SMD no ha demostrado un papel pronóstico, probablemente por su escasa incidencia.



## ***Mutaciones de MLL***

El gen *MLL* (leucemia de linaje mixto) localizado en 11q23 se fusiona a diversos genes mediante traslocaciones cromosómicas en las leucemias agudas<sup>109</sup>. A día de hoy se han identificado más de 40 genes distintos como *partners* de *MLL*<sup>110</sup>. El gen *MLL* está codificado por 100 kb de ADN pero casi todos los puntos de ruptura se localizan en una región de 8.3 kb<sup>111</sup>. La fusión de extremo aminoterminal del *MLL* al extremo carboxiterminal del *partner* genera una proteína quimérica aberrante clave en la leucemogénesis. La traslocación más común que afecta a 11q23 en LMA es la t(9;11)(p22;q23)<sup>112</sup> que crea el transcrito de fusión *MLL-AF9*<sup>113</sup>. Otras traslocaciones frecuentes son: t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p12;q23), t(11;19)(q23;p13.1) y t(11;19)(q23;p13.3) que resultan en los transcritos de fusión *MLL-AF6*, *MLL-AF10*, *MLL-ELL* o *MLL-ENL*, respectivamente<sup>114,115,116,117</sup>. Además de estas traslocaciones recíprocas, *MLL* se puede reordenar generando una duplicación parcial en tandem, *MLL-PTD*, que no se detecta por citogenética convencional y es indetectable por FISH.

En un estudio reciente en 114 pacientes diagnosticados de LMA *de novo* con mutaciones de *MLL*<sup>118</sup>, la mediana de supervivencia para los pacientes con *MLL-PTD* fue significativamente inferior (3,8 meses) a la de los pacientes con traslocaciones que afectaban 11q23 (9 meses). No se detectaron diferencias en términos de tasa de RC, SG, duración de la RC y SLE. Tampoco se encontraron diferencias pronósticas significativas entre los adultos con *MLL-AF9* y cualquier otra traslocación que afectara a 11q23. Sí se encontraron

diferencias en tasa de RC, duración de la RC, SLE y SG entre adultos y niños con mutaciones del gen *MLL* a favor de la edad pediátrica.

Los reordenamientos de *MLL* son muy poco frecuentes en los SMD *de novo*<sup>119</sup>.

Recordemos que la presencia de traslocaciones balanceadas que alteran 11q23 son típicas de las leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios a agente quimioterápicos y, en concreto, a inhibidores de la topoisomerasa-II. Se trata de neoplasias mieloides con pronóstico muy malo pero escapan del objetivo de este estudio<sup>120</sup>.

### ***Mutaciones de p53***

El gen supresor de tumores *p53* integra numerosas señales que controlan la proliferación celular normal y la apoptosis. *p53* funciona como un factor de transcripción al unirse a ciertas secuencias del ADN regulando la transcripción de genes diana involucrados en el control del ciclo celular, reparación de ADN y apoptosis. En respuesta a cualquier injuria al DNA y otras formas de estrés, *p53* promueve la frenada del ciclo celular en la transición G1/S o G2/M o la apoptosis. En condiciones fisiológicas la actividad de *p53* se encuentra reprimida por MDM2 mediante interacción física de las dos proteínas, y *p53* crea una retroalimentación positiva sobre la transcripción de MDM2 por lo que se considera que estos dos genes se autoregulan de manera independiente. Hay datos que sugieren que *p53* disminuye la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2 e incrementa la expresión de la proteína pro-apoptótica BAX<sup>121</sup>.

El anti-oncogen *p53* se encuentra frecuentemente mutado en las neoplasias humanas pero nos es frecuente que así ocurra en la LMA (sólo 9%). La mayoría de estas mutaciones son sin sentido (*missense*). En LMA, más del 90% de los pacientes tienen *p53 wt*, pero sí éste está mutado o eliminado por deleción, los pacientes pueden presentar enfermedad quimiorresistente<sup>122,123</sup> y mal pronóstico, incluso ha sido descrito como factor pronóstico independiente ( $p=0.005$ )<sup>124,125,126</sup>. De nuevo, la frecuencia de mutaciones de *p53* está incrementada en la LMA secundaria a SMD o en los SMD secundarios a tratamientos antineoplásicos, se encuentra asociada a -5q, -7q<sup>127</sup>, -17p<sup>131</sup>, lógicamente, y a cariotipos complejos, edad avanzada y pronóstico infausto<sup>128</sup>.

El papel que *p53* pueda estar jugando en la leucemogénesis de los SMD *de novo* permanece esquivo. Buena prueba de ello es el amplio rango de frecuencias reportados en las distintas series (0-25%). Parece que las mutaciones de *p53* son más frecuentes en formas avanzadas de mielodisplasia<sup>129</sup>. Sin embargo otros autores han encontrado estas mutaciones en fases más tempranas de la enfermedad y asociados a cariotipos complejos<sup>130</sup>. La inexistencia de pruebas que demuestren que las mutaciones de *p53* juegan un papel pronóstico en los SMD se debe, muy probablemente, a su escasa frecuencia y a lo corta que son las series publicadas hasta la fecha.

## ***Mutaciones de PU.1***

Un miembro de la familia *ets* de factores de transcripción, PU.1, ha sido recientemente involucrado, por distintos mecanismos, en la leucemogénesis. Se trata de un factor transcripcional se encuentra más expresado durante el desarrollo hematopoyético y se expresa específicamente en células mieloides maduras y linfocitos B<sup>131</sup>. Durante la maduración hematopoyética, un conjunto importante de genes incrementa su expresión debido a la acción de PU.1 especialmente, en la línea mieloide, el receptor de GM-CSF<sup>132</sup>. La sobre-expresión de PU.1 en progenitores eritroides bloquea su diferenciación y genera una eritroleucemia en modelos murinos<sup>133</sup>. El bloqueo de la expresión de PU.1 por métodos moleculares conduce a un fallo de maduración mieloide y la producción in vitro de colonias mieloides<sup>134</sup>. Experiencias en ratones con disrupción de ambos alelos de PU.1 muestra serios defectos en la maduración mieloide y linfoide dándose ausencia de macrófagos, linfocitos B y una aparición retrasada de neutrófilos<sup>135</sup>. La reducción de un 80% en la expresión de PU.1 en ratones es suficiente para causar LMA en ratones<sup>136</sup>. A nivel clínico, parece que existe una relación inversa entre la expresión de *Flt3* y la de PU.1. La sobre-expresión de PU.1 suprime la expresión del gen promotor de *Flt3*<sup>137</sup>. Por otra parte, aunque no es objeto de este estudio, PU.1 está claramente suprimido por PML/RAR $\alpha$  en la LPA<sup>138</sup>.

Diversos grupos han reportado frecuencias variables de mutaciones de PU.1 en series de pacientes<sup>139,140</sup>. Hasta el momento no se ha establecido su papel pronóstico en la LMA ni en los SMD.

### ***Mutaciones de nucleofosmina***

La nucleofosmina (NPM) es una proteína de transporte nucleocitoplasmática codificada por el gen *NPM1* localizado en el cromosoma 5q35. Fisiológicamente participa de la ribogénesis y la duplicación centrosómica, regula la ruta del gen supresor de tumores de Patrón Alternativo de Lectura (ARF) relacionado con p53 y juega un papel estelar en la embriogénesis y el mantenimiento de la estabilidad genómica<sup>141</sup>. Las mutaciones del extremo carboxiterminal de NPM que permite su presencia anómala en el citoplasma se ha detectado en el 35% de los pacientes con cariotipo normal. Este fenómeno se ha establecido recientemente como factor pronóstico favorable al predecir una buena respuesta a la quimioterapia de inducción<sup>142</sup>. Se desconoce la incidencia y el papel pronóstico de este factor en los SMD y sólo existen reportes anecdóticos<sup>143</sup>.

### ***Mutaciones de Flt3***

El gen no mutado (*wild type* o *wt*) *flt3*, conocido también por tirosina-kinasa *fms-like 3*, codifica un receptor con actividad tirosina-kinasa de clase III que se expresa casi exclusivamente en células hematopoyéticas de manera fisiológica. La tirosina-kinasa *fms-like* es clave en la proliferación de las células troncales, su diferenciación y supervivencia<sup>144</sup>.

La presencia de mutaciones de *flt3* han sido implicadas, *in vitro*, en la leucemogénesis<sup>145</sup>. Estas mutaciones determinan que FLT3 permanezca

constitutivamente activado fosforilando proteínas responsables de la transducción de señales de distintas vías. Dianas de esta actividad intrínseca tirosín-kinasa son STAT5 y la ruta de Ras/MAPKs, incluyendo C-jun y C-raf<sup>146</sup> lo que conduce al fenotipo maligno. Las mutaciones más frecuentes de *flt3* son las duplicaciones internas en tándem (ITD), que es además la mutación más frecuente descrita en la LMA del adulto, presente en un 20-30% de los pacientes. Esta mutación afecta al dominio juxtamembranoso<sup>147</sup> de *flt3* y reduce la expresión de CEBPA, PU.1 y tirosina-fosfatasas (PTPs) implicadas en la diferenciación mieloide<sup>148</sup>. En las mutaciones puntuales simples como D835, D836 o Y842C se produce un cambio en el sitio de activación del segundo dominio tirosina-kinasa<sup>149,150</sup>. La mutación ITD ha demostrado, en general, conferir mal pronóstico en LMA<sup>151</sup>. La mutación D835 es menos frecuente (6%) y su perfil pronóstico está menos definido, incluso en grandes series de pacientes, probablemente por su baja incidencia y al ser distinto el mecanismo de trasducción de señales implicado<sup>152,153,153,154</sup>. Recientes abordajes con tecnología de *chips* de DNA han permitido redefinir grupos pronósticos para la SLE en base a la ratio de expresión de los genes RUNX y ATRX, independientemente de si se trata de mutaciones en ITD o puntuales del dominio de activación<sup>155</sup>. Existe un grupo pequeño de pacientes (1-2%), pero significativo, que expresa ambas mutaciones<sup>156</sup>. También se han descrito mutaciones puntuales que afectan al exón 14<sup>157</sup> pero se desconocen sus implicaciones fisiopatológicas. Además, se han descrito un mecanismo autocrino de estimulación mediada por *flt3*-ligando en algunos pacientes diagnosticados de LMA. En estos pacientes se detectan altos niveles de

expresión de *flt3*, pero en ausencia de mutaciones, y sobreexpresión de *flt3* wt<sup>158</sup>.

Ahondando en el punto de vista pronóstico diversos estudios han demostrado que la mutación FLT3/ITD está asociada a un riesgo incrementado de recaída y de supervivencia recortada para un grupo de pacientes que, de otro modo, habrían sido clasificados, erróneamente, con riesgo idéntico al de los pacientes con cariotipo normal<sup>151,159,160</sup>. Un meta-análisis reciente muestra que el cociente de riesgo (*hazard ratio*) para la SLE es de 1,88 (intervalo de confianza 95%: 1,58-2,23;  $p < 0,001$ ) para cualquier mutación de FLT3, 1,86 (intervalo de confianza 95%: 1,52-2,29;  $p < 0,001$ ) para FLT3/ITD y de 1,90 (intervalo de confianza 95%: 1,40-2,60;  $p < 0,001$ ) para las mutaciones puntuales del dominio de activación de FLT3<sup>161</sup>. También el tamaño de la región amplificada en ITD parece tener importancia pronóstica ya que este puede variar de 3 a cientos de nucleótidos siendo peor cuanto mayor (>40 nucleótidos) sea dicha región amplificada<sup>162</sup>. Los pacientes con niveles bajos o nulos de FLT3 wt parecen tener un pronóstico particularmente infausto<sup>163</sup>. De forma interesante se ha visto una correlación positiva entre la presencia de mutaciones de FLT3 y conocidos marcadores pronósticos negativos "clásicos" en la LMA como leucocitosis, porcentaje de blastos en sangre periférica y médula ósea, y niveles séricos de LDH<sup>157,164</sup>.

Por otra parte, la presencia de mutaciones FLT3/ITD parece también influir el pronóstico de los pacientes jóvenes sometidos a trasplante alogénico. En un estudio de de Labarthe *et al* FLT3/ITD es descrito como el factor pronóstico peyorativo principal para obtener una segunda remisión completa y la supervivencia<sup>165</sup>. Los autores abogan por adelantar la consideración de estos

pacientes para trasplante alogénico en la primera RC. Esta conclusión parece refrendada por el trabajo de Gale *et al*/ del grupo MRC en 1135 pacientes diagnosticados de LMA<sup>166</sup>. Sin embargo, FLT/ITD carece de valor pronóstico en los pacientes autotrasplantados en primera RC<sup>167</sup>. Se ha confirmado que FLT3/ITD confiere mal pronóstico en la LMA en edad pediátrica<sup>168</sup> pero su papel es irrelevante en niños que presentan t(8;21)<sup>169</sup>. También se están empleando los niveles de expresión de FLT3 como un marcador válido de enfermedad mínima residual (EMR) pero con resultados controvertidos ya que sólo la PCR específica para FLT3/ITD resulta de interés<sup>170,171</sup>. Un estudio reciente ha correlacionado positivamente otro marcador genético pronóstico de LMA, NPM-1, ya analizado en esta monografía, con FLT3/ITD. La no presencia de FLT3/ITD en pacientes con mutaciones de NPM-1 confiere un pronóstico favorable<sup>172</sup>.

El significado pronóstico de FLT3/ITD en SMD parece poco relevante, especialmente por su escasa incidencia<sup>173,174</sup>, aunque sí parece bien establecido que se daría más frecuentemente en pacientes con SMD avanzado, por ejemplo, AREB, sería una lesión genética adquirida tardíamente en la patogénesis y se asocia a mutaciones de RAS<sup>97</sup>. Algunos autores han encontrado una asociación positiva entre la presencia de mutaciones de FLT3/ITD, una rápida progresión a leucemia aguda y una supervivencia más corta<sup>175,176</sup>. En relación con este dato y a favor de un posible mecanismo de autoretroalimentación en fases avanzadas de la enfermedad, se ha visto que los pacientes con AR son los que expresan, mediante ELISA, mayores niveles de FLT3 ligando<sup>177</sup>.



Desde el punto de vista terapéutico ya existe amplia experiencia, al menos en forma de ensayos clínicos fase I y II, con inhibidores de FLT3. Varios nuevos compuestos están demostrando una moderada actividad antileucémica como Tandutinib (MLN518/CT53518)<sup>178</sup>, SU5416<sup>179</sup> o más marcada como el SU11248<sup>180</sup> o CEP-701<sup>181</sup>. PKC412 ha demostrado un perfil de eficacia y toxicidad interesante en pacientes no tratables con quimioterapia convencional por razones de edad o comorbilidad<sup>182</sup>. Se ha demostrado, *in vitro*, que la coexistencia de mutaciones ITD y las puntuales del dominio de activación confiere resistencia a los inhibidores de FLT3 gracias a hiperfosforilación constitutiva de STAT5, pero esta resistencia es reversible en combinación con rapamicina<sup>183</sup>. Ya se empiezan a describir, como con otros fármacos frente a dianas moleculares, algunas mutaciones de FLT3 que confieren resistencia clínica a estos compuestos. Un ejemplo de estos mecanismos de resistencia es N676K, en el dominio kinasa de FLT3, que confiere resistencia a PKC412<sup>184</sup>.

### ***Expresión de SHP-1 (PTPN6)***

La proteína-tirosina fosfatasa (PTP) SHP-1 está codificada por el gen *PTPN6* y se localiza en el brazo corto del cromosoma 12. Se expresa predominantemente en las células hematopoyéticas y juega un papel clave en la contrarregulación de ciertas rutas de trasducción de señales a partir de la unión de citocinas y factores de crecimiento a sus receptores en la superficie celular. Este es el mecanismo contrarregulador descrito para la eritropoyetina,

interleukina-3, interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$ , factor estimulador de colonias-1 (CSF-1), factor de células troncales (SCF), TCR y BCR<sup>185,186,187,188,189,190</sup>

La pérdida de su función mediante mutaciones de ocurrencia natural como el caso de los ratones "apolillados" (*motheaten*) o por la pérdida de su sitio de unión en el extremo carboxiterminal del receptor eritropoyetina en policitemia familiar va acompañados de hiperproliferación y activación anormal de las células mieloides, monocitoides y eritroides<sup>191,192</sup>. Estas anomalías se han repetido cuando se expresaron formas *dominant-negative* de SHP-1 en células totipotenciales embrionarias<sup>193</sup>.

Desde el punto de vista clínico no conocemos, en toda su extensión, la importancia que la expresión de SHP-1 puede tener en la patogenia de las neoplasias mieloides. Se han descrito errores de transcripción como hiperedición y *splicing* alternativo en pacientes diagnosticados de LMA<sup>194</sup>.

Cuando los pacientes alcanzaron remisión completa se redujo dramáticamente la frecuencia de estos acontecimientos. Por otra parte se ha descrito la metilación aberrante del promotor de PTPN6 en un 11% de pacientes con LMA<sup>195</sup>. Otro posible mecanismo de pérdida de función de SHP-1 descrita en pacientes con LMA son las mutaciones *missense* y los polimorfismos de nucleótido simple (SNP)<sup>196</sup>.

Recientemente, Chen et al<sup>197</sup> han propuesto un nuevo mecanismo de leucemogénesis implicando las dos últimas rutas expuestas en esta memoria. Según estos autores la activación constitutiva de la actividad tirosina-kinasa, cuando se encuentra presente la mutación FLT3/ITD, no solo incrementa el contenido citoplasmático de proteínas fosforiladas en residuos tirosina lo que conduce a un incremento en la proliferación y supervivencia de los blastos, si

no que además se suprimiría el mecanismo contrarregulatorio que supone la actividad de la tirosina-fosfatasa SHP-1.

Hasta el momento, se desconocen las implicaciones que podrían tener la expresión de SHP-1 y su modulación por las mutaciones activadoras de FLT3 en el pronóstico de los pacientes con neoplasias mieloides.

Tabla 3. Anomalías genéticas detectadas frecuentemente en pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides y su significación pronóstica.

Anomalía genética	Importancia pronóstica	Bibliografía seleccionada
<u>Efecto negativo</u>		
FLT3/ITD	SG y DRC sig. más corta.	157
FLT3 <sup>ITD</sup> / <sup>-*</sup>	SLE y SG sig. más corta.	164
MLL DPT	SG sig. más corta.	119
Mutación KIT	↑ % recaídas.	90
Mutación p53	Quimiorresistencia	124
<u>Efecto positivo</u>		
Mutaciones CBF	DRC y SG sig. más larga	79
Mutaciones NPM-1	↑ % RC	143
<u>No concluyente</u>		
Mutaciones RAS		92,94
<u>Desconocido</u>		
PTPN6		195

Abreviaturas: SG, supervivencia global; DRC, duración de la remisión completa; SLE, supervivencia libre de enfermedad; RC, remisión completa; ITD, duplicación interna en tándem; DPT, duplicación en tándem.

\* Pacientes con neoplasias mieloides FLT3/ITD que carecen de expresión de alelo *wild-type*.

## B. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### I. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

En pacientes diagnosticados de LMA *de novo*, la presencia de mutaciones de FLT3 que confieren una actividad intrínseca tirosina-kinasa está asociada a un riesgo incrementado de recaída, una supervivencia recortada y permite la segregación de un grupo de pacientes con peor pronóstico a pesar de tener citogenética normal.

La expresión de la proteína-tirosina-fosfatasa SHP-1 está disminuida en los pacientes con síndromes mielodisplásicos, esta disminución en la expresión es mayor en los pacientes con SMD más avanzados y tiene un impacto pronóstico significativo en la progresión de enfermedad y en la supervivencia global.

De acuerdo con el modelo de leucemogénesis en neoplasias mieloides propuesto por Chen et al<sup>198</sup> los pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides portadores de mutaciones activadoras de FLT3 tienen abolida o disminuida la expresión del gen PTPN6 lo que confiere un peor pronóstico al tratarse de entidades más agresivas caracterizadas por una gran masa tumoral y leucocitosis.

## II. OBJETIVOS.

1. Demostrar, en pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides *de novo*, que la presencia de mutaciones activadoras de FLT3 supone un factor pronóstico desfavorable especialmente para aquellos pacientes con cariotipo normal.
2. Demostrar que la expresión del gen *PTPN6* se encuentra disminuida o abolida en las células hematopoyéticas de los pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides, que ésta se encuentra en relación con el estadio de enfermedad y constituye un factor pronóstico en la evolución de los síndromes mielodisplásicos.
3. Demostrar que la presencia de mutaciones de FLT3, especialmente FLT3/ITD, supone la supresión o reducción de la expresión del gen *PTPN6* en pacientes con neoplasias mieloides.
4. Demostrar que la coincidencia en determinados pacientes de ambas lesiones moleculares permite definir un subgrupo de neoplasias mieloides con características biológicas y clínicas agresivas con un impacto pronóstico negativo.

## C. MÉTODOS DE ESTUDIO

### ESTUDIOS CLÍNICOS

La recogida de datos clínicos de esta tesis doctoral se realizó mediante:

1) seguimiento y evaluación clínica de los pacientes durante el ingreso y 2) seguimiento en consultas externas. La evaluación clínica incluyó analítica rutinaria (hemograma y bioquímica) así como aspirado y/o biopsia de médula ósea al diagnóstico y al día +14 tras el inicio de la terapia de inducción, en el caso de los pacientes tratados; y , 2) revisión de la historia clínica previa. Los 338 pacientes estudiados provenientes de 5 Instituciones Españolas y 2 norteamericanas fueron clasificados según la propuesta FAB (French-American-British)<sup>198</sup>, la clasificación de la OMS<sup>47</sup> y el IPSS<sup>10</sup>. Al diagnóstico, 244 pacientes presentaban una LMA *de novo* no promielocítica, 19 pacientes con LMA-M3, 25 pacientes con LMA secundaria (de los cuáles nueve eran secundarios a terapia previa y 16 a SMD) y 50 pacientes diagnosticados de SMD no evolucionados a AML. Los pacientes que fueron tratados por LMA *de novo* no promielocítica fueron incluidos en diferentes esquemas de quimioterapia de inducción fundamentalmente antraciclinas más citarabina, con o sin etopósido. El tratamiento posterior se planificó de acuerdo con la respuesta en el día +14 y la citogenética al diagnóstico. Brevemente, los pacientes con cariotipo normal, t(8;21) o inv(16) y buena respuesta a la quimioterapia en el día +14 (<5% de blastos en una médula hipoplásica) se les dio una quimioterapia de consolidación y fueron autotrasplantados. Los pacientes que no movilizaron no recibieron tratamiento adicional. El trasplante

alogénico fue reservado para pacientes sin cariotipo favorable. El trasplante de donante no emparentado se autorizó en aquellos pacientes con cariotipo de alto riesgo como las alteraciones del cromosoma 5 ó 7. Los pacientes tratados por SMD incluidos en este estudio recibieron el esquema FLAG-IDA-97 de PETHEMA<sup>4</sup>. El resto de pacientes no tratados con quimioterapia solo recibió tratamiento de soporte.

Todos los datos se almacenaron para su posterior análisis en una base de datos MS Access 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU).

## **ESTUDIOS CITOGENÉTICOS**

A partir de muestras de aspirado de médula ósea se practicó un cultivo, a corto plazo, según las recomendaciones del International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1995)<sup>199</sup>. Se estudiaron, al menos, 20 metafases por muestra. Se establecieron grupos de riesgo citogenético para los pacientes diagnosticados de LMA de acuerdo con los criterios de MRC<sup>15</sup> y para los pacientes diagnosticados de SMD se siguieron los criterios del IPSS<sup>10</sup>.

## ESTUDIOS MOLECULARES

Los métodos de estudio molecular empleados en esta tesis han sido: PCR convencional, RT-PCR, PCR cuantitativa o *real-time PCR (RQ-PCR)* y DNA *fingerprinting* con endonucleasas de restricción.

A partir de muestras de aspirado de médula ósea, y en las 24 hrs siguientes a su obtención, se realizó el aislamiento de la capa mononuclear mediante centrifugación basada en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Upsala, Suecia). Las células recogidas se suspendieron en una solución de tiocianato de guanidino y se almacenaron a -80°C. El ADN se aisló mediante el procedimiento salino descrito por Miller et al<sup>200</sup>. El ARN se aisló mediante el procedimiento fenol-cloroformo descrito por Chomczynski and Sacchi<sup>201</sup>. Para la RT-PCR, 0,5 µg de ARN fue sometido a una transcripción reversa mediante TaqMan Gold RT-PCR Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).



## ***Detección de FLT3/ITD***

Se realizó mediante PCR convencional gracias a los cebadores descritos por Nakao et al.<sup>202</sup> y electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. (Figura 1)

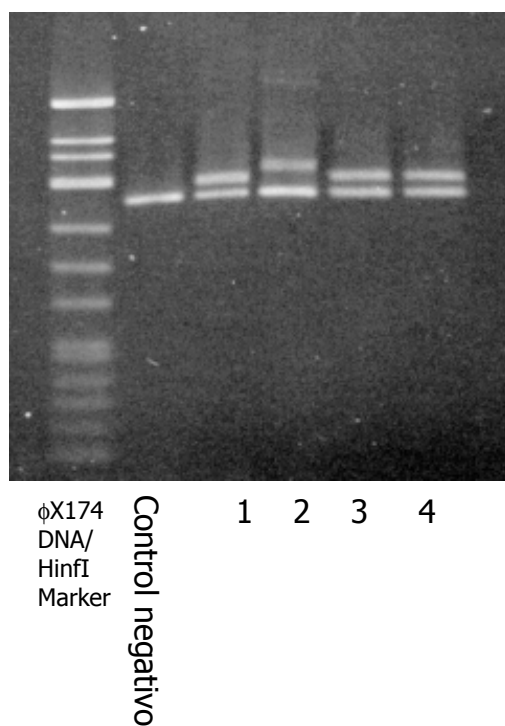


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la detección de fragmentos de distinto tamaño de FLT3/ITD tras PCR específica.

### ***Detección de la mutación FLT3/D835***

Para la detección de la mutación FLT3/D835 se amplificó, sobre muestras de DNA, una región de 114 pares de bases del exón 17 del gen FLT3 empleando los cebadores 17F y 17R descritos por Yamamoto et al<sup>150</sup>. El producto amplificado fue, a continuación, digerido por la endonucleasa de restricción EcoR V (Promega, Madison, WI, EEUU). Cuando el exón 17 WT era el amplificado, la digestión producía dos fragmentos de 68 y 46 pares de bases. La presencia de mutaciones D835 o I836 impide la digestión del fragmento amplificado mostrando un producto de 114 pares de bases y también los fragmentos de 68 y 46 pares de bases del alelo WT (Figura 2). En casos dudosos se confirmó la presencia de FLT3/D835 mediante secuenciación con el hardware ABI PRISM 7300 Sequence Detection Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

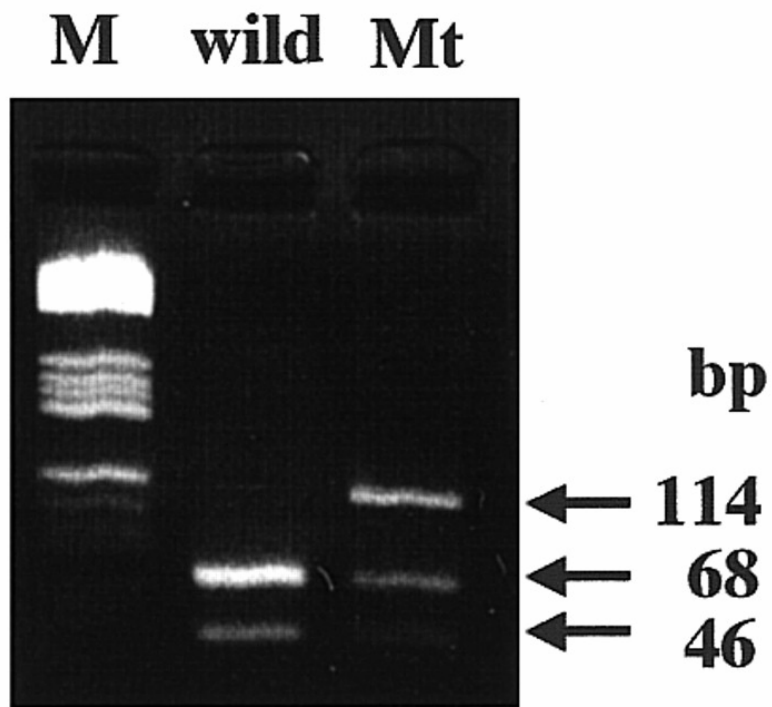


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la detección de FLT3/D835. La amplificación de una región de 114 pares de bases del exon 7 y su posterior digestión con EcoR V genera dos fragmentos de 68 y 46 pares de bases en el caso del WT (carrera wild). Si existe mutación D835 o I836 (carrera Mt) no se produce la digestión del alelo mutado.

### ***RQ-PCR de SHP-1 (PTPN6)***

La PCR cuantitativa en tiempo real del gen *PTPN6* se realizó mediante el ABI PRISM 7300 Sequence Detection Instrument y su software *ad hoc*. Los niveles de expresión génica fueron normalizados al gen *housekeeping GAPDH*. Las sondas específicas TaqMan® y los cebadores específicos para el gen diana y el control estaban disponibles comercialmente (Assay-on-Demand™ Gene Expression Products, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Dichas cuantificaciones se realizaron en tubos aparte para cada gen y por duplicado para cada muestra. Se empleó el software TaqMan® para el cálculo del valor dintel (*Ct*) (Figura 3) de cada muestra según las recomendaciones del fabricante. Se emplearon las medias de las replicas para el cálculo del *Ct*. La expresión génica fue calculada mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$ . Básicamente, se restó a la expresión del gen de interés (*PTPN6*) el del control *GAPDH* y se expresó como  $\Delta Ct$ . A continuación se elevó 2 a  $-\Delta Ct$ .

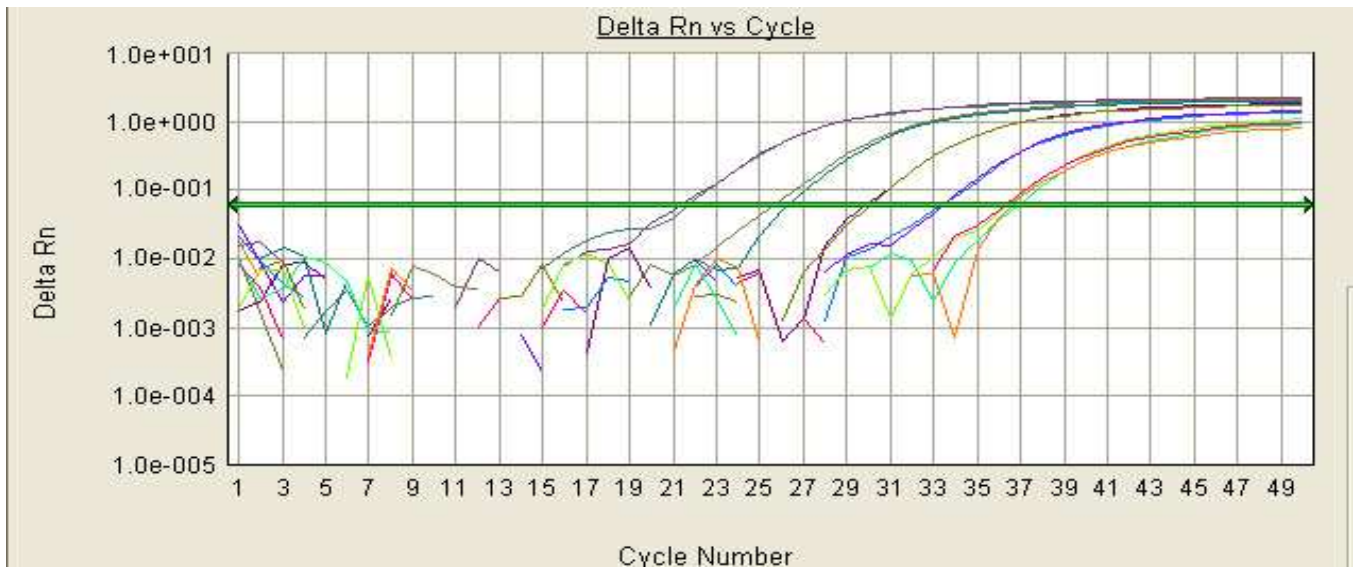


Figura 3. Captura de pantalla del software ABI-PRISM 7300 System SDS mostrando las curvas de amplificación de la RT-PCR de los PTPN6 y GAPDH en pacientes diagnosticados de LMA y SMD.

## **ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS**

Se emplearon biopsias de médula ósea al diagnóstico. Las médulas fueron fijadas, descalcificadas e incluidas en parafina mediante protocolos estándar y se realizaron las técnicas histológicas e histoquímicas rutinarias como parte del proceso diagnóstico del paciente.

### ***Inmunohistoquímica para SHP-1***

Sobre cortes de biopsias de MO de 5µm de grosor se emplearon técnicas estándar de inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal de conejo anti-SHP-1 disponible comercialmente (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, EEUU) diluido al 1:200. Como anticuerpo secundario se empleó una IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa (Dakocytomation, Glostrup, Dinamarca) y se reveló con DAB (Vector Labs, Burlingame, CA, EEUU). (Figura 4).

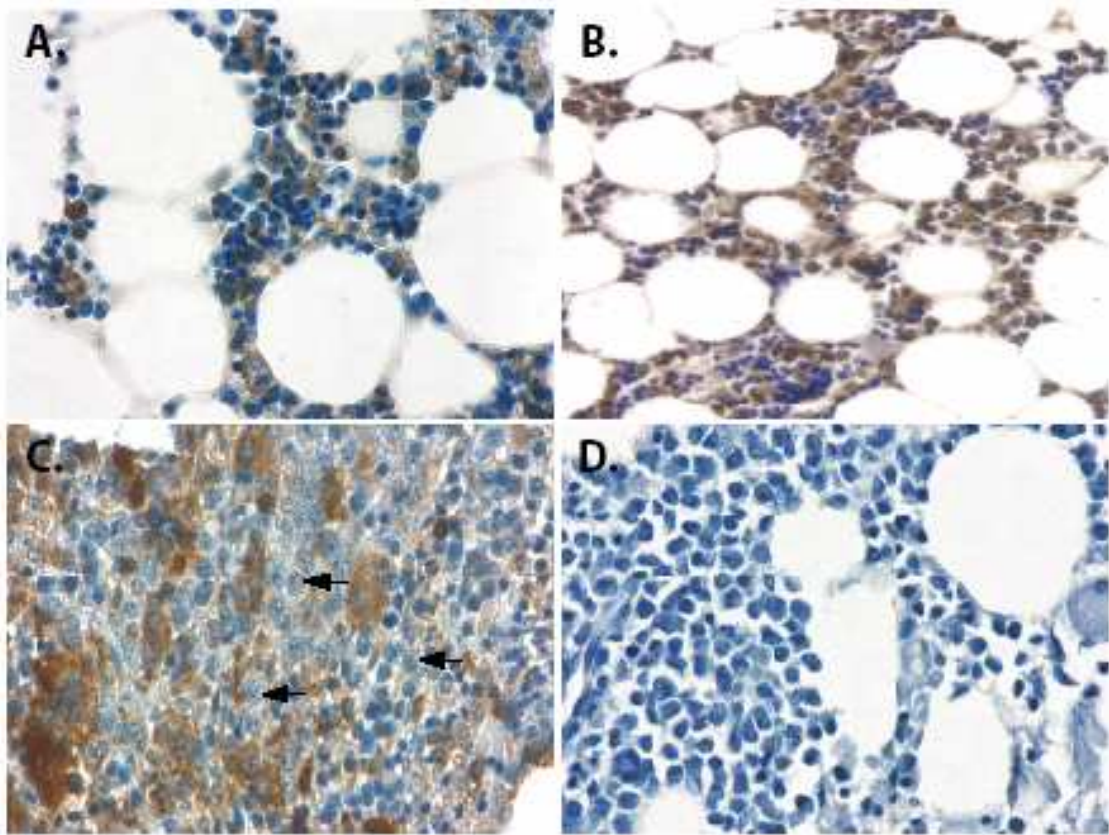


Figura 4. Tinción mediante inmunohistoquímica de SHP-1 en la médula ósea de: un control sano (**A**), un paciente diagnosticado de anemia refractaria (AR) (**B**), un paciente diagnosticado de anemia refractaria con exceso de blastos-I (AREB-I)(**C**), y un paciente diagnosticado de LMA secundaria a SMD(**D**).

## **ESTUDIOS ESTADÍSTICOS**

La correlación entre variables cuantitativas se realizó mediante los tests de Spearman y Pearson. Para determinar la correlación entre variables cualitativas se empleó el test de Fisher. Para la estimación de la supervivencia global, SLE, DRC y tiempo a la progresión (TTP) se empleó el método de Kaplan-Meier y para las comparaciones entre grupos se utilizó el test log-rank y el log-rank estratificado. El análisis multivariante se realizó según el modelo de riesgos proporcionados de Cox. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas si  $p < 0.05$  en un test de dos colas.

Los análisis estadísticos presentados en estos trabajos se han realizado bajo las plataformas BMDP Statistical Library (BMDP Statistical Software, Los Angeles, CA, EEUU) y SPSS 13.0 Statistical package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

### **Consideraciones éticas**

La recogida de datos clínicos, muestras biológicas y participación en ensayos clínicos terapéuticos expuestos en esta memoria han requerido el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación de los Comités Éticos de los Centros participantes en estos estudios (Hospital La Fe, Valencia; Scripps Clinic, La Jolla, CA, EEUU; Hospital General Universitario, Alicante; Hospital Dr Peset, Valencia; Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba).



## D. RESULTADOS

### INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES DE FLT3

El análisis de mutaciones de FLT3 fue realizado en 208 pacientes, resultando positivo en 52 casos. La forma más frecuente fue la *internal tandem duplication* o ITD, 32 pacientes, siendo 8 los casos que presentaban más de una ITD. 16 pacientes presentaron la mutación D835 y en 4 pacientes se daban ambas mutaciones. Cuarenta (24%) de los 166 casos de LMA *de novo* tenían mutaciones afectando FLT3 (24 ITD, 12 D835 y 4 ITD+D835). En los 19 casos de promielocítica, 8 pacientes presentaban alteraciones de FLT3 (6 casos ITD y 2 casos D835). En pacientes con leucemia secundaria 4/23 casos presentaron alguna clase de mutación del FLT3 (2 casos ITD y 2 casos D835).

La secuenciación de las 10 muestras que presentaban la mutación D835 permitió identificar cuatro mutaciones distintas siendo D835Y la más frecuente (Tabla 4), seguida de D385H y anecdóticamente se encontraron otras mutaciones como D835V y D835A.

Tabla 4. Descripción del espectro de mutaciones de FLT3 D835.

Mutación	n	Cambio aa
GAG→TAT	5	Asp→Tyr
GAT→CAT	3	Asp→His
GAT→GTT	1	Asp→Val
GAT→GCT	1	Asp→Ala

### **ALTERACIONES DE FLT3 Y CARACTERÍSTICAS AL DIAGNÓSTICO DE AML *de novo***

La presencia de FLT3 ITD se asoció con hiperleucocitosis ( $p < 0,0001$ ), citogenética de riesgo intermedio ( $p=0,03$ ) y particularmente con el cariotipo normal ( $p=0,04$ ). No se encontraron asociaciones de características clínicas con las mutaciones D835. Los cuatro pacientes con ITD y mutaciones de D835 tenían recuentos superiores a  $50 \times 10^9/L$  y un cariotipo por otra parte normal. También es destacable que en 5/7 pacientes que presentaban alguna alteración adicional a ITD también presentaban hiperleucocitosis y cariotipo normal al diagnóstico. (Tabla 5)

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes diagnosticados de LMA *de novo*.

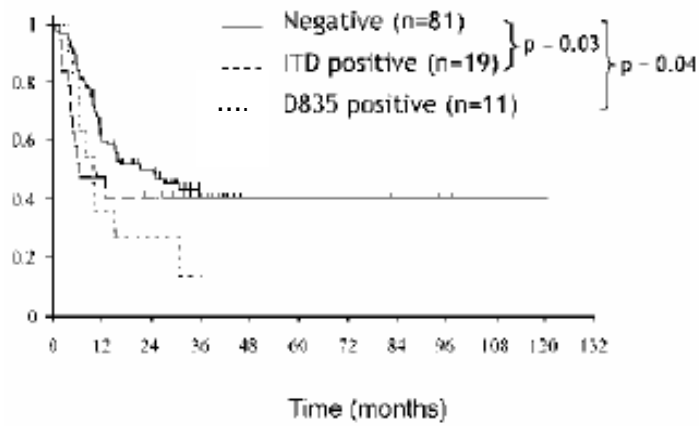
Variables	FLT3 wt		Mutación FLT3		p
	n	%	n	%	
Casos	126		40		
Edad					
≤ 20	18	14,3	4	10	ns
21-50	39	31,0	18	45	
>50	69	54,8	18	45	
Leucos (x10 <sup>9</sup> /L)					
≤ 10	62	49,2	4	10,0	<0,0001
10-50	39	31,0	17	42,5	
>50	25	19,8	19	47,5	
Hemoglobina (g/dL)					
≤ 10	78	61,9	29	72,5	ns
>10	48	38,1	11	27,5	
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)					
≤ 50	55	44,0	21	52,5	ns
>50	70	56,0	19	47,5	
Subtipo FAB					
M0	5	4,0	2	5,0	ns
M1	33	26,2	14	35,0	
M2	44	34,9	7	17,5	
M4	17	13,5	9	22,5	
M5	18	14,3	6	15,0	
M6	4	3,2	0	0,0	
M7	2	1,6	0	0,0	
Inclasificables	3	2,4	2	5,0	
Riesgo citogenético					
Bajo	14	12,6	0	0,0	0,03
Intermedio	81	73,0	31	93,9	
Alto	16	14,4	2	6,1	

## **INFLUENCIA DEL ESTADO MUTACIONAL DE FLT3 EN LA EFICACIA TERAPEÚTICA EN PACIENTES DE LMA NO PROMIELOCÍTICA**

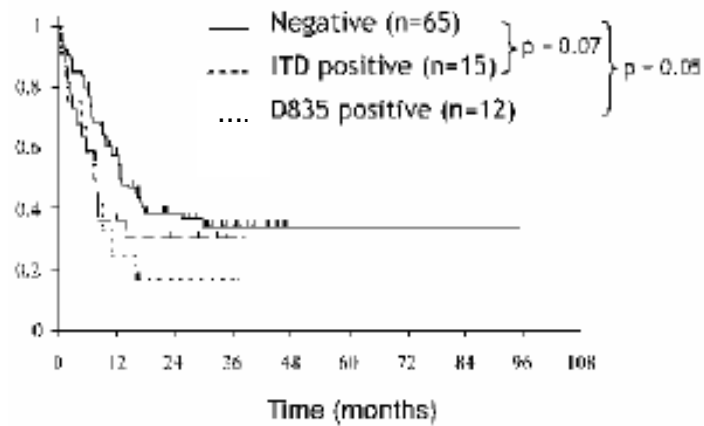
Las mutaciones que afectaban a FLT3 no tuvieron ninguna influencia en la respuesta a la quimioterapia de inducción (Tabla 6). La curva actuarial a los tres años en términos de SLR (Supervivencia libre de recaída) para la cohorte completa fue de  $40 \pm 5\%$ . Las mutaciones de FLT3 se asociaron con una SLR más corta a los tres años ( $41 \pm 12\%$  en el caso de ser positivas para ITD;  $14 \pm 12\%$  en el caso de la mutación D835; y  $43 \pm 6\%$  en el caso de no presentar mutaciones)(Figura 5A). Cuando se realizó este mismo análisis por subgrupos de riesgo citogenético, los pacientes con riesgo intermedio y FLT3 mutado presentaron una SLE más corta (ITD  $30 \pm 10\%$ , D835  $17 \pm 11\%$ , no mutación  $36 \pm 6\%$ )(Figura 5B). La SLR en los pacientes diagnosticados de LMA positivos para mutaciones fue de  $17 \pm 14\%$ ;  $38 \pm 20\%$  y  $47 \pm 19\%$  si los pacientes habían sido tratados solo con quimioterapia, trasplante autólogo y alogénico respectivamente, mientras que los pacientes sin mutaciones estas cifras se transformaron en  $27 \pm 9\%$ ,  $54 \pm 37\%$  y  $60 \pm 15\%$  respectivamente. Aunque estas diferencias mostraban una tendencia no fueron estadísticamente significativas. Los pacientes que presentaban ambas mutaciones, es decir, D835 e ITD, habían muerto ya al realizar este análisis, uno durante la inducción, y los otros tres tras recaída a los dos, cuatro y seis meses post-remisión.

Tabla 6. Resultado clínico de los pacientes con AML *de novo*.

Características clínicas	FLT3 wt		FLT3 mutado		p
	n	%	n	%	
Respuesta a inducción					
RC	81	77,9	28	73,7	
Fallo					
Resistencia	15	14,4	6	15,8	N.S.
Muerte	8	7,7	4	10,5	
Tratamiento postinducción					
QT	37	45,7	13	46,4	
AutoTPH	28	34,6	7	25	N.S.
AloTPH	16	19,8	8	28,6	



**A**



**B**

Figura 5. Panel A. Análisis Kaplan-Meier de la SLR en pacientes diagnosticados de LMA *de novo*, no promielocítica, según si presentaban Flt3 sin mutaciones, Flt3 con mutaciones ITD o D835. Panel B. Análisis Kaplan-Meier de la SLE en el subgrupo de pacientes con citogenética intermedia según si presentaban Flt3 sin mutaciones, Flt3 con mutaciones ITD o D835.

## **CORRELATO CLÍNICO DE LA EXPRESIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEINA TIROSINA FOSFATASA SHP-1 EN BIOPSIAS DE MÉDULA OSEA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE SMD**

En este análisis se contó con 45 pacientes de los que se disponía de biopsia de M.O. al diagnóstico. Tras una mediana de seguimiento de 15 meses (extremos, 0-153 meses) 16/45 pacientes habían progresado, nueve de ellos a LMA, con una mediana de tiempo a la progresión (TTP) de 12 meses (extremos, 0-152 meses). La pérdida de expresión de SHP-1 era específica de la estirpe mieloide en cinco pacientes (12,5%) y era específica de la estirpe megacariocítica en 6 pacientes (15%).

Si menos del 50% de la serie megacariocítica se teñía para SHP-1, el TTP era menor, siendo 5,3 y 6,9 meses el tiempo de progresión a leucemia de dos de estos pacientes. Sin embargo en el caso de que el paciente presentara en la biopsia de MO más del 50% de las células de la estirpe megacariocítica con actividad SHP-1, determinada por inmunohistoquímica, un 25% de los pacientes progresaron a LMA en 18,5 meses ( $p < 0,01$ ). También se observó una correlación entre la expresión de SHP-1 en la serie mieloide y el TTP (Tabla 7 y Figura 6).

La aplicación de la Clasificación de la OMS ( $p < 0,001$ ) y de la clasificación FAB ( $p < 0,001$ ) resultaron válidas como factor pronóstico respecto al TTP, lo que ya ha sido ampliamente respaldado en innumerables series internacionales. Sin embargo no se ha podido reproducir en este sentido el impacto del IPSS en esta serie.

La aplicación del modelo de regresión de Cox univariante a esta serie de pacientes ha demostrado el impacto positivo que la expresión de SHP-1 en megacariocitos, en términos cuantitativos ( $\geq 50\%$  frente a  $< 50\%$ ), tiene en el TTP (hazard ratio (HR)= 0,185; intervalo de confianza del 95%, 0,030-0,610;  $p=0,009$ ). Se observó el mismo efecto al estudiar la expresión de SHP-1 en la estirpe mieloide (hazard ratio (HR)= 0,140; intervalo de confianza del 95%, 0,027-0,728;  $p=0,019$ ). Al estudiar la expresión de SHP-1 en conjunto en células mieloides y megacariocitos ( $\geq 50\%$  vs  $< 50\%$ ) se observó también un impacto pronóstico en el TTP (hazard ratio (HR)= 0,140; intervalo de confianza del 95%, 0,027-0,728;  $p=0,019$ ). El análisis multivariante del TTP estableció la expresión de SHP-1 en los megacariocitos como único factor pronóstico independiente en el tiempo a la progresión (TTP) ( $p=0,026$ ).

La supervivencia global (SG) era reducida en aquellos pacientes en los que  $< 50\%$  de las células mieloides presentaban positividad para SHP-1 por inmunohistoquímica (mediana de supervivencia 10 meses frente a 37,5 meses en los pacientes con  $\geq 50\%$  células mieloides positivas para SHP-1) ( $p < 0,001$ ). Esta influencia pronóstica en la SG también se constató en la serie megacariocítica (mediana de supervivencia de 10 meses frente a 52 meses en los pacientes con  $< 50\%$  de células megacariocíticas positivas para SHP-1 y en los que tenían  $\geq 50\%$  células megacariocíticas positivas para SHP-1, respectivamente) ( $p < 0,001$ ).

La correlación entre la expresión de SHP-1 en megacariocitos ( $\geq 50\%$  vs  $< 50\%$ ) con la SG también se analizó mediante una regresión de Cox resultando estadísticamente significativa (HR 0.053; IC 95%, 0.009-0.301;  $p= 0.001$ ). El mismo análisis para la SG se realizó con la expresión de SHP-1 en serie



mieloide con el siguiente resultado estadísticamente significativo: HR 0.073;  
IC 95%, 0.014-0.370,  $p= 0.002$ .

Figura 6 (Siguiete página). Curvas Kaplan-Meier comparando: (A) el TTP en pacientes con  $<50\%$  o  $\geq 50\%$  de megacariocitos positivos para SHP-1, (B) TTP según expresión de SHP-1 en células mieloides, (C) TTP según expresión de SHP-1 en ambos linajes celulares, (D) SG y expresión de SHP-1 en megacariocitos, (E) SG según la expresión de SHP-1 en células mieloides, (F) SG según la expresión de SHP-1 en ambos linajes celulares.

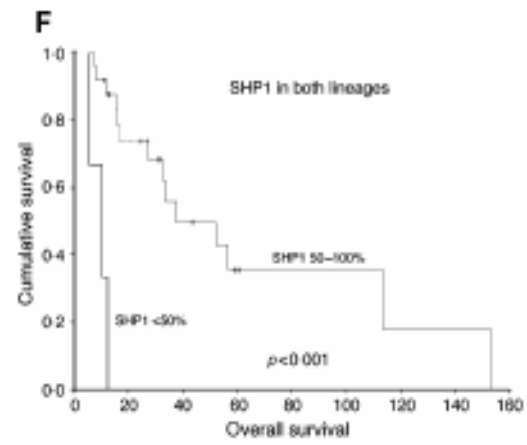
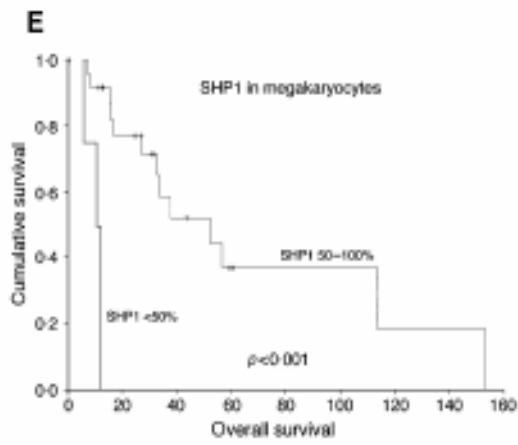
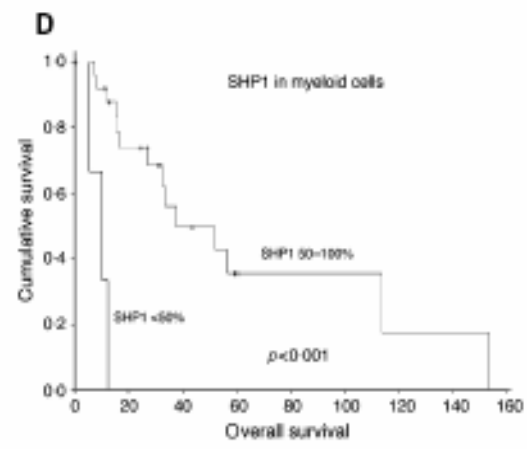
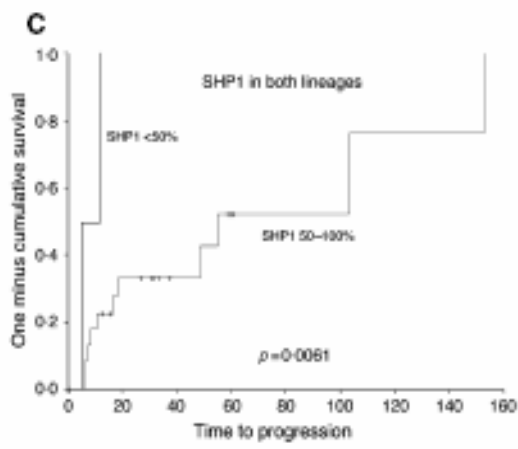
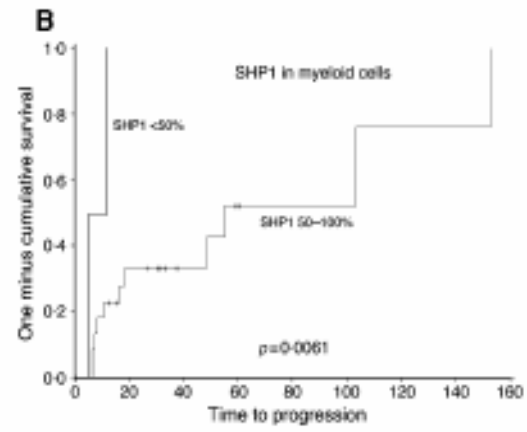
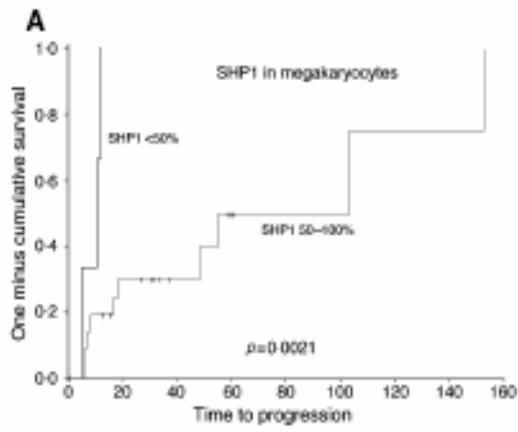


Tabla 7. Valor pronóstico de las características individuales del IPSS, del propio IPSS y la inmunohistoquímica de SHP-1.

	N° Pacientes	Mediana supervivencia (en meses)	P	Mortalidad [N (%)]	Tiempo a la progresión 25% pacientes (meses)
Células mieloides positivas SHP-1					
< 50%	4	10	< 0,001	3 (75)	5
≥ 50%	29	37,5		14 (48)	16,5
Megacariocitos positivos SHP-1					
< 50%	6	10	< 0,001	4 (67)	5
≥ 50%	27	52		13 (48)	18,5
Megacariocitos y células mieloides positivas SHP-1					
< 50%	4	10	< 0,001	3 (75)	5
≥ 50%	29	37,5		14 (48)	16,5
Citogenética					
Buena	11	56,5	< 0,001	5 (45,5)	18,5
Intermedia	7	27		5 (71,5)	7,5
Mala	1	7,5		1 (100)	7
N° citopenias					
0-1	7	32,5	N.S.	4(57)	18,5
2-3	22	33,5		11(50)	10,5
% Blastos					
< 5	11	57	N.S.	5 (45,5)	18,5
5-10	9	12		5 (55,5)	7
11-20	7	27		4 (57)	11,5
21-30	1	33,5		1 (100)	N.D.
<i>IPSS</i>					
<i>Bajo</i>	3	57	N.S.	2 (66,5)	18,5
<i>Int-I</i>	3	N.A.		0 (0)	N.D.
<i>Int-II</i>	10	17		6 (60)	8,5
<i>Alto</i>	2	7,5		2 (100)	7

N.S. No significativo estadísticamente.

N.D. No disponible

## **IMPACTO PRONÓSTICO DE LA COEXISTENCIA DE MUTACIONES ACTIVADORAS DE FLT3 Y SUPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN PTPN6 EN PACIENTES CON NEOPLASIAS MIELOIDES.**

Para valorar el posible impacto pronóstico que la presencia de mutaciones activadoras de FLT3 y los niveles de expresión de SHP-1 pudieran tener en las neoplasias mieloides, se estudiaron 85 pacientes diagnosticados de LMA y SMDs. Las características demográficas de los pacientes se resumen en la Tabla 8. Se obtuvieron muestras consecutivas de pacientes desde noviembre de 1999 a septiembre de 2005. Los resultados del análisis de mutaciones de Flt3 y los niveles de expresión de SHP-1 aparecen en la Tabla 9 y en la Figura 8, aunque en dos pacientes se desconocía el estatus de Flt3. Debido a la alta variabilidad interindividual de los datos presentados se ha optado por realizar las gráficas en escala logarítmica. La mediana de los niveles de expresión de SHP-1 en las muestras de pacientes con blastos leucémicos fueron considerablemente menores que en las muestras de células CD34+ de donantes sanos. La expresión más baja de SHP-1 se detectó en los pacientes que presentaban mutaciones del Flt3 ( $p=0,001$ ) (Véase Tabla 9 y Figura 8).

La tasa de RC fue superior en el grupo de pacientes que tenían una citogenética de riesgo bajo/favorable o intermedia (62,5% y 69,2%, respectivamente) frente a los pacientes cuya citogenética era desfavorable o de alto riesgo (36,8%), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El análisis univariante a largo plazo reveló que la mortalidad fue superior en aquellos individuos mayores de 60 años (86,5%) frente a individuos más jóvenes, < 60 años, 86,5% frente a 64,6% ( $p=0,035$ ).

También la masa tumoral muestra un impacto pronóstico en la mortalidad, ya que un 84% de los pacientes que tenían > 50% de blastos en M.O. habían muerto a fecha del último control frente a una tasa del 70% en el resto de casos ( $p=0,008$ ). También se ha podido establecer una correlación entre tener una mutación activadora de Flt3 y la cifra de leucocitos y blastos. Así las mutaciones activadoras de Flt3 se detectaron más frecuentemente, 28,6%, entre los pacientes con cifras más altas de leucocitos en SP al diagnóstico ( $> 20 \times 10^9/L$ ) frente a solo un 2,5% de casos si los pacientes no presentaban leucocitosis ( $p=0,001$ ). Además las mutaciones activadoras de Flt3 se detectaron más frecuentemente, 32%, entre los pacientes con cifras más altas de blastos en MO al diagnóstico ( $> 50\%$ ), frente a solo un 8% de casos en los pacientes con  $< 50\%$  de blastos en MO al diagnóstico ( $p=0,026$ ).

Para realizar otros estudios estadísticos se estratificaron los pacientes de la siguiente manera: dado que la mediana de expresión de SHP-1 (0.07721) en los pacientes que presentaban mutaciones de Flt3 era la mitad que la expresada por los pacientes sin mutaciones (0.14257), los pacientes se asignaron a tres grupos dependiendo del grado de expresión de SHP-1 ( $< 0,07$ ;  $0,07-0,14$ ;  $> 0,14$ ) (Véase Tabla 9). Además los pacientes con menor expresión de SHP-1, es decir, que pertenecían al grupo con valores de expresión de SHP-1  $< 0,07$ , y también tenían mutaciones de Flt3 (N=8) se analizaron como un grupo aparte.

Tabla 8. Características de los pacientes.

Variables	Número de pacientes	%
	85	
Edad		
Mediana	59	
Rango	0-86	
Sexo		
Masculino	44	51.8
Femenino	41	48.2
Clasificación FAB		
LMA		
M0	9	10.6
M1	12	14.1
M2	22	25.9
M4	16	18.8
M5	7	8.2
M6	10	11.8
M7	2	2.4
SMD		
AR	1	1.2
AREB	2	2.3
AREB-T	2	2.3
LMMC	2	2.3
Cariotipo (N=58)		
LMA MRC		
Favorable	3	5.2
Intermedio	28	48.3
Desfavorable	20	34.5
SMD IPSS		
Bajo	5	8.6
Intermedio	1	1.7
Alto	1	1.7
RC†	43	58
Muerte precoz *	17	23
Mediana de RC, meses		8.1
Mediana SG (Actuarial Kaplan-Meier meses)		8.73
Mediana seguimiento, meses		6.73
Rango		0-66

† Solo 74 pacientes recibieron quimioterapia de inducción. 11 pacientes no fueron tratados: por SMD de bajo riesgo (N=3) o mal estado general (N=6). 2 pacientes murieron antes de iniciar el tratamiento..

\* Pacientes muertos durante la inducción días=1-30.

Tabla 9. Comparativa de los niveles de expresión de SHP-1 mRNA en aspirados de médula ósea de pacientes con neoplasias malignas mieloides que presentaban mutaciones de FLT3 frente a pacientes sin alteraciones de FLT3 y células CD34+ de donantes sanos movilizados. Los valores expresados son el  $2^{-\Delta C_t}$  empleando como gen de referencia GADPH.

Gen	CD34+ Controles N=14			Pacientes sin mutaciones de FLT3 N=70			Pacientes con mutaciones FLT3 N=13		
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo
SHP-1	0.32147	0.22845	0.82645	0.14257	0.01139	1.76540	0.07721	0.01143	0.80843

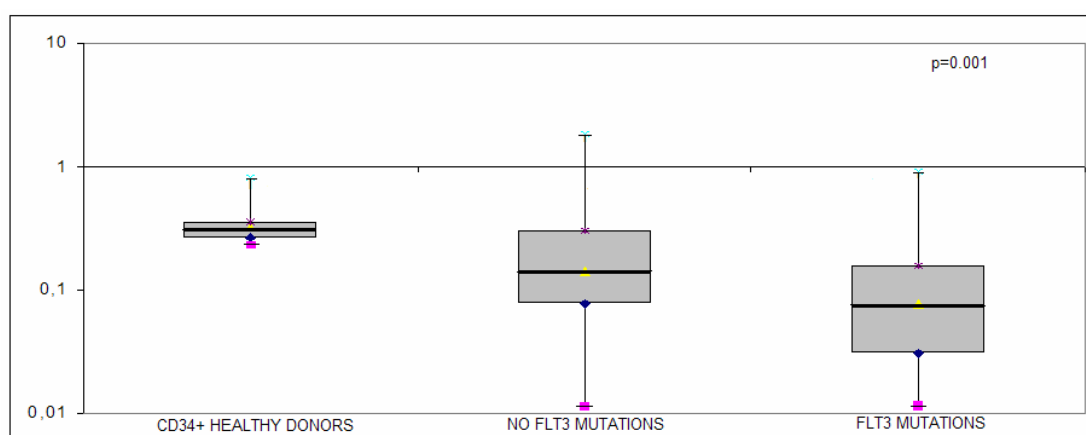


Figura 8. Comparativa de la expresión de SHP-1 en células CD34+ seleccionadas de pacientes sanos movilizados para citaféresis con G-CSF frente a 85 pacientes con neoplasias mieloides divididos en dos subgrupos según la presencia o no de mutaciones de *FLT3*. Test estadístico empleado Kruskal-Wallis.



Una cifra de blastos elevada al diagnóstico fue la única variable correlacionada con los niveles más bajos de expresión de SHP-1 ( $< 0,07$ ) ( $p=0,017$ ). La asociación de cifras más elevadas de blastos al diagnóstico en los pacientes con niveles de expresión más bajos de SHP-1 y que además presentaban mutaciones de Flt3 fue incluso más significativa estadísticamente ( $p=0,0083$ ). Los pacientes más jóvenes (entre 21 y 40 años) fueron los que más frecuentemente (37,5%) se encontraban en los niveles más bajos de expresión de SHP-1 y además presentaban mutaciones de Flt3 en comparación con otros grupos de edad ( $p=0,019$ ). También, los pacientes que presentaban cifras más altas de leucocitos al diagnóstico ( $> 20 \times 10^9/L$ ) presentaban más frecuentemente la combinación de ambos factores de riesgo, es decir, mutaciones de Flt3 y una expresión de SHP-1 en el nivel más bajo (17,1% vs 0%) ( $p=0,005$ ).

El análisis univariante mostró una SG más baja en los pacientes que al diagnóstico presentaban coagulación intravascular diseminada (CID) ( $p=0,001$ ), una edad superior a 60 años ( $p<0,001$ ), LDH  $>700$  U/L ( $p=0,035$ ), creatinina  $>1,5$  mg/dL ( $p<0,001$ ) y presentar simultáneamente niveles de expresión de SHP-1 en el nivel más bajo de las categorías descritas y mutaciones de Flt3 ( $p=0,021$ ) (Figura 9A).. Tres de estas variables resultaron tener un valor pronóstico independiente en el análisis multivariante: edad al diagnóstico ( $\geq 60$  años vs  $<60$  años) (HR 2,98; IC 95%: 1,54-5,64;  $p=0,001$ ); CID al debut (HR 3,68; IC 95%:1,55-8,75;  $p=0,003$ ); y LDH  $>700$  U/L (HR 2,04; IC 95%: 1,03-4,04;  $p=0,039$ ).

El análisis univariante de la SLE mostró una recaída más precoz en aquellos pacientes con Flt3/ITD en comparación con aquellos pacientes sin mutaciones o que presentaban la mutación Flt3/D835 ( $p=0,054$ ) (Figura 9B).

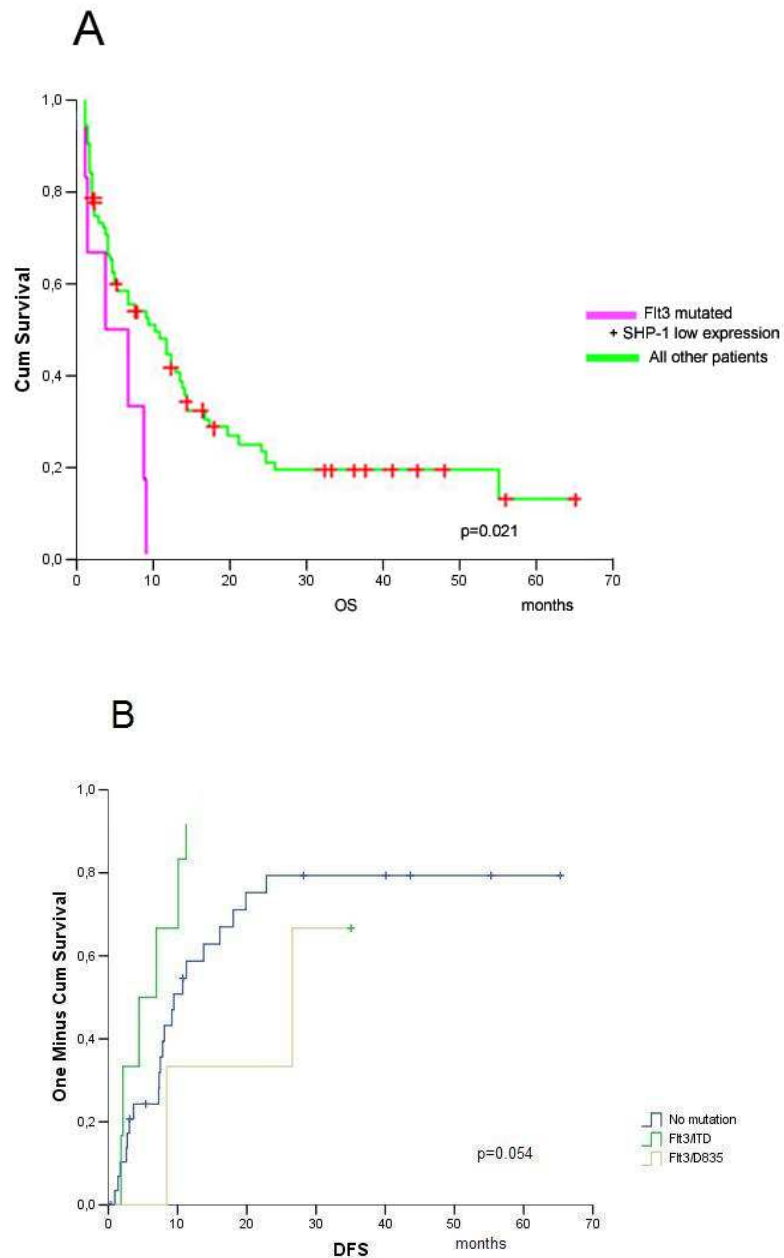


Figura 9. Panel A. Análisis Kaplan-Meier de la SG en pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides comparando aquellos pacientes que presentaban mutaciones activadoras de FLT3 y los niveles más bajos de expresión de SHP-1 con el resto de los pacientes de esta cohorte. Panel B. Análisis Kaplan-Meier de la SLE según status mutacional de FLT3.

## E. DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis demuestra, en una serie amplia de pacientes diagnosticados de LMA *de novo* o SMD, como la presencia de mutaciones activadoras de FLT3 reduce o suprime la expresión del gen PTPN6 y el impacto pronóstico que, de manera independiente o conjunta, dichos eventos moleculares tienen sobre el paciente.

La fosforilación proteica es un mecanismo post-traducción muy generalizado en la regulación de procesos vitales clave para la vida multicelular, entre ellos la transducción de señales desde receptores de superficie como son los de los factores de crecimiento. El genoma humano codifica, al menos, 518 proteína-kinasas y 90 de ellas son específicas para residuos tirosina<sup>203</sup>. La acción de estas enzimas ha de ser contrarrestada para establecer la duración e intensidad del estímulo por dos familias de proteína-fosfatasas: las específicas y duales para serina/treonina (como, PP1 y PP2); y las específicas para tirosinas<sup>204</sup>. En comparación con las kinasas, el genoma humano codifica muchas menos fosfatasas serina/treonina pero al menos tantas PTPs como PTKs, aproximadamente 90, lo cuál, a pesar de cierta redundancia, indica especificidad. Cualquier desequilibrio en este ajustado sistema puede conducir a patología en el ser humano<sup>192,205</sup>. Este modelo de equilibrio funcional entre proteína-kinasas y proteína-fosfatasas resulta particularmente atractivo para desentrañar la fisiopatología de la leucemogénesis de las neoplasias mieloides ya que permite señalar dianas moleculares sobre las que potencialmente se podría actuar y mejorar los resultados terapéuticos

actuales. Sin embargo, hasta ahora, solo se ha hecho hincapié en una parte de esta ecuación: el incremento de la actividad tirosina-kinasa. Buena prueba de ello son nuestros resultados con FLT3. Nuestro trabajo permite confirmar, como ya se ha comunicado ampliamente desde la fecha de su publicación<sup>152,162,163,164</sup>, que la presencia de mutaciones activadoras de FLT3, y de una forma más clara FLT3/ITD, supone, en general, un factor pronóstico negativo en los pacientes diagnosticados de LMA *de novo*. Además permite segregar, dentro del grupo de pacientes con citogenética normal, un subgrupo con peor pronóstico. Esta capacidad de discriminación pronóstica es también válida para pacientes tratados con distintos esquemas y modalidades de TPH, como ya se ha publicado<sup>166</sup>. Este modelo ya ha dado notables éxitos en otras patologías hematológicas como el desarrollo de fármacos antagonistas de la actividad tirosín-kinasa de BCR-ABL en la LMC<sup>206</sup> aunque, como ya hemos visto, los resultados hasta el momento con inhibidores de FLT3 han sido más modestos<sup>179,180,181,182,183</sup>.

Pero, ¿qué ocurre con la segunda parte de la ecuación?, ¿juega algún papel en la fisiopatología de estas entidades la disminución o abolición de la actividad tirosina-fosfatasa de las PTPs?. El segundo estudio descrito en esta tesis permite afirmar que la determinación de los niveles de expresión de SHP-1 mediante inmunohistoquímica en la médula ósea de pacientes diagnosticados con SMD, al diagnóstico, tiene un valor pronóstico importante. Este dato no es sorprendente a la luz del papel que SHP-1 parece jugar como inhibidor de las rutas de segundos mensajeros de los factores de crecimiento hematopoyéticos<sup>186,187,188,189,191</sup>. Por tanto, la inhibición o reducción de su expresión, respecto a controles normales, podría estar dando una ventaja

proliferativa a los blastos en respuesta a factores de crecimiento endógenos. Esta hipótesis parece confirmarse con nuestros resultados. Así, la pérdida de la expresión de SHP-1 en todas las células hematopoyéticas, o al ser estudiadas por línea hematopoyética, parece estar asociada a una SG más corta y una progresión más rápida de enfermedad. Además, esta pérdida de expresión parece correlacionarse con el estadio de enfermedad. Todos los pacientes que no se tiñeron mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo frente a SHP-1 correspondían al grupo de alto riesgo según el IPSS.

Una vez verificados que los dos mecanismos fisiopatológicos se dan en las neoplasias mieloides, parece interesante estudiar el modelo en conjunto. Este interés se ha visto impulsado por la publicación de dos trabajos que añaden al modelo una variable que redefiniría este desequilibrio entre PTKs y PTPs. Según Chen *et al*<sup>198</sup> y Sattler *et al*<sup>207</sup>, la inhibición o reducción en la expresión de las PTPs específicas frente a la PTKs activadas implicadas en la leucemogénesis se realiza mediante un mecanismo directo dependiente de las PTKs. En el caso de Sattler *et al.*, SHIP, otra PTP que juega un papel clave en la hematopoyesis, está suprimida por la acción de BCR-ABL en la LMC. Sin embargo, ambos estudios carecen de correlato clínico. Sólo el estudio de Chen *et al.* muestra la confirmación de la recuperación de la expresión de SHP-1 mediante Western Blot en cuatro pacientes diagnosticados de LMA con mutaciones activadoras de FLT3 cuando las células fueron cultivadas con CEP-701, un conocido inhibidor de FLT3.

El tercer aspecto estudiado en esta tesis intenta conocer si las neoplasias mieloides encajarían en este modelo descrito y sus consecuencias pronósticas.

Nuestros datos en pacientes diagnosticados de LMA *de novo* y que presentan mutaciones de FLT3 muestran la reducción de la expresión de PTPN6 a la mitad en comparación con otros pacientes con neoplasias mieloides sin mutaciones de FLT3. De acuerdo con la mecánica expuesta, cabría esperar que los pacientes que presentan mutaciones activadoras de FLT3 con expresión suprimida o reducida de SHP-1 tuvieran mayor masa tumoral, fundamentalmente blastos, debido a un incremento en la proliferación, la inhibición de la apoptosis y el bloqueo de la diferenciación celular. Los resultados de nuestro trabajo también parecen confirmar esta hipótesis. Así, la presencia de una cifra incrementada de blastos superior al 50% en el momento del diagnóstico se correlaciona con los niveles más bajos de expresión del gen PTPN6 ( $p=0.017$ ). El modelo gana poder estadístico cuando tenemos en cuenta la coexistencia de mutaciones de FLT3 y niveles bajos de expresión de SHP-1, estableciendo una correlación más fuerte con una cifra incrementada de blastos ( $>50\%$ ) al diagnóstico ( $p<0.01$ ). Esta correlación estadística, teniendo en cuenta ambos factores, se repite para la leucocitosis ( $>20 \times 10^9/L$ ) al diagnóstico ( $p=0.005$ ).

Nuestros resultados muestran, desde un punto de vista pronóstico, el impacto negativo que la presencia de ambas lesiones moleculares ocasiona en los pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides. Ningún paciente que presentara una mutación con actividad intrínseca tirosina-kinasa de FLT3 y además se incluyera entre los pacientes con menor expresión de PTPN6 ( $<0.07$ ) habría sobrevivido más de diez meses. Sin embargo el modelo no alcanza significación estadística al evaluar la SLE. Probablemente esto sea debido a que el impacto que determinados eventos considerados para la

estimación de la SLE, como las muertes tóxicas en la inducción, no se ven influenciados por la disminución en la expresión de SHP-1 causada por las mutaciones activadoras de FLT3.

Esta línea de investigación nos ha permitido, por primera vez en la literatura, mostrar, en una serie amplia de pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides, como la presencia de mutaciones activadoras de FLT3 reduce o suprime la expresión del gen PTPN6. También nos ha permitido establecer que la coexistencia de ambos errores genéticos constituye un factor pronóstico peyorativo y define clínico-biológicamente una neoplasia más agresiva, en pacientes jóvenes, caracterizada por leucocitosis y recuento de blastos en médula ósea incrementados al diagnóstico. Por tanto, parece confirmarse la importancia del modelo propuesto por Chen *et al.* en las neoplasias mieloides, pero quedan todavía muchas preguntas por responder para conocer más íntimamente la interacción entre PTKs y PTPs en la leucemogénesis. Si este modelo se confirma, en ésta y otras entidades hematológicas, deberíamos centrar nuestro esfuerzo en desarrollar estrategias terapéuticas duales que inhiban la actividad PTK, ya actualmente disponibles, e incrementen la capacidad de re-equilibrio que aporta la actividad tirosina-fosfatasa, inéditas hasta el momento en la clínica.



## F. CONCLUSIONES

1. En pacientes con LMA de novo, las mutaciones de FLT3, particularmente la FLT3/ITD, confieren actividad tirosina-kinasa constitutiva que se asocia a leucocitosis y a cariotipo normal.
2. Las mutaciones de FLT3, que confieren actividad tirosina-kinasa constitutiva, suponen un factor pronóstico desfavorable en términos de SLE y SG.
3. La reducción o pérdida en la expresión del gen *PTPN6* favorece la progresión a leucemia aguda en los pacientes diagnosticados de SMD.
4. La reducción o pérdida en la expresión del gen *PTPN6* tiene valor pronóstico en los pacientes diagnosticados de SMD y se correlaciona con otros índices pronósticos ampliamente empleados como el IPSS.
5. La expresión de SHP-1 está reducida o suprimida en los pacientes diagnosticados de neoplasias mieloides que presentan una mutación activadora de FLT3 mediante un mecanismo desconocido.

6. La coexistencia de una mutación activadora de FLT3 y la supresión de la expresión SHP-1 ejerce un impacto pronóstico negativo en términos de SG en los pacientes diagnosticados de LMA y SMD.
  
7. La coexistencia de una mutación activadora de FLT3 y la supresión de la expresión SHP-1 permite definir un subgrupo clínico-biológico entre las LMA que se caracteriza por afectar a pacientes jóvenes con hiperleucocitosis e incremento de blastos al diagnóstico.

## G. BIBLIOGRAFÍA

<sup>1</sup> Freireich EJ. Arabinosyl cytosine: A 20 year update. J Clin Oncol 1987; 5:523-4.

<sup>2</sup> Cassileth PA, Lynch E, Hines JD, Oken MM, Mazza JJ, Bennett JM, et al. Varying intensity of postremission therapy in acute myeloid leukemia. Blood 1992; 79:1924-30.

<sup>3</sup> Gajewski JL, Ho WG, Nimer SD, Hirji KF, Gekelman L, Jacobs AD, Champlin RE. Efficacy of intensive chemotherapy for acute myelogenous leukemia associated with a preleukemic syndrome. J Clin Oncol 1989; 7:1637-45.

<sup>4</sup> Sanz GF, Mena-Duran AV, Ribera JM, Bernal T, Palomera L, del Cañizo MC et al. Autologous stem cell transplantation after FLAG-IDA chemotherapy for high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemias secondary to MDS (sAML) does not improve outcome: A PETHEMA experience in 103 patients. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2005; 106:793.

<sup>5</sup> Foon KA, Gale RP. Therapy of acute myelogenous leukemia. Blood Reviews 1992; 6:15-25.

<sup>6</sup> Yanada M, Matsuo K, Emi N, Naoe T. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid

leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* 2005; 103:1652–58.

<sup>7</sup> Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 98-117.

<sup>8</sup> Kern W, Haferlach T, Schoch C, Sauerland MC, Heinecke A, Wormann B et al. *Ann Hematol* 2004; 83:S49-51.

<sup>9</sup> Tallman MS. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006; 19:311-20.

<sup>10</sup> Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89:2079-88.

<sup>11</sup> Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhou L et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988; 72:567-72.

<sup>12</sup> Bloomfield CD, Goldman A, Hossfeld D, de la Chapelle A. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1982: clinical

significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 11:332–50.

<sup>13</sup> Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, Reeves BR, Alimena G et al. The clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40:203–16.

<sup>14</sup> Bloomfield CD, Shuma C, Regal L, Philip PP, Hossfeld DK, Hagemeijer AM, et al. Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia. A third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer* 1997; 80:S2191–S8.

<sup>15</sup> Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92:2322-33.

<sup>16</sup> Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96:4075-83.

<sup>17</sup> Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100:4325–36.

<sup>18</sup> Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Loffler H, Schlegelberger B, et al. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 2001 ; 112:118-26.

<sup>19</sup> Schoch C, Schnittger S, Kern W, Dugas M, Hiddemann W, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with recurring chromosome abnormalities as defined by the WHO-classification: incidence of subgroups, additional genetic abnormalities, FAB subtypes and age distribution in an unselected series of 1,897 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003 ; 88:351-2.

<sup>20</sup> Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M, Bernard P, Leroux D, Huguet-Rigal F et al. Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia*. 1995; 9:1491-8.

<sup>21</sup> Piazza F, Gurrieri C, Pandolfi PP. The theory of APL. *Oncogene* 2001; 20:7216-22.

<sup>22</sup> Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 2001; 7:444-51.

<sup>23</sup> Cassinat B, Chomienne C. Biological features of primary APL blasts: their relevance to the understanding of granulopoiesis, leukemogenesis and patient management. *Oncogene* 2001; 20:7154-60.

<sup>24</sup> Matsui W, Smith BD, Vala M, Beal N, Huff CA, Diehl LF et al. Requirement for myeloid growth factors in the differentiation of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 128:853-62.

<sup>25</sup> Sanz MA, Martin G, Gonzalez M, Leon A, Rayon C, Rivas C et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood* 2004; 103:1237-43.

<sup>26</sup> Vangala RK, Heiss-Neumann MS, Rangatia JS, Singh SM, Schoch C, Tenen DG et al. The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* 2003; 101:270-7.

<sup>27</sup> Rangatia J, Vangala RK, Treiber N, Zhang P, Radomska H, Tenen DG et al. Downregulation of c-Jun expression by transcription factor C/EBPalpha is critical for granulocytic lineage commitment. *Mol Cell Biol* 2002; 22:8681-94.

<sup>28</sup> Mrozek K, Prior TW, Edwards C, Marcucci G, Carroll AJ, Snyder PJ, Koduru PR, Theil KS, Pettenati MJ, Archer KJ, Caligiuri MA, Vardiman JW, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD et al. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2001; 19:2482–92.

<sup>29</sup> Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, Bitter MA, Vardiman JW, Rowley JD. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood* 1986; 68:1242-9.

<sup>30</sup> Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Morel P, Beuscart R, Bauters F. Cytogenetics and their prognostic value in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 283 cases. *Br J Haematol* 1989; 73:61-7.

<sup>31</sup> Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, 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.

<sup>32</sup> Byrd JC, Dodge RK, Carroll A, Baer MR, Edwards C, Stamberg J 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.

<sup>33</sup> Palmieri S, Sebastio L, Mele G, Annunziata M, Annunziata S, Copia C et al. High-dose cytarabine as consolidation treatment for patients with acute myeloid leukemia with t(8;21). *Leuk Res* 2002; 26:539–43.

<sup>34</sup> Byrd JC, Ruppert AS, Mrozek K, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC 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.

<sup>35</sup> Rubnitz JE, Raimondi SC, Tong X, Srivastava DK, Razzouk BI, Shurtleff SA et al. Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2002; 20:2302–9.

<sup>36</sup> Schoch C, Haferlach T, Bursch S, Gerstner D, Schnittger S, Dugas M 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; 35:20-9.

<sup>37</sup> Schiffer CA, Lee EJ, Tomiyasu T, Wiernik PH, Testa JR. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in patients with de novo acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 1989; 73:263–70.

<sup>38</sup> Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, Bitter MA, Vardiman, Elliott MA, et al. The prognostic significance of trisomy 8 in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:583–6.

<sup>39</sup> Schoch C, Haase D, Fonatsch C, Haferlach T, Loffler H, Schlegelberger B et al. The significance of trisomy 8 in de novo acute myeloid leukaemia: the accompanying chromosome aberrations determine the prognosis. *Br J Haematol* 1997; 99:605–11.

<sup>40</sup> Wolman SR, Gundacker H, Appelbaum FR, Slovak ML. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2002; 100:29–35.

<sup>41</sup> Schoch C, Kern W, Krawitz P, Dugas M, Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W. Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. *Blood*. 2001; 98:3500.

<sup>42</sup> Braess J, Jahns-Streubel G, Schoch C, Haase D, Haferlach T, Fiegl M et al. Proliferative activity of leukaemic blasts and cytosine arabinoside pharmacodynamics are associated with cytogenetically defined prognostic subgroups in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113:975-82.

<sup>43</sup> Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R, Hahlen K, Huismans DR, Zimmermann M, et al. Cellular drug resistance in childhood acute myeloid leukemia is related to chromosomal abnormalities. *Blood* 2002; 100:3352–60.

<sup>44</sup> Haase D, Feuring-Buske M, Konemann S, Fonatsch C, Troff C, Verbeek W et al. Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood* 1995; 86:2906-12.

<sup>45</sup> Heaney M. L., Golde D. W. Medical Progress: Myelodysplasia. *N Engl J Med* 1999; 340:1649-1660.

<sup>46</sup> Nimer SD. Clinical management of myelodysplastic syndromes with interstitial deletion of chromosome 5q. *J Clin Oncol* 2006; 24:2576-82.

<sup>47</sup> Jary L, Mossafa H, Fourcade C, Genet P, Pulik M, Flandrin G. The 17p-syndrome: a distinct myelodysplastic syndrome entity?. *Leuk Lymphoma* 1997; 25:163-8.

<sup>48</sup> Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17:3835-49.

<sup>49</sup> Olney HJ, Le Beau MM. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14:479-95.

<sup>50</sup> Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H et al. Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 1993; 7:499-508.

<sup>51</sup> Muller-Berndorff H, Haas PS, Kunzmann R, Schulte-Monting J, Lubbert M. Comparison of five prognostic scoring systems, the French-American-British (FAB) and World Health Organization (WHO) classifications in patients with myelodysplastic syndromes: results of a single-center analysis. *Ann Hematol*. 2006; DOI: 10.1007/s00277-005-0030-z.

<sup>52</sup> Ito Y, Ohyashiki K, Hirai H, Ogawa S, Mitani K, Hotta T et al. Assessment of the international prognostic scoring system for determining chemotherapeutic indications in myelodysplastic syndrome: Japanese retrospective multicenter study. *Int J Hematol* 2005; 82:236-42.

<sup>53</sup> Jadersten M, Montgomery SM, Dybedal I, Porwit-MacDonald A, Hellstrom-Lindberg E. Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood* 2005; 106:803-11.

<sup>54</sup> Pfeilstocker M, Reisner R, Nosslinger T, Gruner H, Nowotny H, Tuchler H et al. Cross-validation of prognostic scores in myelodysplastic syndromes on 386 patients from a single institution confirms importance of cytogenetics. *Br J Haematol* 1999; 106:455-63.

<sup>55</sup> Giagounidis AA, Germing U, Aul C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5-10.

<sup>56</sup> Solé F, Luno E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90:1168-78.

<sup>57</sup> Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003; 102:43-52.

<sup>58</sup> Tricot G, Boogaerts MA, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe H, Verwilghen RL. The myelodysplastic syndromes: different evolution patterns based on sequential morphological and cytogenetic investigations. *Br J Haematol* 1985; 59:659-70.

<sup>59</sup> Lubbert M, Wijermans P, Kunzmann R, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C et al. Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Br J Haematol* 2001; 114:349-57.

<sup>60</sup> Estey E, Thall P, Beran M, Kantarjian H, Pierce S, Keating M. Effect of diagnosis (refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation, or acute myeloid leukemia [AML]) on outcome of AML-type chemotherapy. *Blood* 1997; 90:2969-77.

<sup>61</sup> Kameoka J, Funato T, Obara Y, Kadowaki I, Yokoyama H, Kimura T et al. Clonal evolution from trisomy into tetrasomy of chromosome 8 associated with the development of acute myeloid leukemia from myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 124:159-64.

<sup>62</sup> Nevill TJ, Fung HC, Shepherd JD, Horsman DE, Nantel SH, Klingemann HG et al. Cytogenetic abnormalities in primary myelodysplastic syndrome are highly predictive of outcome after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1998; 92:1910-7.

<sup>63</sup> Applebaum FR, Anderson J. Allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome: outcome analysis according to IPSS score. *Leukemia* 1998; 12:S25-S29.

<sup>64</sup> Cermak J, Vitek A, Michalova K. Combined stratification of refractory anemia according to both WHO and IPSS criteria has a prognostic impact and improves identification of patients who may benefit from stem cell transplantation. *Leuk Res* 2004; 28:551-7.

<sup>65</sup> List A, Kurtin S, Roe D J, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D et al. Efficacy of Lenalidomide in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2005; 352:549-57.

<sup>66</sup> Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:311-21.

<sup>67</sup> Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:502-13.

<sup>68</sup> Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999; 23:166-75.

<sup>69</sup> Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H et al. Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt. *Blood* 1992; 80:1825-31.

<sup>70</sup> Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 $\beta$ /CBF $\beta$  proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14:5558-68.

<sup>71</sup> Shoemaker SG, Hromas R, Kaushansky K. Transcriptional regulation of interleukin 3 gene expression in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9650-54.

<sup>72</sup> Alland L, Muhle R, Hou H Jr, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N et al. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 1997; 387:49-55.

<sup>73</sup> Kitabayashi I, Ida K, Morohoshi F, Yokoyama A, Mitsushashi N, Shimizu K et al. The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1. *Mol Cell Biol* 1998; 18:846-58.

<sup>74</sup> Durst KL, Lutterbach B, Kummalue T, Friedman AD, Hiebert SW. The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol Cell Biol* 2003; 23:607-19.



<sup>75</sup> Adya N, Stacy T, Speck NA, Liu PPI. The leukemic protein core binding factor beta (CBFbeta)-smooth-muscle myosin heavy chain sequesters CBFalpha2 into cytoskeletal filaments and aggregates. *Mol Cell Biol* 1998; 18:7432-43.

<sup>76</sup> Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia* 2005; 19:329-334.

<sup>77</sup> Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1416-24.

<sup>78</sup> Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J* 2003; 4:31-40.

<sup>79</sup> Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, et al: CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22:624-33.

<sup>80</sup> Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de

novo acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002; 100:2717-23.

<sup>81</sup> Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 2005; 19:1751-9.

<sup>82</sup> Byrd JC, Marcucci G, Parthun MR, Xiao JJ, Klisovic RB, Moran M et al. A phase 1 and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105:959-967.

<sup>83</sup> Klymenko S, Trott K, Atkinson M, Bink K, Bebeshko V, Bazyka D et al. Aml1 gene rearrangements and mutations in radiation-associated acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *J Radiat Res (Tokyo)* 2005; 46:249-55.

<sup>84</sup> Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 2004; 104:1474-81.

<sup>85</sup> Harada H, Harada Y. Point mutations in the AML1/RUNX1 gene associated with myelodysplastic syndrome. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2005; 15:183-96.

<sup>86</sup> Steensma DP, Gibbons RJ, Mesa RA, Tefferi A, Higgs DR. Somatic point mutations in RUNX1/CBFA2/AML1 are common in high-risk myelodysplastic syndrome, but not in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Eur J Haematol* 2005; 74:47-53.

<sup>87</sup> Nakao M, Horiike S, Fukushima-Nakase Y, Nishimura M, Fujita Y, Taniwaki M et al. Novel loss-of-function mutations of the haematopoiesis-related transcription factor, acute myeloid leukaemia 1/runt-related transcription factor 1, detected in acute myeloblastic leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2004; 125:709-19.

<sup>88</sup> Niimi H, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T et al. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia* 2006; 20:635-44.

<sup>89</sup> Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:11-22.

<sup>90</sup> Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: A rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 2000; 96:1655-69.

<sup>91</sup> Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:650-65.

<sup>92</sup> Coghlan DW, Morley AA, Matthews JP, Bishop JF. The incidence and prognostic significance of mutations in codon 13 of the N-ras gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8:1682-87.

<sup>93</sup> Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S et al: Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93:3074-80.

<sup>94</sup> Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006; 107:3847-53.

<sup>95</sup> Kolitz JE. Current therapeutic strategies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2006; DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06219.x.

<sup>96</sup> Padua RA, Guinn BA, Al-Sabah AI, Smith M, Taylor C, Pettersson T et al. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia* 1998; 12:887-92.

<sup>97</sup> Shih LY, Huang CF, Wang PN, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Kuo MC. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; 18:466-75.

<sup>98</sup> Christiansen DH, Andersen MK, Desta F, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of genes in the receptor tyrosine kinase (RTK)/RAS-BRAF signal transduction pathway in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19:2232-40.

<sup>99</sup> Pellagatti A, Esoof N, Watkins F, Langford CF, Vetrie D, Campbell LJ et al. Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes using cDNA microarray technology. *Br J Haematol* 2004; 125:576-83.

<sup>100</sup> Pradhan A, Mijovic A, Mills K, Cumber P, Westwood N, Mufti GJ, Rassool FV. Differentially expressed genes in adult familial myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2004; 18:449-59.

<sup>101</sup> Kurzrock R, Albitar M, Cortes JE, Estey EH, Faderl SH, Garcia-Manero G et al. Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2004; 22:1287-92.

<sup>102</sup> Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* 1991; 78:2962-68.

<sup>103</sup> Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC. CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:192–95.

<sup>104</sup> Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 121:775-77.

<sup>105</sup> Gari M, Goodeve A, Wilson G, Winship P, Langabeer S, Linch D et al. c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 105:894-900.

<sup>106</sup> Kohl TM, Schnittger S, Ellwart JW, Hiddemann W, Spiekermann K. KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. *Blood* 2005; 105:3319-21.

<sup>107</sup> Ning ZQ, Li J, McGuinness M, Arceci RJ. STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity. *Oncogene* 2001; 20:4528-36.

<sup>108</sup> Cairoli R, Beghini A, Morello E, Grillo G, Montillo M, Larizza L et al. Imatinib mesylate in the treatment of Core Binding Factor leukemias with KIT mutations. A report of three cases. *Leuk Res* 2005; 29:397-400.

<sup>109</sup> Ziemer-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R III, Patel Y, Harden A, Rubinelli P, Smith SD, LeBeau MM, Rowley JD. Identification of a gene, *MLL*, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10735–9.

<sup>110</sup> Meyer C, Schneider B, Reichel M, Angermueller S, Strehl S, Schnittger S et al. Diagnostic tool for the identification of *MLL* rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:449–54.

<sup>111</sup> Thirman MJ, Gill JH, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H *et al.* Rearrangement of the *MLL* gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 1993; 329:909–14.

<sup>112</sup> Swansbury GJ, Slater R, Bain BJ, Moorman AV, Secker-Walker LM. Hematological malignancies with t(9;11)(p21–22;q23): a laboratory and clinical study of 125 cases. *Leukemia* 1998; 12:792–800.

<sup>113</sup> Iida S, Seto M, Yamamoto K, Komatsu H, Tojo A, Asano S et al. *MLLT3* gene on 9p22 involved in t(9;11) leukemia encodes a serine/proline rich protein homologous to *MLLT1* on 19p13. *Oncogene* 1993; 8:3085–92.

<sup>114</sup> Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H et al. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res* 1993; 53:5624–28.

<sup>115</sup> Chaplin T, Bernard O, Beverloo HB, Saha V, Hagemeijer A, Berger R et al. The t(10;11) translocation in acute myeloid leukemia (M5) consistently fuses the leucine zipper motif of AF10 onto the HRX gene. *Blood* 1995; 86:2073–76.

<sup>116</sup> Rubnitz JE, Morrissey J, Savage PA, Cleary M. *ENL*, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* 1994; 84:1747–52.

<sup>117</sup> Thirman MJ, Levitan DA, Kobayashi H, Simon MC, Rowley JD. Cloning of *ELL*, a gene that fuses to *MLL* in a t(11;19)(q23;p13.1) in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12110–14.

<sup>118</sup> Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Kuo MC, Tang TC, Lin TH, Lai CL. Characterization of fusion partner genes in 114 patients



with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia* 2006 ; 20:218-23.

<sup>119</sup> Pappa V, Young BD, Economopoulos T, Papageorgiou E, Panani A, Lilington D et al. Absence of MLL gene rearrangement in de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Ann Hematol* 2004; 83:170-5.

<sup>120</sup> Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J et al. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* 1993; 82:3705-11.

<sup>121</sup> Sun Y. p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer. *Mol Carcinog* 2006; 45:409-15.

<sup>122</sup> Zhang W, Kornblau SM, Kobayashi T, Gambel A, Claxton D, Deisseroth AB. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1051-7.

<sup>123</sup> Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84:3148-57.

<sup>124</sup> Melo MB, Ahmad NN, Lima CS, Pagnano KB, Bordin S, Lorand-Metze I et al. Mutations in the p53 gene in acute myeloid leukemia patients correlate with poor prognosis. *Hematology* 2002; 7:13-9.

<sup>125</sup> Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97:3589-95.

<sup>126</sup> Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H, Kitamura K, Minami S, Miyawaki S et al. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2000; 65:23-31.

<sup>127</sup> Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Sasai Y, Kobayashi M, Fujii H et al. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 1999; 13:1235-42.

<sup>128</sup> Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001; 19:1405-13.

<sup>129</sup> Tang JL, Tien HF, Lin MT, Chen PJ, Chen YC. P53 mutation in advanced stage of primary myelodysplastic syndrome. *Anticancer Res* 1998; 18:3757-61.

<sup>130</sup> Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood* 1995; 85:2189-93.

<sup>131</sup> Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 1990; 61:113–124.

<sup>132</sup> Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP regulate the expression of the granulocyte–macrophage colony-stimulating factor receptor gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15:5830–5845.

<sup>133</sup> Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 1988; 331: 277–80.

<sup>134</sup> Voso MT, Burn TC, Wulf G, Lim B, Leone G, Tenen DG. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of the transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7932–6.

<sup>135</sup> Scott EW, Simon MC, Anastai J, Singh H .The transcription factor PU.1 is required for the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 1994; 265:1573–7.

<sup>136</sup> Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* 2004; 36:624–630.

<sup>137</sup> Inomata M, Takahashi S, Harigae H, Kameoka J, Kaku M, Sasaki T. Inverse correlation between Flt3 and PU.1 expression in acute myeloblastic leukemias. *Leuk Res* 2006; 30:659-64.

<sup>138</sup> Mueller BU, Pabst T, Fos J, Petkovic V, Fey MF, Asou N et al. ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood* 2006; 107:3330–38.

<sup>139</sup> Mueller BU, Pabst T, Osato M, Asou N, Johansen LM, Minden MD et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100:998–1007.

<sup>140</sup> Lamandin C, Sagot C, Roumier C, Lepelley P, De Botton S, Cosson A et al. Are PU.1 mutations frequent genetic events in acute myeloid leukemia (AML)?. *Blood* 2002; 100:4680-1.

<sup>141</sup> Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature Cell Biol* 2002; 4:529–33.

<sup>142</sup> Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *New Eng J Med* 2005; 352: 254–66.

<sup>143</sup> Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leuk Res* 2006; DOI:10.1016/j.leukres.2006.03.013

<sup>144</sup> Rossi B, Zanolin E, Vincenzi C, Diani F, Pizzolo G, de Wynter E et al. Effect of addition of FLT-3 ligand and megakaryocyte growth and development factor on hemopoietic cells in serum-free conditions. *Stem Cells Dev* 2004; 13:362-71.

<sup>145</sup> Moore MA. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol* 2005; 33:719-37.

<sup>146</sup> Takahashi S. Identification of Flt3 internal tandem duplications downstream targets by high-throughput immunoblotting protein array system. *Am J Hematol* 2006 ; DOI:10.1002/ajh.20697.

<sup>147</sup> Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19:624-31.

<sup>148</sup> Zheng R, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG, Small D. Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood* 2004; 103:1883-90.

<sup>149</sup> Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97:2434-9.

<sup>150</sup> Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, Estey E, Giles F, Feldman E et al. Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2005; 105:335-40.

<sup>151</sup> Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:905-13.

- <sup>152</sup> Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005; 105:4792-9.
- <sup>153</sup> Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99:4326-35.
- <sup>154</sup> Choudhary C, Schwable J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T et al. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 2005 ; 106:265-73.
- <sup>155</sup> Lacayo NJ, Meshinchi S, Kinnunen P, Yu R, Wang Y, Stuber CM et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. *Blood* 2004; 104:2646-54.
- <sup>156</sup> Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100:4372-80.
- <sup>157</sup> Smith ML, Arch R, Smith LL, Bainton N, Neat M, Taylor C et al. Development of a human acute myeloid leukaemia screening panel and

consequent identification of novel gene mutation in FLT3 and CCND3. *Br J Haematol* 2005; 128:318-23.

<sup>158</sup> Ozeki K, Kiyoi H, Hirose Y, Iwai M, Ninomiya M, Kodera Y et al. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103:1901-8.

<sup>159</sup> Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98:1752-9.

<sup>160</sup> Bao L, Wang X, Ryder J, Ji M, Chen Y, Chen H et al. Prospective study of 174 de novo acute myelogenous leukemias according to the WHO classification: subtypes, cytogenetic features and FLT3 mutations. *Eur J Haematol* 2006; 77:35-45.

<sup>161</sup> Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 2005; 19:1345-9.



<sup>162</sup> Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107:3724-6.

<sup>163</sup> Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61:7233-9.

<sup>164</sup> Ciolli S, Vannucchi AM, Leoni F, Nozzoli C, Longo G, Salati A et al. Internal tandem duplications of Flt3 gene (Flt3/ITD) predicts a poor post-remission outcome in adult patients with acute non-promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2004; 45:73-8.

<sup>165</sup> de Labarthe A, Pautas C, Thomas X, de Botton S, Bordessoule D, Tilly H et al. Allogeneic stem cell transplantation in second rather than first complete remission in selected patients with good-risk acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:767-73.

<sup>166</sup> Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, Srirangan S, Wheatley K, Burnett AK, Linch DC. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135

patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 2005; 106:3658-65.

<sup>167</sup> Yoshimoto G, Nagafuji K, Miyamoto T, Kinukawa N, Takase K, Eto T et al. FLT3 mutations in normal karyotype acute myeloid leukemia in first complete remission treated with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36:977-83.

<sup>168</sup> Kang HJ, Hong SH, Kim IH, Park BK, Han KS, Cho HI et al. Prognostic significance of FLT3 mutations in pediatric non-promyelocytic acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2005; 29:617-23.

<sup>169</sup> Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M et al. KIT mutations, and not FLT3 internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 2006; 107:1806-9.

<sup>170</sup> Scholl S, Loncarevic IF, Krause C, Kunert C, Clement JH, Hoffken K. Minimal residual disease based on patient specific Flt3-ITD and -ITT mutations in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2005; 29:849-53.

<sup>171</sup> Kainz B, Fonatsch C, Schwarzinger I, Sperr WR, Jager U, Gaiger A. Limited value of FLT3 mRNA expression in the bone marrow for prognosis and

monitoring of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005; 90:695-6.

<sup>172</sup> Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106:3747-54.

<sup>173</sup> Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T 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; 11:1605-9.

<sup>174</sup> Xu F, Taki T, Yang HW, Hanada R, Hongo T, Ohnishi H et al. Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br J Haematol* 1999; 105:155-62.

<sup>175</sup> Shih LY, Lin TL, Wang PN, Wu JH, Dunn P, Kuo MC et al. Internal tandem duplication of fms-like tyrosine kinase 3 is associated with poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2004; 101:989-98.

<sup>176</sup> Georgiou G, Karali V, Zouvelou C, Kyriakou E, Dimou M, Chrisochou S et al. Serial determination of FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome patients at diagnosis, follow up or acute myeloid leukaemia transformation: incidence and their prognostic significance. *Br J Haematol* 2006; 134:302-6.

<sup>177</sup> Zwierzina H, Anderson JE, Rollinger-Holzinger I, Torok-Storb B, Nuessler V, Lyman SD. Endogenous FLT-3 ligand serum levels are associated with disease stage in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999; 13:553-7.

<sup>178</sup> De Angelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB et al. Phase I clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood* 2006; DOI 10.1182/blood-2006-02-005702.

<sup>179</sup> Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL et al. SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood* 2003; 102:795-801.

<sup>180</sup> O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA et al. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3

phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. Clin Cancer Res 2003; 9:5465-76.

<sup>181</sup> Smith BD, Levis M, Beran M, Giles F, Kantarjian H, Berg K et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Blood 2004; 103:3669-76.

<sup>182</sup> Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. Blood. 2005; 105:54-60.

<sup>183</sup> Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, Eichenlaub S, Reindl C, Ellwart JW et al. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). Blood 2005 ; 105:3679-85.

<sup>184</sup> Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. Blood 2006; 107:293-300.

<sup>185</sup> Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995; 80:729-38.

<sup>186</sup> Wheadon H, Paling NR, Welham MJ. Molecular interactions of SHP1 and SHP2 in IL-3-signalling. *Cell Signal* 2002; 14:219-29.

<sup>187</sup> David M, Chen HE, Goelz S, Lerner AC, Neel BG. Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* 1995; 15:7050-8.

<sup>188</sup> Chen HE, Chang S, Trub T, Neel BG. Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* 1996; 16:3685-97.

<sup>189</sup> Paulson RF, Vesely S, Siminovitch KA, Bernstein A. Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat Genet* 1996; 13:309-15.

<sup>190</sup> Shultz LD, Rajan TV, Greiner DL. Severe defects in immunity and hematopoiesis caused by SHP-1 protein-tyrosine-phosphatase deficiency. *Trends Biotechnol* 1997; 15:302-7.

<sup>191</sup> Kruger J, Butler JR, Cherapanov V, Dong Q, Ginzberg H, Govindarajan A et al. Deficiency of Src homology 2-containing phosphatase 1 results in abnormalities in murine neutrophil function: studies in motheaten mice. *J Immunol* 2000; 165:5847-59.

<sup>192</sup> Furukawa T, Narita M, Sakaue M, Otsuka T, Kuroha T, Masuko M et al. Primary familial polycythaemia associated with a novel point mutation in the erythropoietin receptor. *Br J Haematol* 1997; 99:222-7.

<sup>193</sup> Paling NR, Welham MJ. Tyrosine phosphatase SHP-1 acts at different stages of development to regulate hematopoiesis. *Blood* 2005; 105:4290-7.

<sup>194</sup> Beghini A, Ripamonti CB, Peterlongo P, Roversi G, Cairoli R, Morra E et al. RNA hyperediting and alternative splicing of hematopoietic cell phosphatase (PTPN6) gene in acute myeloid leukemia. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2297-304.

<sup>195</sup> Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 129:60-5.

<sup>196</sup> Luo JM, Liu ZL, Hao HL, Wang FX, Dong ZR, Ryuzo O. Mutation analysis of hematopoietic cell phosphatase gene in acute leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2004; 12:128-32.

<sup>197</sup> Chen P, Levis M, Brown P, Kim KT, Allebach J, Small D. FLT3/ITD mutation signaling includes suppression of SHP-1. *J Biol Chem* 2005; 280:5361-9.

<sup>198</sup> Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51:189-99.

<sup>199</sup> Mitelman F. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tennessee, October 1994. Basel: S. Karger AG ,1995.

<sup>200</sup> Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.

<sup>201</sup> Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.

<sup>202</sup> Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10:1911-8.



<sup>203</sup> Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298:1912-34.

<sup>204</sup> Mustelin T, Rahmouni S, Bottini N, Alonso A. Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation. *Immunol Rev* 2003; 192: 139–147.

<sup>205</sup> Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004; 36:337-8.

<sup>206</sup> Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344:1031-7.

<sup>207</sup> Sattler M, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Winkler T, Algate PA et al. BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19:7473-80.