

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Biologia

Departament de Bioquímica i Biologia

Molecular

Programa Oficial de Postgrau en Biotecnologia



Caracterización Molecular de las Leucemias Mieloides Agudas *de novo*

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Mariam Ibáñez Company

Dirigida por:

Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Dra. Esperanza Such Taboada



VNIVERSITAT D VALÈNCIA
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

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

ESPERANZA SUCH TABOADA, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS *DE NOVO*”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Mariam Ibáñez Company**, Licenciada en Biología, y reúne, a nuestro juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

Fdo.: Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Fdo.: Dr. Esperanza Such Taboada

Valencia, Junio 2013

“El éxito en la vida no se mide por lo que has logrado, sino por los obstáculos que has tenido que enfrentar en el camino.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas me gustaría agradecer a todas y a cada una de las personas que han hecho posible que esta Tesis saliera adelante y, lo más importante, que han estado a mi lado de una manera u otra a lo largo de estos años fuera y dentro del Servicio de Hematología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

En primer lugar quería darle las gracias al Prof. Miguel Ángel Sanz por darme la oportunidad de unirme a su grupo, por su admirable vocación clínica y científica, por sus sabios consejos, por la perseverancia, rigurosidad y responsabilidad con la que me ha enseñado a trabajar. Gracias por ser un gran profesor los <lunes con el jefe>. Pero sobretodo, muchas gracias por haberte mantenido en pie en la recta final de esta Tesis pese a no <<sentirte las piernas>>.

A la Dra. Esperanza Such, sin la que hoy no sería la persona que soy. Gracias por haberme permitido aprender tanto a tu lado y sobre todo por cada uno de tus consejos, por haberme brindado todo tu apoyo, y lo que es más, por haber confiado siempre en mí, mucho más que yo misma. Gracias también por esas 'mini broncas' que me has tenido que dar para hacerme reflexionar y hacerme 'parar'. Desde el primer día que empecé a trabajar junto a ti has sido mi modelo a seguir, y lo seguirás siendo. Siempre has tenido una palabra de aliento y me has animado a luchar por conseguir todo lo que me he propuesto. Gracias por contar conmigo siempre y por ser tan accesible y cercana. Créeme cuando te digo que sin ti, nunca habría alcanzado mis metas profesionales, ni tampoco, muchas de las personales. Y por encima de todo, te doy las gracias por ser mi amiga, además de una gran compañera.

Gracias al Dr. José Cervera, que sin ser director de esta Tesis podría considerarse codirector de la misma. Gracias por tu enorme dedicación y paciencia, y por haber escuchado atentamente cada una de las ideas y problemas que te he planteado, mejorando siempre las primeras y ayudándome a resolver los segundos. Gracias a ti también por la confianza que has depositado en mi formación como investigadora y por haberme animado a zambullirme en el mundo de la NGS que tanto me apasiona e ilusiona. Espero que, aunque ya no estés en la mesa de detrás, y tengas 'nuevas chicas', sigamos creando muchos nuevos proyectos juntos.

A mis compañeras del 'labo', a M^a Ángeles, por escucharme y por todos esos abrazos que me has dado siempre que lo he necesitado, y que espero que me sigas dando pese a ser la nueva Super. Gracias por haber sido 'mi mami del labo'. A la Dra. Ana Valencia, a la que echo muchísimo de menos, por su alegría, por todos sus ánimos y por bailar conmigo cada vez que un experimento salía bien. Gracias por

haberme dejado compartir mesa contigo, pese a tener unas gafas de cada color. A mis hematólogas 'contaminadas' que poco a poco fueron incorporándose a las CitoG, Irene, Inés y María, por no ser sólo mis compis, sino también mis amigas. Gracias por darme lo mejor de vosotras, por escucharme y aconsejarme. Me siento muy afortunada de poder trabajar con vosotras. Gracias por hacer del trabajo algo divertido y por formar una mini familia. Siempre me habéis animado a seguir adelante por grande que fuese el fracaso y me habéis mostrado el lado positivo de las cosas. Y gracias por haberme enseñado tantísimas cosas sobre Hematología, sin vosotras nunca habría aprendido que un 'paciente no puede recaer después de morirse'.

Y cómo no, nuestros grandes técnicos Bea, Iván, Ana, M^a Carmen y Ángela gracias porque con vuestro trabajo diario habéis contribuido a esta Tesis.

No me puedo olvidar de Marta, 'mi pequeño saltamontes', gracias por ser una gran confidente. Eres una gran luchadora y una excepcional investigadora. Gracias también al resto de miembros del Laboratorio de Biología Molecular, en especial a la Dra. Eva Barragán, por haberme prestado siempre su ayuda.

Al servicio de Hematología de La Fe al completo, al excelente equipo de adjuntos, residentes, enfermeros, técnicos, secretarios, etc, porque sin ellos mi Tesis no habría sido posible. En especial a los Drs: Mariluz Pérez-Sirvent (por tener siempre unas palabras amables y prestarme sus apreciadas laminillas), a Malé Senent (por ser tan cercana y estar dispuesta a ayudarme siempre en todo), a Federico Moscardó (siempre bromeando), a Adriana Gascó (Barcelona será inolvidable), a Amparo Avaria y a todos los resis, que han hecho que me sienta una más. A Lourdes Cordon, por haber sido mi amarilla, y a todas las chicas del laboratorio de los colorines. A Silves Oltra, por haber jugado al tetris con mis secuencias para que las tuviera cuando las necesitaba y por haberme enseñado todo sobre secuenciación. También, a la Dra. Alegría Montoro, que sin ser de este servicio, se han convertido en un gran apoyo y motivación.

A todos mis compis de la Uni, que compartieron conmigo tantos momentos, haciéndolos únicos, en especial a Nere (por ser tan inconformista, ser tan luchadora y rescatarme cuando más lo necesité), a M^aCarmen y a Moon (por escucharme, tener las palabras adecuadas para cada situación y animarme siempre) y a Lore (que desde la distancia siempre está presente). Y cómo olvidar al gran Manu, sin el que hoy no estaría defendiendo esta Tesis Doctoral. Gracias por ayudarme a tener esta oportunidad.

A Cris e Isma, por quererme tanto, por estar junto a mi por encima de todo, y por hacer tan especial mi vida. Sois un regalo diario.

Y por supuesto, dar las gracias a los más importantes, mi familia. Gracias por ser mi máximo apoyo y ser las personas que más confían en mí. A mi madre, por enseñarme el valor de la constancia, por animarme a seguir luchando pase lo que pase, por tus desvelos y consuelos, y por mostrarme que éste es mi camino. A mi padre, por estar sin estar, y por sentirse tan orgulloso de mí. A mis hermanos, en especial a mi hermana Anaïs, por cada uno de tus besos y abrazos, y por tus lecciones sobre la vida (pese a ser la peque). A mis iaios, por permitirme crecer a vuestro lado, en especial a mi iaia Maruja. A mis tíos, M^aCarmen y José (por ser como unos padres y estar en esos momentos que tanto os necesitamos las tres), y a 'la Cristi' y Tito (siempre os estaré infinitamente agradecida por *todo*). Y a Ramón, por sentirte orgulloso de mí, sin tener que hacerlo. A Desi y Lorena, por ser las mejores primas.

Y por último, no por ello menos importante, a Javi (*SuperJota*). Por encontrarme cuando más perdida estaba, por enseñarme a ser mejor persona y mostrarme que las cosas más sencillas son las más maravillosas. Por tu infinita paciencia, apoyo y dedicación (principalmente en éstos últimos meses, *Himalaya*). Por ser mi nueva familia. Por tu confianza ciega en mí. *Gracias por creer en mí*.

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDOS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	11
1.1.1. <i>Epidemiología y etiopatogenia</i>	11
1.1.1.1 Clasificación de la LMA.....	16
1.1.1.2 Factores pronóstico en la LMA.....	19
1.2. NUEVOS MARCADORES MOLECULARES EN LA LMA.....	25
1.2.1. <i>Mutaciones de ASXL1</i>	28
1.2.2. <i>Mutaciones de IDH</i>	31
1.2.3. <i>Mutaciones de c-CBL</i>	36
1.2.4. <i>Mutaciones de DNMT3A</i>	38
1.2.5. <i>Mutaciones de TP53</i>	41
2. HIPÓTESIS.....	45
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIAL Y MÉTODOS	53
4.1. PACIENTES.....	55
4.2. ESTUDIO CITOGENÉTICO	55
4.2.1. <i>Cultivo</i>	56
4.2.2. <i>Sacrificio del cultivo</i>	56
4.2.3. <i>Preparación de extensiones</i>	56
4.2.4. <i>Tinción de bandas G</i>	56
4.2.5. <i>Análisis del cariotipo</i>	57
4.3. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES	57
4.3.1. <i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	57
4.3.2. <i>Caracterización molecular de los pacientes</i>	58
4.3.3. <i>Estudio del estatus mutacional de los genes ASXL1, IDH1, IDH2, c-</i> <i>CBL, DNMT3A y TP53</i>	60
4.3.3.1 <i>Diseño de cebadores</i>	60
4.3.3.2 <i>Técnica de curvas de disociación de alta resolución (High</i> <i>Resolution Melting)</i>	64
4.3.3.3 <i>Secuenciación</i>	70

4.4. DEFINICIONES.....	72
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
5. RESULTADOS	75
5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	77
5.2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO HRM.....	80
5.3. FRECUENCIA Y ASOCIACIONES DE LAS MUTACIONES EN LA SERIE GLOBAL .	82
5.3.1. ASXL1.....	82
5.3.2. IDH1/IDH2.....	87
5.3.3. C-CBL	92
5.3.4. FLT3, NPM1 y CEBPA	92
5.3.5. <i>Relación entre las mutaciones detectadas en los genes de estudio</i>	92
5.3.6. <i>Impacto de las mutaciones de ASXL1, IDH1 e IDH2 en el</i> <i>pronóstico de la serie global.....</i>	94
5.4. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES EN EL CODÓN R882 DEL GEN <i>DNMT3A</i> EN LOS PACIENTE DE RIESGO CITOGENÉTICO INTERMEDIO (RCI).....	101
5.4.1. <i>Características de los pacientes de RCI.....</i>	101
5.4.2. <i>Frecuencia de las mutaciones de DNMT3A y asociación con las</i> <i>características clínico-biológicas</i>	105
5.4.3. <i>Estudio de la concomitancia de las mutaciones</i>	108
5.4.4. <i>Impacto de las mutaciones en la supervivencia.....</i>	109
5.5. ANÁLISIS DE LOS PACIENTES DE RIESGO CITOGENÉTICO ADVERSO (RCA)	116
5.5.1. <i>Características de los pacientes de RCA</i>	116
5.5.2. <i>Frecuencia de las mutaciones de TP53 y asociación con las</i> <i>características clínico-biológicas</i>	120
5.5.3. <i>Estudio de mutaciones simultáneas</i>	124
5.5.4. <i>Análisis de supervivencia</i>	125
6. DISCUSIÓN	131
7. CONCLUSIONES	144
8. BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXO	172

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- CALGB** = Cancer and Leukemia Group B
- CBF** = Core-binding factor
- CGH** = hibridación genómica comparada
- CMH** = Células madre hematopoyéticas
- DMSO** = Dimetilsulfóxido
- DPT** = Duplicaciones en tándem de MLL
- DNA** = ácido desoxiribonucleico
- EBMT** = European Group for Blood and Marrow Transplantation
- FAB** = Franco-Americano-Británico
- FISH** = fluorescence in situ hybridization
- ISCN** = Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica
- Kb** = Kilobases
- LMA** = leucemia mieloide aguda
- MO** = médula ósea
- MRC** = Medical Research Council
- OMS** = Organización Mundial de la Salud
- PCR** = polymerase chain reaction
- RC** = Riesgo de recaída
- RCA** = Riesgo citogenético adverso
- RCI** = Riesgo citogenético intermedio
- SLE** = supervivencia libre de enfermedad
- SG** = supervivencia global
- SMD** = síndrome mielodisplásico
- SMPC** = síndrome mieloproliferativo crónico
- SNP** = Single Nucleotide Polymorphism
- SP** = sangre periférica
- SSP** = sequence-specific primer
- STR** = short tandem repeat
- SWOG/ECOG** = Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group
- TPH** = trasplante de progenitores hematopoyéticos
- UPD** = disomía uniparental

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leucemia Mieloide Aguda

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad clonal heterogénea resultante de la transformación maligna de células madre hematopoyéticas. Se caracteriza por la presencia de diversas alteraciones genéticas adquiridas en células de estirpe mieloide que alteran sus mecanismos normales de auto-renovación, proliferación y diferenciación celular (Fröhling *et al.*, 2005). Como consecuencia, en la médula ósea se acumulan precursores mieloides inmaduros con capacidad de replicación, pero sin capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras. De este modo, el espacio medular es ocupado por células tumorales que impiden una hematopoyesis normal, provocando una insuficiencia medular y las consecuencias clínicas que de ello se derivan (Estey *et al.*, 2006).

En los últimos años ha tenido lugar un importante avance en el conocimiento del sustrato biológico de la LMA, derivado fundamentalmente de la identificación de nuevas alteraciones moleculares hasta ahora desconocidas. Sin embargo, el conocimiento sobre el papel biológico de buena parte de estas alteraciones es todavía deficitario. Además, las complejas interacciones derivadas de la presencia combinada de estas alteraciones, así como el impacto clínico que de ello pudiera derivarse, hace que este campo un área de especial interés para profundizar en la investigación biológica de la LMA.

1.1.1. Epidemiología y etiopatogenia

En los países occidentales, la LMA tiene una incidencia de 2-3 nuevos casos por 100.000 habitantes al año, con un incremento progresivo con la edad, hasta alcanzar un pico de 12,6 por 100.000 habitantes/año en pacientes mayores de 65 años. Se estima que en Europa el 0.6% de todas las formas de cáncer corresponden a LMA, lo que equivale a unos 18.000 casos nuevos de LMA cada año, suponiendo para una población como la española, entre 900 y 1000 nuevos casos anuales, aproximadamente (Sanz M, 2001; Sanz M *et al.*, 2003). Esta enfermedad comprende el 80% de las leucemias

agudas en adultos y el 15-20% de las pediátricas, siendo la neoplasia más frecuente en neonatos. Dentro de la totalidad de los procesos neoplásicos, la LMA es la causante del 1,2% de la mortalidad global por cáncer.

Pese a que en la gran mayoría de los casos la causa de la LMA se desconoce, se sabe que hay diversos factores que predisponen a sufrir estas hemopatías y que podrían explicar hasta un 5% de los casos. Entre ellos destacan los factores genéticos, las inmunodeficiencias, ciertos factores ambientales y los virus. Varios hechos apoyan la participación de factores genéticos en el desarrollo de las LMA. Por ejemplo, se ha demostrado que la probabilidad de que un hermano gemelo de un sujeto afecto sufra esta enfermedad es superior a la de la población sana (Kellet, 1937; Maureen *et al.*, 1998; Higgins *et al.*, 2001). Además, la LMA se ha descrito con una mayor incidencia en pacientes con cromosomopatías (como el síndrome de Down), (Hasle *et al.*, 2000) con los síndromes caracterizados por una reparación defectuosa del DNA (Taylor, 2001) o con el síndrome plaquetario familiar (Minelli *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha visto que ciertos factores ambientales influyen en la génesis de las LMA, que es la neoplasia que más a menudo se asocia a las radiaciones ionizantes (como por ejemplo accidentes nucleares o procedimientos médicos), siendo en estos casos la estirpe mieloide la que con mayor frecuencia resulta afectada (Bolufer *et al.*, 2007; Guillem *et al.*, 2007). Por último, en modelos animales, se ha demostrado la acción de los virus en el desarrollo de las leucemias, e incluso a día de hoy, se dispone de modelos experimentales de leucemias inducidas por virus (Safaa *et al.*, 2012). Pese a que no hay pruebas definitivas de que ello también ocurra en la especie humana, se supone que los virus, especialmente los retrovirus, pueden contribuir al desarrollo de la LMA (Workman *et al.*, 2007; Zuber *et al.*, 2009).

Aunque las causas genéticas involucradas en el desarrollo de las enfermedades hematológicas están siendo investigadas desde hace muchos años, el proceso de la leucemogénesis no está aclarado por completo.

En los últimos años, han sido muchos los avances que se han efectuado en el conocimiento de los mecanismos que determinan la transformación maligna de las células precursoras de la hematopoyesis. La caracterización sistemática de anomalías cromosómicas estructurales junto

con la reciente incorporación de los microarrays de DNA y la ultrasecuenciación de los genomas, han determinado la implicación de un gran número de genes. Un ejemplo de ello es el papel que juegan los protooncogenes en el desarrollo de la enfermedad. Se ha visto que cuando existe una mutación en estos genes, el crecimiento y la diferenciación celular pueden alterarse, dando lugar a la transformación neoplásica de una clona celular de precursores inmaduros de la hematopoyesis. Sin embargo, diferentes estudios han evidenciado que la traslación y activación de protooncogenes no es la única vía de activación de la leucemogénesis, ya que también pueden ocurrir mutaciones en otros genes. Otro mecanismo es la alteración de los genes supresores de tumores que, en condiciones normales, regulan la actividad de los protooncogenes, pero como consecuencia de diversas mutaciones, permiten que éstos no puedan ser transcripcionalmente reprimidos en el momento adecuado, provocando asimismo la transformación neoplásica de una clona celular.

En conjunto, cada una de las diversas posibilidades alteran una multitud de rutas moleculares que finalmente desencadenan la enfermedad a través de la proliferación incontrolada de precursores mieloides inmaduros. Los blastos leucémicos compiten con ventaja con las células hematopoyéticas normales e inhiben su crecimiento. El resultado final es la expansión clonal de las células blásticas inmaduras mieloides que puede afectar a una o varias líneas mieloides, provocando la desaparición prácticamente total de las células hematopoyéticas normales, infiltrando la médula ósea, la sangre circulante y otros tejidos, produciendo, finalmente, una insuficiencia medular y alteraciones en la función de otros órganos infiltrados (Figura 1).

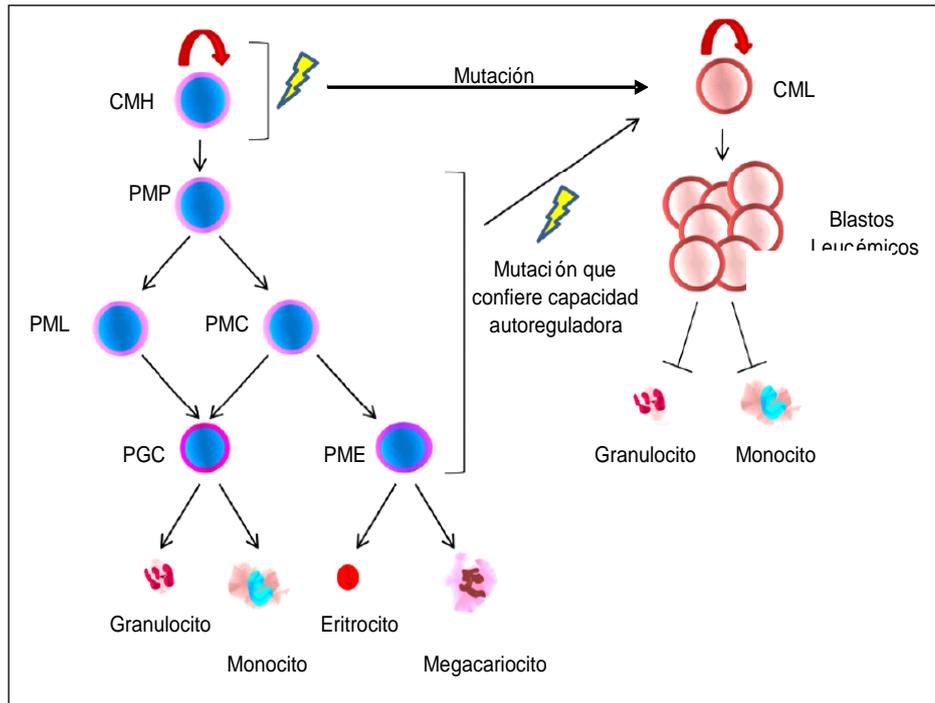


Figura 1. La célula de origen en la LMA. Durante la mielopoyesis normal las células madre hematopoyéticas (CMH) se diferencian en células sanguíneas maduras de distintos linajes. En primer lugar las CMH se diferencian en progenitores multipotentes (PMP) que a su vez se diferencian en progenitores multipotentes linfoides (PML) y en progenitores mieloides comunes (PMC). A partir de cualquiera de estas dos células se pueden formar los progenitores de granulocitos y de monocitos (PGC), mientras que sólo las PMC pueden formar progenitores de megacariocitos o eritrocitos (PME). Las mutaciones pueden acumularse en las células CMH adquiriendo la capacidad inherente de autorrenovación, dando lugar a células madre leucémicas (CML). De forma alternativa, las mutaciones pueden ocurrir en los otros linajes celulares mencionados (Horton *et al.*, 2012).

Todos estos hallazgos, junto con los estudios funcionales llevados a cabo con el fin de aclarar la patogénesis molecular, han demostrado que la mayoría de los genes involucrados en el proceso de la leucemogénesis no son capaces por sí solos de transformar una célula progenitora y, por lo tanto, es necesaria la cooperación con otros eventos oncogénicos. Actualmente, la hipótesis más aceptada sugiere que el proceso leucémico podría desencadenarse de forma secuencial mediante la adquisición de lesiones en el DNA de algunas células hematopoyéticas de forma consecutiva (Kelly *et al.*, 2002; Speck *et al.*, 2002). Así, las mutaciones en los genes implicados en el desarrollo de la LMA podrían clasificarse en al menos dos clases: las mutaciones de clase I, que confieren una ventaja proliferativa y/o de supervivencia a las células sin afectar a su capacidad de diferenciación, y las

mutaciones de clase II, que impiden la diferenciación normal de las células hematopoyéticas (Deguchi *et al.*, 2002). En modelos animales se ha visto que estos dos tipos de mutaciones cooperan dando lugar al desarrollo de una LMA, requiriéndose de al menos una alteración en un gen de cada clase o de la asociación entre mutaciones de una misma clase (Figura 2) (Renneville A *et al.*, 2008).

Entre las mutaciones de clase I, se incluyen las duplicaciones internas en tándem de *FLT3* (*FLT3-ITD*) o las mutaciones del gen *RAS*, que suponen una activación constitutiva de diversas proteínas. Se sabe que en condiciones normales, la activación de proteínas tirosín-quinasa intracelulares y de sus receptores estimula la fosforilación de las proteínas y provoca diferentes eventos a nivel intracelular que activan la transcripción en el núcleo y estimulan la proliferación celular (Kottaridis *et al.*, 2001). Sin embargo, como consecuencia de diversas mutaciones en los genes implicados en este proceso celular, los factores de crecimiento y las señales de adhesión que regulan la proliferación se activan de manera autónoma, escapando de los procesos de regulación del ciclo celular. Además de las variaciones en el funcionamiento de las proteínas como consecuencia de mutaciones génicas, las tirosín-quinasa activadas pueden transmitir señales de proliferación por afectación de familias proteicas, como es el caso de la familia *RAS* (Valk *et al.*, 2004), provocando un aumento en la capacidad de invasión y metástasis, y una disminución de la apoptosis. Debido a que las LMA con mutaciones de *RAS* no tienen fusión de quinasa ni mutaciones activantes de las mismas, se ha sugerido que, en esta enfermedad, *RAS* y las moléculas tirosín-quinasa son equivalentes desde un punto de vista biológico.

Por el contrario, las mutaciones de clase II afectan casi invariablemente a factores de transcripción, como son *NPM1* o *CEBPA* (Gupta *et al.*, 2008). Al regular la estabilidad y la actividad transcripcional de *p53*, *NPM1* puede tener una función potencial como supresor de tumores, jugando un papel crítico en la transformación celular maligna durante la leucemogénesis (Falini *et al.*, 2005). Por otro lado, *CEBPA* participa en la maduración de los granulocitos y está especialmente sobreexpresado durante este proceso, ejerciendo una regulación negativa de *MYC*, a la vez que activa transcripcionalmente a los promotores de diversos factores de crecimiento

(Williams *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 1998). La pérdida de función de *CEBPA* facilita la leucemogénesis por un bloqueo en la diferenciación granulocítica, y en estudios llevados a cabo con ratones se ha podido observar una ausencia de neutrófilos maduros con el resto de células hematopoyéticas en proporciones normales.

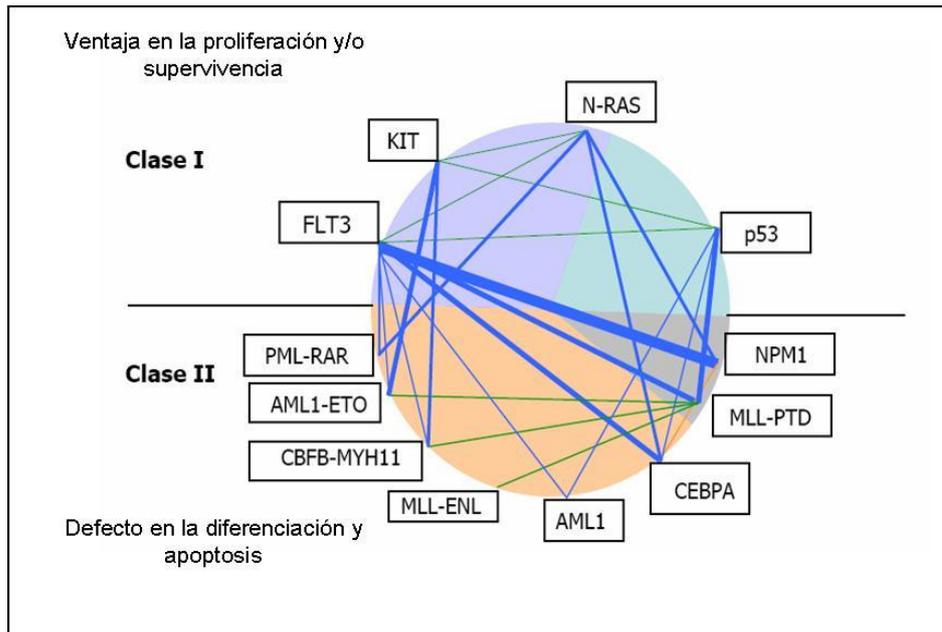


Figura 2. Modelo cooperativo de leucemogénesis. Patrón de asociación de las diferentes mutaciones. Las líneas verdes indican asociación entre mutaciones de una misma clase. El grosor de las líneas representa la prevalencia de la combinación de mutaciones (Renneville A *et al.*, 2008).

1.1.1.1 Clasificación de la LMA

Durante más de 25 años, el sistema de clasificación de la LMA se ha basado en la clasificación Franco-Américo-Británica (FAB) establecida en 1976 (Bennett *et al.*, 1976)¹ y actualizada en 1985 (Bennett *et al.*, 1985)² y 1991 (Bennett *et al.*, 1991)³. Esta clasificación buscaba identificar el equivalente leucémico de las células mieloides para cada estadio normal de diferenciación atendiendo a criterios morfológicos y citquímicos (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación FAB de la LMA.

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

LMA: leucemia mieloblástica aguda; LPA: leucemia promielocítica aguda.

Sin embargo, la baja reproducibilidad de esta clasificación y el conocimiento cada vez más profundo de la biología de la LMA que ha tenido lugar en los últimos años, pusieron de manifiesto la necesidad de incorporar nuevos parámetros para una correcta agrupación. Con este objetivo nace la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que pretende incorporar e interrelacionar la morfología, la citogenética y las alteraciones moleculares, buscando ser no sólo una herramienta útil para el diagnóstico, sino también en la clínica al correlacionarse de una forma más precisa con el pronóstico (Harris *et al*, 1999; Vardiman *et al*, 2002). La versión revisada del año 2008 de esta clasificación se muestra en la Tabla 2 (Arber *et al*, 2008).

Tabla 2. Clasificación de las neoplasias mieloides agudas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2008)*

1. LMA con anomalías genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22); CBFβ-MYH11
LMA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA (M3c y M3v)**
LMA con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL†
LMA con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
LMA con inv(3)(q21q26) o t(3;3)(q21;26); RPN1-EVI1
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Entidad Provisional : LMA con mutaciones <i>NPM1</i>
Entidad Provisional : LMA con mutaciones CEBPA
2. LMA con cambios relacionados con mielodisplasia‡
3. LMA relacionada con tratamientos citotóxicos§
4. LMA no especificada de otro modo
LMA mínimamente diferenciada (M0)**
LMA sin maduración (M1)**
LMA con maduración (M2)**
Leucemia aguda mielomonocítica (M4)**
Leucemia aguda monoblástica o monocítica (M5a y M5b)**
Leucemia aguda eritroide (M6)
Leucemia eritroide pura
Eritroleucemia
Leucemia aguda megacarioblástica (M7)**
Leucemia aguda basofílica
Panmielosis aguda con mielofibrosis (sinónimos: mielofibrosis aguda, mioesclerosis aguda)
5. Sarcoma mioide

6. Proliferación mieloide relacionada con el síndrome de Down
Mielopoyesis anormal transitoria
LMA/SMD relacionada con el síndrome de Down
7. Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica
8. Leucemias agudas de linaje ambiguo
Leucemia aguda indiferenciada
Leucemia aguda fenotípicamente mixta con t(9;22)(q34;q11.2); BCR/ABL1
Leucemia aguda fenotípicamente mixta con t(v;11q23); MLL reordenado
Leucemia aguda fenotípicamente mixta (mieloide / linfoide B), (NOS)

LMA: leucemia mieloblástica aguda.

*Adaptado de Swerdlow *et al.*, 2008.

** Entre paréntesis, su contrapartida en la clasificación FAB.

† Otras translocaciones afectando al gen *MLL* se deben reportar:

‡ Las alteraciones citogenéticas suficientes para diagnosticar LMA con cambios relacionados con mielodisplasia son:

- Cariotipo complejo (definido como 3 o más alteraciones cromosómicas)
- Alteraciones no balanceadas: -7 o del(7q); -5 o del(5q); i(17q) o t(17p); -13 o del(13q); del(11q); del(12p) o t(12p); del(9q); idic(X)(q13)
- Alteraciones balanceadas: t(11;16)(q23;p13.3); t(3;21)(q26.6;q22.1); t(1;3)(p36.3;q21.1); t(2;11)(p21;q23); t(5;12)(q33;p12); t(5;7)(q33;q11.2); t(5;17)(q33;p13); t(5;10)(q33;q21); t(3;5)(q25;q34)

§ Los Agentes citotóxicos principalmente implicados en neoplasias hematológicas relacionadas con el tratamiento son: agentes alquilantes, radiaciones ionizantes y los inhibidores de la topoisomerasa II.

|| Las leucemias agudas BCR-ABL1 pueden presentar un fenotipo mixto linfoide/mieloide, pero de cualquier forma deben tratarse como leucemias linfoblásticas agudas BCR-ABL1 positivas.

1.1.1.2 Factores pronóstico en la LMA

En general, el pronóstico de los pacientes con LMA está condicionado tanto por factores dependientes del paciente como por las características biológicas de la enfermedad: edad avanzada, estado general, antecedentes de quimio/radioterapia, trastornos hematológicos previos, hiperleucocitosis, citogenética, alteraciones moleculares, respuesta al tratamiento, persistencia de enfermedad mínima residual (EMR), etc, (Tabla 3).

Tabla 3. Factores pronóstico adversos en la LMA.

Factores pronóstico adversos		
Para el fracaso de inducción	Para la recaída	Para la supervivencia
Cariotipo desfavorable	Cariotipo desfavorable	Cariotipo desfavorable
Edad > 60 años	Edad > 60 años	Edad > 60 años
Leucemia secundaria	Tardanza en la remisión ¹	Tardanza en la remisión ¹
ECOG desfavorable	EMR elevada	EMR elevada
Gen <i>MDR1</i> (+)	Alteraciones <i>FLT3</i> ²	Alteraciones <i>FLT3</i> ²
Leucocitos > 20 x 10 ⁹ /L	Alteraciones <i>MLL</i> ²	Alteraciones <i>MLL</i> ²
Inmunofenotipo desfavorable	Mutaciones de <i>c-kit</i> en CBF ³	Mutaciones de <i>c-kit</i> en CBF ³
	Gen <i>MDR1</i> (+)	
	Leucocitos > 20 x 10 ⁹ /L	
	LDH elevada al diagnóstico	
	Afección extramedular	

¹Más de 50 días o más de un ciclo. ²Las alteraciones de *FLT3* y *MLL* diferencian grupos de mal pronóstico dentro de los pacientes con cariotipo normal. Existen otras alteraciones moleculares menos frecuentes que se asocian a mal pronóstico. Otras alteraciones moleculares como las que afectan a *NPM1* o *CEBPA* se asocian a un mejor pronóstico, siempre y cuando no se asocien a alteraciones de *FLT3* y los valores de EMR sean favorables. ³Mutaciones en el exón 17 del gen *c-kit*.

Merecen especial atención las alteraciones citogenéticas y moleculares específicas que, además de ser importantes para la precisa caracterización de las leucemias y su correcta valoración pronóstica, permiten identificar diferentes subgrupos dentro de las LMA que se caracterizan por presentar un fenotipo y un curso clínico similares.

1.1.1.2.1 Alteraciones citogenéticas

El análisis citogenético de la LMA *de novo* en el momento del diagnóstico revela alguna anomalía citogenética numérica y/o estructural en torno al 50% de los pacientes (Mrózek *et al.*, 2004) y constituye uno de los factores pronóstico más importantes (Grimwade *et al.*, 1998; Grimwade *et al.*, 2001; Mrózek *et al.*, 2004). En la Tabla 4 se resumen las alteraciones más relevantes descritas en las cuatro series de pacientes más amplias publicadas.

Tabla 4. Principales alteraciones citogenéticas en la LMA.

Alteraciones Citogenéticas	MRC n = 5876 (%) (Grimwade, 2010)	SWOG/ECOG n = 609 (%) (Slovak, 2000)	CALGB n = 1213 (%) (Byrd, 2002)
Normal	2432 (41)	244 (40)	582 (48)
t(8;21)	421 (7)	50 (8)	81 (7)
Inv(16)	284 (5)	53 (9)	96 (8)
11q23	211 (4)	42 (7)	54 (5)
+8	547 (10)	25 (4)	41 (3)
-5 /del (5q)	275 (4)	36 (6)	86 (7)
-7 /del (7q)	424 (7)	52 (9)	95 (8)
t(6;9)	42 (1)	11 (2)	8 (0,7)
t(9;22)	47 (1)	8 (1)	--
Abn (3q)	203 (3)	12 (2)	12 (1)
Otras numéricas	1402 (24)	91 (17)	287 (24)
Otras estructurales	2044 (35)	88 (14)	141 (12)
Cariotipos complejos	553 (9)	53 (9)	--

MRC: *Medical Research Council* (Grimwade *et al.*, 1998; Grimwade *et al.*, 2010); SWOG/ECOG: *Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group* (Slovak *et al.*, 2000); CALGB: *Cancer and Leukemia Group B* (Byrd *et al.*, 2002).

De un modo general, la mayor parte de los estudios han coincidido en identificar tres grupos (favorable, intermedio y adverso) con distinta probabilidad de recaída y de supervivencia en función de los hallazgos del cariotipo (Tabla 5). En la Tabla se recogen los distintos grupos de riesgo establecidos en la reciente actualización del sistema del *Medical Research Council* (MRC) (Grimwade *et al.*, 2010).

Tabla 5. Grupos de riesgo citogenético según el MRC 2010 (Grimwade *et al.*, 2010).

Grupo pronóstico	Alteraciones citogenéticas
Favorable	t(8;21); inv(16)
Intermedio	Entidades no clasificadas como favorable o adverso
Adverso	Add (5q), -5, del(5q), -7, add (7q)/del(7q), abn(3q), inv (3)/t(3;3), 20q, 21q, -17, abn(17p), t(6;9), t(9;22), t(6;11), t(11q23), cariotipos complejos con ≥ 4 anomalías no relacionadas

Aproximadamente, el 25% de los pacientes presentan citogenética favorable, categoría que incluye las alteraciones t(8;21) e inv(16) o t(16;16). Estas se dan especialmente en pacientes jóvenes con LMA *de novo* asociadas a tasas de RC de alrededor del 90% y a una supervivencia global (SG) a los 5 años de aproximadamente 65%.

En un lugar intermedio queda un grupo muy heterogéneo, que incluye la mayoría de LMA (45-60%), constituido fundamentalmente por los pacientes con cariotipo normal junto con todas aquellas alteraciones que no pueden incluirse en los grupos de riesgo favorable o adverso. Es importante destacar que las alteraciones del grupo intermedio acompañadas de alteraciones

moleculares de buen pronóstico pasan a ser consideradas como favorables y lo contrario ocurre cuando se acompañan de alteraciones moleculares de mal pronóstico que pasan a ser desfavorables.

Finalmente, los pacientes con alteraciones citogenéticas etiquetadas como de mal pronóstico muestran una tasa elevada de resistencia al tratamiento de inducción a lo que se suma una alta probabilidad de recidiva y en consecuencia una corta supervivencia (5-14%) (Grimwade *et al.*, 1998; Slovak *et al.*, 2000; Byrd *et al.*, 2002; Grimwade *et al.*, 2010). Recientemente, el grupo HOVON-SAKK de Holanda y Suiza ha identificado un nuevo subgrupo, al que ha denominado cariotipo monosómico (CM), que parece presentar un pronóstico particularmente adverso. Se define por la presencia de múltiples monosomías autosómicas o una monosomía autosómica más una o más alteraciones estructurales (Breems *et al.*, 2008). La incorporación del CM a los grupos citogenéticos del MRC contribuye a definir el pronóstico con una mayor precisión. Medeiros *et al.*, (2010), determinaron la incidencia del CM en los pacientes con LMA e identificaron que la proporción de pacientes portadores aumentaba con la edad, estando presente en el 20% de los pacientes mayores de 60 años que formaron parte de su estudio. De forma global, el CM se asocia con un peor pronóstico y una menor supervivencia, incluso peor que el grupo de pacientes de cariotipo complejo, permitiendo así la clasificación de los pacientes de riesgo citogenético adverso en dos subgrupos, en función de la presencia de un CM (Medeiros *et al.*, 2010). Además, recientemente se ha observado que los pacientes con un CM tienen una frecuencia significativa menor de mutaciones en los genes *NPM1* y en *FLT3-ITD*, lo que podría implicar una biología de la enfermedad diferente (Kayser *et al.*, 2012). Por último, se ha sugerido que estos pacientes podrían beneficiarse de un tratamiento más intensivo (Oran *et al.*, 2011).

1.1.1.2.2 Alteraciones moleculares

Durante los últimos 15 años se han identificado diversas alteraciones moleculares en los pacientes con LMA, principalmente en aquellos que presentan un cariotipo normal. Entre ellas destacan las alteraciones de los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*.

Mayoritariamente, las mutaciones del gen *FLT3* provocan la activación constitutiva de su dominio tirosina quinasa. Estas mutaciones (repeticiones internas en tándem, ITD) afectan a la región yuxtamembrana en el 20 - 27% de los pacientes con LMA con cariotipo normal, mientras que el 5 - 7% de los pacientes presentan mutaciones que afectan al dominio quinasa (D835) (Kottaridis *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Schnittger *et al.*, 2002; Thiede *et al.*, 2002). Pese a algunas discrepancias, casi todos los estudios coinciden en otorgar un papel pronóstico adverso a la presencia de mutaciones de *FLT3*-ITD (Whitman *et al.*, 2001; Stirewalt *et al.*, 2004; Reindl *et al.*, 2006; Schittenhelm *et al.*, 2006). Algunos estudios han sugerido también que el número de mutaciones encontradas en cada paciente (Kottaridis *et al.*, 2001) o la longitud de los segmentos duplicados (Stirewalt *et al.*, 2006) podrían asimismo tener influencia pronóstica. En contraste, las mutaciones *FLT3*-D835 no aparecen acompañarse de un pronóstico adverso en los pacientes de riesgo citogenético intermedio o cariotipo normal (Gale *et al.*, 2005; Heidel *et al.*, 2006; Bornhäuser *et al.*, 2007).

Otro gen bien caracterizado es *NPM1*, donde las inserciones 'in-frame' en el exón 12 se encuentran en aproximadamente el 30% de los pacientes con cariotipo normal. Este gen se encuentra implicado en diversas translocaciones cromosómicas asociadas a linfomas o leucemias y las mutaciones detectadas producen una proteína *NPM1* aberrante que se deslocaliza en el citoplasma, dónde no puede desempeñar su función (Falini *et al.*, 2005). Estas mutaciones se asocian con un pronóstico relativamente favorable en pacientes con cariotipo normal que carecen de mutaciones *FLT3*-ITD (Thiede *et al.*, 2006).

Del mismo modo, las mutaciones en el gen *CEBPA*, que participa en la maduración de los granulocitos y está especialmente sobreexpresado durante este proceso, se han descrito en pacientes con LMA con cariotipo normal con

una frecuencia entre el 7 y el 11% y resultan en una pérdida de función de *CEBPA*, que facilita la leucemogénesis por un bloqueo en la diferenciación. La mayoría de las mutaciones en *CEBPA* se caracterizan por la combinación de una mutación en la región N-terminal y otra mutación en la región Bzip, cada una en un alelo diferente. Pese a que se han descrito mutaciones heterocigotas en un único alelo (Barjesteh *et al.*, 2003), se ha visto que tan solo las mutaciones bialélicas son las que confieren un pronóstico favorable a los pacientes portadores (Lin *et al.*, 2005; Wouters *et al.*, 2009; Dufour *et al.*, 2010). Así, los pacientes con mutaciones de *CEBPA* tienen un curso clínico favorable con mejores porcentajes de supervivencia, supervivencia libre de evento (SLEV) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años que el resto de pacientes del grupo de riesgo citogenético intermedio o con cariotipo normal. Sin embargo, al igual que ocurre con las mutaciones de *NPM1*, parece que el valor pronóstico favorable de las mutaciones de *CEBPA* se pierde cuando éstas se acompañan de *FLT3*-ITD en un mismo paciente (Mrózek *et al.*, 2007; Mrózek *et al.*, 2009).

Las mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA* permiten una clasificación pronóstica de los pacientes LMA con cariotipo normal. Las mutaciones de *NPM1* o *CEBPA* se han incluido ya en la clasificación de la OMS 2008 como subentidades provisionales, ya que ambas alteraciones parecen ser eventos genéticos primarios con un papel causal de la enfermedad. Sin embargo, buena parte de las alteraciones genéticas que subyacen en esta enfermedad son todavía desconocidas. Por ello, independientemente del estudio de las mutaciones conocidas, la lista de anomalías genéticas estudiadas en este grupo de pacientes va creciendo día a día y muchas de ellas están siendo incluidas en la caracterización molecular de la LMA.

1.2. Nuevos marcadores moleculares en la LMA

Recientemente, merced sobre todo a las nuevas técnicas de secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing, NGS) la lista de los genes que juegan un papel en la fisiopatología de la LMA está creciendo rápidamente, permitiendo una mejor caracterización de la

enfermedad (Ley *et al.*, 2008; Mardis *et al.*, 2009) (Tabla 6). Desde que en el año 2008, el grupo liderado por el Dr. Timothy Ley publicó el primer caso de LMA secuenciado mediante NGS (Ley *et al.*, 2008), diversos estudios han llevado a la identificación de nuevas mutaciones recurrentes, principalmente en pacientes con LMA-CN (Mardis *et al.*, 2009; Marcucci *et al.*, 2010; Ley *et al.*, 2010; Grossmann *et al.*, 2011). El posterior estudio en series más amplias de pacientes ha permitido confirmar que estas alteraciones están presentes en una proporción significativa de pacientes con LMA, mostrando un notable solapamiento con otras mutaciones ya conocidas.

Tabla 6. Nuevas variaciones genéticas recurrentes en adultos con LMA: Significado biológico y clínico (Marcucci *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2011)

Gen	Frecuencia de mutaciones	Implicación clínica
IDH1/IDH2	16% LMA (<i>IDH1</i> 6%; <i>IDH2</i> , 8%). Asociadas con LMA-CN (<i>IDH1</i> 10-16%; <i>IDH2</i> , 10-19%).	Asociación con las mutaciones en <i>NPM1</i> ^{pos} / <i>FLT3-ITD</i> ^{neg} confiriendo un mayor riesgo de recaída y una SG inferior. Las mutaciones en <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> son mutuamente excluyentes. <i>IDH2</i> más frecuente en pacientes mayores.
KIT	25-30% de LMA-CBF.	Las mutaciones se asocian con peor evolución. Ensayos clínicos evaluando los inhibidores de <i>KIT</i> .
WT1	Mutaciones encontradas en 10-13% de LMA-CN.	Papel pronóstico por esclarecer. <i>WT1</i> SNP <i>rs.16754</i> asociado con un peor pronóstico en LMA-CN.
RUNX1	5-13% de LMA. Asociado con trisomía 13, trisomía 21 y cariotipo normal.	Mutaciones asociadas con <i>MLL-PTD</i> ; correlación inversa con la presencia de mutaciones en <i>CEBPA</i> y <i>NPM1</i> . Asociado a una menor RC, SLR y SG menor.
MLL-PTD	5-11% de LMA-CN. > 90% de pacientes con trisomía 11.	Asociación con una menor RFS y EFS. No es un factor pronóstico independiente.
NRAS	9-14% de LMA-CN.	No se ha asociado con ningún factor pronóstico. Podría predecir la

Gen	Frecuencia de mutaciones	Implicación clínica
	> 40% de LMA-CBF.	sensibilidad al tratamiento.
KRAS	5-17% de LMA-CBF.	No se ha asociado con ningún factor pronóstico.
TP53	56-76% de LMA de cariotipo complejo.	Asociado a cariotipos complejos y con una evolución peor.
TET2	< 10% LMA.	Significación clínica en investigación.
ASXL1	7 - 30% LMA <i>de novo</i> .	Significación clínica en investigación.
CBL	Mutaciones raras en LMA.	Sin impacto pronóstico.

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda; CN, cariotipo normal; FAB, Franco-Americana-Británica; SMD, síndrome mielodisplásico; NPM neoplasmas mieloproliferativos; RC, remisión completa; SLR, supervivencia libre de recaída; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; ITD, duplicación interna en tandem; TKD, dominio tirosín quinasa; UPD, disomía uniparental; SNP, polimorfismo de un solo nucleótido; CBF, factor core-binding; JM, domino yuxtamembrana; PTD, duplicación parcial en tandem.

Recientemente se ha observado que muchos de los genes en los que se han identificado mutaciones están implicados en mecanismos de regulación epigenética. La metilación aberrante del DNA, frecuentemente detectada en las neoplasias mieloides malignas, está asociada fundamentalmente con el silenciamiento de genes supresores de tumores y se cree que contribuye a la progresión de la enfermedad y a un peor pronóstico. Un ejemplo de estas nuevas mutaciones son las detectadas en los genes *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2* y *DNMT3A*. Las mutaciones de *IDH* pueden conducir a una disminución en la hidroxilación de 5mC y las mutaciones de *DNMT3A* afectan a la metilación de histonas de forma funcionalmente similar a las mutaciones de *ASXL1*. Por otro lado, se ha descrito que las mutaciones en genes como *c-CBL* activan de forma aberrante a genes como *FLT3*, provocando una diferenciación y proliferación de las células hematopoyéticas anómalas (Figura 3) (Jankowska *et al.*, 2011).

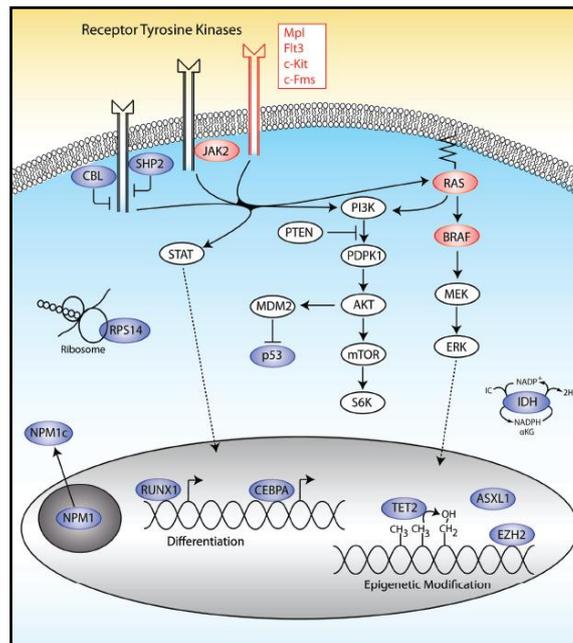


Figura 3. Dianas de las mutaciones puntuales y de las deleciones en LMA. Mutaciones en múltiples vías han sido implicadas en la patogénesis de la LMA. En rojo aparecen las mutaciones que provocan una activación, mientras que en azul aparecen las mutaciones o deleciones que provocan una pérdida de función (Bejar *et al.*, 2011).

1.2.1. Mutaciones de ASXL1

El gen *ASXL1* está compuesto por 12 exones y se localiza en el cromosoma 20 (banda q11.1). Pertenece a una familia de proteínas que tienen una doble función ya que, en áreas localizadas, interactúan con la cromatina aumentando la transcripción de ciertos genes y reprimiendo la de otros, a través de la interacción con los complejos de proteínas 'polycomb' y con distintos represores y activadores transcripcionales (Lee *et al.*, 2010). A diferencia de lo que ocurre en *Drosophila*, el papel de *ASXL1* en leucemogénesis no parece estar mediado por el complejo 'polycomb repressive deubiquitinase' (PR-DUB) (Gelsi-Boyer *et al.*, 2012). Diferentes estudios funcionales han evidenciado que el gen *ASXL1* se expresa en la mayoría de células hematopoyéticas, y aquellos que se han llevado a cabo en ratones 'knockout' han mostrado que cuando, como consecuencia de una mutación, *ASXL1* se expresa de forma anómala, la mielopoyesis presenta defectos leves sin llegar a desarrollar neoplasias hematológicas malignas (Fisher *et al.*, 2010). Datos más recientes han demostrado que *ASXL1*

interactúa con los componentes del complejo 'polycomb' PRC2 llamados EZH2 y SUZ12 que producen cambios en la metilación de las histonas H3. Estos componentes también se han encontrado mutados en neoplasias mieloides. Por todo ello, se postula que la inhibición de la función de *ASXL1* podría producir la desmetilación de las histonas H3 (Gelsi-Boyer *et al.*, 2012).

Debido a que el exón 12 del gen *ASXL1* es el encargado de codificar más del 60% de la secuencia codificante (que da lugar al dominio 'Plant HomeoDomain', PHD) es dónde comúnmente se centra la búsqueda de mutaciones. Generalmente, las alteraciones a lo largo de ésta región del gen suelen ser mutaciones sin sentido o que afectan a la pauta de lectura y que dan lugar a una proteína truncada en su porción C-terminal. En los últimos años han sido descritas variaciones en el gen *ASXL1* en diferentes neoplasias mieloides. La frecuencia descrita de mutaciones en pacientes con LMA *de novo* oscila entre un 7% y un 30%, según la población de estudio (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010). La mutación más frecuente es una duplicación de una guanina (c.1934dupG) que conduce a una proteína truncada (p.Gly646TrpfsX12). Sin embargo, un estudio más reciente defiende que esta mutación es un artefacto de la PCR (Abdel-Wahab *et al.*, 2010). Actualmente, pese a la controversia, se sigue considerando una de las mutaciones más frecuentes en neoplasias mieloides (Gelsi-Boyer *et al.*, 2012). Las alteraciones en *ASXL1* han sido detectadas principalmente en los pacientes que presentaban un cariotipo normal y se ha visto que aquellos pacientes mayores de 60 años presentaban una frecuencia de mutaciones en *ASXL1* hasta cinco veces superior a la que presentaban los pacientes más jóvenes (Metzeler *et al.*, 2011). Cuando se ha estudiado la interacción de *ASXL1* con otros genes, se ha observado una asociación excluyente entre las mutaciones de este gen y las mutaciones de los genes *NPM1* y *FLT3*. Sin embargo, se ha descrito una relación significativa entre las mutaciones de *ASXL1* y las del gen *CEBPA* (Metzeler *et al.*, 2011). Un estudio posterior llevado a cabo por Abdel-Wahab *et al.*, (2010) han confirmado estos resultados, y además, se sabe que las mutaciones del gen *ASXL1* no coexisten con mutaciones en *IDH1*, pero sí que lo hacen con mutaciones en los genes *JAK2* y *TET2*. De este último estudio, se deduce que las mutaciones en *ASXL1* son anteriores a la adquisición de estas otras

dos alteraciones y se ha demostrado que las mutaciones en este gen no parecen adquirirse durante la transformación leucémica.

Aunque con distintos matices, la mayoría de los trabajos publicados ((Abdel-Wahab *et al.*, 2010; Metzeler *et al.*, 2011) coinciden en otorgar a la presencia de mutaciones en *ASXL1* un valor pronóstico adverso, al observarse una disminución de la tasa de RC y de la supervivencia (Tabla 7). No obstante, el carácter pronóstico independiente de esta variable no ha sido demostrado de forma fehaciente. Son necesarios nuevos estudios que confirmen estos hallazgos para determinar el impacto pronóstico real. Asimismo, son necesarios estudios funcionales de la proteína para poder determinar si las alteraciones se traducen en una pérdida de supresión tumoral o en la señalización aberrante del receptor del ácido retinoico, tal y como se ha sugerido (Lee *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2012).

Tabla 7. Resumen de la bibliografía sobre el estudio de mutaciones en *ASXL1* en pacientes con LMA.

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
Carbuccia <i>et al.</i> , 2010	LMA <i>de novo</i> (n = 46)	3/46 (6%)	Relación epistásica entre las mutaciones de <i>NPM1</i> y <i>ASXL1</i> .
Boulwood <i>et al.</i> , 2010	LMA (n = 27)	8/27 (30%)	Las mutaciones son más frecuentes en CN.
Chou <i>et al.</i> , 2010	LMA <i>de novo</i> (n = 501)	54/501 (11 %) (9% LMA-CN)	Las mutaciones confieren una SG más corta. No es un factor pronóstico adverso independiente.
Rocquain <i>et al.</i> , 2010	LMA (n = 64)	11/64 (17%)	Las mutaciones no ejercen efecto sobre el pronóstico.
Shen <i>et al.</i> , 2011	LMA <i>de novo</i> (n = 1185)	27/1185 (5 %)	No hay efecto estadísticamente significativo sobre la SG y/o la SLR.
Metzeler <i>et al.</i> , 2011	LMA <i>de novo</i> (n = 423)	6/189 <60a (3%) 39/234 ≥60a (16%)	En los pacientes con LMA-CN las mutaciones se asocian con una mayor edad y con un peor resultado.

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda; CN, cariotipo normal; RC, remisión completa; SLR, supervivencia libre de recaída; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; a, años.

1.2.2. Mutaciones de IDH

La enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) es una enzima implicada en el metabolismo de los carbohidratos que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato a alfa cetoglutarato (2HG), generando la reducción de los agentes NADPH o NADH, necesarios para diferentes procesos biológicos. En los organismos eucariontes existen varias isoformas localizadas en diferentes compartimentos celulares y que emplean diferentes cofactores.

La enzima *IDH1* está localizada en el citoplasma o en el peroxisoma y cataliza las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalosuccinato utilizando exclusivamente NADP⁺ como aceptor de electrones. El gen que codifica para esta enzima se encuentra situado en el cromosoma 2 (banda q33.3) dando lugar a una proteína de 414 aminoácidos

que se presenta en homodímeros que necesitan, por cada uno, la unión de un catión magnesio o manganeso. Su variante mitocondrial es la enzima *IDH2* y cataliza las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalosuccinato utilizando también exclusivamente NADP⁺ como aceptor de electrones. Esta proteína de 452 aminoácidos está codificada por el gen *IDH2* localizado en el cromosoma 15 (banda q26.1). Participa en el metabolismo intermedio de carbohidratos y en la producción de energía estando estrechamente asociada al complejo piruvato deshidrogenasa.

Las mutaciones en *IDH1* fueron identificadas por primera vez en los gliomas malignos y posteriormente en las LMA (Parsons *et al.*, 2005; Mardis *et al.*, 2009). Estudios posteriores han revelado que algunos pacientes también presentan mutaciones en el gen *IDH2*, (Mrózek *et al.*, 2007) siendo un evento poco frecuente en pacientes con síndromes mieloproliferativos (Tefferi *et al.*, 2008), síndromes mielodisplásicos (Kosmider *et al.*, 2010) y leucemias linfoblásticas agudas (Abbas *et al.*, 2010). En cualquier caso, las mutaciones que se han descrito hasta el momento en *IDH1* e *IDH2* se encuentran localizadas ambas en el exón 4 que es el encargado de codificar el sitio de unión del isocitrato. En el gen *IDH1* la arginina en posición 132 es la que con mayor frecuencia se encuentra afectada; en el gen *IDH2* las mutaciones se localizan en el codón 140 o en el 172, codificantes también para una arginina. Los diferentes análisis funcionales que se han desarrollado en los últimos años sugieren que las alteraciones en estos genes se traducen en una pérdida de la actividad de la enzima isocitrato, ya que estos pacientes desarrollan una menor afinidad por el isocitrato, y en una ganancia de función catalizadora que provoca la acumulación en exceso de este metabolito en el medio (Dang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009). Aunque en un primer momento los análisis funcionales se desarrollaron en pacientes con gliomas portadores de mutaciones en *IDH1* o *IDH2*, estos resultados se han confirmado en pacientes que presentaban alteraciones en estos mismos genes y padecían LMA (Murugan *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2010) (Tabla 8). Otros estudios desarrollados en pacientes con gliomas han evidenciado que las mutaciones en *IDH* son un evento temprano y que existe una asociación entre la presencia de mutaciones con un incremento de la sensibilidad al tratamiento, debido a una disminución de la producción de NADPH, viéndose

así disminuido el riesgo de progresión. Gracias a un estudio publicado recientemente por Lu *et al.*, (2012), se ha sabido que el 2HG producido en las células en las que *IDH* aparece mutado puede prevenir la desmetilación de las histonas, requerida para la diferenciación celular a partir de las células progenitoras, y que este hecho es suficiente para desencadenar el bloqueo del ciclo celular. Todos estos hallazgos han sido confirmados por Figueroa *et al.*, (2010), a través de un estudio llevado a cabo en una serie de 398 pacientes con LMA *de novo* menores de 60 años. Además, estudios posteriores han relacionado estas mutaciones con anomalías en diferentes vías epigenéticas (Yan *et al.*, 2009; Mardis *et al.*, 2009).

El primer estudio llevado a cabo para conocer el estado mutacional de *IDH* en pacientes con LMA se realizó en una cohorte de 188 individuos con LMA *de novo*, donde se observaron mutaciones en *IDH1* pero no en *IDH2* en el 9% de los casos estudiados, todas ellas localizadas en el codón R132 (Mardis *et al.*, 2009). En un trabajo posterior llevado a cabo en una población china, (Chou *et al.*, 2010) la frecuencia de mutaciones *IDH1*^{R132} descrita fue del 6% y, en concordancia con lo publicado en el trabajo anteriormente mencionado, se observó una asociación entre dichas mutaciones y una citogenética de riesgo intermedio, concretamente, con un cariotipo normal. Del mismo modo, se evidenció una asociación significativa entre las mutaciones del gen *IDH1* y las mutaciones en *NPM1*. Poco después, Green *et al.*, observaron que, en los pacientes que son *FLT3-ITD* negativos, las mutaciones en *IDH1* son un factor adverso independiente para la recaída (Green *et al.*, 2010). Por otro lado, Wagner *et al.*, han descrito el SNP *rs11554137* (V71I) en el gen *IDH1* cuyo efecto consiste en alterar los niveles de mRNA y que podría asociarse con una peor evolución de la enfermedad en los pacientes portadores de la alteración (Wagner *et al.*, 2010).

Respecto a *IDH2*, se han descrito mutaciones que afectaban al exón 4 (R172 o R140) en pacientes con LMA *de novo* con una frecuencia de aproximadamente el 10% (Abbas *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2010). Las mutaciones en *IDH2*^{R172} se han asociado con una peor evolución de la enfermedad, a diferencia de aquellos pacientes que portan mutaciones en *IDH2*^{R140}. Además también se ha observado una mayor tendencia a recaer de aquellos pacientes *FLT3-ITD*^{neg}/*NPM1*^{neg} e *IDH2*^{R172}, siendo las tasas

similares a las de los pacientes con una citogenética de riesgo adverso (Green *et al.*, 2011).

Los trabajos que se han realizado en busca de un panel de mutaciones concomitantes con los genes *IDH* han puesto de manifiesto que pacientes portadores de mutaciones en *IDH2* tienden a no mostrar alteraciones en los genes *FLT3*, *NPM1* y *ASXL1* (Ward *et al.*, 2010). Estos resultados están en concordancia con los resultados publicados por Lou *et al.*, (2012), que, además, han visto una frecuente coexistencia de las mutaciones en *IDH1* con *RUNX1*, *PTPN11*, *NRAS*, *FLT3* y *MLL-PTD*.

Mayoritariamente, el análisis de la incidencia de mutaciones en ambos genes se ha llevado a cabo en series de pacientes con CN o de riesgo citogenético intermedio. Estos estudios han permitido observar, entre otras cosas, que existe una relación excluyente entre las mutaciones en *IDH1* e *IDH2*, siendo poco frecuente encontrar ambas alteraciones coexistiendo en un mismo paciente. Pese a que gran parte de los estudios muestran que en pacientes con LMA *de novo* estas mutaciones no afectan a la supervivencia, (Abbas *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2012) otros autores defienden su pronóstico adverso, sugiriendo el análisis de estas mutaciones como un nuevo marcador pronóstico. (Marcucci *et al.*, 2010; Paschka *et al.*, 2010; Boissel *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2010). Una vez más, son necesarios estudios que confirmen el carácter pronóstico independiente o no de las alteraciones de estos genes en pacientes con LMA.

Tabla 8. Resumen de la bibliografía sobre el estudio de mutaciones en *IDH* en pacientes con LMA.

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
Gross <i>et al.</i> , 2010	LMA (n = 145)	<i>IDH1</i> 11/145 (8%) <i>IDH2</i> 2/145 (1%)	Hay una asociación con los pacientes con CN. No hay diferencias en la supervivencia.
Chou <i>et al.</i> , 2010	LMA <i>de novo</i> (n = 493)	<i>IDH1</i> 27/493 (6%)	Las mutaciones se asocian con <i>NPM1</i> y con CN.
Marcucci <i>et al.</i> , 2010	LMA-CN <i>de novo</i> (n=358)	<i>IDH1</i> 49/358 (14%) <i>IDH2</i> 69/358 (19%)	Las mutaciones en <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> son más recurrentes en LMA-CN. Efecto desfavorable sobre el resultado.

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
Wagner <i>et al.</i> , 2010	LMA-CN <i>de novo</i> (<60 a) (n = 275)	<i>IDH1</i> (R132) 30/275 (11%) <i>SNP</i> rs11554137 33/275 (12%)	Solo el SNP rs11554137 se asocia con un peor pronóstico.
Thol <i>et al.</i> , 2010	LMA-CN (n = 272)	<i>IDH2</i> 33/272 (12%)	Las mutaciones no influyen sobre el tratamiento.
Paschka <i>et al.</i> , 2010	LMA (<60a) (n = 805)	<i>IDH1</i> 61/805 (8%) <i>IDH2</i> 70/805 (9%)	Las mutaciones son un factor pronóstico desfavorable en los pacientes con LMA-CN con <i>NPM1</i> ^{pos} / <i>FLT3</i> ^{neg} .
Rocquain <i>et al.</i> , 2010	LMA (n = 64)	<i>IDH1</i> 3/64 (5%) <i>IDH2</i> 4/64 (6%)	Las mutaciones no tienen efecto sobre el pronóstico.
Boissel <i>et al.</i> , 2010	LMA (n = 520)	<i>IDH1</i> 70/520 (14%) <i>IDH2</i> 15/502 (3%)	Las mutaciones se asocian con LMA-CN y con un peor pronóstico.
Abbas <i>et al.</i> , 2010	LMA <i>de novo</i> (n = 893)	<i>IDH1</i> 55/893 (6%) <i>IDH2</i> 97/893 (11%)	Las mutaciones se asocian con un peor pronóstico en los pacientes con LMA-CN con <i>NPM1</i> ^{pos} / <i>FLT3</i> ^{neg} .
Green <i>et al.</i> , 2010	LMA (<60 a) (n = 1333)	<i>IDH1</i> 107/1333 (8%)	Las mutaciones de <i>IDH1</i> son un factor negativo independiente para la recaída de los pacientes <i>FLT3-ITD</i> ^{neg} .
Figueroa <i>et al.</i> , 2010	LMA-CN <i>de novo</i> (<60 a) (n = 398)	<i>IDH1</i> 24/398 (6%) <i>IDH2</i> 33/398 (9%)	Las mutaciones son más frecuentes en LMA-RCI.
Schnittger <i>et al.</i> , 2010	LMA (n = 1414)	<i>IDH1</i> 93/1414 (7%)	Las mutaciones son más prevalentes en LMA-RCI.
Caramazza <i>et al.</i> , 2010	LMA <i>de novo</i> (n = 15)	<i>IDH</i> 4/15 (27%)	Las mutaciones se asocian con LMA - trisomía 8.
Green <i>et al.</i> , 2011	LMA (<60 a) (n = 1473)	<i>IDH2</i> 148/1473 (10%)	En pacientes sin anomalías moleculares con <i>IDH2</i> ^{R172} , tasas de recaída similares a las de LMA-RCA.
Shen <i>et al.</i> ,	LMA <i>de novo</i>	<i>IDH1</i> 52/1185 (9%)	No hay un impacto sobre

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
2011	(n = 1185)	<i>IDH2</i> 53/1185 (10%)	la supervivencia.
Lin <i>et al.</i> , 2011	LMA (n = 198)	<i>IDH1</i> 4/198 (2%) <i>IDH2</i> 10/198 (5%)	No hay efeto sobre la supervivencia.
Ho <i>et al.</i> , 2011	LMA <i>de novo</i> (n = 274)	SNP <i>rs11554137</i> 30/274 (11%)	Los pacientes SNP ^{POS} tienen una peor SG y SLR.

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda; CN, cariotipo normal; RCI, riesgo citogenética intermedio; RCA, riesgo citogenética adverso; RC, remisión completa; SLR, supervivencia libre de recaída; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; a, años.

1.2.3. Mutaciones de *c-CBL*

El gen *c-CBL* forma parte de la familia de *CBL*. Está compuesto por 16 exones que codifican 906 aminoácidos en un único transcrito. Se encuentra localizado en el cromosoma 11 (banda q23.3) y codifica una ubiquitina ligasa E3 que juega un papel regulador en la señalización de las tirosina quinasas. Por una parte favorece su activación, al provocar la unión del activador al dominio de unión en el extremo N-terminal y, por otra, sirve de adaptador al reclutar componentes reguladores de las señales de transducción como SHP2 y P13K. En las neoplasias mieloides se ha visto que el gen *c-CBL* participa en la ubiquitinación anómala de *MPL* (Saur *et al.*, 2010), *KIT* (Bandi *et al.*, 2009) y *FLT3* (Sargin *et al.*, 2007).

Se han encontrado mutaciones localizadas principalmente en el exón 8, en el exón 9 y en la región intrónica (Grand *et al.*, 2009). Muchas de las variaciones que se han descrito son sustituciones ‘missense’ en el dominio RING o en el dominio de unión que impiden la actividad ubiquitina ligasa de *CBL* por lo que las células adquieren una mayor capacidad proliferativa (Reindl *et al.*, 2009). Otras mutaciones producen alteraciones en el ‘splicing’ y la formación de nuevos codones de parada. Las mutaciones en *c-CBL* están frecuentemente asociadas con la disomía uniparental (UPD) en 11q por lo que podría tratarse de un proceso anterior a la UPD. Diferentes análisis demuestran que las mutaciones en *c-CBL* son adquiridas y raramente se ven relacionadas con otras mutaciones conocidas (Makishima *et al.*, 2009; Grand *et al.*, 2009). Los estudios llevados a cabo en pacientes con LMA, (Sargin *et*

al., 2007; Abbas *et al.*, 2008; Ghassemifar *et al.*, 2011) han relacionado *c-CBL* con la modulación de la señalización de *FLT3*, ya que al provocar una activación constitucional de las rutas de dicho gen podría activarse la transformación de las células hematopoyéticas, contribuyendo en este subgrupo de pacientes a la patogénesis de la LMA.

La mayoría de las mutaciones detectadas son homocigotas, por lo que se piensa que la proteína normal podría tener una función como supresor de tumores (Sargin *et al.*, 2007). Por lo general, las mutaciones en *c-CBL* no se asocian con mutaciones en *RAS* o *PTPN11*, pero muestran características bioquímicas y clínicas similares (Sargin *et al.*, 2007; Muramatsu *et al.*, 2010). Sin embargo, se han detectado mutaciones en *c-CBL* coexistiendo con mutaciones en los genes *RUNX1*, *FLT3*, *JAK2* y *TP53* (Sargin *et al.*, 2007; Saur *et al.*, 2010). En un estudio reciente de 577 pacientes con MPN o SMD/MPN, se encontraron mutaciones en el gen *c-CBL* en menos del 1% de los pacientes (Grand *et al.*, 2010). Esta misma frecuencia fue la detectada en estudios posteriores en el que se incluían una gran cohorte de pacientes, entre ellos pacientes con LMA (Sargin *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2008; Makishima *et al.*, 2009; Ghassemifar *et al.*, 2011). Pero esta frecuencia podría ser mayor en aquellas leucemias con aberraciones en 11q o en CBF ([t(8;21);inv(16)] (Reindl *et al.*, 2009) (Tabla).

Del mismo modo que ocurre con otros genes, existe controversia entre los resultados obtenidos a partir de estudios llevados a cabo por diferentes grupos. Por ello son necesarios más estudios que nos permitan elucidar las implicaciones reales de este gen en la leucemogénesis.

Tabla 9. Resumen de la bibliografía sobre el estudio de mutaciones en *c-CBL* en pacientes con LMA.

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
Sargin <i>et al.</i> , 2007	LMA (n = 150)	1/150 (1%)	Las mutaciones podrían modular la señalización de <i>FLT3</i> .
Abbas <i>et al.</i> , 2008	LMA <i>de novo</i> (n = 319)	2/319 (1%)	Las mutaciones podrían asociarse con las LMA CBF.
Reindl <i>et al.</i> , 2009	LMA (n = 279)	3/279 (1%)	<i>CBL</i> podría modular la activación constitutiva de <i>FLT3</i> .

Ghassemifar <i>et al.</i> , 2011	LMA (n = 90)	4/90 (4%)	Las mutaciones tienen una baja incidencia.
----------------------------------	-----------------	--------------	--

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda; CN, cariotipo normal; RC, remisión completa; SLR, supervivencia libre de recaída; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; añ, años.

1.2.4. Mutaciones de DNMT3A

Estudios recientes realizados mediante la tecnología de NGS han identificado mutaciones somáticas recurrentes en el gen *DNMT3A* (DNA metiltransferasa 3A) en un alto porcentaje de los pacientes con LMA *de novo* (Ley *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011).

El gen *DNMT3A* se localiza en el cromosoma 2 (banda p23.3) y codifica para una proteína de 912 aminoácidos. *DNMT3A* es crucial para la metilación del DNA mediante la conversión de las citosinas a 5-metilcitosina (Baylin *et al.*, 2006; Esteller *et al.*, 2007) siendo muy importante para los procesos de embriogénesis, impronta e inactivación del cromosoma X. Los ensayos enzimáticos *in vitro* muestran una reducción en la metilación del DNA en aquellas células en las que *DNMT3A* se encuentra mutado. Se ha observado un aumento de los niveles de *DNMT3A* en blastos mieloides malignos comparado con las células mononucleares de la médula ósea normal, sugiriendo que la sobreexpresión de *DNMT3A* contribuye a la hipermetilación de los promotores de algunos genes (Mizuno *et al.*, 2001).

Las mutaciones más recurrentes se dan en la arginina en posición 882 (R882), que mayoritariamente es sustituida por una histidina o una citosina (R882H o R882C), y promueven la proliferación celular en cultivos celulares. En general, todos los estudios coinciden en que las mutaciones de *DNMT3A* se asocian con una disminución general de la supervivencia (Thol *et al.*, 2011). Por ello, se han llevado a cabo diferentes trabajos con el fin de elucidar el fuerte papel patogénico que tienen las mutaciones de *DNMT3A* en la LMA, principalmente en pacientes con cariotipo normal, dónde la frecuencia de mutaciones es significativamente más alta (**Tabla 10**) (Shah *et al.*, 2011; Stegelmann *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2011).

En pacientes con LMA se ha observado que la incidencia de mutaciones varía en función de la población de estudio. En la población

occidental aproximadamente un 20% de los pacientes con esta enfermedad son portadores de mutaciones en el gen *DNMT3A*, (Stegelmann *et al.*, 2011) frente a alrededor del 7% de la población asiática (Hou *et al.*, 2012). Por ello, una hipótesis a comprobar sería determinar si existe una diferencia geográfica en la incidencia de mutaciones de *DNMT3A*.

Recientemente, en un estudio llevado a cabo por Hou, *et al.*, (2012), se ha investigado las mutaciones de *DNMT3A* en pacientes diagnosticados de LMA *de novo* y se ha analizado su interacción con la de otros 16 genes. Se han identificado mutaciones en 70 (14%) de 506 pacientes estudiados, presentando 51 (73%) de los pacientes mutados un cariotipo normal. Además, demostraron una asociación positiva de las mutaciones de *DNMT3A* con una edad avanzada, con un recuento de leucocitos y de plaquetas más alto, con un riesgo citogenético intermedio (principalmente cariotipo normal), con mutaciones en *FLT3-ITD*, *NPM1*, *PTPN11* e *IDH2*. Sin embargo, mostraron una asociación negativa con las mutaciones en *CEBPA*. El análisis multivariado demostró que la mutación *DNMT3A* es un factor independiente de mal pronóstico para la supervivencia global y para la supervivencia libre de recaída, tanto en la serie global como en el grupo de pacientes con cariotipo normal. En conjunto, estos autores han podido realizar una nueva estratificación de los pacientes con LMA en diferentes grupos pronósticos, incorporando al sistema las mutaciones de *DNMT3A*. También observaron que las mutaciones de *DNMT3A* se mantuvieron estables durante el curso de la enfermedad. Estos resultados han sido apoyados por los publicados por Marková *et al.*,(2012), que observaron que los pacientes que son portadores de mutaciones en *DNMT3A* y *FLT3-ITD* al mismo tiempo tienen una tasa de recaída mucho mayor que los pacientes que portan tan solo una de ellas (Marková *et al.*, 2012).

Más recientemente, Ribeiro *et al.*,(2012), han propuesto incorporar el análisis de las mutaciones de *DNMT3A* en el diagnóstico molecular de la LMA, ya que el efecto que se ha visto descrito es similar al que causa la edad, la citogenética y las mutaciones en *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*, y que hoy en día están reconocidos como factores pronósticos independientes (Ribeiro *et al.*, 2012).

Aunque de forma general, todos los grupos que han estudiado la incidencia de estas mutaciones en sus respectivas cohortes de pacientes coinciden en que *DNMT3A* tiene un papel importante en el desarrollo de la LMA, se requieren estudios adicionales en series de pacientes más amplias que nos permitan comprobar la importancia biológica y el impacto clínico de estas mutaciones como nuevo marcador molecular.

Tabla 10. Resumen de la bibliografía sobre el estudio de mutaciones en *DNMT3A* en pacientes con LMA.

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
Ley <i>et al.</i> , 2010	LMA <i>de novo</i> (n = 281; 56/281 RCI)	62 / 281 (22%) 37/62 R882 ^{pos}	Las mutaciones se asocian con una mayor edad, con RCI, con <i>FLT3-ITD</i> ^{mut} y con una menor SG. Factor pronóstico desfavorable independiente.
Felicitas <i>et al.</i> , 2011	LMA <i>de novo</i> (<60 a) (n = 444)	81 / 444 (18%)	Se asocia con una mayor edad, un mayor recuento de leucocitos y de plaquetas, con CN, con las mutaciones en <i>FLT3-ITD</i> , <i>NPM1</i> e <i>IDH1</i> . Factor pronóstico independiente negativo para la SG, y en CN también sobre la SLR y las tasas de RC.
Shen <i>et al.</i> , 2011	LMA <i>de novo</i> (n = 1185)	73 / 1185 (12%)	Las mutaciones se asocian con LMA M4 y M5. Factor pronóstico desfavorable independiente para la remisión.
Jiang <i>et al.</i> , 2011	LMA <i>de novo</i> (n = 182)	12/ 98 (12 %)	Asociación de las mutaciones con el RCI.
LaRochelle <i>et al.</i> , 2011	LMA <i>de novo</i> -RCI (n = 194)	39 / 194 (14 %)	Se asocia con un mayor recuento de leucocitos, con <i>FLT3-ITD</i> ^{mut} y <i>NPM1</i> ^{pos}
Hou <i>et al.</i> , 2012	LMA <i>de novo</i> (n = 500)	51/ 223 (23 %) 62 / 318-RCI (20 %)	Se asocia con una mayor edad, un mayor recuento de leucocitos y de plaquetas, con RCI y CN, con las mutaciones en <i>FLT3-ITD</i> , <i>NPM1</i> , <i>PTPN11</i> e <i>IDH2</i> . Factor pronóstico

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
			independiente negativo para la SG.
Markovà <i>et al.</i> , 2012	LMA-RCI (n = 226)	67 / 226 (30 %)	La mutación R882 ^{pos} se asocia con un mayor recuento de leucocitos. Confieren una peor SG y SLR. Los pacientes <i>DNMT3A</i> ^{mut} / <i>FLT3-ITD</i> ^{pos} recaen más.
Marcucci <i>et al.</i> , 2012	LMA <i>de novo</i> (n = 415)	145 / 415 (35%) (62% R882 ^{pos})	Es un factor pronóstico adverso independiente para la SLE.
Singh <i>et al.</i> , 2012	LMA (n = 104)	20 / 104 (12%)	El análisis de las mutaciones por HRM es un método eficaz para el diagnóstico clínico.
Ribeiro <i>et al.</i> , 2012	LMA-CN <i>de novo</i> (<60 a) (n = 415)	96 / 415 (23%) (24% R882 ^{pos})	Se asocian con <i>FLT3-ITD</i> y <i>NPM1</i> . Las mutaciones son un factor pronóstico independiente.
Renneville <i>et al.</i> , 2012	LMA-CN <i>de novo</i> (<60 a) (n = 123)	38 / 123 (29%)	Las mutaciones se asocian con LMA M4 y M5 y con <i>NPM1</i> ^{pos} . Factor pronóstico desfavorable independiente para la SG y la SLE.

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda; CN, cariotipo normal; RCI, riesgo citogenética intermedio; RC, remisión completa; SLR, supervivencia libre de recaída; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; a, años.

1.2.5. Mutaciones de TP53

El gen que codifica la proteína p53 se localiza en el cromosoma 17 (banda p13.1), se extiende a lo largo de 20 kb de DNA genómico y contiene 11 exones. Posee dos promotores diferentes, uno en la región 5' del primer exón, que origina la proteína completa, y un promotor localizado en el primer intrón, que origina un transcrito de menor tamaño, aunque se sabe que también existen secuencias reguladoras en la porción 3' del gen.

La proteína p53 está formada por 393 aminoácidos que se agrupan en 3 dominios diferenciados. El dominio aminoterminal, con actividad transactivadora, y que interacciona con la RNA polimerasa aumentando la

transcripción. En esta región también se encuentra una región rica en prolinas necesaria para la apoptosis (Walker *et al.*, 1996). En la región central se localiza el dominio de unión al DNA, resistente a la acción de enzimas proteolíticas que permite la función de p53 como factor de transcripción. Por último, el dominio carboxiterminal que dota a p53 de las funciones como señal de localización nucleolar (NLS), oligomerización y como diana de fosforilación para una quinasa dependiente de ciclina (CDK). Este dominio también interviene en la apoptosis (Lassus *et al.*, 1999), en la regulación de la transcripción y en el reconocimiento del daño de la doble cadena de DNA.

La activación del gen *TP53* se produce por daño celular y por algunos oncogenes, y produce un incremento de las formas activas de la proteína con capacidad de unión al DNA y con capacidad de funcionar como factor de transcripción. Una vez activada la proteína p53 se une a las zonas promotoras de muchos genes, impidiendo la progresión del ciclo celular en G1 y en G2 (Kuerbitz *et al.*, 1992; Kirsch *et al.*, 1995; Levine *et al.*, 1997) permitiendo que las enzimas de reparación de DNA corrijan los defectos inducidos (Taylor *et al.*, 1999) y en el caso de que éstos sean irreparables, la célula sea desviada hacia la apoptosis (Lang *et al.*, 2004; Petitjean *et al.*, 2007). Por todo ello, se ha denominado a p53 como el guardián del genoma, puesto que interviene, una vez activada, en el mantenimiento de su integridad.

Hasta el momento se han identificado un gran número de mutaciones diferentes en *TP53*, que determinan un fenotipo recesivo (Olive *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 2004) originando una proteína alterada (Petitjean *et al.*, 2007). Aproximadamente el 95% de las mutaciones descritas se localizan en el dominio de unión al DNA, (Fukasawa *et al.*, 1996) perdiendo los mutantes su afinidad por el mismo. Las consecuencias funcionales de las mutaciones de *TP53* son variadas y dependen no sólo de la región o dominio afectado sino también del tipo de mutación. Se han encontrado mutaciones en *TP53* en líneas celulares generadas a partir de casos con LMA, lo que sugiere que estas lesiones pueden contribuir a la inmortalización celular. La mayoría de las mutaciones descritas en pacientes con LMA se localizan preferentemente, como en otros tipos de cáncer, en las zonas conservadas del dominio de unión al DNA y corresponden a mutaciones puntuales que originan un cambio

en el aminoácido que codifican, aunque también se han descrito mutaciones que desplazan la pauta de lectura. En los pacientes con LMA, la inactivación de *TP53* tiene un papel destacado en la transformación neoplásica, asociándose con progresión de la enfermedad, cariotipos complejos y aumento de resistencia a la quimioterapia (Seifert *et al.*, 2009). Además, este gen coopera con otros protooncogenes, como los de la familia RAS, dando lugar a un aumento de la expresión de genes que participarían en el desarrollo tumoral (McMurray *et al.*, 2008).

Los estudios efectuados al principio de la década de los 90 sugerían una frecuencia de mutaciones del 10-15% en pacientes con LMA (Slingerland *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992; Kurosawa *et al.*, 1995). En estos trabajos se incluían un elevado porcentaje de pacientes con monosomía de los brazos cortos del cromosoma 17 (17p), en los que las mutaciones de *TP53* llegan a alcanzar el 50% de los casos. También se han descrito mutaciones en *TP53* asociadas a translocaciones cromosómicas en las que participa 17p (Wang *et al.*, 1997).

Pocos han sido los trabajos llevados a cabo en pacientes con LMA *de novo*, ya que la gran mayoría se realiza en series de pacientes con LMA secundaria. Actualmente, en pacientes con LMA *de novo*, la frecuencia de mutaciones en *TP53* que se ha detectado es menor al 10%, asociándose con cariotipos complejos (Fenaux *et al.*, 1991; Lai *et al.*, 1995) y corroborándose su asociación con una mayor resistencia a la quimioterapia y con una supervivencia más corta (Haferlach *et al.*, 2008; Bowen *et al.*, 2009; Seifert *et al.*, 2009). Ninguno de los trabajos ha detectado una asociación entre las mutaciones de *TP53* y las mutaciones de otros genes analizados (Tabla 11). A este respecto, la publicación más significativa ha sido realizada por Rücker *et al.*, (2012)⁴ que han observado alteraciones en el gen *TP53* en el 70% de los pacientes estudiados con LMA-CC (n = 234), de los que el 60% eran portadores de mutaciones y el 40% de deleciones cromosómicas. Los pacientes que presentaban cualquier alteración en *TP53* se caracterizaban por presentar mayor edad, un mayor grado de complejidad genómica y exhibían con mayor frecuencia un cariotipo monosómico.

Tabla 11. Resumen de la bibliografía sobre el estudio de mutaciones en *TP53* en pacientes con LMA.

Autores	Pacientes	Mutaciones	Correlación clínica
Fenaux <i>et al.</i> , 1991	LMA (n = 46)	4 / 10 (40 %) pa con -17p	Las mutaciones de <i>TP53</i> solo están implicadas en la leucemogénesis de los pacientes con -17p.
Fenaux <i>et al.</i> , 1992	LMA (n = 66)	3 / 66 (5 %)	Baja frecuencia en pacientes LMA. Se asocian a una mayor edad, a un CC y a menor SG.
Haferlach <i>et al.</i> , 2008	LMA (n = 235)	4 / 193 (2 %) 29 / 42 (69 %) CC	En la LMA se asocian con el grupo de pacientes con CC.
Bowen <i>et al.</i> , 2009	LMA (n = 166)	61 / 166 (37 %)	En pacientes con CC o anormalidades en cromosoma 5, 7 o 17, se asocian con una menor tasa de remisión y una menor SG.
Seifert <i>et al.</i> , 2009	LMA (n = 2272)	105 / 2272 (5%) 20 / 105 (19 %) RCA	En pacientes con CC, inversa correlación con las mutaciones en <i>FLT3</i> y <i>NPM1</i> . No ejercen efecto sobre le pronóstico.
Dunna <i>et al.</i> , 2012	LMA (n = 141)	44 / 141 (31 %)	Las mutaciones se asocian con un mayor recuento de blastos y de leucocitos, y una menor SLE.
Rücker <i>et al.</i> , 2012	LMA- CC (n=234)	94 / 234 (40%)	Las mutaciones se asocian con CC, la edad, y con mayor complejidad genómica. Factor pronóstico negativo.

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda; CC, cariotipo complejo; RA, riesgo citogenética adverso; RC, remisión completa; SLR, supervivencia libre de recaída; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; añ, años; pa, pacientes.

2. HIPÓTESIS

La patogenia de la Leucemia Mieloide Aguda implica la adquisición secuencial de varias lesiones moleculares. Algunas de estas alteraciones, descritas recientemente, han contribuido a mejorar notablemente el conocimiento sobre la leucemogénesis así como a mejorar la estimación del pronóstico de estos pacientes, especialmente en aquellos casos con un cariotipo normal. Sin embargo, el espectro completo de mutaciones, las distintas combinaciones posibles, su potencial valor diagnóstico, pronóstico o terapéutico y, sobre todo, cuáles de ellas tienen un carácter causal son todavía desconocidos. Por todo ello, aumentar el conocimiento de las alteraciones moleculares en paralelo con el comportamiento clínico podría contribuir no sólo a un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en esta enfermedad, sino también a un más apropiado manejo terapéutico.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es el estudio de nuevas dianas moleculares, que podrían ser clave durante la leucemogénesis, en una amplia serie de pacientes diagnosticados de LMA *de novo*; el fin es llegar a comprender de manera más profunda la evolución de estas neoplasias, así como identificar nuevos marcadores moleculares con potencial pronóstico y/o terapéutico. Para ello, se analizará la presencia de mutaciones en los genes *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *c-CBL*, *DNMT3A* y *TP53* mediante la técnica de análisis genético 'high resolution melting' (HRM), ya que permite realizar el cribado de variaciones genéticas de una manera global, sencilla, rápida y coste-efectiva, lo que facilita su rápida incorporación a la práctica clínica. Así, este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterización de la serie: recogida de los datos clínicos y de las muestras de pacientes con LMA *de novo* y caracterización exhaustiva de las mismas, mediante una combinación apropiada de citomorfología, citometría de flujo, citogenética convencional, FISH y detección de los reordenamientos específicos de cada subtipo de LMA, así como las mutaciones de *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *MLL-DPT* y la sobreexpresión de los genes *EVI-1* y *WT1*.
2. Puesta a punto de los métodos moleculares requeridos:
 - a. Diseño y puesta a punto de la técnica HRM para el rastreo de mutaciones de las regiones codificantes de los genes objeto de estudio: *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *c-CBL*, *DNMT3A* y *TP53*
 - b. Validación de la técnica del HRM mediante secuenciación directa por Sanger para determinar la sensibilidad y especificidad de ésta técnica, de forma global y para cada uno de los genes analizados.
 - c. Confirmación de las mutaciones detectadas por HRM en cada uno de los ensayos realizados a cada paciente mediante secuenciación directa por Sanger.
3. Estudio de la frecuencia de mutaciones en las regiones codificantes de los genes *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *c-CBL*, *DNMT3A* y *TP53* en una serie de pacientes diagnosticados de LMA *de novo* de un único centro.

4. Análisis de estadístico para correlacionar las alteraciones genómicas de *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *c-CBL*, *DNMT3A* y *TP53* con las características de los pacientes con LMA y las características de la enfermedad.
5. Evaluar el valor pronóstico de las alteraciones genómicas de *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *c-CBL*, *DNMT3A* y *TP53*, de forma aislada o combinada, con marcadores moleculares/citogenéticos bien establecidos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

La serie analizada incluyó 220 pacientes adultos diagnosticados de LMA *de novo* en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, entre septiembre de 1998 y septiembre del 2011, exceptuando pacientes del subtipo M3. Se analizaron muestras de médula ósea obtenidas en el momento del diagnóstico mediante punción esternal o en cresta ilíaca postero-superior. El diagnóstico de los pacientes se basó en los criterios morfológicos y citoquímicos de la clasificación Franco-Américo-Británica (FAB), (Bennet *et al.*, 1987) y en la clasificación de la OMS (Arber *et al.*, 2008). El criterio limitante para la inclusión en el estudio fue la disponibilidad de muestra de DNA obtenida en el momento del diagnóstico. Se realizó el estudio citogenético y molecular en todos los casos. El tratamiento recibido se ajustó al protocolo vigente en cada momento: LMA 92, PETHEMA 99 y PETHEMA 2007. Todos ellos contemplaban un esquema inicial de quimioterapia de inducción que incluía daunorubicina o idarubicina más citarabina, con o sin etopósido. La terapia post-remisión consistió en 1 ó 2 cursos de quimioterapia de consolidación con dosis intermedias/altas de citarabina, seguido de trasplante autólogo cuando fue posible (n = 28) o trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (n = 41). Los pacientes que no movilizaron no recibieron tratamiento adicional. Los pacientes que no recibieron quimioterapia (n = 37) fueron excluidos del análisis de supervivencia. El estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado en concordancia con las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales.

4.2. Estudio citogenético

El análisis citogenético convencional consistió en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células leucémicas obtenidas tras el cultivo *in vitro*.

4.2.1. Cultivo

A partir de muestras de aspirado de médula ósea se practicaron cultivos de 24 horas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibiótico. Los cultivos se prepararon en cámara de flujo laminar y posteriormente se incubaron a 37°C durante toda la noche en un incubador con 5% de presión de CO₂ y una humedad del 90%.

4.2.2. Sacrificio del cultivo

Para impedir la formación del huso acromático y que, por tanto, los cromosomas se dirijan a los polos de la célula, se añadieron 100µL de colchicina al día siguiente, dejándolo actuar 30 minutos a 37°C. Para la recolección de los cromosomas se transfirió el cultivo a un tubo cónico y se centrifugó durante 5 minutos a 1.500 rpm, decantándose el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento posteriormente. Se añadieron 10mL de CIK (atemperado a 37°C) y se incubó durante 30 minutos a 37°C para permitir su entrada en las células y que éstas aumentaran de volumen. Posteriormente, se vertió gota a gota el fijador Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) completando hasta 5mL, se centrifugó, decantó y resuspendió el botón celular. La fijación con solución de Carnoy se repitió hasta tres veces para la obtención de un botón celular limpio.

4.2.3. Preparación de extensiones

Para la elaboración de las preparaciones se vertió una gota de suspensión celular sobre un portaobjetos desengrasado previamente en metanol frío. La extensión se secó al aire y en llama. Los portaobjetos con metafases aptas se dejaron envejecer toda la noche en horno a 60°C.

4.2.4. Tinción de bandas G

Los cromosomas se identificaron mediante el método de bandas G con tripsina-Giemsa, (Seabright M *et al.*,1971). Las extensiones se sometieron a una digestión enzimática con tripsina y se tiñeron con una

solución de Giemsa (47,5mL fosfato monopotásico + 47,5mL fosfato bisódico + 5mL de Giemsa) durante 5 minutos. Por último se lavaron y se dejaron secar toda la noche.

4.2.5. Análisis del cariotipo

Para la aceptación de un cariotipo se analizaron al menos 20 metafases por muestra. Las metafases fueron analizadas usando el programa Ikaros (Metasystems Inc., Alemania). Las anomalías cromosómicas fueron descritas de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica (ISCN, Shaffer *et al.*, 2009). En función de las alteraciones encontradas, los pacientes se estratificaron en tres grupos de riesgo citogenético según el Medical Research Council trials (MRC) del 2010, (Grimwade D *et al.*, 2010):

- el grupo favorable que incluye las alteraciones t(8;21) o inv(16),
- el grupo adverso, que incluye add(5q), -5, del(5q), -7, add(7q)/del(7q), abn(3q), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), 20q, 21q, -17, abn(17p), t(6;9), t(9;22)(q34;q11), t(6;11)(q27;q23), t(11q23) y cariotipos complejos con al menos 4 anomalías no relacionadas, y
- el grupo intermedio que incluye pacientes con cariotipo normal y con alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorable o adversas.

4.3. Estudio de las alteraciones moleculares

4.3.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción del DNA se utilizó el kit comercial QIAAmp® DNA Mini kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método es rápido y eficaz y permite extraer DNA incluso de muestras muy hipocelulares. La calidad, integridad y cantidad del DNA se determinó mediante espectrofotometría, medida como absorbancia a una longitud de onda (λ) de entre 260nm y 280nm (Nanodrop), y mediante la migración en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio para visualización del nivel de degradación. Se seleccionaron aquellas muestras con concentraciones

superiores a 50 mg/ μ L, cuya cantidad total no fuera inferior a 1 μ g y presentaran ratios Abs260/280 de alrededor de 1.8. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Debido a la gran cantidad de análisis que se realizan con las muestras de DNA de un paciente y la escasa cantidad de muestra disponible, se realizó una amplificación completa del DNA genómico a partir de una pequeña cantidad, mediante el REPLI-g MIDI Kit de QIAGEN, consiguiendo así ampliar el número y la variedad de análisis a realizar sobre la muestra. Para ello, partimos de una cantidad de DNA genómico mayor a 10 ng suspendido en tampón Tris-EDTA (TE) hasta obtener un volumen final de 2,5 μ l. En aquellos casos en los que el DNA de partida era de muy buena calidad, se partió de una cantidad de 1-10 ng de DNA genómico. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se obtuvo una gran cantidad de DNA amplificado uniformemente, con un rendimiento de aproximadamente 40 μ g per 50 μ l de reacción. El DNA amplificado se diluyó en TE a una concentración 1:100 y se usó de forma general 3 μ l del DNA diluido para cada PCR, ya que la medida por densidad óptica no precisa de la cuantificación de DNA. El DNA amplificado se trató del mismo modo que el DNA genómico con los mínimos ciclos congelación-descongelación posibles, por lo que se almacenó a 4°C a corto plazo o a -20°C para almacenaje a largo plazo.

4.3.2. Caracterización molecular de los pacientes

Existen diversas alteraciones moleculares que pueden jugar un papel determinante en la leucemogénesis y que han ayudado a delimitar diferentes subgrupos de riesgo dentro del grupo de pacientes con cariotipo normal. Dentro de la caracterización molecular de los pacientes de la serie estudiada se realizó el análisis de las siguientes alteraciones que consideramos con especial relevancia pronóstica:

- **FLT3:** El estudio de la mutación de la duplicación interna en tándem del receptor *FLT3* (*FLT3-ITD*) se realizó por PCR con los cebadores que amplifican la región que codifica el dominio yuxtamembrana del receptor (Nakao M *et al.*, 1996). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L con 2 μ L de cDNA, 0,5 μ M de

cada cebador, 0,5 mM de MgCl₂ y una unidad internacional de actividad enzimática (U) de DNA polimerasa. Después de 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, a la PCR se le aplicó un programa de 30 ciclos consistentes en: etapa de desnaturalización de 45 segundos a 94°C, hibridación durante 1 minuto a 58°C y 2 minutos de amplificación a 72°C. Al producto amplificado se le hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se detectó con bromuro de etidio.

- ***NPM1***: La detección de la mutación del gen *NPM1* se fundamenta en el uso de sondas de hibridación marcadas con fluorógenos que han sido diseñadas para el alelo normal, realizando una PCR en tiempo real con el sistema LightCycler® siguiendo el método descrito por Schnittger *et al.*, (2005). La PCR fue llevada a cabo en un volumen total de 10 µL. Los cebadores y sondas fueron añadidos a una concentración de 0,5 µM y 0,4 µM, respectivamente, el MgCl₂ a 3 mM y 1 µL de LightCycler-FastStart DNA Master Hybridation Probes (Roche Diagnostics, Germany). Se aplicaron 45 ciclos de amplificación a 55°C de temperatura de hibridación. El análisis de las curvas de fusión (*melting*) comenzó a los 34°C y continuó hasta los 70°C con una rampa de elevación de 0,25°C por segundo de detección continua de fluorescencia.
- ***CEBPA***: Para detectar las mutaciones en el gen *CEBPA* se amplificaron las regiones TAD1, TAD2, (que codifican los dominios de transactivación) incluyendo la región entre ambos, y BZIP (región básica-cremallera leucina) del gen. Para ello se realizaron tres PCRs utilizando el cebador TAD1R-2 descrito por Benthous *et al.*, (2008) y el resto de cebadores descritos por Lin *et al.*, (2006). Los fragmentos amplificados presentan tamaños de 431 pb para el TAD1, 251 pb para el TAD2 y 246 pb para BZIP. Los cebadores 'forward' se utilizaron marcados en 5' con 6-FAM y la detección de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis capilar (EC), con polímero POP-7 añadiendo el marcador de pesos moleculares ROX 500. La PCR fue llevada a cabo en un volumen total de 10 µL. Los

cebadores se añadieron a una concentración de 0,5 μ M, los dNTPS a 0,25 μ M y el tampón a 1x. En el caso de TAD1 y BZIP, se añadió MgCl₂ a 2 mM, 7% de DNMSO y 1,5U de Taq Expand High Fidelity Plus PCR system. Para TAD2 se añadió MgCl₂ a 1,5 mM, 10% de DNMSO y 1,5 U de Taq Expand High Fidelity Plus PCR system. Además se preparó una mezcla de 12,5 μ L de Formamida y 0,5 μ L de marcador GS500-35 (Gene Scan™-500 ROX™ Size Standard, Part N° 401734, Applied Biosystems). Posteriormente se añadieron 2 μ L del producto de PCR en el caso de los fragmentos TAD1 y TAD2 y 0,5 μ L en el caso de BZIP. La EC se efectuó en el equipo 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems empleando un capilar de 50 cm relleno con el polímero POP-7. Las condiciones de electrofóresis del programa de inyección conocido como FragmentAnalysis50_POP7inyeccorta fueron temperatura 60°C, tiempo de inyección 12 seg a 1,6 Kvolts. y carrera a 15 Kvolts.

4.3.3. Estudio del estatus mutacional de los genes ASXL1, IDH1, IDH2, c-CBL, DNMT3A y TP53

4.3.3.1 Diseño de cebadores

Para la detección de mutaciones en los genes de estudio se usaron cebadores específicos para cada uno de ellos, considerando que para hacer un análisis mediante la técnica de 'High Resolution Melting' en un equipo LightCycler 480® (Roche Diagnostics), el fragmento amplificado generado por los cebadores no debe ser superior a 250 pb, (aunque diferentes estudios han demostrado que podrían analizarse hasta amplicones de 400 pb).

En el diseño de los cebadores se tuvo en cuenta las siguientes condiciones: la longitud de los cebadores (entre 17 y 28 nucleótidos), que el contenido de GC fuese elevado (idealmente del 45% al 55%) y que terminaran en C/G. Por otra parte, la secuencia del oligonucleótido no debe contener zonas de poliG o poliC que pudieran llevar a hibridaciones no específicas, ni zonas ricas en poliA y poliT que pudieran provocar una menor eficiencia de amplificación. Además se comprobó que la pareja de cebadores tuviera entre sí un porcentaje de GC similar, que fuesen complementarios a

las regiones deseadas y que ambos cebadores tuvieran una temperatura de fusión (T_m) similar (normalmente, T_m entre 56°C – 62°C). De lo contrario, la amplificación sería menos eficiente o incluso podría no funcionar ya que el cebador con la T_m más alta hibridaría mal o inespecíficamente a bajas temperaturas, mientras que el oligonucleótido con la T_m más baja podría no funcionar a temperaturas más altas. Las temperaturas de fusión de los cebadores, con un tamaño comprendido entre 18 y 24 bases, se calcularon mediante la fórmula de Wallace, $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$.

Por último, se comprobó que las parejas de cebadores no formaran horquillas internas y que no tuviesen una homología intra-oligonucleótido en más de 3 pares de bases, a fin de evitar la formación de estructuras parcialmente de doble cadena que pudieran interferir con la hibridación al molde. Además, se probó que no existieran alineamientos parciales ni totales entre ambos cebadores (mediante la comprobación en el programa *MEGA 4.1*, Tamura K, et al., 2007) y que sólo amplificaran la región de interés, es decir, que fueran específicos (mediante un BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de alineamiento entre secuencias de nucleótidos entre dichos cebadores y la secuencia consenso del genoma humano proporcionada por el National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Bajo estos criterios, se diseñaron cebadores definidos para cada una de las regiones de interés en los diferentes genes a estudio con la ayuda del programa informático Primer 3 [Input \(versión 0.4.0\)](http://www.microsofttranslator.com/bv.aspx?ref=SERP&br=ro&mkt=es-ES&dl=es&lp=EN_ES&a=http%3a%2f%2ffrodo.wi.mit.edu%2fprimer3%2f) http://www.microsofttranslator.com/bv.aspx?ref=SERP&br=ro&mkt=es-ES&dl=es&lp=EN_ES&a=http%3a%2f%2ffrodo.wi.mit.edu%2fprimer3%2f (Tabla 12).

Tabla 12. Secuencia de los cebadores empleados para el estudio de los genes

Gen		
	Cebador	Secuencia
ASXL1_exón 12 Fragmento 1		
	Sentido	AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT*
	Antisentido	CAGCAGTGGTGATGGTGGTGA
ASXL1_exón 12 Fragmento 2		
	Sentido	TGCCATAGAGAGGGCGGCCACC
	Antisentido	ACAGTTGGACTCACAGATGGGCTA*
ASXL1_exón 12 Fragmento 3		
	Sentido	AGAGGACCTGCCTTCTCTGAGAAA*
	Antisentido	GGAAGTGGCCAAGCTCTTGAC
ASXL1_exón 12 Fragmento 4		
	Sentido	GCAAGGACCCACCGTTCCTGC
	Antisentido	GCATTGGATACCCATCCCATCGAA*
ASXL1_exón 12 Fragmento 5		
	Sentido	ACTTGAAAACCAAGGCTCTCGT*
	Antisentido	CACGGTGAGTCCACGGATACA
ASXL1_exón 12 Fragmento 6		
	Sentido	TCTGGACTGTGCCATCTCGAG
	Antisentido	TACAAGGACAGATGGGATGGTTGC*
ASXL1_exón 12 Fragmento 7		
	Sentido	GGTGGACAAGGATGAGAAACCCAA*
	Antisentido	CCATGGCTCGCTACGCATGGG
ASXL1_exón 12 Fragmento 8		
	Sentido	CCCACGATGACAGCATGTCAG
	Antisentido	AAGTCCGTGCTATGTCACAGGACA*
ASXL1_exón 12 Fragmento 9		
	Sentido	TGGATTCCAAAGAGCAGTTCTCTTC*
	Antisentido	CCATGTCTGGTGGGGTACAGA

Gen		
	Cebador	Secuencia
<i>ASXL1</i> _exón 12 Fragmento 10		
	Sentido	CTTTTTGGCTCTGGGAATGTGG
	Antisentido	TTGGAAGGGATGCCCTTTGTCATG*
<i>ASXL1</i> _exón 12 Fragmento 11		
	Sentido	ACAGGAAAGCTACTGGGCATAGTC*
	Antisentido	CACTGACAGCAGCACGGTGGGA
<i>ASXL1</i> _exón 12 Fragmento 12		
	Sentido	GCCTTGCTGGAAGTGTGGTG
	Antisentido	ACTCTTTAGGCAGGAGCACTCTTG*
<i>IDH1</i> [±]		
	Sentido	CCATTTGTCTGAAAACTTTGCT
	Antisentido	GTAAGTCATGTTGGCAATATTGTGA
<i>IDH2</i> [±]		
	Sentido	GCTGCAGTGGGACCACTATT
	Antisentido	CTCTGCAGTACAAGGCCACA
<i>c-CBL</i> exón 8 ^φ		
	Sentido	CAGTTATTTATTCAACT
	Antisentido	CTGGCTTTTGGGGTTAGGTT
<i>c-CBL</i> exón 9 ^φ		
	Sentido	CTGTTACTATCTTTTGCTT
	Antisentido	AAAGCCGTAAAACACTTAACGA
<i>DNMT3A</i> [†]		
	Sentido	TCCTGCTGTGTGGTTAGACG
	Antisentido	CCATGTCCCTTACACACACGC
<i>TP53</i> _exón 5 [*]		
	Sentido	CAACTCTGTCTCCTTCCTCCTCCTAC
	Antisentido	GATTCCTCACTGATTGCTCTTAG
<i>TP53</i> _exón 6 [*]		

Gen		
	Cebador	Secuencia
	Sentido	CAGATAGCGATGGTGAGCAGCT
	Antisentido	GGTTAAGGGTGGTTGTCACT
<i>TP53_exón 7*</i>		
	Sentido	AGGCGCACTGGCCTCATCTTGG
	Antisentido	TGCTGTGCCCCAGCCTCTGCTTGCC
<i>TP53_exón 8*</i>		
	Sentido	GACCTGATTTCTTACTGCCTCTTG
	Antisentido	AAGGGTGCAGTTATGCCTCAGATT

* Gelsi-Boyer V *et al.*, (2010); * Green A *et al.*, (2010); ° Makishima H *et al.*, (2009); † Thol F *et al.*, (2011); ‡ Krypuy M *et al.*, (2007)

4.3.3.2 **Técnica de curvas de disociación de alta resolución (*High Resolution Melting*)**

El método de curvas de disociación de alta resolución o *High Resolution Melting* (HRM), es una técnica simple, rápida y de relativo bajo coste que se usa para la identificación de variaciones en las secuencias de nucleótidos que conforman el DNA. Los equipos de nueva generación como el LightCycler 480® (Roche Diagnostics) permiten realizar la amplificación del producto y el análisis de las curvas de ‘melting’ en el mismo vial sin ningún tratamiento post-PCR adicional, lo que simplifica el manejo y reduce problemas de contaminación. Por ello el HRM es una técnica post-PCR que puede emplearse como método de cribado de mutaciones. Además es una técnica no destructiva por lo que la muestra inicial puede emplearse para posteriores estudios de secuenciación.

La técnica de HRM se basa en la amplificación de la región de interés mediante una PCR asociando intercalantes fluorescentes que se unen específicamente a la doble cadena de DNA. Tras ello, se produce el calentamiento gradual de la muestra; a medida que las dos hebras se van separando, se emite una fluorescencia que es medida por el aparato, generando una curva característica. Las curvas de fusión presentan morfología similar pero son distinguibles unas de otras por la temperatura de

fusión (o temperatura de *melting*, del inglés) (T_m) definida como la temperatura a la que se ha desnaturalizado la mitad del DNA (Figura 4) y que es dependiente de la longitud, secuencia, contenido y distribución en GC del fragmento de DNA a estudio, (Montgomery J *et al.*, 2007). Debido a que la T_m es el parámetro con mayor influencia sobre la eficiencia y especificidad de la reacción de PCR, en un primer paso, la determinación de la temperatura de anillamiento de cada una de las parejas de cebadores se realizó mediante PCR convencional.

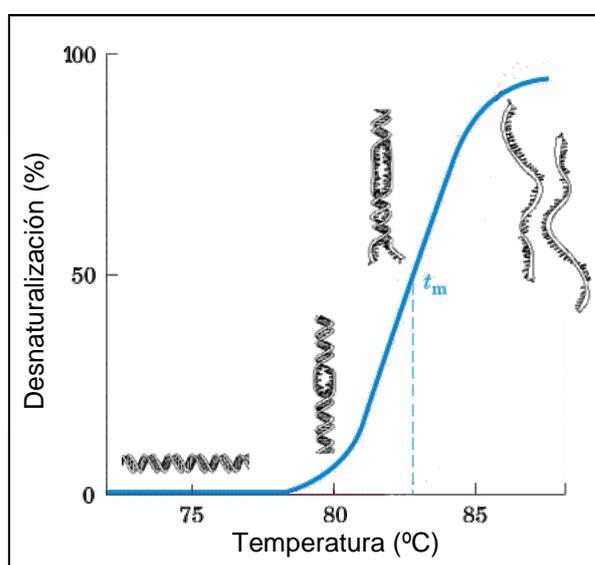


Figura 4. Temperatura de fusión (T_m).

La mezcla de reacción HRM se optimizó utilizando el reactivo LightCycler480 High Resolution Melting Master, una mezcla de reacción específicamente desarrollada para producir resultados óptimos. Debido a que las sales afectan al comportamiento de disociación, es importante que la concentración de tampón, Mg^{2+} y otras sales en la mezcla de reacción sean tan uniformes como sea posible en todas las muestras. Por ello, para asegurar la especificidad y robustez de la PCR llevamos a cabo una titulación para determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ en la reacción. Con este fin, se utilizaron concentraciones finales de $MgCl_2$ entre 1,5 y 3,5 mM,

partiendo de una solución de almacenamiento de concentración 25 mM suministrada individualmente con el kit de master mix.

Con todo ello, la amplificación por PCR y el posterior análisis de las curvas de fusión fue llevada a cabo en un equipo LightCycler 480 con un sistema de placas de 96 pocillos, empleando los cebadores específicos en cada caso. Los amplificados obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 2% para comprobar que el fragmento amplificado tuviera el tamaño esperado y, por último, se contrastó que era el adecuado mediante secuenciación convencional de Sanger. Cuando la técnica estuvo a punto para cada uno de los fragmentos de interés se analizó la serie de pacientes.

Se estudiaron:

- el exón 12 del gen *ASXL1*,
- el exón 4 del gen *IDH1*,
- el exón 4 del gen *IDH2*,
- los exones 8 y 9 del gen *c-CBL*,
- la arginina en posición R882 del exón 23 del gen *DNMT3A* y
- los exones del 5 al 8 del gen *TP53*.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado en cada ensayo, junto con una muestra de DNA mutado correspondiente al fragmento de estudio, como control positivo, y dos muestras de DNA sano, como control negativo. Las PCRs fueron amplificadas en una reacción final de 10µL, conteniendo 3 µL de DNA genómico replicado, 5 µL del master mix, una cantidad de MgCL₂ variable según cada uno de los fragmentos analizados (Tabla 13) determinada específicamente para cada uno de los fragmentos a amplificar y 50 pmol de los cebadores específicos.

Tabla 13. Tamaño del fragmento amplificado y condiciones de amplificación para cada pareja de cebadores

Gen	Amplicón (pb)	Condiciones Amplificación	[MgCl₂]
ASXL1_exón 12 Fragmento 1	341	65-55°C 1°C/cycle	2,5 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 2	336	65-55°C 1°C/cycle	2,5 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 3	343	65-55°C 1°C/cycle	2,0 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 4	303	65-55°C 1°C/cycle	2,0 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 5	353	65-55°C 1°C/cycle	2,0 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 6	307	65-55°C 1°C/cycle	2,5 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 7	358	65-55°C 1°C/cycle	2,0 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 8	384	65-55°C 1°C/cycle	2,5 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 9	366	65-55°C 1°C/cycle	2,0 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 10	306	65-55°C 1°C/cycle	2,0 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 11	349	65-55°C 1°C/cycle	2,0 mM
ASXL1_exón 12 Fragmento 12	347	65-55°C 1°C/cycle	2,5mM
<i>IDH1</i>	360	59 °C	2,0 mM
<i>IDH2</i>	293	60 °C	2,5 mM
<i>c-CBL</i> exón 8	286	60 °C	2,0 mM
<i>c-CBL</i> exón 9	309	58 °C	2,0 mM

Gen	Amplicón (pb)	Condiciones Amplificación	[MgCl ₂]
<i>DNMT3A</i>	164	59 °C	2,5mM
<i>TP53</i> _exón 5	293	65-55°C 1°C/cycle	2,5mM
<i>TP53</i> _exón 6	258	65-55°C 1°C/cycle	2,5mM
<i>TP53</i> _exón 7	200	65-55°C 1°C/cycle	2,5mM
<i>TP53</i> _exón 8	245	65-55°C 1°C/cycle	2,5mM

El programa que se empleó para la amplificación del fragmento se detalla en la Tabla 14.

Tabla 14. Programa de amplificación de la PCR por HRM

Temperatura	Ciclos	Modo de Adquisición	Incubación	Ratio [°C/s]	[°C/s]
Desnaturalización	1				
95 °C		Ninguno	600 s	4,4	
Amplificación	45				
95 °C		Ninguno	10 s	4,4	
Dependiente del primer		Ninguno	13 s	2,2	
72°C		Simple	14 s	4,4	
Fusión	1				
95°C		Ninguno	60 s	4,4	
40°C		Ninguno	60 s	2,2	
56°C			1 s	4,4	
95°C		Ninguno		0,04	25
Enfriamiento	1				
40°C		Ninguno	10 s	2,2	

El análisis de los datos de amplificación y la especificidad del producto se realizó con el programa LightCycler 480 Software, versión 1.5 (Roche Instrument Center, Rotkreuz, Switzerland). El análisis óptimo de la amplificación se consigue cuando las curvas de amplificación tienen un valor de $C_p < 30$, alcanzando una 'plateau' similar, teniendo en cuenta que entre las muestras a analizar el valor de C_p no debe variar más de 5 unidades de C_p . (Figura 5)

El análisis de las curvas de disociación se llevó a cabo mediante el software Gene Scanning, versión 1.2, que ofrece el mismo programa. En un primer paso, se realizó la normalización de los datos de las curvas de disociación, estableciendo valores uniformes de fluorescencia inicial ('pre-fusión') y final ('post-fusión') de todas las muestras. Con el parámetro que analiza el cambio de temperaturas ('temperature shift') se pudo equiparar el punto en el cual el DNA en cada muestra estaba totalmente desnaturalizado y con el que analiza las distintas curvas ('difference plot') se generó un gráfico donde las muestras quedaron agrupadas en función de sus curvas de disociación (Figura 5). De este modo, aquellas muestras que presentaron diferencias en las curvas de fusión se seleccionaron para su posterior estudio por secuenciación de Sanger, lo que, en última instancia, permitió identificar la alteración.

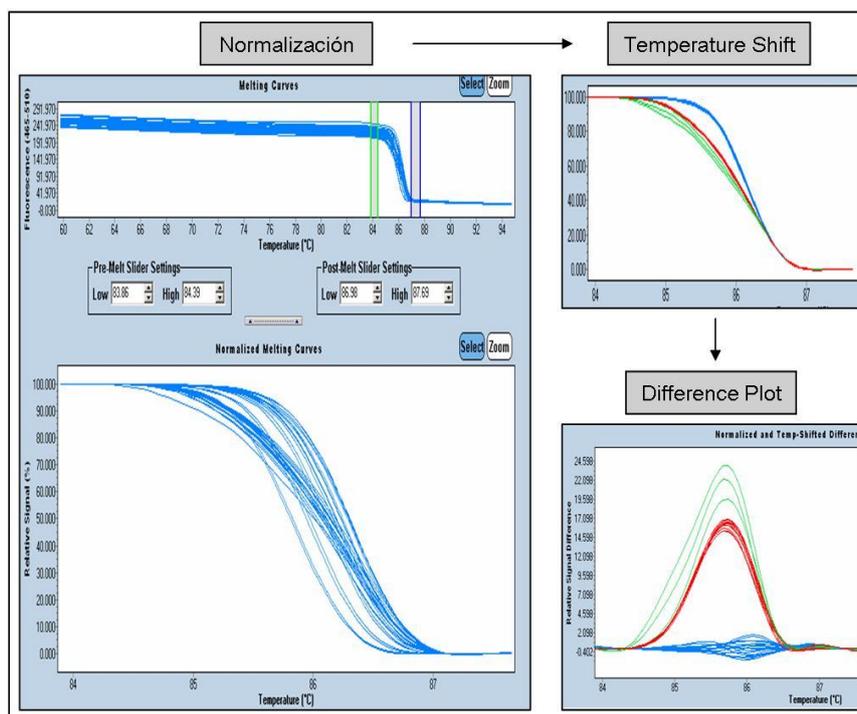


Figura 5. Análisis de las curvas de disociación HRM mediante ‘Gene Scanning’.

4.3.3.3 Secuenciación

Todas aquellas muestras que presentaban curvas de fusión diferentes se consideraron posibles portadores de alteraciones y se enviaron a secuenciar para confirmar los resultados. Para ello, el producto de PCR de cada una de las muestras se trató con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) para eliminar los restos de cebadores y de nucleótidos que pudieran haber quedado sin utilizar tras la amplificación. Se mezclaron 8 μL del producto de PCR obtenido con 3,2 μL de ExoSAP-IT y se incubaron a 37°C durante 15 minutos (tiempo en el que la enzima realiza su acción), y a 80°C durante otros 15 minutos para inactivarla. La incubación se llevó a cabo en el termociclador 2720-Thermal Cycler (Applied Biosystems).

La primera fase de la reacción de secuenciación se realizó usando 1 μL del cebador directo o reverso, 1 μL de la enzima Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3 μL del Buffer 5x Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction kit y 5 μL del producto

de la reacción con ExoSAP-IT. Esta primera fase se llevó a cabo en el termociclador 2720-Thermal Cycler, comportando una primera etapa de activación de la polimerasa a 94°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos que comprendían, una primera fase de desnaturalización de 96°C durante 10 segundos, una fase de hibridación a 50°C para todos los genes durante 6 segundos y una fase de extensión de la cadena a 60°C durante 4 minutos.

Debido a que para llevar a cabo la reacción de secuenciación de los productos amplificados, éstos deben estar libres de restos de cebadores, dNTPS, enzimas y demás compuestos utilizados durante la PCR, se realizó la purificación de las reacciones de secuenciación. Este proceso se llevó a cabo por filtración mediante el empleo del kit comercial Gel Filtration Cartridge (Genycell Biotech España, S.L.), cuando se analizaban pocas secuencias, o el kit QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany), cuando se secuenciaban 96 muestras. Estos kits permiten la purificación de 10-300 µl mediante la filtración por vacío. El sistema utiliza un sencillo procedimiento de lavado-elución. Este proceso consta de dos partes. En primer lugar, se realizó una centrifugación para eliminar el tampón de conservación de las columnas. A continuación, se añadió el producto de la PCR de secuenciación a las columnas de elución que contienen un pH óptimo para la unión del DNA, y se centrifugó de nuevo. De este modo, las impurezas se eliminaron y el DNA puro se eluyó en un pequeño volumen de dicho tampón.

Finalmente, el producto de la reacción fue resuspendido en 20 µL de formamida y se llevó a secuenciar. En todas las muestras se secuenció la cadena sentido y anti-sentido. Para ello se utilizó el secuenciador ABIPRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,).

El análisis de la secuencia se correlacionó con el GeneBank Accession number de cada uno de los genes (Tabla 15) y con los controles negativos de médulas óseas de donantes sanos, todo ello mediante el programa de análisis Sequence Scanner de Applied Biosystems y el programa MEGA 4.1, (Tamura K, et al. 2007)

Tabla 15. Número del GeneBank de cada uno de los genes analizados

Gen	GeneBank Accession Number
ASXL1	NM_015338.4
IDH1	NM_005896
IDH2	NM_002168
c-CBL	NM_005188
DNMT3A	NM_029465.1
TP53	NM_000017.10

4.4. Definiciones

Remisión completa (RC): Porcentaje de blastos en médula ósea inferior al 5% sobre la celularidad nucleada con normalización de los recuentos hematopoyéticos en sangre periférica, lo que implica un recuento absoluto de neutrófilos $> 1.000/\mu\text{l}$ y de plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{L}$ (Cheson *et al.*, 2003).

El resto de respuestas posibles al tratamiento de inducción, que incluyen la remisión con recuperación hematopoyética incompleta, la remisión sin recuperación de plaquetas, la respuesta parcial o la refractariedad, han sido consideradas en un grupo único como 'no respuesta'. Por tanto, en términos de medición de la eficacia del tratamiento de inducción sólo se ha considerado como respuesta válida la remisión completa.

Recaída de la LMA: El término recaída hace referencia a la reaparición de la enfermedad después de haber alcanzado RC. Los criterios diagnósticos son los mismos que se utilizan en el debut de la enfermedad e incluyen la presencia de un más de 5% de células blásticas en la médula ósea.

Supervivencia libre de enfermedad (SLE): Representa la probabilidad de estar vivo y sin leucemia a un momento determinado. Se calcula desde que el paciente alcanza RC, hasta que recae de la enfermedad o fallece, cualquiera de las dos cosas que ocurra en primer lugar.

Supervivencia libre de recaída (SLR): Representa la probabilidad de estar sin leucemia en un momento determinado. Se calcula desde que el paciente

alcanza RC hasta que se documenta la reaparición de la enfermedad según los criterios previamente descritos.

Supervivencia global (SG): Hace referencia a la probabilidad de estar vivo en un determinado momento. Se calcula desde la fecha de diagnóstico de la leucemia hasta la fecha de la última visita o hasta la muerte del paciente, sea ésta por la causa que sea y con independencia del estado de la enfermedad.

4.5. Análisis estadístico

Para caracterizar de forma general la serie de pacientes estudiados se realizó un análisis descriptivo que incluyó un estudio de frecuencias de las distintas variables, el análisis de las diferencias y la definición, en el caso de variables cuantitativas continuas, de su distribución según la normalidad. Para el estudio de la normalidad se emplearon las pruebas de Kolmorov-Smirnov o Shapiro-Wilk. En el caso de variables continuas se analizaron las diferencias entre grupos mediante la t de Student para variables con una distribución normal o la U de Mann-Whitney para las variables que no seguían dicha distribución. La homogeneidad de las varianzas para la t de Student se estudió mediante la prueba de Levene.

La estimación de la SLE, SLR y SG se realizó mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en dichas estimaciones de acuerdo a las distintas variables de agrupación se calcularon con el test de log-rank (Mantel, 1966).

El análisis de supervivencia se completó con un análisis multivariante mediante un modelo de regresión de Cox (Cox, 1972). Todas las variables con un valor de P inferior a 0,1 en el análisis univariante fueron trasladadas al análisis multivariante, junto con aquellas que sin tener dicho valor de P han sido descritas previamente como potenciales variables de valor pronóstico en la LMA. Las variables en las que el número de casos perdidos era mayor al 10% fueron excluidas del estudio multivariante.

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

5.RESULTADOS

5.1. Características de los pacientes.

Se incluyeron un total de 220 pacientes diagnosticados de LMA *de novo* entre septiembre de 1999 y julio de 2011 en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, y de los que se disponía de muestra de DNA al diagnóstico.

Las principales características clínicas y biológicas de los 220 pacientes incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 16. La serie estaba compuesta por 126 hombres y 95 mujeres con una mediana de edad de 58 años (extremos: 16 – 88 años), siendo el 53% de los pacientes mayores de 60 años. La mediana de edad al diagnóstico fue de 58 años (extremos: 16 – 88), Ciento veinticinco fueron hombres (57%) y 95 mujeres (43%). La mediana de leucocitos fue de $12 \times 10^9/L$ (extremos: 1 – 396), la de hemoglobina de 9,1 g/dL (extremos: 5 – 17 g/dL) y la de plaquetas de $57 \times 10^9/L$ (extremos: 5 – 572). De acuerdo con la clasificación FAB, el 30% de las LMA presentaban escasa diferenciación (n = 65), el 25% mostraban maduración granulocítica (n = 56), el 33% participación monocítica (n = 74), el 8% componente eritroide (n = 18) y el 1% componente megacariocítico (n = 2). Siguiendo esta clasificación, 4 pacientes no pudieron ser incluidos en ninguna de las categorías (3%).

En 189 pacientes (86%) el estudio del cariotipo fue valorable. Ochenta y nueve pacientes (47%) presentaron un cariotipo normal y 101 pacientes presentaron un cariotipo con alguna alteración (53%). En 12 pacientes el cariotipo no fue valorable debido a que no se obtuvieron metafases o no fueron de calidad aceptable (5%), mientras que en 18 pacientes no se realizó estudio citogenético (9%). Las alteraciones encontradas en los pacientes permitieron estratificarlos en tres grupos de riesgo citogenético de acuerdo con la clasificación revisada del MRC (2010): 22 pacientes en el grupo favorable (12%) , 111 pacientes en el grupo intermedio (58%) y 56 pacientes en el grupo adverso (30%).

Tabla 16. Características principales de la serie global de pacientes con LMA *de novo*

Características	Pacientes N (%)
Total	220
Edad, años (rango)	58 (16-88)
≥60	117 (53)
<60	103 (47)
Sexo	
Hombre	125 (57)
Mujer	95 (43)
Riesgo Citogenético	
Favorable	22 (12)
Intermedio	111 (58)
Adverso	56 (30)
Cariotipo	
Normal	89 (47)
Con anomalías	100 (53)
FAB	
M0	13 (6)
M1	52 (24)
M2	56 (25)
M4	45 (20)
M5	26 (13)
M6	18 (8)
M7	2 (1)
Bifenotípicas	3 (2)
Sin clasificar	2(1)
Leucocitos (×10⁹/L)	
Mediana	12

Características	Pacientes N (%)
Rango	1-396
Neutrófilos (x109/L)	
Mediana	14
Rango	1-89
Plaquetas (x109/L)	
Mediana	57
Rango	(5-572)
Hemoglobina (g/dL)	
Mediana	9,1
Rango	5-17
% Blastos SP	
Mediana	42
Rango	0-100
<i>FLT3-ITD</i>	
Mutado	45 (22)
Wild-type	161 (78)
<i>FLT3-D835</i>	
Mutado	8 (4)
Wild-type	190 (96)
<i>NPM1</i>	
Mutado	61 (30)
Wild-type	137 (70)
<i>FLT3-ITD/NPM1 status</i>	
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 mut</i>	28 (14)
<i>FLT3-ITD mut/ NPM1 wt</i>	19 (10)
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	33 (17)

Características	Pacientes N (%)
<i>FLT3</i> -ITD wt / <i>NPM1</i> wt	115 (59)
<i>CEBPA</i>	
Mutado	8 (10)
Wild-type	73 (90)
<i>ASXL1</i>	
Mutado	17 (8)
Wild-type	203 (92)
<i>IDH1</i>	
Mutado	6 (3)
Wild-type	187 (85)
SNP <i>rs11554137</i>	27 (12)
<i>IDH2</i>	
Mutado	13 (6)
Wild-type	207 (94)

Mut: mutado, wt: wild-type; SP: sangre periférica

De los 220 pacientes, 184 fueron tratados con quimioterapia intensiva (83%), de los cuáles 111 pacientes alcanzaron RC (60%), 99 tras un ciclo de inducción (89%) y 12 tras dos ciclos (11%). En el momento del análisis, 50 pacientes habían recaído (27%), mientras que 63 pacientes permanecían vivos (34%). La mediana de seguimiento fue de 49 meses.

5.2. Sensibilidad y especificidad del método HRM

La serie global (n = 220) fue analizada buscando posibles mutaciones en el exón 12 del gen *ASXL1*, el exón 4 del gen *IDH1*, el exón 4 del gen *IDH2* y en los exones 8 y 9 del gen *c-CBL*. En los 111 pacientes del riesgo citogenético intermedio se analizaron adicionalmente la mutación situada en el codón R882 del gen *DNMT3A* y en los 56 pacientes de riesgo citogenético adverso, los exones del 5 al 8 del gen *TP53*.

En todos los casos, las curvas de fusión mostraron variaciones entre el grupo de muestras con DNA wild-type y el grupo de muestras que presentaban alguna alteración en la secuencia del fragmento de interés.

Para determinar la sensibilidad y la especificidad se compararon los resultados de la secuenciación por el método tradicional de Sanger con los obtenidos tras el análisis por HRM. La sensibilidad y la especificidad del HRM para la detección de una variante en la secuencia fue de 0,90 [136 muestras positivas reales / (136 muestras positivas reales + 15 falsos negativos)] y 0,98 (3.223 muestras negativas reales / (3.223 muestras negativas reales + 72 muestras falsas positivas), respectivamente. La sensibilidad y la especificidad para cada uno de los genes analizados por HRM se detallan en la Tabla , siendo el rastreo de mutaciones en el gen *DNMT3A* el más sensible (1) y el del gen *ASXL1* el más específico (0,98). Debido a que algunas de las curvas estaban próximas a los límites estándar que definen las diferencias entre los grupos de muestras (con o sin alteraciones), al realizar la secuenciación por el método de Sanger, obtuvimos falsos 72 positivos y 15 falsos negativos.

Tabla 17 . Sensibilidad y especificidad del método de rastreo de mutaciones por HRM

Resultados	Genes				Total
	<i>ASXL1</i>	<i>IDH</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>TP53</i>	
Nº Total de reacciones	2640	440	111	168	3359
Positivos	58	44	17	17	136
Falsos positivos	34	17	5	16	72
Negativos	2582	396	94	151	3223
Falsos negativos	4	8	0	3	15
Sensibilidad	0,94	0,86	1	0,85	0,9
Especificidad	0,98	0,96	0,95	0,90	0,98

5.3. Frecuencia y asociaciones de las mutaciones en la serie global

5.3.1. ASXL1

Cuando se comprobaron mediante secuenciación directa las variaciones detectadas por la técnica de HRM, se pudieron identificar 18 mutaciones en 17 de los pacientes estudiados (8%) (Figura 6).

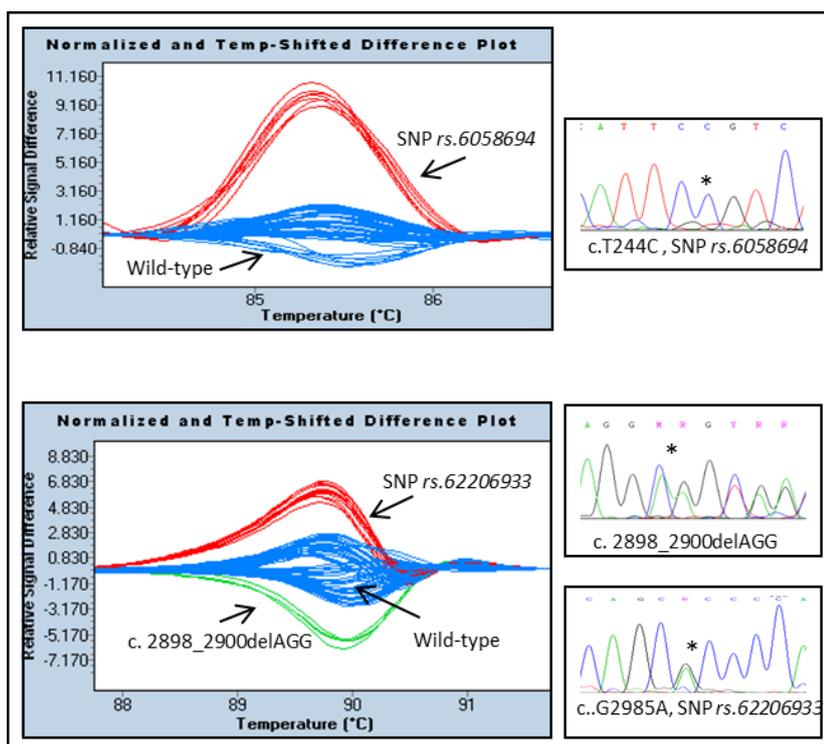


Figura 6. Ejemplos de curvas de HRM y sus secuencias correspondientes para algunas de las variaciones detectadas en el gen *ASXL1*

Las anomalías observadas se detallan en la Tabla 18. Un paciente resultó ser portador de dos mutaciones en este gen. Cuatro pacientes presentaron una mutación que provocó una alteración en la pauta de lectura (22%). El resto de las mutaciones fueron puntuales provocando, en último término, un cambio de aminoácido. Además en 28 pacientes se detectaron diferentes SNP (16%) (Tabla). Once pacientes resultaron ser portadores de más de un SNP al mismo tiempo (39%). Siete pacientes portadores de una mutación se clasificaron en el grupo de riesgo citogenético intermedio (41%), 6 en el grupo adverso (35%) y 1 en el grupo favorable (1%). Tres pacientes con

una mutación en el gen *ASXL1* no pudieron ser clasificados en función del grupo de riesgo citogenético (18%).

Tabla 18. Mutaciones detectadas en el exón 12 del gen *ASXL1*

Pacientes N (%)	Mutación	
	Cambio en el transcrito	Efecto de la mutación
1 (1)	c.C1816A	p.Cys605Xs
4 (22)	c.2898_2900delAAG	p.Gly967fs
4 (22)	c.C3025T	p.Leu1108Phe
1 (1)	c.G3307C	p.Glu1102Asp
1 (1)	c.C3507T	p.Ser1168Phe
2 (11)	c.G3513A	p.Arg1171Arg
1 (1)	c.G3779A	p.Gly1259Ala
1 (1)	c.G3864A	p.Gly1287Asp
2 (11)	c.A3907T	p.Lys1302Leu
1 (1)	c.C3936A	p.Ala1311Glu

Tabla 19. SNPs detectados en el exón 12 del gen *ASXL1*

Pacientes N (%)	dbSNP	Mutación	
		Cambio en el transcrito	Efecto de la mutación
33 (52)	rs. 6058694	c.T244C	p.Pro750=
12 (19)	rs.62206933	c.C2985T	p.His995=
7 (11)	rs.117901891	c.G3519A	p.Leu1173=
2 (3)	rs.4911231	c.T3759C	p.Ser1253=
5 (8)	rs.143041800	c.C4099T	p.Ser1365=
4 (7)	rs.144014492	c.T4281G	p.Pro1427=

Cuando se compararon las mutaciones del gen *ASXL1* con las características clínico-biológicas de los pacientes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con o sin la mutación (Tabla 20). Sin embargo, se observó que los pacientes mutados presentaban una tendencia a un mayor número de blastos en sangre periférica en el momento del diagnóstico, sin que esta diferencia llegara a ser estadísticamente significativa (41% de blastos en los pacientes sanos vs. 70% en los mutados; $P = 0,06$).

Tabla 20. Características principales de la serie global de pacientes con LMA *de novo* en función del estado mutacional de *ASXL1*

Características	ASXL1		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
Total	203 (92)	17 (8)	
Edad, años (rango)	60 (17-88)	62 (16-83)	0,80
≥60	107 (53)	9 (53)	
<60	96 (47)	8 (47)	
Sexo			0,80
Hombre	116 (57)	9 (53)	
Mujer	87 (43)	8 (47)	
Riesgo Citogenético			0,69
Favorable	21 (13)	1 (7)	
Intermedio	104 (59)	7 (53)	
Adverso	50 (28)	6 (40)	
Cariotipo			0,90
Normal	84 (48)	5 (36)	
Con anomalías	92 (52)	9 (64)	
FAB			0,85

Características	ASXL1		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
M0	11 (5)	1 (5)	
M1	46 (23)	6 (35)	
M2	54 (27)	2 (12)	
M4	43 (21)	2 (12)	
M5	25 (12)	4 (24)	
M6	16 (8)	2 (12)	
M7	2 (1)	0 (0)	
Bifenotípicas	3 (2)	0 (0)	
Sin clasificar	1 (1)	0 (0)	
Leucocitos (×10⁹/L)			0,12
Mediana	12	24	
Rango	1-396	2-385	
Neutrófilos (×10⁹/L)			0,19
Mediana	14	10	
Rango	1-89	0-62	
Plaquetas (×10⁹/L)			0,52
Mediana	58	43	
Rango	5-572	18-131	
Hemoglobina (g/dL)			0,77
Mediana	9,10	9	
Rango	5-17	7-11	
% Blastos SP			0,06
Mediana	41	70	
Rango	0-100	0-98	
FLT3-ITD			0,75

Características	ASXL1		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
Mutado	41 (22)	4 (27)	
Wild-type	150 (78)	11 (73)	
FLT3-D835			0,45
Mutado	7 (4)	1 (7)	
Wild-type	177 (96)	13 (93)	
NPM1			0,23
Mutado	55 (30)	6 (46)	
Wild-type	130 (70)	7 (54)	
FLT3-ITD/NPM1 status			0,39
<i>FLT3-ITD mut /NPM1 mut</i>	26 (14)	2 (15)	
<i>FLT3-ITD mut/NPM1 wt</i>	17 (10)	2 (15)	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	26 (16)	4 (31)	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	110 (60)	5 (39)	
CEBPA			0,53
Mutado	8 (11)	0 (0)	
Wild-type	67 (89)	6 (100)	
IDH1			0,77
Mutado	6 (3)	0 (0)	
Wild-type	172 (85)	15 (88)	
SNP <i>rs11554137</i>	25 (12)	2 (12)	
IDH2			0,77
Mutado	12 (6)	1 (6)	
Wild-type	191 (94)	16 (94)	

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica

5.3.2. *IDH1/IDH2*

Se detectaron mutaciones canónicas de *IDH* en 19 pacientes (9%), de los que 6 pacientes presentaron la mutación *IDH1*^{R132} (3%). Esta mutación se debe a un cambio de base de una adenina por una guanina en la posición 395 del cDNA (c.G395A) y tiene como consecuencia un cambio en la proteína de una histidina por una arginina en la posición 132 (p.Arg132His). Además, 27 pacientes resultaron portadores del SNP *rs11554137* (12%), que está localizado en el codón 105 (GGC_GGT; *IDH1*105GGT) y tiene como consecuencia un cambio de una isoleucina por una valina en la posición 71 de la proteína (V71I) (Figura 7).

Ningún paciente de riesgo citogenético adverso resultó ser portador de una mutación en *IDH1*. Dos de los pacientes mutados se clasificaron dentro del grupo de riesgo citogenético favorable (40%) y tres dentro del grupo intermedio (60%). Sin embargo, de los pacientes portadores del SNP, 3 formaban parte del grupo de riesgo citogenético favorable (13%), 7 del adverso (30%) y 13 del intermedio (57%).

Trece pacientes presentaron la mutación *IDH2*^{R140} (6%). Esta mutación se debe al cambio de una timina o una adenina por una guanina en la posición 419 del cDNA (c.G419T/A) y tiene como consecuencia un cambio en la proteína de una leucina o una glutamina por una arginina en la posición 140 (p.Arg140Leu/Gln) (Figura 7).

Las mutaciones en el gen *IDH2* se encontraron representadas de forma uniforme en los grupos de riesgo citogenético intermedio, 6 pacientes (50%), y adverso, 6 pacientes (50%).

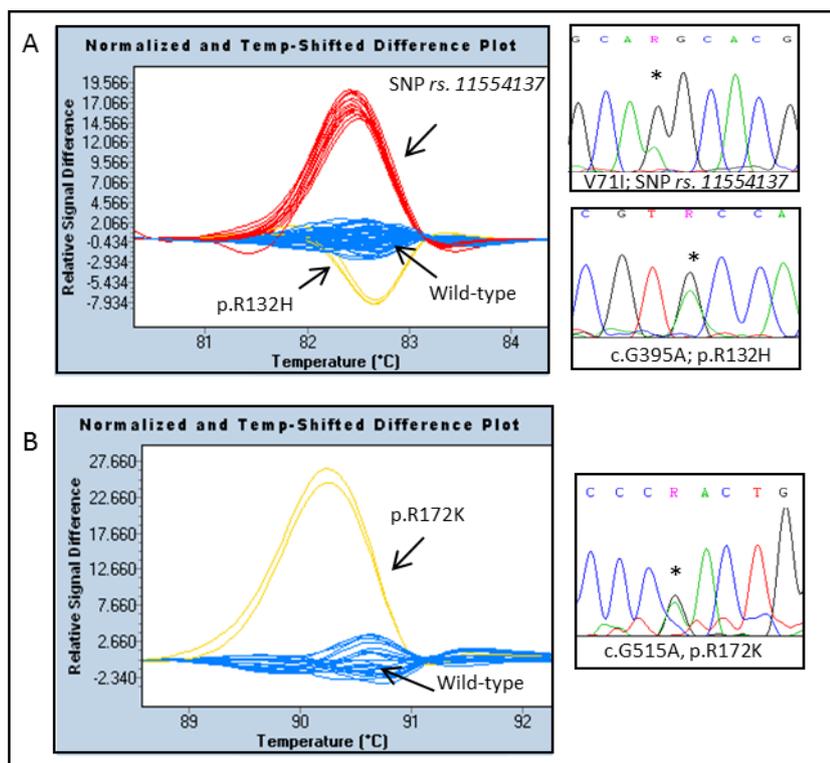


Figura 7. Curvas de HRM y sus secuencias correspondientes para las distintas variaciones detectadas en los genes *IDH1* (A) e *IDH2* (B)

Cuando se estudió la relación entre las mutaciones en los genes de *IDH* y las características clínico-biológicas de los pacientes (Tabla 21), se observó que, de forma estadísticamente significativa, los pacientes con mutaciones en el gen *IDH1* se clasificaban principalmente en los grupos M1, M2, M4 y M5 de la clasificación FAB ($P = 0,05$), aunque uno de los pacientes con *IDH1*^{R132} era M7. Además, los pacientes portadores de mutaciones en el gen *IDH2* presentaban niveles de hemoglobina significativamente más bajos en el momento del diagnóstico (mediana: 8,30 g / dL en los pacientes mutados vs. 9,13 g / dL en los sanos; $P = 0,02$). El resto de variables analizadas no presentaron ninguna asociación significativa con las mutaciones de los genes *IDH*.

Tabla 21. Características principales de la serie global de pacientes con LMA *de novo* en función del estado mutacional de *IDH*

Características	<i>IDH1</i>				<i>IDH2</i>		
	WT N (%)	Mut N (%)	SNP N (%)	<i>P</i>	WT N (%)	Mut N (%)	<i>P</i>
Total	187	6 (3)	27 (12)		207 (94)	13(6)	
Edad, años (rango)	60 (16-88)	51 (30-69)	63 (21-87)	0,57 0,51	61 (16-88)	57 (17-88)	0,73 0,77
≥60	99 (53)	2 (33)	16 (59)		111 (53)	6 (46)	
<60	88 (47)	4 (67)	11 (41)		96 (47)	7 (54)	
Sexo				0,21			0,57
Hombre	102	5 (83)	18 (67)		119 (58)	6 (46)	
Mujer	85 (45)	1 (17)	9 (33)		88 (42)	7(54)	
Riesgo Citogenético				0,32			0,35
Favorable	17 (11)	2 (40)	3 (13)		23 (13)	0 (0)	
Intermedio	95 (59)	3 (60)	13 (57)		105 (59)	6 (50)	
Adverso	49 (30)	0 (0)	7 (30)		50 (28)	6 (50)	
Cariotipo				0,12			0,89
Normal	75 (45)	1 (20)	13 (54)		84 (56)	5 (42)	
Con anomalías	91 (55)	4 (80)	11 (46)		99 (54)	7 (58)	
FAB				0,05			0,30
M0	12 (7)	0 (0)	0 (0)		12 (6)	0 (0)	
M1	43 (24)	1 (17)	8 (31)		48 (23)	4 (31)	
M2	48 (27)	1 (17)	7 (27)		55 (27)	1 (8)	
M4	27 (15)	2 (32)	6 (23)		42 (20)	3 (23)	
M5	24 (14)	1 (17)	4 (15)		27 (13)	2 (15)	
M6	18 (10)	0 (0)	0 (0)		16 (8)	2 (15)	

Resultados

Características	IDH1				IDH2		
	WT N (%)	Mut N (%)	SNP N (%)	P	WT N (%)	Mut N (%)	P
M7	1 (1)	1 (17)	0 (0)		1 (1)	1 (8)	
Bifenotípicas	3 (2)	0 (0)	0 (0)	0	3 (2)	0 (0)	
Sin clasificar	1 (1)	0 (0)	1 (4)		1 (2)	0 (0)	
Leucocitos (×10⁹/L)				0,11			0,36
Mediana	10	14	27		13	3	
Rango	1-396	3-147	1-250		1-396	1-105	
Neutrófilos (×10⁹/L)				0,62			0,56
Mediana	14	13	10		13	14	
Rango	0-89	0-56	0-62		0-89	0-35	
Plaquetas (×10⁹/L)				0,24			0,89
Mediana	61	92	51		57	58	
Rango	5-572	36-222	14-284		5-572	18-133	
Hemoglobina (g/dL)				0,67			0,02
Mediana	9,5	8,50	9,30		9,13	8,30	
Rango	5-17	8-12	5-14		5-17	6-10	
% Blastos SP				0,28			0,59
Mediana	40	50	55		42	31	
Rango	0-100	0-90	0-98		0-100	0-98	
FLT3-ITD				0,38			0,49
Mutado	39 (22)	0 (0)	6 (26)		41 (21)	4 (31)	
Wild-type	138	6 (100)	17 (74)		152 (79)	9 (69)	
FLT3-D835				0,87			0,40

Características	<i>IDH1</i>				<i>IDH2</i>		
	WT N (%)	Mut N (%)	SNP N (%)	<i>P</i>	WT N (%)	Mut N (%)	<i>P</i>
Mutado	7 (4)	0 (0)	1 (4)		7 (4)	1 (8)	
Wild-type	163	6 (100)	21 (96)		179 (96)	11 (92)	
<i>NPM1</i>				0,87			0,76
Mutado	52 (31)	2 (40)	7 (33)		58 (31)	3 (25)	
Wild-type	120	3 (60)	14 (67)		128 (69)	9 (75)	
<i>FLT3-ITD/ NPM1 status</i>				0,63			0,81
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 mut</i>	26 (15)	0 (0)	2 (10)		27 (15)	1 (8)	
<i>FLT3-ITD mut/ NPM1 wt</i>	17 (11)	0 (0)	2 (10)		17 (9)	2 (17)	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	26 (15)	2 (40)	5 (23)		31 (17)	2 (17)	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	100	3 (60)	12 (57)		108 (59)	7 (58)	
<i>CEBPA</i>				0,87			0,65
Mutado	7 (10)	0 (0)	1 (14)		8 (10)	0 (0)	
Wild-type	66 (90)	1 (100)	6 (86)		69 (90)	4 (100)	
<i>ASXL1</i>				0,77			0,74
Mutado	15 (8)	0 (0)	2 (7)		16 (8)	1 (8)	
Wild-type	173	16(100)	25 (93)		192 (92)	12 (92)	
<i>IDH1</i>							0,78
Mutado					6 (3)	0 (0)	
Wild-type					176 (85)	11 (85)	
SNP <i>rs11554137</i>					25 (12)	2 (15)	

Características	IDH1				IDH2		
	WT N (%)	Mut N (%)	SNP N (%)	P	WT N (%)	Mut N (%)	P
IDH2							0,74
Mutado	11 (6)	0 (0)	2 (7)				
Wild-type	176	6 (100)	25 (93)				

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica

5.3.3. C-CBL

No se encontraron mutaciones en *c-CBL* en ninguno de los 220 pacientes estudiados.

5.3.4. FLT3, NPM1 y CEBPA

En 206 pacientes se determinó el estado mutacional del gen *FLT3*, siendo 45 pacientes portadores de la mutación *FLT3-ITD* (22%) y 8 de la mutación *FLT3-D835* (4%). En 198 pacientes se analizó el gen *NPM1*, y se observaron alteraciones en 61 pacientes (30%). Respecto a la concurrencia de mutaciones en *FLT3-ITD* y *NPM1*, 28 pacientes fueron positivos para alteraciones en ambos genes (*FLT3-ITD* mutado/*NPM1* mutado) (15%) frente a 115 que no presentaban ninguna alteración (*FLT3-ITD* wild-type /*NPM1* wild-type) (59%). Por otro lado, 19 pacientes eran portadores de una alteración sólo en *FLT3-ITD* (*FLT3-ITD* mutado/*NPM1* wild-type) (10%), así como 33 sólo en *NPM1* (*FLT3-ITD* wild-type/*NPM1* mutado) (17%).

El estado mutacional del gen *CEBPA* se determinó en 81 pacientes, de los cuales 8 resultaron ser portadores de una mutación (10%).

5.3.5. Relación entre las mutaciones detectadas en los genes de estudio

De forma global, cuando se analizó la concurrencia de mutaciones entre los genes de estudio, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, a excepción de la asociación ya descrita de los genes *FLT3* y

NPM1. Cabe destacar, sin embargo, que ninguno de los pacientes portadores de mutaciones en el gen *ASXL1* presentaba mutaciones en los genes *IDH1* o *CEBPA* al mismo tiempo. Un paciente resultó tener una mutación en el gen *ASXL1* y ser positivo para la mutación R140 del gen *IDH2*. Cuatro pacientes presentaron mutaciones simultáneas en *ASXL1* y *FLT3-ITD*. Ningún paciente presentó mutaciones concomitantes de los genes *IDH1* y *FLT3* o *CEBPA*, ni tampoco en los genes *IDH2* y *CEBPA*. Tampoco se detectaron mutaciones simultáneas en los genes *IDH1* e *IDH2*, aunque dos de los pacientes estudiados eran portadores del SNP *rs11554137* en el gen *IDH1* y de la mutación R140 en el gen *IDH2* (Figura 8 y Figura 9).

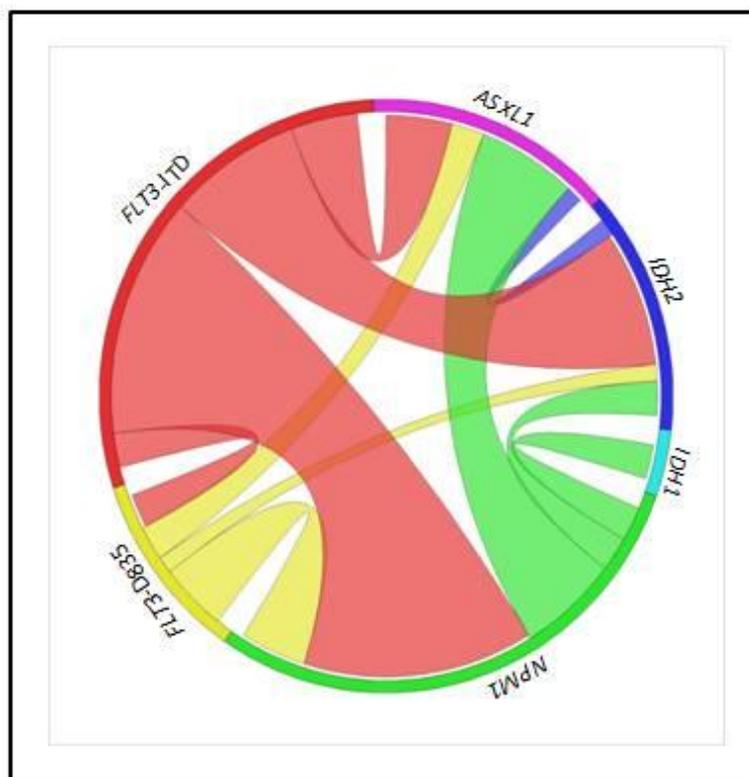


Figura 8. Relación entre las mutaciones de estudio y otras mutaciones comunes en los 220 pacientes con LMA *de novo*. Un diagrama Circos representa la frecuencia relativa y por parejas de la ocurrencia simultánea de las mutaciones. La longitud del arco corresponde a la frecuencia de mutaciones en el primer gen y la anchura corresponde al porcentaje de pacientes que también presentan una mutación en el segundo gen. La correlación entre los genes se muestra sólo una vez en la dirección

de las agujas del reloj. ITD se refiere a las duplicaciones internas en tándem ('Internal tandem duplication').

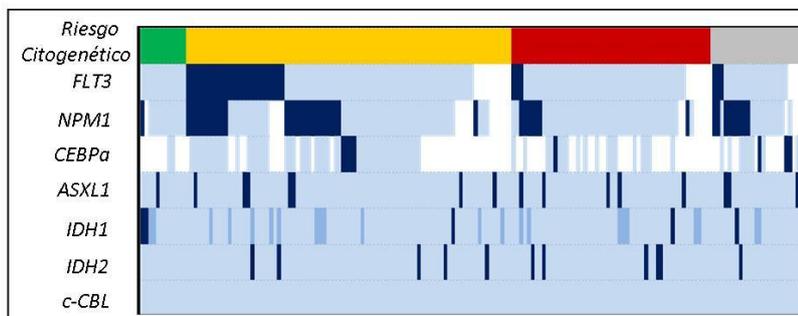


Figura 9. Relación entre las mutaciones de los 220 pacientes con LMA *de novo* y el riesgo citogenético. En las columnas se representa cada uno de los pacientes de la cohorte y en las filas los genes analizados. En azul oscuro se indica la presencia de una mutación, en azul claro la ausencia de mutación y en azul celeste la presencia del SNP *rs11554137* en *IDH1*. Los grupos de riesgo citogenético se muestran en la parte superior de la gráfica, con el verde que indica el riesgo favorable, el amarillo el riesgo intermedio, el rojo el riesgo adverso rojo y el gris no clasificado. En blanco se muestran los datos no disponibles para esa muestra

5.3.6. Impacto de las mutaciones de *ASXL1*, *IDH1* e *IDH2* en el pronóstico de la serie global

En la serie global, con una mediana de seguimiento de 49 meses, la tasa de remisión completa fue similar entre los pacientes portadores de una mutación en *ASXL1* o en *IDH* y los no mutados (para las mutaciones de *ASXL1*, 54% vs. 60%; $P=0,65$; y para las mutaciones de *IDH* 65% vs. 59%; $P=0,64$). Además, la presencia de mutaciones en *ASXL1* o *IDH* no ejercía un efecto negativo sobre la tasa de recaída (para las mutaciones de *ASXL1*, 29% vs. 23%; $P=0,55$; y para las mutaciones de *IDH* 37% vs. 22%; $P=0,14$). El análisis univariante de la SG (Tabla 22), SLE y SLR (Tabla 23) incluyó tanto factores clínico-biológicos de los pacientes como las mutaciones en los genes *ASXL1*, *IDH1* e *IDH2*. El análisis univariante de la serie global demostró que la SG no se vio afectada de forma estadísticamente significativa por el estado mutacional de los genes *ASXL1* (mediana: 6 meses en mutados vs. 11 en wild-type; $P=0,84$), *IDH1* (mediana: 6 meses en mutados, 10 meses SNP vs. 11 en wild-type; $P=0,86$) o *IDH2* (mediana: 28 meses en mutados vs. 10 en wild-

type; $P = 0,71$) (Figura 10). Del mismo modo, la presencia de mutaciones no tuvo ningún impacto pronóstico en la SLE ni en la SLR. Cuando se estratificaron los pacientes según la edad, del grupo de riesgo citogenético o del estado mutacional de los genes *FLT3/NPM1*, tampoco se encontró una relación entre la presencia de mutaciones y la supervivencia de los pacientes (Anexo).

En cuanto a las características clínico-biológicas, la edad mayor de 60 años (mediana: 3 meses en los pacientes ≥ 60 años vs. 25 meses en los < 60 años; $P < 0,001$), la citogenética (mediana: 23 meses en los pacientes de riesgo citogenético favorable vs. 15 meses en los de riesgo intermedio vs. 3 meses en los de riesgo adverso; $P < 0,001$), la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD (mediana: 6 meses en los pacientes mutados vs. 15 meses en los wild-type; $P = 0,01$), y la estratificación del riesgo molecular en función de la presencia de mutaciones concomitantes en *FLT3*-ITD/*NPM1* (mediana: 5 meses los pacientes *FLT3*-ITD mutado/*NPM1* mutado vs. 12 meses *FLT3*-ITD mutado/*NPM1* wild-type; ($P = 0,05$), *FLT3*-ITD mutado/*NPM1* wild-type vs. 14 meses *FLT3*-ITD wild-type/*NPM1* wild-type; ($P = 0,01$) influyeron negativamente en la SG. La edad mayor de 60 años tuvo un impacto sobre la SLE a los 5 años (8% pacientes ≥ 60 años vs. 51 % < 60 años; $P < 0,001$) y la SLR a los 5 años (11% pacientes ≥ 60 años vs. 61% < 60 años; $P < 0,001$), mientras que en la SLE había una tendencia a que la citogenética ($P = 0,06$), la presencia de las mutaciones *FLT3*-ITD ($P = 0,06$) y la estratificación del riesgo molecular según la presencia de mutaciones en *FLT3*-ITD/*NPM1* ($P = 0,07$) influyeran sobre el resultado final, sin llegar a ser estadísticamente significativas.

Tabla 22. Análisis univariante para la SG en la serie global

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
Total	184			
Edad, años (rango)				<0,001
≥60	100 (54)	25	45	
<60	84 (46)	3	11	
Sexo				
Hombre	105 (57)	12	30	
Mujer	79 (43)	9	29	
Riesgo Citogenético				<0,001
Favorable	22 (13)	23	47	
Intermedio	117 (69)	15	32	
Adverso	32 (19)	3	11	
Cariotipo				0,13
Normal	83 (49)	16	34	
Con anomalías	93 (51)	7	26	
FAB				0,97
M0	12 (7)	18	39	
M1	44 (25)	11	24	
M2	42 (24)	8	35	
M4	41 (23)	7	24	
M5	25 (14)	10	35	
M6	12 (7)	9	18	
M7	2 (1)	4	50	
Leucocitos (×10⁹/L)				0,46
< 20	102 (55)	12	29	

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
≥ 20	82 (45)	9	30	
Plaquetas (×109/L)				0,09
< 100	137 (74)	8	27	
≥ 100	47 (26)	18	36	
FLT3-ITD				0,01
Mutado	131 (77)	15	34	
Wild-type	41 (23)	6	20	
FLT3-D835				0,72
Mutado	158 (96)	10	31	
Wild-type	7 (4)	67	57	
NPM1				0,54
Mutado	111 (70)	14	30	
Wild-type	55 (30)	10	34	
FLT3-ITD/NPM1 status				0,01
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 mut</i>	27 (15)	5	17	
<i>FLT3-ITD mut/ NPM1 wt</i>	16 (9)	12	38	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	28 (15)	NA	52	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	93 (61)	14	28	
CEBPA				0,78
Mutado	59 (94)	18	38	
Wild-type	4 (6)	8	25	
ASXL1				0,84
Mutado	171 (93)	11	29	
Wild-type	13 (7)	6	39	
IDH1				0.86

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
Mutado	155 (84)	11	29	
Wild-type	6 (3)	10	33	
SNP <i>rs11554137</i>	23 (13)	6	31	
IDH2				0,71
Mutado	173 (94)	10	31	
Wild-type	6 (6)	28	14	

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica

Tabla 23. Análisis univariante para la SLE y SLR en la serie global

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
Total	110			108		
Edad, años (rango)			<0,001			<0,001
≥60	74 (67)	51 %		73 (68)	61 %	
<60	36 (33)	8 %		35 (32)	11 %	
Sexo			0,43			0,30
Hombre	62 (56)	41 %		62 (57)	53 %	
Mujer	48 (44)	29 %		46 (23)	37 %	
Riesgo Citogenético			0,06			0,32
Favorable	18 (17)	39 %		18 (18)	51 %	
Intermedio	74 (71)	36 %		72 (71)	44 %	
Adverso	12 (12)	27 %		12 (12)	57 %	
Cariotipo			0,54			0,79
Normal	55 (50)	38 %		53 (52)	45 %	
Con anomalías	55 (50)	32 %		49 (48)	45 %	

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
FAB			0,68			0,55
M0	8 (8)	19 %		8 (10)	38 %	
M1	27 (26)	25 %		27 (33)	32 %	
M2	22 (21)	42 %		21 (26)	59 %	
M4	24 (23)	33 %		23 (28)	43 %	
M5	15 (14)	52 %		15 (18)	61 %	
M6	7 (7)	29 %		7 (9)	50 %	
M7	2(2)	50 %		2 (2)	-	
Leucocitos (x109/L)			0,13			0,51
< 20	64 (58)	28 %		62 (58)	54 %	
≥ 20	46 (42)	45 %		46 (42)	38 %	
Plaquetas (x109/L)			0,76			0,58
< 100	82 (75)	38 %		80 (74)	34 %	
≥ 100	28 (25)	30 %		28 (26)	51 %	
FLT3-ITD			0,06			0,10
Mutado	81 (80)	39 %		81 (79)	48 %	
Wild-type	23 (20)	25 %		21 (21)	41 %	
FLT3-D835			0,16			0,11
Mutado	94 (88)	35 %		92 (96)	47 %	
Wild-type	4 (12)	50 %		4 (4)	-	
NPM1			0,53			0,12
Mutado	66 (68)	31 %		66 (67)	38 %	
Wild-type	35 (32)	45 %		33 (33)	60 %	
FLT3-ITD/NPM1 status			0,07			0,09

Resultados

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
<i>FLT3</i> -ITD mut / <i>NPM1</i> mut	14 (14)	13 %		12 (12)	38 %	
<i>FLT3</i> -ITD mut/ <i>NPM1</i> wt	12 (12)	42 %		12 (12)	55 %	
<i>FLT3</i> -ITD wt / <i>NPM1</i> mut	21 (21)	59 %		21 (21)	71 %	
<i>FLT3</i> -ITD wt / <i>NPM1</i> wt	53 (53)	29 %		53 (54)	34 %	
CEBPA			0,79			0,28
Mutado	34 (92)	47 %		34 (92)	54 %	
Wild-type	3 (8)	33 %		3 (8)	-	
ASXL1			0,60			0,38
Mutado	103	36 %		101(94)	46 %	
Wild-type	7 (6)	29 %		7 (6)	39 %	
IDH1			0,42			0,22
Mutado	98 (87)	32 %		94 (87)	41 %	
Wild-type	4 (4)	50 %		4 (4)	-	
SNP <i>rs11554137</i>	10 (9)	56 %		10 (9)	68 %	
IDH2			0,34			0,45
Mutado	103	37 %		101(94)	48 %	
Wild-type	7 (6)	14 %		7 (6)	20 %	

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica; Pr. Act: probabilidad actuarial.

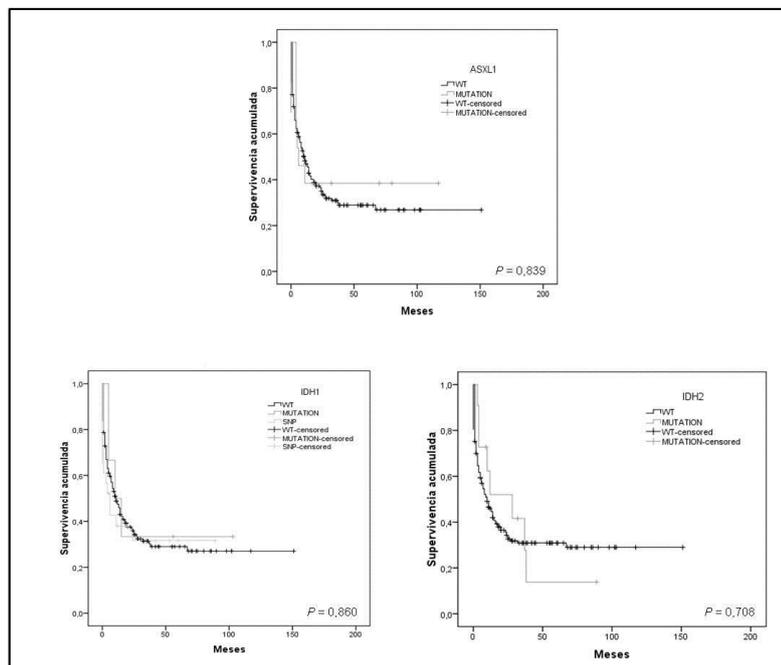


Figura 10. Curvas del análisis de supervivencia global de los genes *ASXL1*, *IDH1* y *IDH2* en la serie global

5.4. Estudio de las mutaciones en el codón R882 del gen *DNMT3A* en los paciente de riesgo citogenético intermedio (RCI)

5.4.1. Características de los pacientes de RCI

Las principales características clínicas y biológicas de los 111 pacientes de riesgo citogenético intermedio se detallan en la Tabla . La mediana de edad al diagnóstico fue de 56 años (extremos, 16 – 88), de los cuales el 53% de los pacientes eran mayores de 60 años. Sesenta y cuatro fueron hombres (58%) y 47 mujeres (42%). Al diagnóstico, la mediana de leucocitos fue de $18 \times 10^9/L$ (extremos: 1–385), la de hemoglobina de 9,1 g/dL (extremos: 5 – 17 g/dL) y la de plaquetas de $65 \times 10^9/L$ (extremos: 14 – 572). De acuerdo con la clasificación FAB, el 25% de las LMA presentaban escasa diferenciación ($n = 39$), el 23% mostraban maduración granulocítica ($n = 26$) y el 35% participación monocítica ($n = 39$). Siguiendo esta clasificación, 3 pacientes no pudieron ser incluidos en ninguna de las categorías (3%).

En los 111 pacientes el estudio del cariotipo se determinó de forma valorable, de los cuales 87 presentaron un cariotipo normal al diagnóstico (78%) y 24 pacientes presentaron un cariotipo con alguna alteración (22%).

Por lo que respecta al estado mutacional, 35 pacientes resultaron portadores de una mutación *FLT3*-ITD (32%) , 5 de una mutación *FLT3*-D835 (5%), 41 de una mutación en el gen *NPM1* (37%), 7 tenían una mutación en *ASXL1* (6%), 2 en el gen *IDH1* (1%) y 6 en el gen *IDH2* (5%) (Figura 11).

Tabla 24. Características principales de los pacientes de RCI

Características	Pacientes N (%)
Total	111
Edad, años (rango)	56 (16-88)
≥60	58 (52)
<60	53 (48)
Sexo	
Hombre	64 (58)
Mujer	47 (42)
Cariotipo Normal	87 (78)
FAB	
M0	9 (8)
M1	30 (27)
M2	26 (23)
M4	22 (20)
M5	17 (15)
M6	4 (4)
Bifenotípicas	2 (2)
Sin clasificar	1 (1)
Leucocitos (×10⁹/L)	18
Mediana	1-385

Características	Pacientes N (%)
Rango	
Neutrófilos (×109/L)	10
Mediana	0-68
Rango	
Plaquetas (×109/L)	65
Mediana	14-572
Rango	
Hemoglobina (g/dL)	
Mediana	9
Rango	5-17
% Blastos SP	
Mediana	42
Rango	0-100
FLT3	
Mutado	36 (33)
Wild-type	72 (67)
NPM1	
Mutado	43 (42)
Wild-type	59 (58)
FLT3-ITD/NPM1 status	
<i>FLT3</i> -ITD mut / <i>NPM1</i> mut	23 (23)
<i>FLT3</i> -ITD mut/ <i>NPM1</i> wt	13 (13)
<i>FLT3</i> -ITD wt / <i>NPM1</i> mut	21 (21)
<i>FLT3</i> -ITD wt / <i>NPM1</i> wt	45 (44)
ASXL1	
Mutado	7 (6)

Características	Pacientes N (%)
Wild-type	104 (94)
IDH1	
Mutado	2 (1)
Wild-type	96 (897)
SNP <i>rs11554137</i>	13 (12)
IDH2	
Mutado	6 (5)
Wild-type	105 (95)

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica

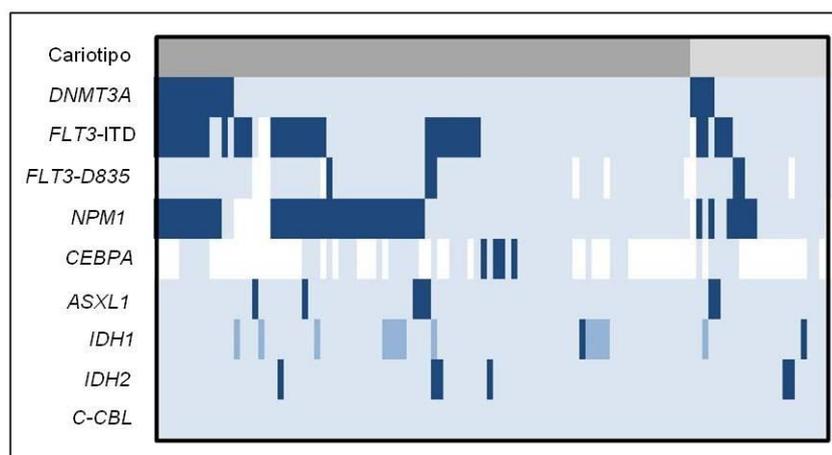


Figura 11. Relación entre las mutaciones de los 111 pacientes con RCI. En las columnas se representa cada uno de los pacientes la cohorte y en las filas los genes analizados. En azul oscuro se indica la presencia de la mutación, en azul claro la ausencia de mutación y en azul celeste la presencia del SNP *rs11554137* en *IDH1*. El cariotipo se muestra en la parte superior de la gráfica, con el gris oscuro el cariotipo normal, y con el gris clarito el cariotipo con alguna anomalía

De los 111 pacientes, 96 fueron tratados con quimioterapia intensiva (86%), de los cuales 59 pacientes alcanzaron RC (62%) tras la inducción. En el momento del análisis, 30 pacientes habían recaído (51%), mientras que 37 pacientes permanecían vivos (63 %).

5.4.2. Frecuencia de las mutaciones de *DNMT3A* y asociación con las características clínico-biológicas

Ciento once pacientes fueron analizados para detectar posibles alteraciones en la posición R882 del gen *DNMT3A*. Diecisiete pacientes (15%) mostraron un cambio 'missense' en el codón R882 del gen *DNMT3A*, provocando un intercambio de una arginina por una citosina (R882C, n = 8), por una histidina (R882H, n = 4), por una serina (R882S, n = 3), o por una prolina (R882P, n = 2) (Figura 12).

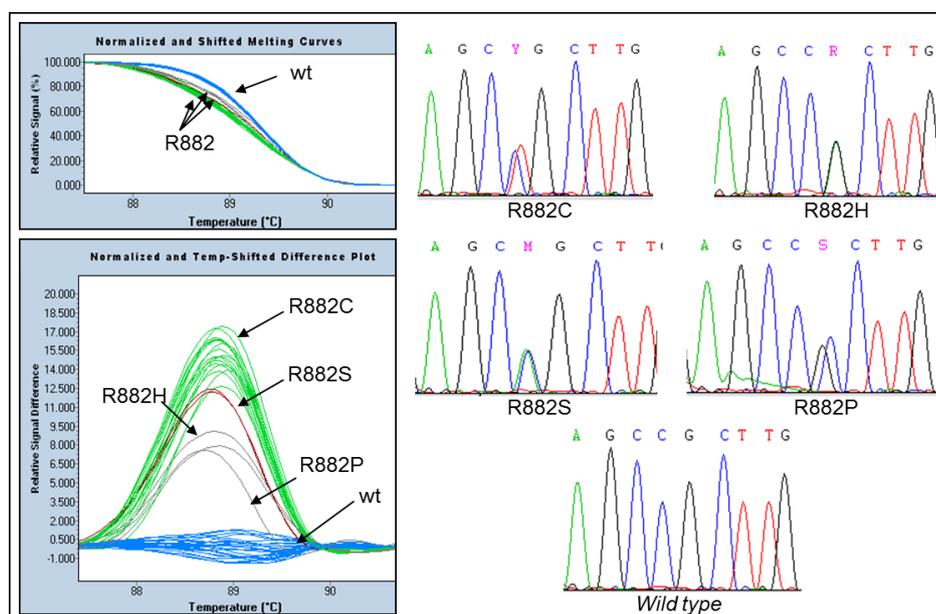


Figura 12. Curvas del HRM y sus secuencias correspondientes para las distintas mutaciones detectadas en el codón R882 del gen *DNMT3A*

Al comparar los factores clínico-biológicos de los pacientes con la mutación *DNMT3A*-R882, no se encontró correlación significativa entre las mutaciones del gen y la edad o el sexo (Tabla 25). Sin embargo los pacientes que presentaron mutaciones en R882 en el momento del diagnóstico tenían un recuento de leucocitos en sangre periférica mayor que aquéllos que no la presentaron (mediana: $39 \times 10^9/L$ en los pacientes mutados vs. $10 \times 10^9/L$ en los wild-type; $P = 0,01$), un menor recuento de neutrófilos (mediana: $7 \times 10^9/L$ en los pacientes mutados vs. $12 \times 10^9/L$ en los wild-type; $P = 0,01$) y, en consecuencia, un mayor porcentaje de blastos en sangre periférica (mediana: 77% en los pacientes mutados vs. 30 % en los wild-type; $P = 0,01$).

De los 111 pacientes estudiados, 87 tenían CN (78%) y 13 de ellos (15%) eran portadores de una alteración en R882. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con *DNMT3A* mutado y los pacientes con CN o con otras alteraciones citogenéticas.

Tabla 25. Principales características de la serie de pacientes LMA-RCI

Características	<i>DNMT3A</i>		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	<i>P</i>
Total	94 (85)	17 (15)	
Edad, años (rango)	60 (16-88)	56 (30-76)	0,63
≥60	48 (51)	10 (59)	0,37
<60	46 (49)	7 (41)	
Sexo			0,18
Hombre	52 (55)	12 (71)	
Mujer	42 (45)	5 (29)	
Cariotipo Normal	74 (85)	13 (15)	0,53
FAB			0,53
M0	8 (9)	1 (6)	
M1	24 (26)	6 (35)	
M2	25 (27)	1 (6)	
M4	17 (18)	5 (29)	
M5	13 (14)	4 (24)	
M6	4 (4)	-	
Bifenotípicas	2 (2)	-	
Sin clasificar	1 (1)	-	
Leucocitos (×10⁹/L)			0,002
Mediana	10	39	

Características	DNMT3A		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
Rango	1-385	1-324	
Neutrófilos (×109/L)			0,01
Mediana	2	7	
Rango	0-68	0-33	
Plaquetas (×109/L)			0,15
Mediana	64	96	
Rango	14-225	27-572	
Hemoglobina (g/dL)			0,77
Mediana	9	9	
Rango	5-17	5-14	
% Blastos SP			0,01
Mediana	30	77	
Rango	0-99	0-100	
FLT3-ITD			<0,001
Mutado	24 (26)	12 (75)	
Wild-type	68 (74)	4 (25)	
NPM1			0,001
Mutado	30 (35)	13 (81)	
Wild-type	56 (65)	3 (19)	
FLT3-ITD/NPM1 status			<0,001
FLT3-ITD mut /NPM1 mut	13 (16)	10 (67)	
FLT3-ITD mut/NPM1 wt	11 (14)	2 (13)	
FLT3-ITD wt /NPM1 mut	18 (21)	3 (13)	
FLT3-ITD wt /NPM1 wt	44 (49)	1 (7)	
ASXL1			0,92

Características	DNMT3A		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
Mutado	6 (6)	1 (6)	
Wild-type	88 (84)	16 (94)	
IDH1			0,58
Mutado	2 (2)	0 (0)	
Wild-type	80 (85)	16 (94)	
SNP <i>rs11554137</i>	12 (13)	1 (6)	
IDH2			0,36
Mutado	6 (7)	0 (0)	
Wild-type	88 (93)	17 (100)	

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica

5.4.3. Estudio de la concomitancia de las mutaciones

Cuando se estudió la concurrencia de mutaciones del gen *DNMT3A* con el resto de genes analizados, se observó que tan solo un paciente presentaba la mutación R882 en el gen *DNMT3A* y una mutación en el gen *ASXL1*. Ningún paciente presentó mutaciones en el gen *DNMT3A* y en los genes *IDH1* o *IDH2*. Sin embargo, la presencia de mutaciones en *DNMT3A* se asoció de forma significativa con la presencia de alteraciones en los genes *FLT3-ITD* (75% de los pacientes con *FLT3-ITD* mutado vs. 25% de los pacientes *FLT3-ITD* wild-type; $P = 0,001$) y *NPM1* (81 % de los pacientes con *NPM1* mutado vs. 19% de los pacientes *NPM1* wild-type; $P = 0,002$). Doce pacientes (11%) eran portadores al mismo tiempo de mutaciones en los genes *DNMT3A* y *FLT3-ITD*, mientras que otros 12 pacientes (11%) lo eran para los genes *DNMT3A* y *NPM1* (Figura 13). Estas mutaciones también se asociaron de forma significativa con el grupo de riesgo molecular *FLT3-ITD* mutado/*NPM1* mutado (67 % de los pacientes con *DNMT3A*-R882 mutado vs. 16% de los pacientes wild-type; $P < 0,001$).

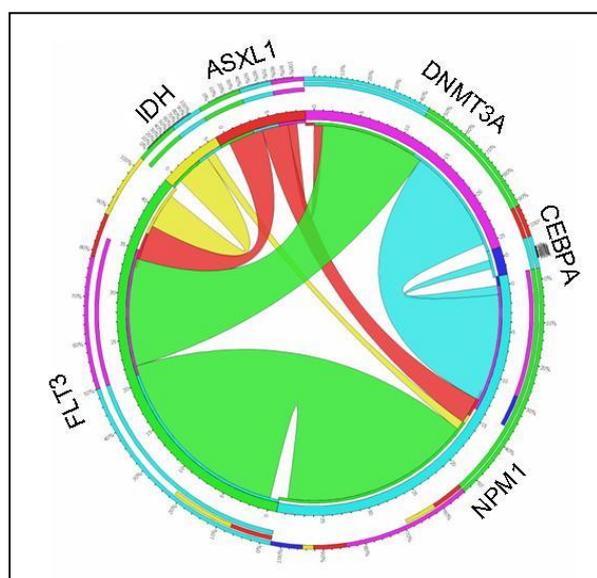


Figura 13. Relación entre las mutaciones del gen *DNMT3A* y otras mutaciones comunes en los 111 pacientes con LMA-RCI. Un diagrama Circos representa la frecuencia relativa y por parejas de la concurrencia de mutaciones. La longitud del arco corresponde a la frecuencia de mutaciones en el primer gen y la anchura corresponde al porcentaje de pacientes que también presentan una mutación en el segundo gen. La correlación entre los genes se denota solo una vez en la dirección de las agujas del reloj

5.4.4. Impacto de las mutaciones en la supervivencia

En cuanto a las características clínico-biológicas, la edad mayor de 60 años (mediana: 6 meses en los pacientes ≥ 60 años vs. 67 meses en los pacientes <60 años; $P < 0,001$) la presencia de las mutaciones de *FLT3*-ITD (mediana: 7 meses *FLT3*-ITD mutado vs. 24 meses *FLT3*-ITD wild-type; $P = 0,004$) y la estratificación del riesgo molecular en función de la presencia de mutaciones en *FLT3*-ITD/*NPM1* (mediana: 7 meses los pacientes *FLT3*-ITD mutado/*NPM1* mutado vs. 12 meses *FLT3*-ITD mutado/*NPM1* wild-type vs. 20 meses *FLT3*-ITD wild-type/*NPM1* wild-type; $P = 0,01$) influyeron negativamente en la SG. Las mismas características clínico-biológicas también afectaron de forma negativa a la SLE a los 5 años (40 % pacientes ≥ 60 años vs. 55% pacientes <60 años; $P < 0,001$; 29% pacientes *FLT3*-ITD mutado vs. 43% *FLT3*-ITD wild-type; $P = 0,05$; 26% pacientes *FLT3*-ITD mutado/*NPM1* mutado vs. 44% *FLT3*-ITD mutado/*NPM1* wild-type vs. 64% *FLT3*-ITD wild-type/*NPM1* mutado vs. 24% *FLT3*-ITD wild-type/*NPM1* wild-type; $P = 0,026$) mientras que la

SLR a los 5 años fue influenciada por la edad mayor de 60 años (25% pacientes ≥ 60 años vs. 61% pacientes <60 años; $P < 0,001$).

Cuando se analizó el efecto de las mutaciones en *DNMT3A*-R882, se vio que la tasa de remisión completa fue similar entre los pacientes portadores de una mutación y los pacientes no mutados (60% vs. 87%; $P = 0,11$). El análisis de la supervivencia reveló que los pacientes con mutaciones en *DNMT3A* mostraban una mayor tasa de recaída (70% vs. 49%; $P = 0,04$). La SG y la SLE no se vieron afectadas por esta mutación (mediana: 11 meses en mutados vs. 16 meses en wild-type; $P = 0,644$; mediana: 9 meses en mutados vs. 20 meses en wild-type; $P = 0,141$, respectivamente). Sin embargo, la SLR a los 5 años fue significativamente mayor en los pacientes que no presentaban mutaciones en el gen *DNMT3A* (30% pacientes mutados vs. 51% wild-type; $P = 0,04$) (Figura 14) (Tabla y Tabla 27).

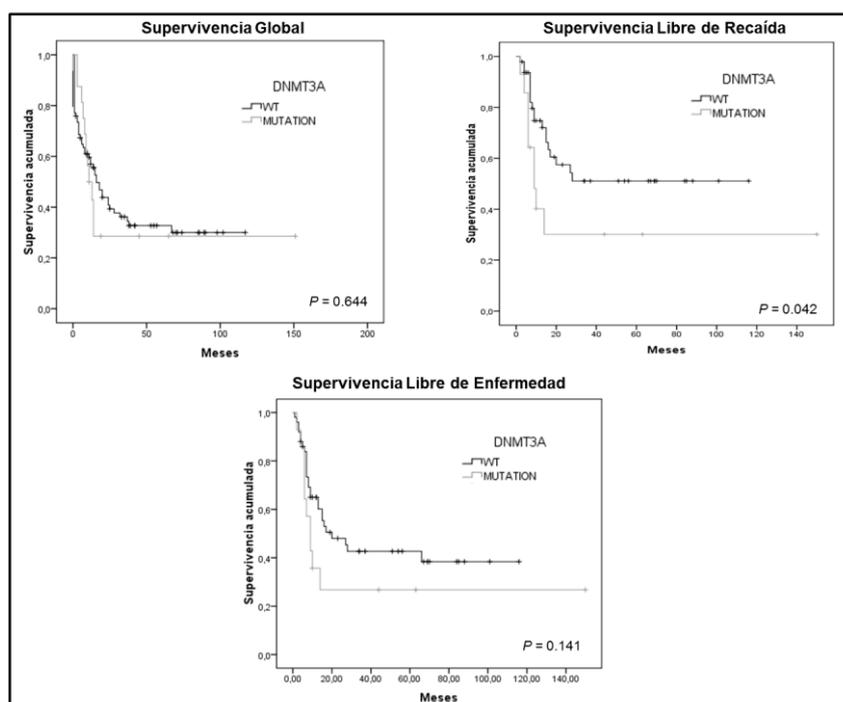


Figura 14. Curvas del análisis de supervivencia de *DNMT3A*-R882

Tabla 26. Análisis univariante para la SG en la serie de pacientes con LMA-RCI

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
Total	99			
Edad, años (rango)				<0,001
≥60	58 (59)	67	51	
<60	41 (41)	6	8	
Sexo				0,97
Hombre	58 (59)	16	33	
Mujer	41 (41)	13	31	
Cariotipo				0,49
Normal	81 (82)	NA	34	
Con anomalías	18 (18)	8	20	
FAB				0,98
M0	9 (9)	18	17	
M1	29 (30)	14	27	
M2	20 (21)	16	37	
M4	20 (21)	16	28	
M5	16 (17)	15	34	
M6	2 (2)	6	-	
Leucocitos (×10⁹/L)				0,96
< 20	50 (51)	18	29	
≥ 20	49 (49)	14	35	
Plaquetas (×10⁹/L)				0,21
< 100	74 (75)	14	29	
≥ 100	25 (25)	37	41	

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
FLT3-ITD				0,004
Mutado	62 (65)	24	38	
Wild-type	34 (35)	7	21	
NPM1				0,88
Mutado	51 (56)	18	28	
Wild-type	40 (44)	13	40	
FLT3-ITD/NPM1 status				0,01
<i>FLT3-ITD mut /NPM1 mut</i>	22 (24)	7	21	
<i>FLT3-ITD mut/NPM1 wt</i>	12 (13)	12	33	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	19 (21)	NA	62	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	30 (42)	20	23	
CEBPA				0,11
Mutado	40 (93)	20	43	
Wild-type	3 (7)	8	100	
DNMT3A-R882				0,64
Mutado	83 (84)	16	33	
Wild-type	16 (16)	11	29	
DNMT3A/FLT3				0,004
<i>DNMT3A mut / FLT3-ITD mut</i>	12 (13)	9	21	
<i>DNMT3A wt / FLT3-ITD wt</i>	57 (61)	24	38	
<i>DNMT3A wt /FLT3-ITD mut; DNMT3A mut / FLT3-ITD wt</i>	25 (27)	6	18	

Mut: mutado; wt: wild-type.

Tabla 27. Análisis univariante para la SLE y SLR en la serie de pacientes con LMA-RCI

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
Total	64			62		
Edad, años (rango)			0,001			0,001
≥60	48 (72)	55 %		45 (73)	61 %	
<60	18 (28)	40 %		17 (24)	25 %	
Sexo			1			0,79
Hombre	37 (58)	41 %		37 (60)	50 %	
Mujer	27 (12)	48 %		25 (40)	41 %	
Cariotipo			0,72			0,84
Normal	54 (84)	34 %		52 (84)	43 %	
Con anomalías	10 (16)	37 %		10 (16)	46 %	
FAB			0,76			0,61
M0	7 (13)	21 %		7 (14)	43 %	
M1	19 (37)	25 %		19 (38)	30 %	
M2	11 (21)	34 %		10 (20)	51 %	
M4	12 (23)	46 %		11 (22)	50 %	
M5	11 (21)	54 %		11 (22)	67 %	
M6	2 (4)	50 %		2 (4)	50 %	
Leucocitos (×10⁹/L)			0,18			0,53
< 20	33 (35)	29 %		31 (50)	37 %	
≥ 20	61 (65)	48 %		31 (50)	43 %	
Plaquetas (×10⁹/L)			0,55			0,53
< 100	49 (77)	38 %		47 (76)	46 %	
≥ 100	15 (23)	41 %		15 (24)	49%	

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
FLT3-ITD			0,05			0,11
Mutado	42 (68)	43 %		42 (70)	48 %	
Wild-type	20 (32)	29 %		18 (30)	41 %	
NPM1			0,66			0,31
Mutado	31 (53)	21 %		31 (54)	37 %	
Wild-type	28 (47)	47 %		26 (46)	55 %	
FLT3-ITD/NPM1 status			0,02			0,16
<i>FLT3-ITD mut /NPM1 mut</i>	13 (22)	26 %		11 (9)	35 %	
<i>FLT3-ITD mut/NPM1 wt</i>	9 (15)	44 %		9 (16)	56 %	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	15 (25)	64 %		15 (26)	68 %	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	22 (37)	24 %		22 (39)	27 %	
CEBPA			0,06			0,52
Mutado	25 (93)	45 %		25 (93)	57 %	
Wild-type	2 (7)	0 %		2 (7)	-	
DNMT3A-R882			0,14			0,04
Mutado	50 (78)	43 %		48 (77)	51 %	
Wild-type	14 (22)	27 %		14 (23)	30	
DNMT3A/FLT3			0,01			0,003
<i>DNMT3A mut / FLT3-ITD mut</i>	10 (17)	15 %		10 (17)	19 %	
<i>DNMT3A wt / FLT3-ITD wt</i>	37 (62)	44 %		37 (64)	50 %	
<i>DNMT3A wt /FLT3-ITD mut; DNMT3A mut /</i>	13 (22)	31 %		11 (19)	45 %	

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
<i>FLT3</i> -ITD wt						

Mut: mutado; wt: wild-type; Pr. Act: Probabilidad actuarial

Cuando estratificamos la serie de pacientes con riesgo citogenético intermedio según la edad o del cariotipo (normal vs. no normal) no encontramos ningún impacto significativo ni en la SG, ni en la SLR, ni tampoco en la SLE.

Puesto que las mutaciones de *DNMT3A* se asociaron con las mutaciones de *FLT3*-ITD, estudiamos el efecto de la presentación de ambas mutaciones al mismo tiempo, generando tres grupos en función de los genes mutados. Observamos que los pacientes con al menos una de las dos mutaciones tenían una menor SG (mediana: 6 vs. 24 meses; $P = 0,004$) y, los pacientes que presentaban mutaciones en ambos genes tenían una SLR y SLE a los 5 años más corta (14% vs. 65%; $P = 0,003$; 13% vs. 55%; $P = 0,01$, respectivamente) que los pacientes que no presentaban mutado ninguno de los dos genes (Figura 15).

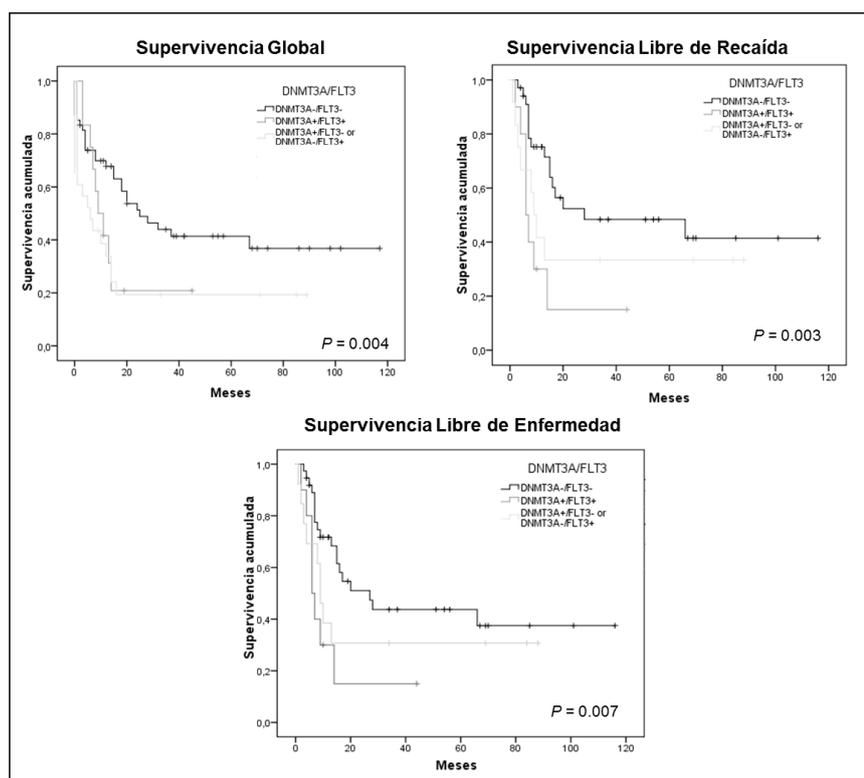


Figura 15. Curvas de supervivencia de los pacientes estratificados en función de las mutaciones de *DNMT3A/FLT3*

El análisis de la SLR se completó con un análisis multivariante incluyendo como variables las mutaciones en *DNMT3A*, edad, presencia de mutaciones en *FLT3-ITD* y estratificación del riesgo molecular *FLT3-ITD/NPM1*. Para la SLR las variables con significado pronóstico independiente fueron: la edad mayor de 60 años, (HR: 2,4; 95% IC: 1,1 - 5,8; $P = 0,05$) y las mutaciones en *DNMT3A* (HR: 4,3; CI: 1,7 - 10,1; $P = 0,001$).

5.5. Análisis de los pacientes de riesgo citogenético adverso (RCA)

5.5.1. Características de los pacientes de RCA

Las principales características clínicas y biológicas de los 56 pacientes de RCA se detallan en la Tabla 28. La mediana de edad al diagnóstico fue de 61 años (extremos: 28 – 85), siendo el 59% de los pacientes mayores de 60 años. Treinta y seis fueron hombres (64%) y 20 mujeres (56 %). Al diagnóstico, la

mediana de leucocitos fue de $5 \times 10^9/L$ (extremos: 1 – 250), de hemoglobina 9,0 g/dL (extremos: 5–16 g / dL) y de plaquetas $52 \times 10^9/L$ (extremos: 10 – 408). De acuerdo con la clasificación FAB, el 33% de las LMA presentaban escasa diferenciación ($n = 13$), el 40% mostraban maduración granulocítica ($n = 16$), el 36% participación monocítica ($n = 10$) y el 38% componente eritroide ($n = 15$). Siguiendo esta clasificación, un paciente no pudo ser incluido en ninguna de las categorías (3%).

En todos los pacientes se realizó el estudio del cariotipo, lo que nos permitió clasificar a 33 pacientes como cariotipo no complejo (59%) y 23 pacientes como cariotipo complejo (41%), de los cuales 19 presentaban una monosomía (83%).

En 4 pacientes se hallaron mutaciones en *FLT3*-ITD (7%), en 1 la mutación *FLT3*-D835 (2%) y en 7 una mutación en el gen *NPM1* (13%). Siete pacientes tenían una mutación en *ASXL1* (12%) y 6 en el gen *IDH2* (11%) (Figura 16).

Tabla 28. Principales características de la serie de pacientes LMA-RCA

Características	Pacientes N (%)
Total	56
Edad, años (rango)	61 (28-85)
≥60	23 (41)
<60	33 (59)
Sexo	
Hombre	36 (64)
Mujer	20 (56)
Cariotipo	
Complejo	23 (41)
No complejo	33 (59)
FAB	
M0	2 (5)

Características	Pacientes N (%)
M1	11 (28)
M2	16 (40)
M4	7 (18)
M5	3 (8)
M6	15 (38)
Bifenotípicas	1 (3)
Leucocitos (×10⁹/L)	
Mediana	5
Rango	1-250
Neutrófilos (×10⁹/L)	
Mediana	16
Rango	0-73
Plaquetas (×10⁹/L)	
Mediana	52
Rango	10-408
Hemoglobina (g/dL)	
Mediana	9,00
Rango	5-16
% Blastos SP	
Mediana	40
Rango	0-98
<i>FLT3-ITD</i>	
Mutado	4 (8)
Wild-type	45 (92)
<i>NPM1</i>	
Mutado	7 (14)
Wild-type	42 (86)

Características	Pacientes N (%)
<i>FLT3-ITD/NPM1</i> status	
<i>FLT3-ITD</i> mut / <i>NPM1</i> mut	2 (43)
<i>FLT3-ITD</i> mut/ <i>NPM1</i> wt	3 (6)
<i>FLT3-ITD</i> wt / <i>NPM1</i> mut	4 (9)
<i>FLT3-ITD</i> wt / <i>NPM1</i> wt	38 (81)
<i>ASXL1</i>	
Mutado	7 (12)
Wild-type	49 (88)
<i>IDH1</i>	
Mutado	0 (0)
Wild-type	49 (88)
SNP <i>rs11554137</i>	7 (12)
<i>IDH2</i>	
Mutado	6 (11)
Wild-type	50 (89)

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica

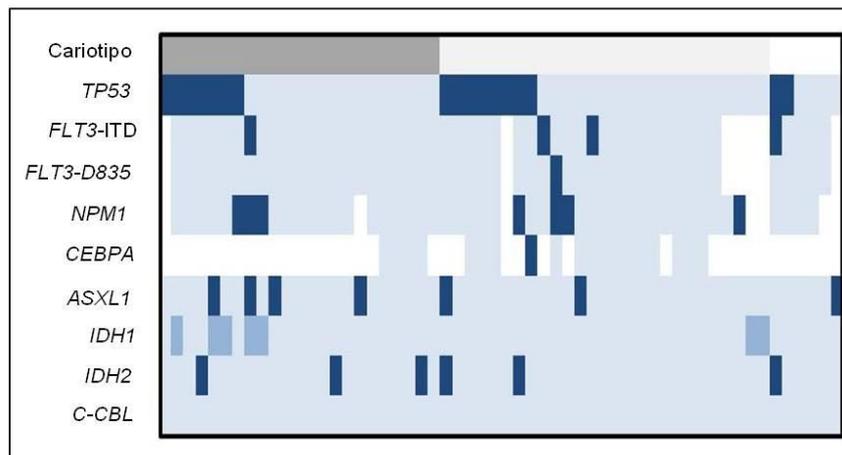


Figura 16. Relación entre las mutaciones de los 56 pacientes con LMA *de novo* y RCA. En las columnas se representa cada uno de los pacientes de nuestra cohorte y las filas los genes analizados. En azul oscuro se indica la presencia de la mutación, en azul claro la ausencia de mutación y en azul intermedio la presencia del SNP *rs11554137* en *IDH1*. El cariotipo se muestra en la parte superior de la gráfica, con el gris oscuro el cariotipo complejo, y con el gris claro, el cariotipo no complejo

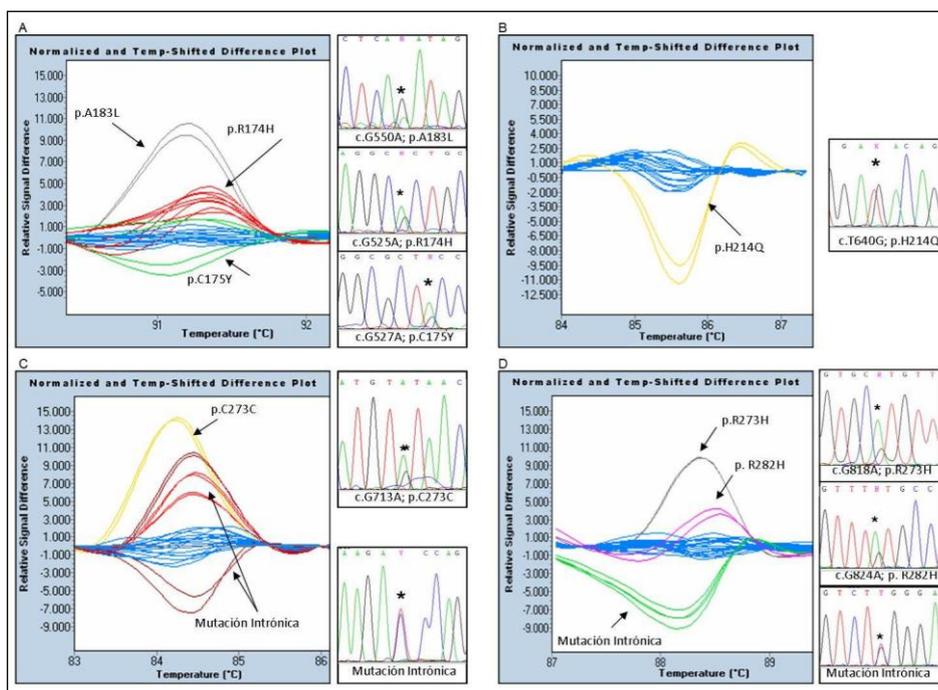
De los pacientes analizados en este subgrupo de pacientes, 43 fueron tratados con quimioterapia intensiva (77%), de los cuales 22 pacientes alcanzaron RC tras la inducción (51%). En el momento del análisis, 10 pacientes habían recaído (46 %), mientras que 7 pacientes permanecían vivos (32 %).

5.5.2. Frecuencia de las mutaciones de *TP53* y asociación con las características clínico-biológicas

Todos los pacientes fueron analizados para detectar posibles alteraciones en los exones del 5 al 8 del gen *TP53* mediante la técnica de HRM y su posterior secuenciación por el método de Sanger. Diecisiete pacientes (34%) mostraron una mutación consecuencia de un cambio en un nucleótido descrito previamente, presentando un cariotipo complejo 7 (41%) de ellos. (Tabla 29, Figura 17).

Tabla 29. Variaciones detectadas en el gen *TP53*

Pacientes	Exón	Mutación	
		Cambio en la secuencia	Cambio en el transcrito
1	5	c.G525A	p.R174H
3	5	c.G527A	p.C175Y
1	5	c.G538A	p.E179K
1	5	c.G550A	p.A183L
3	6	c.T640G	p.H214Q
5	7	c.G713A	p.C273C
2	8	c.G818A	p.R273H
1	8	c.G824A	p.R282H

**Figura 17.** Curvas del HRM y sus secuencias correspondientes para varias mutaciones detectadas en el gen *TP53*; A exón 5, B exón 6, C exón 7, D exón 8

Cuando se analizó la relación de los distintos factores clínico-biológicos con las mutaciones en el gen *TP53*, no se encontró asociación significativa con la edad, el sexo, el recuento de leucocitos al diagnóstico, los niveles de hemoglobina, el subtipo FAB y mutaciones de *FLT3-ITD* y *NPM1* (Tabla 30). La única excepción fue el recuento de plaquetas, siendo menor en los pacientes portadores de alguna mutación, (mediana: $32 \times 10^9/L$ en los pacientes mutados vs. $58 \times 10^9/L$ en los wild-type; $P = 0,04$) y el porcentaje de blastos en sangre periférica, que fue más alto en los pacientes con alguna mutación (54% en los pacientes mutados vs. 25% en los wild-type; $P = 0,02$).

Tabla 30. Principales características de la serie de pacientes LMA-RCA

Características	TP53		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
Total	39 (70)	17 (30)	
Edad, años (rango)	61 (28-33)	64 (30-85)	0,64
≥60	16 (41)	7 (41)	
<60	23 (59)	10 (59)	
Sexo			0,61
Hombre	26 (67)	10 (59)	
Mujer	13 (33)	7 (41)	
Cariotipo			0,57
Complejo	16 (41)	7 (41)	
No complejo	23 (59)	10 (59)	
FAB			0,08
M0	1 (3)	1 (6)	
M1	6 (15)	5 (36)	
M2	14 (36)	2 (12)	
M4	2 (5)	5 (36)	

Características	TP53		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
M5	2 (5)	1 (6)	
M6	11 (28)	2 (12)	
Bifenotípicas	1 (3)	-	
Leucocitos (×109/L)			0,15
Mediana	4	13	
Rango	1-250	1-84	
Neutrófilos (×109/L)			0,37
Mediana	19	13	
Rango	0-73	0-48	
Plaquetas (×109/L)			0,04
Mediana	58	32	
Rango	12-408	10-167	
Hemoglobina (g/dL)			0,21
Mediana	9,13	8,60	
Rango	5-16	5-13	
% Blastos SP			0,02
Mediana	25	54	
Rango	0-97	1-98	
FLT3-ITD			0,64
Mutado	3 (14)	1 (7)	
Wild-type	31 (86)	14 (93)	
NPM1			0,64
Mutado	5 (15)	2 (13)	
Wild-type	29 (85)	13 (87)	
FLT3-ITD/NPM1 status			0,68

Características	TP53		
	Wild-type N (%)	Mutado N (%)	P
<i>FLT3</i> -ITD mut / <i>NPM1</i> mut	2 (6)	0 (0)	
<i>FLT3</i> -ITD mut/ <i>NPM1</i> wt	2 (6)	1 (7)	
<i>FLT3</i> -ITD wt / <i>NPM1</i> mut	2 (6)	2 (14)	
<i>FLT3</i> -ITD wt / <i>NPM1</i> wt	26 (81)	12 (86)	
ASXL1			0,71
Mutado	5 (13)	2 (12)	
Wild-type	34 (87)	15 (88)	
IDH1			0,35
Mutado	0 (0)	0 (0)	
Wild-type	35 (90)	14 (82)	
SNP <i>rs11554137</i>	4 (103)	3 (18)	
IDH2			0,06
Mutado	2 (18)	4 (24)	
Wild-type	37 (82)	13 (76)	

Mut: mutado; wt: wild-type; SP: sangre periférica

5.5.3. Estudio de mutaciones simultáneas

Cuando se estudió la concurrencia de mutaciones en el gen *TP53* con el resto de genes analizados, 4 pacientes fueron portadores de mutaciones en *TP53* y en el gen *IDH2* (24 %) y 2 pacientes presentaron mutaciones en los genes *TP53* y *ASXL1* simultáneamente (12%), pero sin significación estadística. Un paciente fue portador al mismo tiempo de mutaciones en *TP53* y *FLT3*-ITD y 2 pacientes de una mutación en el gen *NPM1*. Ningún paciente presentó simultáneamente mutaciones en *TP53* y *FLT3*-D835. Sin embargo, no se pudo definir un patrón de mutaciones concomitantes en este subgrupo de pacientes de forma estadísticamente significativa. (Figura 16 y Tabla 30).

5.5.4. Análisis de supervivencia

Se realizó el análisis univariante de la SG (Tabla 31), SLE y SLR, (Tabla 32), incluyendo tanto factores clínico-biológicos como las mutaciones en el gen *TP53*. El análisis univariante de la serie de RCA demostró que el estado mutacional del gen *TP53* no tenía ningún impacto significativo en la SG, (mediana: 3 meses en mutados vs. 4 meses en wild-type; $P = 0,633$) (Figura 18), en la SLE a los 5 años (17 % mutados vs. 25 % wild-type; $P = 0,53$) ni tampoco en la SLR a los 5 años (33 % mutados vs. 47 % wild-type, $P = 0,97$).

Tabla 31. Análisis univariante para la SG en la serie de pacientes con LMA-RCA

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
Total	44			
Edad, años (rango)				<0,001
≥60	21 (48)	11	27	
<60	23 (52)	2	5	
Sexo				0,56
Hombre	28 (64)	3	14	
Mujer	16 (46)	5	18	
Cariotipo				0,03
Complejo	20 (49)	3	5	
No complejo	23 (51)	8	7	
FAB				0,43
M0	0 (0)	-	-	
M1	5 (31)	NA	20	
M2	3 (19)	NA	33	
M4	2 (13)	NA	0	
M5	1 (6)	NA	-	

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
M6	4 (25)	NA	25	
M7	1 (6)	NA	0	
Leucocitos (×109/L)				0,97
< 20	28 (64)	4	9	
≥ 20	16 (56)	3	33	
Plaquetas (×109/L)				0,92
< 100	32 (73)	3	20	
≥ 100	12 (27)	7	8	
FLT3-ITD				0,68
Mutado	35 (92)	4	20	
Wild-type	3 (7)	11	0	
NPM1				0,80
Mutado	33 (85)	4	18	
Wild-type	6 (15)	6	17	
FLT3-ITD/NPM1 status				0,95
FLT3-ITD mut /NPM1 mut	2 (5)	2	0	
FLT3-ITD mut/NPM1 wt	2 (5)	2	0	
FLT3-ITD wt / NPM1 mut	3 (8)	6	33	
FLT3-ITD wt /NPM1 wt	30 (81)	14	28	
TP53				0,63
Mutado	14 (32)	3	14	
Wild-type	30 (68)	4	17	

Mut: mutado; wt: wild-type

Tabla 32. Análisis univariante para la SLE y SLR en la serie de pacientes con LMA-RCA

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
Total	18			18		
Edad, años (rango)			0,04			0,29
≥60	9 (50)	33 %		9 (50)	47 %	
<60	9 (50)	89 %		9 (50)	33 %	
Sexo						0,84
Hombre	11 (61)	18 %		11(61)	36 %	
Mujer	7 (39)	29 %		7 (39)	50 %	
Cariotipo			0,33			0,99
Complejo	7 (39)	14 %		7 (39)	38 %	
No complejo	11 (61)	26 %		11(61)	37 %	
FAB			0,39			0,46
M0	0 (0)	-		0 (0)	-	
M1	5 (31)	20 %		5 (31)	30 %	
M2	3 (19)	33 %		3 (19)	-	
M4	2 (13)	0 %		2 (13)	0 %	
M5	1 (6)	-		1 (6)	-	
M6	4 (25)	25 %		4 (25)	50 %	
M7	1 (6)	0 %		1 (6)	-	
Leucocitos (×10⁹/L)			0,18			0,13
< 20	13 (72)	8 %		13(72)	16 %	
≥ 20	5 (28)	40 %		5 (28)	25 %	
Plaquetas (×10⁹/L)			0,52			0,13

Características	SLE			SLR		
	N (%)	Pr. Act a 5 años	P	N (%)	Pr. Act a 5 años	P
< 100	13 (72)	31 %		13(72)	69 %	
≥ 100	5 (28)	0 %		5 (28)	0 %	
FLT3-ITD			0,56			0,41
Mutado	14 (88)	29 %		14(88)	42 %	
Wild-type	2 (12)	0 %		2 (12)	-	
NPM1			0,71			0,17
Mutado	14 (82)	21 %		14(82)	32 %	
Wild-type	2 (12)	33 %		2 (12)	-	
FLT3-ITD/NPM1 status			0,61			0,63
<i>FLT3-ITD mut /NPM1 mut</i>	1 (6)	0 %		1 (6)	-	
<i>FLT3-ITD mut/NPM1 wt</i>	1 (6)	0 %		1 (6)	-	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	2 (13)	50 %		2 (13)	-	
<i>FLT3-ITD wt /NPM1 wt</i>	12 (75)	25 %		12(75)	36 %	
TP53			0,53			0,97
Mutado	12 (67)	25 %		12(67)	47 %	
Wild-type	6 (33)	17 %		6 (33)	33 %	

Mut: mutado; wt: wild-type; Pr. Act: Probabilidad actuarial

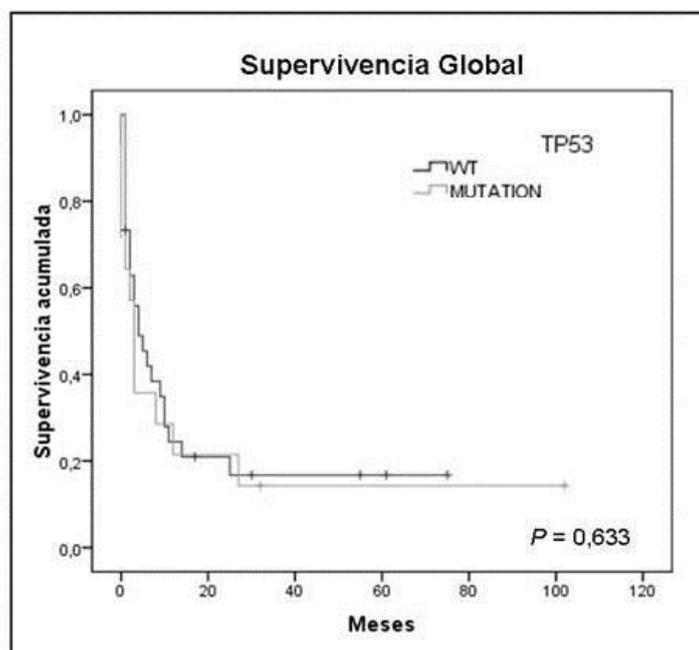


Figura 18. Curvas del análisis de supervivencia global de *TP53*

La falta de impacto en la SG, SLE y SLR se observó también cuando estratificamos la serie de pacientes según la edad o las mutaciones en *FLT3-ITD/NPM1*. Sin embargo, cuando se consideró únicamente aquellos pacientes con cariotipo complejo, la SG a los 24 meses fue significativamente peor en los pacientes con *TP53* mutado (mediana: 5 meses los pacientes mutados vs. 33 meses los pacientes wild-type; $P=0,01$) (Figura 19).

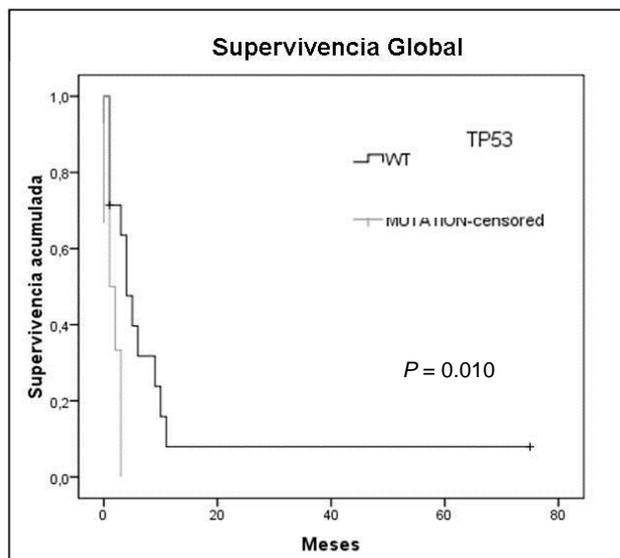


Figura 19. Curvas del análisis de supervivencia de *TP53* en los pacientes con cariotipo complejo

6.DISCUSIÓN

En el presente proyecto de Tesis Doctoral se analiza la frecuencia de mutaciones en una selección de genes potencialmente involucrados en la LMA. Además, se analiza su relación con otras características clínico-biológicas y con otras mutaciones también relevantes en esta enfermedad, así como su implicación pronóstica. El conocimiento de los factores pronósticos creemos que pueden ser determinantes para una mejor caracterización de la enfermedad.

El estudio se planteó en dos vertientes, un análisis de cribado de mutaciones en los genes *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *c-CBL*, *DNMT3A* y *TP53*, en una serie de pacientes de LMA *de novo*, diagnosticados en un sólo centro y el estudio de su relación con el pronóstico.

Siendo evidentes algunas debilidades metodológicas inherentes a los estudios de cohortes históricas, por otro lado denominador común de la mayor parte de los estudios de caracterización de la LMA en la literatura, no es menos cierto que en nuestra cohorte de pacientes se mantiene el valor de las principales variables pronósticas bien establecidas, como la edad, el cariotipo o las mutaciones de los genes *FLT3* y *NPM1*. De alguna manera, esto confiere una cierta fiabilidad a los resultados obtenidos en relación con los genes específicamente analizados en el presente estudio.

En relación con las características de la serie, las alteraciones citogenéticas merecen una mención especial. Cabe destacar que las principales series publicadas que estudian alteraciones moleculares en LMA centran un especial interés en aquellos casos que presentan un cariotipo normal. En el presente estudio se han realizado diferentes análisis, por un lado en la serie global, y por otro lado separadamente en los subgrupos de riesgo citogenético y edad.

Quizás la limitación más notable en nuestra cohorte de estudio sea el tamaño muestral. Aunque en términos relativos es una serie importante para un único centro, la realización de análisis en subgrupos de pacientes que merman la potencia estadística puede no poner de manifiesto relaciones estadísticamente significativas que precisan un mayor tamaño muestral, como

alguno de los estudios disponibles en la literatura (Chou *et al.*, 2010; Marcucci *et al.*, 2010; Paschka *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2010).

Nuestro estudio, como la mayoría de los estudios en la literatura, fue retrospectivo y basado en pacientes que fueron tratados con esquemas basados en un denominador común, pero con algunas variantes a lo largo del periodo de estudio. Por esta razón, como ha sido destacado por otros (Gaidzik *et al.*, 2009), no es tarea fácil comparar los análisis de supervivencia con los resultantes de cada una de las series de pacientes publicadas.

El interés suscitado en los últimos años por el genotipado del DNA ha impulsado el desarrollado de nuevos métodos de análisis que permiten rastrear de forma rápida y eficaz pequeñas variaciones en el genoma (Rauch *et al.*, 2004; Meaburn *et al.*, 2006). Hasta el momento, la secuenciación directa por el método de Sanger ha sido el principal procedimiento de búsqueda de mutaciones. Sin embargo, métodos recientemente desarrollados permiten realizar un cribado previo a la secuenciación, para distinguir las muestras con o sin alteraciones genéticas. De este modo, aunque se mantiene la necesidad de confirmar las muestras positivas, al no ofrecer información sobre la naturaleza y localización de la variación que detectan, se reduce considerablemente el número de casos a secuenciar, ya que son métodos más sensibles, están automatizadas y ofrecen un alto rendimiento en el procesamiento de las muestras. Al mismo tiempo, algunas de estas técnicas han permitido aumentar la sensibilidad y especificidad del análisis. Actualmente, dos de las técnicas más empleadas son la cromatografía líquida desnaturante de alto rendimiento (dHPLC) y el 'high-resolution melting' (HRM). Ambas técnicas presentan unos niveles similares de sensibilidad y especificidad, siendo capaces de detectar alelos mutados en subpoblaciones celulares de hasta el 10% (Chou *et al.*, 2005; Gerhardus *et al.*, 2007). De entre estas técnicas de cribaje, el HRM es valorada como la más robusta y requiere una menor manipulación de la muestra, lo que reduce el riesgo de contaminación. Todo esto la ha llevado a ser considerada actualmente la más idónea en el diagnóstico clínico (Krypuy *et al.*, 2007; Millat *et al.*, 2008; Takano *et al.*, 2008; Audrezet *et al.*, 2008; Bastien *et al.*, 2008; Roleau *et al.*, 2009). Por este motivo, para este trabajo escogimos el método HRM y

posterior secuenciación directa para identificar las principales alteraciones moleculares en la LMA.

En los resultados obtenidos podemos observar que, de las 3.359 determinaciones realizadas mediante HRM, se detectaron 136 positivas (4%) que fueron confirmadas posteriormente por el método de secuenciación de Sanger. La positividad validada por secuenciación en la totalidad de las muestras con un patrón positivo por HRM es una prueba sólida de la alta especificidad de este método de cribaje. La dificultad de esta técnica son las 87 (2,6%) determinaciones cuyas curvas de fusión de HRM eran próximas a los límites que definen las diferencias entre los pacientes clasificados como 'wild-type' o como mutados. La comparación de los resultados obtenidos mediante HRM con los derivados de la secuenciación por el método de Sanger determinó que el 17% de ellas eran positivas mientras que el resto presentaban una secuenciación normal. La valoración de estos resultados en la frontera de positividad-negatividad son obviamente los que presentan mayor complicación. En la literatura se consideran falsos positivos ya que generan la duda de si se deben a la mayor sensibilidad del HRM frente a la secuenciación. La técnica de Sanger permite detectar mutaciones en línea germinal con una sensibilidad del 99%, sin embargo, en el caso de mutaciones somáticas en poblaciones clonales, sólo detecta las que están presentes en al menos el 20% de las células analizadas. Pero tampoco podemos descartar el caso contrario. El HRM es capaz de diferenciar fragmentos con una variación de 0.3°C en su temperatura de fusión. Sin embargo, esta variación se puede ver afectada por el tamaño del fragmento amplificado (si contienen más de 350 pb), por el contenido de pares GC del fragmento, por el tipo de mutación, por la concentración de sales presentes en las muestras o por cualquier combinación de éstas, pudiendo generar patrones de curvas de fusión anómalas (Laurie *et al.*, 2008, Tindall *et al.*, 2008; Garritano *et al.*, 2009). Así pues, basados en nuestro propios resultados, podríamos afirmar que la sensibilidad y la especificidad global de cribado mediante HRM están en torno al 91% y 97%, respectivamente, lo que coincide con lo descrito por otros (Laurie *et al.*, 2008, Tindall *et al.*, 2008; Garritano *et al.*, 2009).

Hasta el momento la selección de genes candidatos para un estudio de las características del nuestro relacionados se establecía basándose en su importancia en otras hemopatías malignas o en rutas de señalización implicadas en la diferenciación, en la apoptosis o en ambas. El desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido encontrar nuevos marcadores moleculares relacionados con el desarrollo de las neoplasias mieloides. Muchas de estas alteraciones afectan tanto a genes implicados en las vías de señalización de la proliferación y en la supervivencia celular, como a genes involucrados en la regulación epigenética del DNA. Sin embargo, queda por esclarecer la implicación que puedan tener en el pronóstico. Por esta razón, para la selección de los genes a estudio para esta Tesis Doctoral (*ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *c-CBL*, *DNMT3A* y *TP53*) hemos tenido muy en consideración la persistente controversia que éstos suscitan aún en relación con su frecuencia e implicación en el pronóstico de la LMA.

La incidencia de alteraciones en el gen *ASXL1* del 16% encontrada en nuestra serie se encuentra en valores intermedios a los descritos en otras series de LMA, entre un 7% y un 30% (Gelsi-Boyer *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2010; Metzeler *et al.*, 2011). La variación que se observa entre los diferentes estudios se debe, principalmente, a la población de estudio seleccionada, especialmente, cuando sólo se incluyen pacientes mayores de 60 años (Metzeler *et al.*, 2011). Además, se ha encontrado una asociación entre las mutaciones de *ASXL1* y el menor recuento de leucocitos, hallazgos que no hemos podido confirmar en nuestra serie (Chou *et al.*, 2010; Metzeler *et al.*, 2011).

La frecuencia con que encontramos las mutaciones canónicas de *IDH* (9%), 3% *IDH1*^{R132} y 6% restante *IDH2*^{R140}, ambas descritas previamente como las más recurrentes en las LMA *de novo*, están en línea con algunas otras series descritas en la literatura (Gross *et al.*, 2010; Paschka *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2011). La incidencia de mutaciones en estos genes varía desde el 8% hasta el 33%, y al igual que en el caso de *ASXL1* se debe principalmente a las diferentes subpoblaciones estudiadas (Mardis *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2010; Paschka *et al.*, 2010). Estas mutaciones cuando se estudian en subgrupos específicos

de pacientes, parecen estar asociadas con la ausencia de alteraciones en el cariotipo y con la edad inferior a 60 años (Mardis *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2010; Gross *et al.*, 2010; Paschka *et al.*, 2010). Nosotros no hemos podido confirmar este hallazgo, aunque observamos un leve aumento no significativo de la frecuencia de las mutaciones de *IDH1/IDH2* (11%) en pacientes menores de 60 años.

La ausencia de mutaciones de *c-CBL* observada en nuestro estudio está acorde con lo publicado en otros estudios previos, en los que en pacientes con LMA *de novo* ha sido siempre menor al 1% y se ha sugerido su asociación con las leucemias CBF (Sargin *et al.*, 2007; Callgiuri *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2008; Reindel *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2010).

En nuestro estudio, como en otros, queda patente la relación mutuamente excluyente entre *IDH1* e *IDH2* (Figuroa *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2011; Welch *et al.*, 2011). Las mutaciones en *IDH* provocan una actividad enzimática neomórfica, siendo suficiente la presencia de una sola mutación para que la célula mutante adquiriera una ventaja proliferativa frente al resto de células (Hartmann *et al.*, 2009; Figuroa *et al.*, 2010). Sin embargo, se han visto mutaciones coincidentes con *NPM1*, *FLT3* y *ASXL1*. La más relevante es la relación de *IDH* con *NPM1* que nosotros encontramos en el 3% de los pacientes. Recientemente, el estudio del CALGB (Patel *et al.*, 2012) observó una frecuencia del 4% y un impacto en el pronóstico de la enfermedad que nosotros no pudimos demostrar. También se encontraron frecuencias similares en la asociación de las mutaciones de *IDH* y *FLT3*, siendo en ambos estudios en torno al 3%. La combinación de mutaciones simultáneamente en *IDH* y *ASXL1* en nuestra serie se limitó a un único paciente, mientras que en el estudio de Patel *et al.*, (2012) sólo encontraron 3 pacientes con mutaciones en ambos genes de 398 estudiados.

En nuestro estudio, llama la atención la alta proporción de pacientes con mutaciones de *ASXL1* coexistentes con *NPM1*, *FLT3* o ambos (5%). En los dos principales trabajos que estudian esta asociación (Metzeler *et al.*, 2011; Schnittge *et al.*, 2013), la frecuencia encontrada es del 1% para *ASXL1* y *NPM1* y del 2% para *ASXL1* y *FLT3*. Ambos estudios sugieren que la baja

frecuencia se debe a que entre *ASXL1* y *NPM1* existe una relación de epistasia, donde la acción de uno de ellos puede estar modificada por la acción del otro. Estos genes, que aunque forman parte de rutas diferentes, actuarían al mismo nivel del ciclo celular.

En línea con lo descrito en series más amplias (Shen *et al.*, 2011), en nuestro estudio no encontramos un impacto significativo de las mutaciones en los genes *IDH* y *ASXL1* sobre el pronóstico de los pacientes con LMA *de novo*. Sin embargo, la controversia en este asunto aún persiste, ya que otros trabajos en pacientes seleccionados en función de la edad y/o el cariotipo han sugerido una relación entre estas mutaciones y una menor supervivencia. En este sentido, se ha descrito una fuerte asociación con una mayor supervivencia cuando las mutaciones de *IDH* son observadas simultáneamente con mutaciones de *NPM1*, permitiendo definir un subgrupo de pacientes con un pronóstico más favorable que cuando se encuentra *NPM1* mutado de forma aislada (Patel *et al.*, 2012). Con estos hallazgos se ha propuesto una nueva estratificación para pacientes con *FLT3* negativo y riesgo citogenético intermedio que, en combinación con el estado mutacional de otros genes (*TET2*, *ASXL1*, *PHF6* y *MLL-PTD*), permite definir un subgrupo de pacientes con mejores tasas de supervivencia que aquellos con *inv(16)* o *t(8:21)* (Patel *et al.*, 2012).

Entre los genes que permiten identificar un subgrupo de peor pronóstico está *ASXL1*. Pero en nuestra serie no pudimos encontrar una relación con el pronóstico. Pensamos que, aparte del tamaño muestral, las discrepancias encontradas entre nuestro estudio y los publicados previamente, podrían explicarse por el hecho de que las mutaciones *missense* en *ASXL1*, más frecuentes en nuestro estudio, podrían no ser las que juegan un papel importante en la leucemogénesis. Se ha especulado que para que se desarrolle la enfermedad es necesaria la presencia de una proteína truncada, que normalmente es el resultado de mutaciones 'frameshifts' o de mutaciones puntuales que se traducen en un codón de parada, y, por tanto, sólo estas últimas tendrían un efecto negativo sobre el pronóstico de los pacientes (Mardis *et al.*, 2009). Además, recientemente Abdel-Wahab *et al.*, (2010) han demostrado que la mutación más recurrente

en *ASXL1*, (pGly646TrpfsX12) representa un artefacto de metodológico y no una mutación somática real. Por esta razón, han postulado que, del mismo modo que esta alteración ha resultado ser un error del proceso de amplificación tradicional, muchas otras podrían serlo también. Es por ello por lo que estos autores proponen revisar la frecuencia real de mutaciones en *ASXL1*, así como su efecto sobre la enfermedad.

En relación con el estudio que llevamos a cabo en los pacientes con RCI, centramos el análisis en las mutaciones de *DNMT3A* que se han descrito principalmente en este subgrupo. La mutación más frecuente es la R882, que representa el 69%-83% de las mutaciones que se detectan en este gen y se ha demostrado un impacto negativo sobre la supervivencia (Ley *et al.*, 2010; Thol *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2011).

La incidencia de *DNMT3A*-R882 en nuestra serie del 15% es similar a las publicadas previamente (Ley *et al.*, 2010; Thol *et al.*, 2011). Nosotros también encontramos una asociación de esta mutación con la hiperleucocitosis como ha sido previamente descrito (Ley *et al.*, 2010; Thol *et al.*, 2011). Sin embargo, dada la alta concomitancia que presenta *DNMT3A*-R882 con las mutaciones de *FLT3*-ITD (75% de los pacientes con *DNMT3A*-R882), no podemos descartar que este hallazgo se deba a la presencia de este último (Marková *et al.*, 2012). En cambio, no hemos podido establecer la relación descrita previamente entre la mutación *DNMT3A*-R882 y la edad o el cariotipo normal (Thol *et al.*, 2011; Marcucci *et al.* 2012).

Otros genes con los que se ha establecido una relación con la mutación *DNMT3A*-R882 son, además de *FLT3*-ITD, *NPM1* e *IDH* (Hou *et al.*, 2011; Reneville *et al.*, 2012). Cuando analizamos la presencia simultánea de estas mutaciones en nuestra serie observamos que el 88% de los pacientes con *DNMT3A*-R882 presentan además mutaciones en *FLT3*-ITD y/o *NPM1* (60% presentan los 3 genes mutados simultáneamente). Sin embargo no se ha encontrado relación con *IDH*, probablemente debido a que las mutaciones de *IDH* no están muy representadas en grupo de riesgo citogenético intermedio.

Estudios previos describen que la mutación *DNMT3A-R882* tiene una influencia negativa en la supervivencia de estos pacientes (Thol *et al.*, 2011). Aunque en nuestra serie no hemos podido observar este hallazgo, pudimos ver una mayor tasa de recaída en los pacientes con la mutación de forma independiente a las mutaciones en los genes *NPM1* y *FLT3*. Por otro lado, como ya proponían Markovà *et al.*, (2012), estudiamos el efecto conjunto de las mutaciones *DNMT3A-R882* y *FLT3-ITD* y comprobamos que la asociación de ambos genes permitía diferenciar 3 grupos de riesgo entre los paciente de RCI: i) sin mutaciones en *DNMT3A-R882* y *FLT3-ITD*; ii) con al menos una de las dos mutaciones; y iii) con ambas mutaciones al mismo tiempo ($P = 0,004$ para SG, $P = 0,007$ para SLE y $P = 0,003$ para SLR). Basados en estos hallazgos, sería razonable considerar la incorporación de esta subclasificación a los algoritmos de decisión terapéutica en un futuro próximo.

La inactivación de *TP53* parece tener un papel destacado en la transformación neoplásica en los pacientes de LMA y se ha observado con mayor frecuencia en pacientes con LMA secundarias a terapia y en pacientes *de novo* con cariotipos complejos, donde la frecuencia alcanza hasta el 60% (Dunna *et al.*, 2012; Rucker *et al.*, 2012). En nuestra cohorte de pacientes con RCA, se detectaron mutaciones puntuales en el gen *TP53* en el 34% de los casos, aumentando al 47% en el subgrupo de pacientes con cariotipo complejo.

Al intentar relacionar las mutaciones de *TP53* con las características clínico-biológicas, observamos, al igual que otros estudios previos, que los pacientes con mutaciones en *TP53* presentaban un menor recuento de plaquetas y un mayor porcentaje de blastos en sangre periférica, en el momento del diagnóstico (Haferlach *et al.*, 2008; Dunna *et al.*, 2012). Sin embargo, no hemos detectado una relación entre las mutaciones en *TP53* y *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*. Sólo Seifert *et al.*, (2009) encontraron una correlación inversa entre las mutaciones de *FLT3* y *NPM1*, que no ha sido confirmada en estudios posteriores (Haferlach *et al.*, 2008; Dunna *et al.*, 2012; Rucker *et al.*, 2012). En cambio, se ha encontrado una relación con el cariotipo complejo, donde dichas mutaciones ejercen un efecto negativo sobre la tasa de remisión y la supervivencia (Rucker *et al.*, 2012). En

nuestro estudio, cuando analizamos los pacientes con cariotipo complejo, observamos que la supervivencia a los 2 años era menor en los pacientes que además presentaban mutaciones en *TP53*. Además, vimos que este efecto se veía reforzado por la presencia de una monosomía, pero cuando se realizó el análisis de supervivencia por estratos, no pudimos hacer comparaciones debido al escaso número de pacientes que conformaban cada uno de los distintos subgrupos.

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva están permitiendo estudiar el genoma o el exoma completo de los pacientes, ampliando, rápidamente, los conocimientos moleculares de LMA. A día de hoy, gracias a estos avances, son diversas las mutaciones génicas recurrentes que han sido descritas en las neoplasias mieloproliferativas, mostrando una enorme heterogeneidad molecular subyacente, con mutaciones que afectan a vías convergentes. El conocimiento de la implicación en la leucemogénesis de estos genes creemos que pueden ser determinantes para mejorar la estratificación del riesgo y seleccionar el tratamiento más apropiado de forma individualizada. Diversos estudios han demostrado que algunas de estas mutaciones ocurren con mayor frecuencia en la LMA, sin embargo, existe una gran controversia en la incidencia y el impacto pronóstico debido a la falta de congruencia de los resultados publicados. No obstante, recientemente, se ha sugerido un perfil mutacional que permite una reclasificación de los pacientes con riesgo citogenético intermedio en función de un grupo de genes (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH*, *ASXL1*, *PHF6*, *MLL-PTD*, *TET2* y *DNMT3A*) (Patel *et al.*, 2012).

Aunque la identificación de nuevas alteraciones moleculares con impacto en el pronóstico de los pacientes es de importancia clínica y biológica, el auténtico reto es integrar este conocimiento en la clínica diaria de la LMA. La secuenciación del genoma completo, sin duda, pasará a formar parte de la evaluación diagnóstica estándar en los próximos años, sin embargo, en la actualidad, es necesario que en los laboratorios de diagnóstico, se desarrollen estrategias diferentes al cribado masivo que permitan aplicar estos conocimientos, disminuyendo los costes y el tiempo necesario para obtener el resultado, sin perder sensibilidad ni especificidad.

Como consecuencia, en la presente Tesis Doctoral, hemos demostrado que la aplicación del HRM, combinado con la secuenciación directa, es un método útil y rápido para el diagnóstico diario de las mutaciones que están siendo integradas en los nuevos esquemas pronóstico y algoritmos de decisión en los pacientes con LMA.

7. CONCLUSIONES

1. El método de High Resolution Melting se ha mostrado muy útil en el rastreo de mutaciones de las regiones codificantes en la LMA., mostrando una alta sensibilidad y especificidad (91% y 97%, respectivamente)
2. No encontramos una relación entre la presencia de mutaciones en los genes *ASXL1*, *IDH1* e *IDH2* (16%, 3% y 6%, respectivamente) y las características de presentación o el pronóstico en la LMA.
3. Aunque detectamos algunos pacientes con mutaciones de *ASXL1* coexistentes con mutaciones de *NPM1*, *FLT3* o de ambos (5%), éstos no presentaron un perfil clínico o biológico característico.
4. Además de la relación mutuamente excluyente entre las mutaciones de *IDH1* e *IDH2*, éstas se asociaron a mutaciones de *NPM1* en el 3% de los pacientes.
5. La presencia de la mutación *DNMT3A-R882* en el 15% de los pacientes con riesgo citogenético intermedio se asoció con recuentos de leucocitos más altos y una mayor tasa de recaídas.
6. El estado mutacional de *DNMT3A-R882* y *FLT3-ITD* permitió diferenciar 3 grupos de riesgo entre los paciente de RCI:
 - i) sin mutaciones en *DNMT3A-R882* y *FLT3-ITD*: favorable
 - ii) con al menos una de las dos mutaciones: intermedio
 - iii) con ambas mutaciones al mismo tiempo: desfavorable
7. Las mutaciones de *TP53* fueron muy comunes en los pacientes con citogenética de riesgo adverso (34%) y se asociaron con recuentos de plaquetas más bajos y un mayor porcentaje de blastos en sangre periférica en el momento del diagnóstico.,
8. En los pacientes con cariotipo complejo, las mutaciones de *TP53* confirieron un peor pronóstico en términos de supervivencia.

8.BIBLIOGRAFÍA

A

Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding *IDH1* and *IDH2* both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2122-6

Abbas S, Rotmans G, Löwenberg B, et al. Exon 8 splice site mutations in the gene encoding the E3-ligase CBL are associated with core binding factor acute myeloid leukemias. *Haematologica*. 2008 Oct;93(10):1595-7.

Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in *ASXL1* (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia*. 2010 Sep;24(9):1656-7.

Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010; 70: 447–452.

Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, et al. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities. In: WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. (ed. Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J.) World Health Organization. 2008; p. 76-81. IARC press, Lyon, France.

B

Bandi SR, Brandts C, Rensinghoff M, et al. E3 ligase-defective Cbl mutants lead to a generalized mastocytosis and myeloproliferative disease. *Blood* 2009; 114: 4197–4208.

Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, et al. Biallelic mutations in the *CEBPA* gene and low *CEBPA* expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J*. 2003;4(1):31-40.

- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006;6(2):107-16.
- Bejar R, Levine R and Benjamin L. Ebert Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *Clin Oncol* 2011.Vol 29:504-515.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. 1991 Jul;78(3):325-9.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33(4):451-8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985 Oct;103(4):620-5.
- Benthaus T, Schneider F, Mellert G, et al. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2008 Oct;143(2):230-9.
- Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, et al. The prognostic *IDH1* (R132) mutation is associated with reduced NADP (+)-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 487–494.
- Boissel N, Nibourel O, Renneville A, et al. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 10;28(23):3717-23
- Bolufer P, Collado M, Barragan E et al. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica*. 2007;92:308-314.

- Bornhäuser M, Illmer T, Schaich M, et al. AML SHG 96 study group. Improved outcome after stem-cell transplantation in *FLT3/ITD*-positive AML. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2264-5.
- Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene *ASXL1* in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1062-5
- Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, et al. *TP53* gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*. 2009;23(1):203-206.
- Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 10;26(29):4791-7. Epub 2008 Aug 11.
- Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*. 2008;26(29):4791-4797.
- Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4325-36.

C

- Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, et al. Mutual exclusion of *ASXL1* and *NPM1* mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia* 2010; 24:469–473.

Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, et al. Mutual exclusion of *ASXL1* and *NPM1* mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):469-73

Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J R Stat Soc B* 1972; 34: 187-220

Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia: Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting tandards for herapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003, 21:4642–4649

Chou WC, Hou HA, Chen CY, et al. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2749-54

Chou WC, Huang HH, Hou HA, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (*ASXL1*) mutations. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4086-94.

D

Damm F, Heuser M, Morgan M, et al. Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2011

Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated *IDH1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462: 739–744.

Deguchi K and Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia* 2002;16:740–744.

Delwel R. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol J*. 2003;4(1):31-40.

Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):570-7

Dunna NR, Vure S, Sailaja K, et al. *TP53* codon 72 polymorphism and risk of acute leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(1):347-50.

E

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007(4);8:286-98

Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006 Nov 25;368(9550):1894-907.

F

Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352:254-266.

Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, et al: p53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 78:1652-1657, 1991

Fenaux P, Preudhomme C, Quiquandon I, et al. Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 1992 Feb;80(2):178-83.

Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):553-67

- Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):553-67
- Fisher CL, Pineault N, Brookes C, et al. Loss-of-function additional sex combs-like1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood* 2010; 115: 38–46.
- Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, et al: Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 23:6285-6295, 2005
- Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, et al: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 271:1744-1747, 1996.

G

- Gaidzik V, Döhner K. Prognostic implications of gene mutations in acutemyeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin Oncol*. 2008 Aug;35(4):346-55. Review.
- Gale RE, Hills R, Kottaridis PD et al. No evidence that *FLT3* status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood*. 2005;106:3658-3665.
- Garritano S, Gemignani F, Voegelé C, et al. Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the *TP53* locus. *BMC Genet*. 2009 Feb 17;10:5.
- Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, et al. Mutations in *ASXL1* are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*.

- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145: 788–800.
- Ghassemifar R, Thien CB, Finlayson J, et al. Incidence of *c-CBL* mutations in human acute myeloid leukaemias in an Australian patient cohort. *Pathology*. 2011 Apr;43(3):261-5.
- Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009;113:6182-92.
- Green CL, Evans CM, Hills RK, et al. The prognostic significance of *IDH1* mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on *FLT3/ITD* status. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2779-82.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal normalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354-65.
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1312-20.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322-2333.

Gross S, Cairns RA, Minden MD, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations

Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, et al. Whole-exome sequencing identifies mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*. 2011 Dec 1;118(23):6153-63.

Guillem VM, Collado M, Terol MJ et al. Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia*. 2007;21:1413-1422.

Gupta M, Raghavan M, Gale RE, et al. Novel regions of acquired uniparental disomy discovered in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Sep;47(9):729-39.

H

Haferlach C, Dicker F, Herholz H, et al. Mutations of the *TP53* gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008;22(8):1539-1541.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold 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: 3835-3849

Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of *IDH1* and *IDH2* mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009

Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 2000;355:165-169.

- Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, 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 Jan 1;107(1):293-300
- Higgins CD, dos-Santos-Silva I, Stiller CA, et al. Season of birth and diagnosis of children with leukaemia: an analysis of over 15 000 UK cases occurring from 1953-95. *Br J Cancer*. 2001 Feb 2;84(3):406-12.
- Ho PA, Kopecky KJ, Alonzo TA, et al. Prognostic implications of the *IDH1* synonymous SNP rs11554137 in pediatric and adult AML: a report from the Children's Oncology Group and SWOG. *Blood*. 2011 Oct 27;118(17):4561-6.
- Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*. 2012 Apr 17.
- Hou HA, Kuo YY, Liu CY, et al. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):559-68.
- Hu G, Zhang W, Deisseroth AB. P53 gene mutations in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1992

J

- Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and *DNMT3A*. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3932-41

K

- Kang M, Lee SW, Kim EJ, et al. Positive regulation of additional sex comb-like 1 gene expression by the pluripotency factor SOX2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 11;421(3):621-6.

Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 16:3158-3168, 1998 6.
Havre PA, Yuan J, Hedrick L, et al: p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res* 5:4420-4424, 1995

Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Slama L, et al. Mutations of *IDH1* and *IDH2* genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1094-6.

Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, 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;98:1752Y1759.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, et al. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(16):7491-7495.

Kurosawa M, Okabe M, Kunieda Y, et al. Analysis of the p53 gene mutations in acute myelogenous leukemia: the p53 gene mutations associated with a deletion of chromosome 17. *Ann Hematol*. 1995

L

Lai J-L, Preudhomme C, Zandecki M, et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion: An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia* 9:370-381, 1995

Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 2004, 119(6):861-872.

- LaRochelle O, Bertoli S, Vergez F, et al. AML patients with *DNMT3A* exon 23 mutations benefit from idarubicin as compared to daunorubicin? A single center experience. *Oncotarget*. 2011 Nov;2(11):850-61.
- Laurie AD, George PM: Evaluation of high-resolution melting analysis for screening the LDL receptor gene. *Clin Biochem* 2008.
- Lee SW, Cho YS, Na JM, et al. *ASXL1* represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1. *J Biol Chem* 2010; 285: 18–29.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):323-31.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 363(25):2424-2433.
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008 Nov 6; 456(7218):66-72.
- Lin J, Yao DM, Qian J, et al. *IDH1* and *IDH2* mutation analysis in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2011 Oct 14.
- Lin J, Yao DM, Qian J, et al. Recurrent *DNMT3A* R882 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *PLoS One*. 2011;6(10)
- Lin LI, Chen CY, Lin DT, et al. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1372-9
- Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012 Feb 15

M

- Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6109–6116. 146.
- Mantel N: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966, 50:163–170
- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):475-86. Epub 2011 Jan 10. Review. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2011 May 1;29(13):1798.
- Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al. *IDH1* and *IDH2* gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2348-55.
- Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, et al. *DNMT3A* mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 1;30(7):742-50.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058-1066.
- Marková J, Michková P, Burčková K, et al. Prognostic impact of *DNMT3A* mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2012 Feb;88(2):128-35.
- McMurray HR, Sampson ER, Compitello G, et al. Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1112-6.
- Meaburn E, Butcher LM, et al: Genotyping pooled DNA using 100 K SNP microarrays: a step towards genomewide association scans. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:e27.

- Medeiros BC, Othus M, Fang M, et al. Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2224-8.
- Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, et al. t(11;22)(q23;q11.2) In acute myeloid leukemia of infant twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6413-8.
- Metzeler KH, Becker H, Maharry K, et al. *ASXL1* mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN "favorable" genetic category. *Blood*. 2011 Oct 26.
- Minelli A, Maserati E, Rossi G et al. Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;40:165-171.
- Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2001;97:1172-1179.
- Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, et al. Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem*. 2007
- Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, et al: Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: Are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 109:431-448, 2007
- Mrózek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, et al: Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 16:64-69, 2009

Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, et al. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2010; 115: 1969–1975.

Murugan AK, Bojdani E, Xing M. Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) mutations in thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 12;393(3):555-9.

O

Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 2004, 119(6):847-860.

Oran B, Dolan M, Cao Q, et al. Monosomal karyotype provides better prognostic prediction after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Mar;17(3):356-64.

P

Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1;28(22):3636-43

Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012 Mar 22;366(12):1079-89.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC *TP53* database. *Hum Mutat* 2007, 28(6):622-629.

R

- Ramadan SM, Fouad TM, Summa V, et al. Acute myeloid leukemia developing in patients with autoimmune diseases. *Haematologica*. 2012
- Rauch A, Rüschemdorf F, Huang J, et al. Molecular karyotyping using an SNP array for genome-wide genotyping. *J Med Genet* 2004, 41:916-922.
- Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S, et al. Point mutations in the juxtamembrane domain of *FLT3* define a new class of activating mutations in AML. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3700-7.
- Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, et al. CBL Exon 8/9 Mutants Activate the *FLT3* Pathway and Cluster in Core Binding Factor/11q Deletion Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome Subtypes. *Clin Cancer Res* 2009;15(7):2238.
- Renneville A, Boissel N, Nibourel O, et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia*. 2012 Jun;26(6):1247-54.
- Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008 May;22(5):915-31
- Ribeiro AF, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, et al. Mutant *DNMT3A*: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5824-31. Epub 2012 Apr 5. PubMed PMID: 22490330.
- Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, et al. Combined mutations of *ASXL1*, *CBL*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KRAS*, *NPM1*, *NRAS*, *RUNX1*, *TET2* and *WT1* genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer*. 2010 Aug 2

Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. *TP53* alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012 Mar 1;119(9):2114-21.

S

Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, et al. *FLT3*-dependent transformation by inactivating *c-CBL* mutations in AML. *Blood* 2007; 110: 1004–1012.

Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, et al. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* 2010; 115: 1254–1263

Schittenhelm MM, Yee KW, Tyner JW, et al. Determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248). *Leukemia*. 2006 Nov;20(11):2008-14.

Schnittger S, Eder C, Jeromin S, et al. *ASXL1* exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013 Jan;27(1):82-91.

Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, et al. *IDH1* mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated *NPM1* status. *Blood*. 2010 Dec 16;116(25):5486-96

Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of *FLT3* length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*. 2002;100:59Y66.

Seifert H, Mohr B, Thiede C, et al. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(4):656-663.

- Shah MY, Licht JD. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2011;43(4):289-290.
- Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1,185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2011 Aug 31.
- Singh RR, Bains A, Patel KP, et al. Detection of High-Frequency and Novel *DNMT3A* Mutations in Acute Myeloid Leukemia by High-Resolution Melting Curve Analysis. *J Mol Diagn.* 2012 May 26.
- Slingerland JM, Minden MD, Benchimol S. Mutation of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. *Blood.* 1991
- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood.* 2000 Dec 15;96(13):4075-83.
- Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jul;2(7):502-13.
- Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, et al. *DNMT3A* mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2011;25(7):1217-1219
- Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. Size of *FLT3* internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107 (9): 3724-26.

T

- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Taylor AM. Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2001;14:631-644.
- Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. *IDH1* and *IDH2* mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase

essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1302-9.

Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107:4011Y4020

Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326Y4335

Thol F, Damm F, Lüdeking A, et al. Incidence and Prognostic Influence of *DNMT3A* Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2889-96.

Thol F, Damm F, Wagner K, et al. Prognostic impact of *IDH2* mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):614-6.

Tindall EA, Petersen DC, Woodbridge P, et al. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum Mutat*. 2009 Jun;30(6):876-83.

V

Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Apr 15;350(16):1617-28.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100: 2292-2302.

W

Wagner K, Damm F, Göhring G, et al. Impact of *IDH1* R132 mutations and an *IDH1* single nucleotide polymorphism in cytogenetically

- normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2356-64
- Walker A, Marcucci G. Impact of molecular prognostic factors in cytogenetically normal acute myeloid leukemia at diagnosis and relapse. *Haematologica*. 2011 May;96(5):640-3.
- Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15335-40.
- Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent *DNMT3A* mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153-1158.
- Wang P, Spielberger RT, Thangavelu M, et al: dic(5;17): A recurring abnormality in malignant myeloid disorders associated with mutations of *TP53*. *Genes Chromosomes Cancer* 20:282-292,
- Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated *IDH1* and *IDH2* mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010; 17: 225–234.
- Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 84:3148-3157, 1994
- Welch JS, Link DC. Genomics of AML: clinical applications of next-generation sequencing. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.
- Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5743–5750.
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L 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;61:7233-7239

Wick W, Hartmann C, Engel C, et al. NOA-04 randomized phase III trial of equential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5874–5880.

Williams SC, Angerer ND, Johnson PF. C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene Expr.* 1997;6:371-385.

Williamson EA, Xu HN, Gombart AF et al. Identification of transcriptional activation and repression domains in human CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem.* 1998;273:14796-14804.

Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood.* 2009 Mar 26;113(13):3088-91. Epub 2009 Jan 26.

Y

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001;97:2434Y2439.

Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene.* 2010 Jun 24;29(25):3723-31.

Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360: 765–773.

Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene *DNMT3A* in acute monocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011;43(4):309-15

Z

Zhao S, Lin Y, Xu W, J et al. Glioma-derived mutations in *IDH1* dominantly inhibit *IDH1* catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* 2009; 324: 261–265.

Zuber J, Radtke I, Pardee TS, et al. Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev.* 2009 Apr 1;23(7):877-89

ANEXO

Tabla I. Análisis univariante para la SG en la serie global con Cariotipo Normal

Características	SG			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	Vivos a 5 años (%)	P
Total	83			
Edad, años				<0,001
< 60	50 (60)	67	50	
≥ 60	33 (40)	6	14	
Sexo				0,69
Hombre	46 (55)	18	35	
Mujer	37 (45)	12	34	
Subtipo FAB				0,80
M0	9 (11)	25	22	
M1	26 (33)	14	31	
M2	18 (23)	18	41	
M4	15 (19)	16	30	
M5	11 (14)	10	30	
M6	1 (1)	6	0	
M7	0 (0)	-	-	
Recuento Leucocitos, × 10⁹/L				0,73
< 20	42 (51)	20	34	
≥ 20	41 (49)	14	35	
Requento Plaquetas, × 10⁹/L				0,05
< 100	62 (75)	14	27	
≥ 100	21 (25)	NR	56	
FLT3- ITD				0,01
Wild-type	52 (63)	24	43	

Características	SG			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	Vivos a 5 años (%)	P
Mutado	30 (37)	8	24	
FLT3 - D835				0,86
Wild-type	74 (96)	16	36	
Mutado	3 (4)	67	37	
NPM1				0,32
Wild-type	42 (55)	24	37	
Mutado	35 (45)	13	38	
FLT3/NPM1				0,001
FLT3-ITD wt / NPM1 mut	17 (21)	NR	59	
FLT3-ITD mut / NPM1 wt	9 (11)	16	44	
FLT3-ITD wt / NPM1 wt	32 (46)	24	32	
FLT3-ITD mut / NPM1 mut	19 (23)	7	22	
CEBPA				0,03
Wild-type	35 (92)	32	49	
Mutado	3 (8)	8	0	
ASXL1				0,97
Wild-type	78 (94)	16	34	
Mutated	5 (6)	6	40	
IDH1				0,1
Wild-type	70 (84)	16	33	
Mutado	1 (1)	0	0	
SNP	12 (14)	24	47	
IDH2				0,83
Wild-type	78 (94)	15	35	
Mutado	5 (6)	28	27	

Mut: mutado; wt: wild-type

Tabla II. Análisis univariante para la SLE Y SLR en la serie global con Cariotipo Normal

Características	SLE			SLR		
	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P
Total	55			53		
Edad, años			0,002			0,001
< 60	39 (70)	52		38 (72)	59	
≥ 60	16 (30)	7		15 (28)	8	
Sexo			0,99			0,99
Hombre	32 (60)	39		32 (60)	47	
Mujer	23 (40)	36		21 (40)	42	
FAB			0,13			0,003
M0	8 (15)	37		8 (15)	37	
M1	18 (34)	27		18 (35)	33	
M2	10 (19)	37		9 (17)	56	
M4	9 (17)	51		8 (15)	57	
M5	7 (13)	48		7 (13)	56	
M6	1 (2)	0		1 (2)	0	
M7	0 (0)	-		0 (0)	-	
Recuento Leucocitos, × 10⁹/L			0,22			0,63
< 20	26 (52)	28		26 (49)	36	
≥ 20	26 (48)	46		27 (51)	51	
Reuento Plaquetas, ×			0,24			0,18

Características	SLE			SLR		
	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P
10 ⁹ /L						
< 100	42 (81)	34		40 (75)	40	
≥ 100	13 (24)	49		13 (25)	41	
FLT3- ITD			0,19			0,44
Wild-type	36 (67)	42		36 (68)	46	
Mutado	18 (33)	32		16 (32)	46	
FLT3 - D835			0,47			0,22
Wild-type	49 (96)	38		47 (96)	46	
Mutado	2 (4)	50		2 (4)	-	
NPM1			0,80			0,75
Wild-type	25 (55)	35		28 (57)	42	
Mutado	25 (45)	43		23 (43)	52	
FLT3/NPM1			0,01			0,10
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	13 (24)	61		13 (25)	66	
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 wt</i>	7 (13)	57		7 (13)	71	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	21 (42)	26		21 (43)	32	
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 mut</i>	12 (22)	22		10 (19)	29	
CEBPA			0,04			0,57
Wild-type	24 (92)	47		24 (92)	60	
Mutado	2 (8)	0		2 (6)	-	
ASXL1			0,38			0,61
Wild-type	52 (94)	36		50 (94)	43	

Características	SLE			SLR		
	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	<i>P</i>	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	<i>P</i>
Mutated	3 (6)	33		3 (6)	27	
IDH1			0,29			0,53
Wild-type	49 (89)	35		47 (89)	44	
Mutado	0 (0)	-		0 (0)	-	
SNP	6 (11)	60		6 (11)	60	
IDH2			0,94			0,70
Wild-type	52 (94)	38		50 (94)	46	
Mutado	3 (6)	33		3 (6)	33	

Mut: mutado; wt: wild-type; Pr. Act: Probabilidad actuarial

Tabla III. Análisis univariante para la SG en la serie global menores de 60 años

Características	SG			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	Vivos a 5 años (%)	P
Total	100			
Sexo				0,09
Hombre	56 (56)	67	51	
Mujer	44 (44)	12	37	
Subtipo FAB				0,62
M0	5 (7)		80	
M1	27 (36)		38	
M2	22 (29)		55	
M4	23 (30)		33	
M5	12 (16)		50	
M6	6 (8)		33	
M7	1 (1)		-	
Riesgo citogenético				0,13
Favorable	16 (16)	23	44	
Intermedio	69 (71)	28	48	
Adverso	12 (12)	8	29	
Cariotipo				0,19
Normal	48 (48)	NR	50	
Anormal	52 (52)	14	40	
Recuento				0,49
Leucocitos, × 10⁹/L				
< 20	50 (50)	28	45	
≥ 20	50 (50)	16	45	

Características	SG			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	Vivos a 5 años (%)	P
Reuento				0,25
Plaquetas, × 10⁹/L				
< 100	77 (77)	16	42	
≥ 100	23 (23)	NR	54	
FLT3 - ITD				0,004
Wild-type	64 (70)	NR	50	
Mutado	28 (30)	NR	29	
FLT3 – D835				0,62
Wild-type	84 (94)	27	46	
Mutado	5 (6)	67	20	
NPM1				0,79
Wild-type	56 (63)	27	44	
Mutado	33 (37)	67	54	
FLT3/NPM1				0,01
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	17 (20)	NR	81	
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 wt</i>	13 (15)	16	46	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	41 (47)	27	42	
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 mut</i>	16 (18)	11	28	
CEBPA				0,56
Wild-type	34 (92)	NR	55	
Mutado	3 (8)	12	33	
ASXL1				0,64
Wild-type	93 (93)	23	44	
Mutated	7 (7)	NR	57	
IDH1				0,80

Características	SG			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	Vivos a 5 años (%)	P
Wild-type	85 (85)	25	45	
Mutado	4 (4)	10	50	
SNP	11 (11)	11	42	
IDH2				0,93
Wild-type	93 (93)	25	46	
Mutado	7 (7)	28	34	

Mut: mutado; wt: wild-type

Tabla IV. Análisis univariante para la SLE Y SLR en la serie global menores de 60 años

Características	SLE			SLR		
	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P
Total	73			72		
Edad, años			0,18			0,20
< 60	43 (60)	58		43 (60)	67	
≥ 60	30 (40)	42		29 (40)	52	
Sexo			0,748			0,53
Hombre	10 (15)	25		4 (6)	75	
Mujer	18 (28)	32		18 (26)	38	
Subtipo FAB	16 (25)	59		16 (24)	67	
M0	16 (25)	49		15 (22)	68	
M1	10 (15)	60		10 (15)	67	
M2	4 (6)	50		4 (6)	67	
M4	1 (2)	-		1 (1)	-	

M5			0,92			0,79
M6	14 (20)	48		14 (20)	68	
M7	52 (73)	48		51 (73)	59	
Bifenotípica	5 (7)	53		5 (7)	80	
Cariotipo			0,80			0,51
Normal	33 (45)	52		33 (46)	54	
Anormal	40 (65)	50		36 (54)	67	
Niveles Hemoglobina, g/dL			0,30			0,51
< 10	38 (52)	48		37 (51)	54	
≥ 10	35 (48)	58		35 (49)	67	
Recuento Leucocitos, × 10⁹/L			0,84			0,67
< 20	57 (78)	52		56 (78)	63	
≥ 20	16 (22)	51		16 (22)	54	
Reuento Plaquetas, × 10⁹/L			0,03			0,003
< 100	50 (74)	60		50 (75)	70	
≥ 100	18 (26)	32		17 (25)	39	
FLT3			0,35			0,18
Wild-type	62 (94)	50		61 (94)	60	
Mutado	4 (6)	50		4 (6)	-	
NPM1			0,83			0,39
Wild-type	40 (60)	49		40 (61)	55	
Mutado	27 (40)	55		26 (39)	64	
FLT3/NPM1			0,11			0,12
FLT3-ITD wt / NPM1 mut	16 (24)	72		16 (25)	82	

<i>FLT3-ITD</i> mut / <i>NPM1</i> wt	10 (15)	50	10 (15)	50
<i>FLT3-ITD</i> wt / <i>NPM1</i> wt	29 (44)	49	29 (45)	57
<i>FLT3-ITD</i> mut / <i>NPM1</i> mut	11 (17)	29	10 (158)	40
CEBPa		0,53		0,32
Wild-type	25 (89)	54	25 (89)	63
Mutado	3 (11)	33	3 (11)	-
ASXL1		0,96		0,81
Wild-type	69 (95)	51	68 (95)	60
Mutated	4 (5)	50	4 (4)	75
IDH1		0,74		0,30
Wild-type	62 (85)	49	61 (84)	56
Mutado	4 (5)	50	4 (5)	-
SNP	7 (10)	69	7 (11)	86
IDH2		0,64		0,29
Wild-type	70 (96)	52	69 (96)	63
Mutado	3 (4)	33	3 (4)	67

Mut: mutado; wt: wild-type; Pr. Act: Probabilidad actuarial

Tabla V. Análisis univariante para la SG en la serie global mayores de 60 años

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
Total	100			
Edad, años				0,09
< 60	56 (56)	67	51	
≥ 60	44 (44)	12	37	

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
Sexo				0,62
Hombre	5 (7)		80	
Mujer	27 (36)		38	
Subtipo FAB	22 (29)		55	
M0	23 (30)		33	
M1	12 (16)		50	
M2	6 (8)		33	
M4	1 (1)		-	
M5				0,13
M6	16 (16)	23	44	
M7	69 (71)	28	48	
Bifenotípica	12 (12)	8	29	
Cariotipo				0,19
Normal	48 (48)	NR	50	
Anormal	52 (52)	14	40	
Niveles Hemoglobina, g/dL				0,49
< 10	50 (50)	28	45	
≥ 10	50 (50)	16	45	
Recuento Leucocitos, × 10⁹/L				0,25
< 20	77 (77)	16	42	
≥ 20	23 (23)	NR	54	
Reuento Plaquetas, × 10⁹/L				0,004
< 100	64 (70)	NR	50	
≥ 100	28 (30)	NR	29	

Características	Supervivencia Global			
	Pacientes N (%)	Mediana (me)	% Vivos a 5 años	P
FLT3				0,62
Wild-type	84 (94)	27	46	
Mutado	5 (6)	67	20	
NPM1				0,79
Wild-type	56 (63)	27	44	
Mutado	33 (37)	67	54	
FLT3/NPM1				0,01
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 mut</i>	17 (20)	NR	81	
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 wt</i>	13 (15)	16	46	
<i>FLT3-ITD wt / NPM1 wt</i>	41 (47)	27	42	
<i>FLT3-ITD mut / NPM1 mut</i>	16 (18)	11	28	
CEBPa				0,56
Wild-type	34 (92)	NR	55	
Mutado	3 (8)	12	33	
ASXL1				0,64
Wild-type	93 (93)	23	44	
Mutated	7 (7)	NR	57	
IDH1				0,80
Wild-type	85 (85)	25	45	
Mutado	4 (4)	10	50	
SNP	11 (11)	11	42	
IDH2				0,93
Wild-type	93 (93)	25	46	
Mutado	7 (7)	28	34	

Mut: mutado; wt: wild-type.

Tabla VI. Análisis univariante para la SLE y SLR en la serie global mayores de 60 años

Características	SLE			SLR		
	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P	Pacientes N (%)	Pr. Act a 5 años (%)	P
Total	73			72		
Edad, años	0,18			0,19		
< 60	43 (60)	58		43 (60)	67	
≥ 60	30 (40)	42		29 (40)	52	
Sexo	0,74			0,53		
Hombre	10 (15)	25		4 (6)	75	
Mujer	18 (28)	32		18 (26)	38	
Subtipo FAB	16 (25)	59		16 (24)	67	
M0	16 (25)	49		15 (22)	68	
M1	10 (15)	60		10 (15)	67	
M2	4 (6)	50		4 (6)	67	
M4	1 (2)	-		1 (1)	-	
M5	0,92			0,79		
M6	14 (20)	48		14 (20)	68	
M7	52 (73)	48		51 (73)	59	
Bifenotípica	5 (7)	53		5 (7)	80	
Cariotipo	0,80			0,51		
Normal	33 (45)	52		33 (46)	54	
Anormal	40 (65)	50		36 (54)	67	
Niveles Hemoglobina, g/dL	0,30			0,51		
< 10	38 (52)	48		37 (51)	54	
≥ 10	35 (48)	58		35 (49)	67	

Recuento Leucocitos, × 10⁹/L			0,84		0,66
< 20	57 (78)	52		56 (78)	63
≥ 20	16 (22)	51		16 (22)	54
Reuento Plaquetas, × 10⁹/L			0,03		0,003
< 100	50 (74)	60		50 (75)	70
≥ 100	18 (26)	32		17 (25)	39
FLT3			0,35		0,18
Wild-type	62 (94)	50		61 (94)	60
Mutado	4 (6)	50		4 (6)	-
NPM1			0,83		0,39
Wild-type	40 (60)	49		40 (61)	55
Mutado	27 (40)	55		26 (39)	64
FLT3/NPM1			0,11		0,12
<i>FLT3-ITD</i> wt / <i>NPM1</i> mut	16 (24)	72		16 (25)	82
<i>FLT3-ITD</i> mut / <i>NPM1</i> wt	10 (15)	50		10 (15)	50
<i>FLT3-ITD</i> wt / <i>NPM1</i> wt	29 (44)	49		29 (45)	57
<i>FLT3-ITD</i> mut / <i>NPM1</i> mut	11 (17)	29		10 (158)	40
CEBPa			0,53		0,31
Wild-type	25 (89)	54		25 (89)	63
Mutado	3 (11)	33		3 (11)	-
ASXL1			0,97		0,81
Wild-type	69 (95)	51		68 (95)	60
Mutated	4 (5)	50		4 (4)	75
IDH1			0,74		0,30

Wild-type	62 (85)	49	61 (84)	56
Mutado	4 (5)	50	4 (5)	-
SNP	7 (10)	69	7 (11)	86
IDH2		0,62		0,28
Wild-type	70 (96)	52	69 (96)	63
Mutado	3 (4)	33	3 (4)	67

Mut: mutado; wt: wild-type; Pr. Act: Probabilidad actuarial