



VNIVERSITAT D VALÈNCIA
(ò ≈) **Facultat de Ciències Biològiques**

Departamento de Genética

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
GENÉTICA MOLECULAR Y EVOLUTIVA (194B)**

***FLT3* Y *NPM1* COMO MARCADORES
MOLECULARES EN LA LEUCEMIA
MIELOBLÁSTICA AGUDA. UTILIDAD
PRONÓSTICA Y DIAGNÓSTICA**

Memoria presentada por
D. Juan Carlos Pajuelo Gámez
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Valencia

Fdo. D. Juan Carlos Pajuelo Gámez
Dirigida por la **Dra. Eva Barragán González**
y el **Dr. Miguel Ángel Sanz Alonso**
Valencia, 2015



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
[ò≈] Facultat de Ciències Biològiques

Departamento de Genética

El Dr. Miguel A. Sanz Alonso, jefe de Hematología del Hospital General Universitario La Fe (Valencia) y profesor asociado del departamento de Medicina de la Universidad de Valencia, y la Dra. Eva Barragán González, facultativo adjunto del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario La Fe (Valencia), certifican que D. Juan Carlos Pajuelo Gámez ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "**FLT3 Y NPM1 COMO MARCADORES MOLECULARES EN LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA. UTILIDAD PRONÓSTICA Y DIAGNÓSTICA**", y autorizan la lectura y defensa del mismo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia en Octubre de 2015.

Fdo. Dr. Miguel Ángel Sanz Alonso

Fdo. Dra. Eva Barragán González

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esperaba con ganas escribir esta parte, y al decir escribir, lo hago en sentido literal, ya que lo único que voy a hacer es dejar plasmado todos los pensamientos y todas las sensaciones que durante este tiempo me han acompañado en cada paso que daba, todo el agradecimiento que desde el primer momento he sentido hacia todos y cada uno de los que habéis hecho posible que haya llegado hasta aquí. Ha sido un camino duro, complejo, un camino que ha costado recorrer, un camino en el que, a pesar de haber sentido o mostrado en algún momento que me fallaban las fuerzas, me habéis ayudado a no perder de vista la meta ni mi afán por querer llegar hasta ella, independientemente de las salidas fáciles que me haya podido encontrar en el trayecto. Este trabajo no es únicamente mío, es algo que se debe a muchas personas que de manera directa o indirecta han participado en su elaboración, por lo que os doy las gracias.

Gracias en primer lugar a Eva Barragán y a Miguel Ángel Sanz. Eva, a ti por tu confianza para dejarme escribir este capítulo de mi historia, por tu paciencia, por tu comprensión, por tu esfuerzo, por tu apoyo, como profesional y como persona, por ser mi referencia y mi guía, por estar ahí siempre que lo he necesitado. A ti Miguel, por dejarme formar parte en su día del grandísimo equipo que tienes, por dejarme aprender de ti tantas cosas que hoy en día sigo aplicando, y por enseñarme el camino que he recorrido en este proyecto.

Gracias al Instituto de Salud Carlos III por haber financiado mi investigación desde sus inicios.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. José Cervera, por abrirme las puertas del mundo en el que quería entrar, por confiar en un joven con muchas ganas e ilusión pero inexperto, por ser mi primer mentor en este campo y por ser quién me enseñó muchas de las técnicas que aquí describo.

Gracias al Dr. Pascual Bolufer, por dejar que me uniera a su equipo para continuar avanzando, por su maestría y enseñanzas en muchos ámbitos, y por transmitirme refinamiento, perfección y detalle en el trabajo, activos de gran valor en mi día a día.

Gracias al Dr. Pau Montesinos, por su inestimable ayuda con las bases de datos, por allanarme el camino con los empujoncitos de última hora.

Gracias a todos mis compañeros en el servicio de hematología: a Zaida, Carlos, Ana y Esperanza, por aquellos inicios montando el laboratorio, con esos Western que se resistían, esos cultivos que nos reclamaban horas más allá de la ciencia entre las rascadas de hielo; a M^a Ángeles por poder contigo para darle orden, sentido y lógica a las cosas; a Gloria, Mónica, Cristina, Luis, Carlos y Migue; a Armando, Malé, Pancho, Jesús, Guillermo, Fede y todos los hematólogos que tanto me habéis enseñado sobre esta disciplina.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio de Eva y Pascual: a Sarai, por esas inolvidables tertulias en los parones de tupper y microondas, a mi “bank partner” Esperanza, por todos esos momentos de risas (no me he olvidado de los volantes ;-)); a Enrique, Jorge, Virginia, Rosa, Marta, Inma, Óscar, a todos, gracias

AGRADECIMIENTOS

por hacerme sentir como en casa, por los buenos momentos compartidos y por los que seguimos compartiendo.

Gracias también a todos mis compañeros en el Departamento de Genética de la UV: Rosa, Carmen, Loli, Isabel, Josep, Juanan, Amparo, M^a Dolores, José Luis e Ivette, por vuestras enseñanzas en campo de la genética, y a Javier, por echarme mil manos con los temas burocráticos.

Gracias por supuesto también a todos mis amigos, sin excepción (no os nombro porque si no tendría que sacar la tesis por fascículos!!), en especial a Victor, Manolo, Higinio y Alonso, por estar ahí desde siempre, incondicionalmente, haciendo de cada momento o conversación con vosotros, un aprendizaje inolvidable. Sois muy grandes!

Y dejando lo mejor para el final, el más importante de mis agradecimientos, el dedicado a toda mi familia, especialmente a mi madre, a mi padre y a mi hermano, los auténticos motores de esta máquina. Gracias por todo el esfuerzo, ánimo y apoyo que me habéis regalado desde el primer día. GRACIAS.

A todos los que estáis o habéis estado, gracias por acompañarme a la meta en lugar de estar esperándome en ella.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

C_i; C_p: Crossing Point

EMR: Enfermedad Mínima Residual

FLT3-ITD: Duplicaciones parciales en tándem (Internal Tandem Duplication) *FLT3*

FLT3-TKD: Dominio tirosín-quinasa (Tyrosine Kinase Domain) *FLT3*

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

LPA: Leucemia Promielocítica Aguda

NCN: Número de Copias Normalizadas

NGS: Next Generation Sequencing

NPM1: Nucleophosmin-1, nucleofosmina-1

OMS: Organización Mundial de la Salud

qPCR: PCR Cuantitativa en Tiempo Real

RC: Remisión Completa

RR: Riesgo de Recaída

RT: Retrotranscripción

SEN: Señal de Exportación Nucleolar

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SLN: Señal de Localización Nucleolar

SMD: Síndrome Mielodisplásico

SMPC: Síndrome Mieloproliferativo Crónico

T_M: Temperatura de Fusión o Melting

TPH: Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	3
1.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	3
1.1.1. Incidencia	3
1.1.2. Etiología	4
1.1.3. Modelo de leucemogénesis	5
1.1.4. Tratamiento	9
1.2. ALTERACIONES MOLECULARES EN LMA	11
1.2.1. Mutaciones del gen <i>CEBPA</i>	13
1.2.2. Mutaciones del gen <i>FLT3</i>	14
1.2.3. Mutaciones del gen <i>NPM1</i>	27
1.2.3.1. <i>NPM1</i> como posible marcador de EMR	36
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
2.1. HIPÓTESIS	40
2.2. OBJETIVOS	41
3. PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO	44
3.1. PACIENTES	44
3.2. TRATAMIENTO	46
3.3. MATERIALES	47
3.3.1. Soluciones y reactivos	47
3.3.1.1. Soluciones	47
3.3.1.2. Reactivos	48
3.3.1.3. Equipos y software	50
3.3.2. Procesado y almacenamiento de las muestras	50
3.3.2.1. Obtención del pellet celular	51
3.3.2.2. Extracción de ADN	52
3.3.2.3. Extracción de ARN	53

ÍNDICE

3.4. ESTUDIOS CLÍNICOS	56
3.5. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS	57
3.6. ESTUDIOS MOLECULARES	57
3.6.1. Detección de mutaciones	57
3.6.1.1. Detección de las mutaciones <i>NPM1</i>	57
3.6.1.2. Detección de las mutaciones <i>FLT3</i>	64
3.6.2. Estudio de la expresión de <i>NPM1</i> mutado como marcador de EMR	74
3.7. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS	80
3.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	81
4. RESULTADOS	84
4.1. DETECCIÓN E INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES <i>FLT3</i>-ITD Y <i>FLT3</i>-D835	84
4.2. ASOCIACIÓN DE LAS MUTACIONES <i>FLT3</i> CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS AL DIAGNÓSTICO	86
4.3. IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS MUTACIONES <i>FLT3</i>	92
4.3.1. Influencia de las mutaciones <i>FLT3</i> en la respuesta terapéutica	92
4.3.2. Influencia de las mutaciones <i>FLT3</i> en la supervivencia	93
4.4. DETECCIÓN E INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES <i>NPM1</i>	98

ÍNDICE

4.5. <i>NPM1</i> EN RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-BIOLÓGICAS	98
4.6. IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS MUTACIONES <i>NPM1</i>	100
4.6.1. Influencia de las mutaciones <i>NPM1</i> en la respuesta terapéutica	100
4.6.2. Impacto de la asociación entre <i>NPM1</i> y <i>FLT3</i> en la supervivencia. Influencia del ratio <i>FLT3</i> -ITD	101
4.7. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICO	104
4.8. ANÁLISIS DEL VALOR DE <i>NPM1</i> COMO MARCADOR DE EMR EN PACIENTES CON LMA	106
4.8.1. Características generales de los pacientes para seguimiento de EMR	106
4.8.2. <i>NPM1</i> mutado en el momento del diagnóstico	107
4.8.3. <i>NPM1</i> mutado en la remisión y la recaída	108
4.8.4. Cinética de variación de la expresión de <i>NPM1</i> mutado en el tiempo	109
5. DISCUSIÓN GENERAL	115
6. CONCLUSIONES	129
7. BIBLIOGRAFÍA	133

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia clonal del tejido hematopoyético, caracterizada por la proliferación de células blásticas anormales de estirpe mieloide en la medula ósea y por una menor producción de células hematopoyéticas normales, condicionando deficiencia de glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos normales (especialmente neutrófilos) en la sangre¹.

La LMA puede presentarse como un proceso *de novo* cuando no hay antecedentes de síndrome mielodisplásico (SMD), síndrome mieloproliferativo crónico (SMPC), ni exposición a agentes leucemogénicos, principalmente fármacos alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II. Si los pacientes presentan alguno de estos antecedentes, se trataría de una LMA secundaria^{2,3,4,5,6}.

1.1.1. Incidencia

La LMA representa aproximadamente el 25% de todas las leucemias del adulto en la población occidental y es el segundo tipo de leucemia más frecuente después de la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). La incidencia estimada de la LMA *de novo* es de 4,0 por 10⁵ habitantes/año, incidencia que aumenta progresivamente con la edad llegando a ser de 16,8 por 10⁵ habitantes/año en adultos mayores de 64 años. Asimismo, la incidencia de la LMA es mayor en hombres que en mujeres, siendo de 4,8 por 10⁵ habitantes/año en hombres y de

INTRODUCCIÓN

3,3 por 10⁵ habitantes/año en mujeres (*SEER Cancer Statistics Review 1975-2012*, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>).

En los adultos, el riesgo aumenta diez veces a partir de los 30 años (aproximadamente un caso cada 100.000 personas) hasta la edad de 70 años (aproximadamente un caso cada 10.000 personas).

Al mismo tiempo, la mayor eficacia de los tratamientos antitumorales ha supuesto como contrapartida un aumento de las LMA secundarias. La utilización de agentes quimioterápicos como la mecloretamina, la procarbazona, el clorambucil, el etopósido, y en un menor grado la ciclofosfamida, contribuyen a producir lesiones en el ADN que en muchos casos no pueden ser reparadas por la maquinaria celular correspondiente. En concreto, el riesgo de desarrollar una LMA secundaria en estos pacientes va incrementándose en un 0.5-1%/año, a partir de los 24 meses de tratamiento, y hasta los 7 años después de haber concluido el mismo, además de tener un pronóstico de recuperación no tan bueno como el de los pacientes con LMA típica^{7,8,9}.

1.1.2. Etiología

Muy poco se conoce acerca de las causas que pueden dar lugar a la LMA, aunque sí que se ha conseguido identificar una serie de factores predisponentes, que van desde determinadas patologías hasta agentes externos^{7,10,11}. Sin embargo, estos factores no se dan en todos los pacientes, incluso, aun cuando un paciente

INTRODUCCIÓN

tenga uno o más factores de riesgo, no hay forma de saber si realmente estos son la causa de la leucemia. Además, muchas personas con uno o más factores de riesgo nunca contraen esta enfermedad.

Entre las patologías que se asocian con una mayor frecuencia de leucemia aguda se encuentra el Síndrome de Bloom, la Ataxia Telangectásica, Neurofibromatosis Tipo 1, Anemia de Fanconi y el Síndrome de Down, donde el riesgo de desarrollar una LMA es un 10-20% superior al de la población normal. En estos casos, se ha identificado una mutación en el factor de transcripción *GATA1*, que está implicado en la diferenciación de los precursores eritroides y megacariocíticos¹².

Por otro lado, en lo referente a los agentes externos que pueden predisponer a una LMA se encuentran los agentes tóxicos tales como los agentes quimioterápicos (inhibidores de la topoisomerasa II, alquilantes), benceno, colas, pinturas, y otros hidrocarburos aromáticos, así como las radiaciones ionizantes^{13,14,15,16}.

1.1.3. Modelo de leucemogénesis

El cáncer, es un proceso debido a la adquisición de múltiples alteraciones genéticas a nivel celular. La evolución del fenotipo maligno resultante va a requerir células con un ciclo vital prolongado, un incremento del potencial proliferativo aún en ausencia de las señales de crecimiento normales, una capacidad de replicación

INTRODUCCIÓN

ilimitada, alteraciones en el control del ciclo celular, la evasión del proceso de apoptosis, y un bloqueo de la diferenciación. La LMA es un excelente ejemplo de este proceso, con numerosas alteraciones genéticas y moleculares descritas que pueden alterar funciones celulares críticas (Fig. 1).

Los recientes conocimientos de la patogénesis de la LMA sugieren que esta podría producirse según el modelo de la adquisición secuencial de lesiones moleculares. Estas alteraciones provocarían una proliferación inadecuada y una capacidad indefinida de auto-renovación escapando a las señales de diferenciación y muerte celular programada. En la LMA se han identificado dos grupos de alteraciones genéticas, unas que bloquean la diferenciación celular afectando fundamentalmente la función de los factores de transcripción que regulan la hematopoyesis (*PML-RAR α* , *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*, *MLL-ENL*, *AML1,CEBPA,MLL-PTD, NPM1*) y otras que alteran la regulación del ciclo celular, la proliferación y/o la inhibición de la apoptosis, mediante mutaciones que afectan a la transducción de señales principalmente en genes tirosín-quinasa (*FLT3, c-KIT, K-RAS, p53, N-RAS*)^{1,17,18,19,20,21}.

Son las denominadas alteraciones de clase I (las que inducen proliferación) y de clase II (las que bloquean la diferenciación).

INTRODUCCIÓN

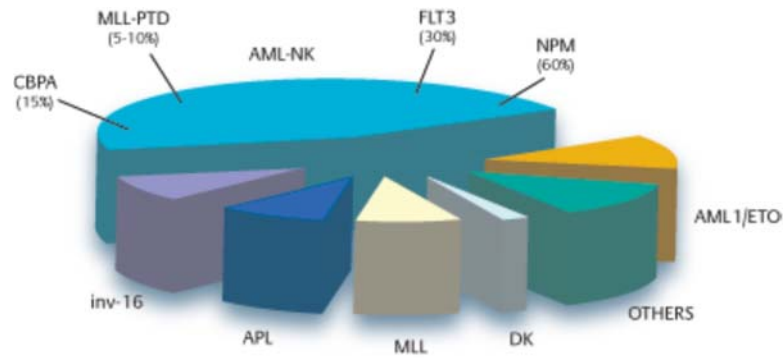


Figura 1. Alteraciones moleculares asociadas con la LMA (Falini B. *et al*, Review in Translational Hematology. (2007) 109(3):874-885).

Este conjunto de alteraciones citogenéticas y moleculares, ha posibilitado el establecimiento de diferentes grupos de riesgo y conocer el pronóstico de cada uno de ellos. De esta manera, los pacientes con un perfil citogenético asociado con un riesgo favorable (por ejemplo, los que presenten reordenamientos *PML-RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1*, o *MYH11-CBF β*) van a ser pacientes con un mejor pronóstico después de los regímenes terapéuticos de consolidación basados en quimioterapia, mientras que los que presenten un perfil desfavorable (monosomías, alteraciones complejas), debido al mal pronóstico establecido para ellos, van a requerir trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico durante la primera remisión con el objetivo de poder mejorarlo^{22,23}. Sin embargo, y a pesar de que esta clasificación resulta extremadamente útil para poder conocer la LMA y tratarla en consecuencia, la mayoría de los pacientes con esta patología, entre el 40 y el 50%, pertenecen a un grupo de riesgo citogenético intermedio, con cariotipos sin ninguna anomalía citogenética. Estos pacientes, constituyen un grupo muy heterogéneo con tasas de supervivencia a 5 años que oscilan entre el 24 y el 42% y

INTRODUCCIÓN

en el que puede haber pacientes que por un lado respondan bien a la consolidación con quimioterapia, pero también pacientes en los que el pronóstico va a ser muy desfavorable. Este desconocimiento sobre cuál va a ser el pronóstico en estos casos, es lo que ha propiciado que durante los últimos años, numerosos trabajos se hayan focalizado en la búsqueda de nuevos biomarcadores, con el objetivo de conseguir una mejor clasificación para este grupo de pacientes²⁴. En este sentido, diversos trabajos han demostrado la existencia de una serie de alteraciones moleculares que pueden estar implicadas en la leucemogénesis^{7,8,25,26,27,28}. Así, las mutaciones en el receptor tirosín-quinasa ***FLT3*** y las mutaciones de ***NPM1*** se asocian significativamente en el grupo de pacientes con cariotipo normal, sugiriendo un modelo de cooperación similar al de las LMA con alteraciones recurrentes, con posibles implicaciones tanto en el tratamiento como en el pronóstico de este específico subgrupo^{29,30,31}. La ausencia de otros factores pronósticos clínicamente relevantes en estos pacientes ha motivado en los últimos años una extensa búsqueda de nuevas alteraciones moleculares que puedan ayudar a profundizar en los mecanismos de la leucemogénesis y, al mismo tiempo, ofrecer una estimación más precisa del pronóstico.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha decidido incorporar las alteraciones genéticas recientemente descritas en LMA, a las características clínicas, citológicas, citoquímicas, morfológicas y/o inmunofenotípicas específicas, estableciendo de esta manera entidades clinico-patológicas independientes, entre las que destacan entre otras, dos nuevas entidades de reciente incorporación, la de las "LMA con mutaciones *NPM1* [nucleofosmina (fosofoproteína nucleolar B23,

numatrina]]”, y la de las “LMA con mutaciones CEBPA [CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha]”.

1.1.4. Tratamiento

En cuanto al tratamiento, durante las dos últimas décadas, los esfuerzos se han centrado en conseguir una supervivencia libre de enfermedad (SLE) prolongada para los pacientes con este tipo de neoplasias. Sin embargo, ni la introducción de nuevos fármacos, ni las modificaciones en las dosis y frecuencias de los esquemas terapéuticos, han permitido alcanzar la completa curación en muchos de estos pacientes, muchos de los cuales, terminan todavía falleciendo en un número significativo. Sin embargo sí que se ha profundizado en la caracterización genética y molecular, ya que pueden ayudar al desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra las dianas moleculares que participan de manera específica en la leucemogénesis^{32,33}, y por otro lado, optimizar al máximo posible las terapias disponibles en la actualidad, buscando para cada entidad su mejor relación riesgo/beneficio. De hecho, durante los últimos años, las estrategias están siguiendo un nuevo camino, en el que en base a conocidos marcadores pronóstico clínico-biológicos, se busca enfocar el tratamiento a cada paciente de forma individual más que al conjunto de la población, donde las variaciones pueden provocar que no en todos los casos, la terapia sea igual de efectiva. Es lo que se denomina terapia adaptada al riesgo³⁴. Mención especial requiere la leucemia promielocítica aguda (LPA), en la que el conocimiento de la alteración citogenética

INTRODUCCIÓN

específica recurrente t(15;17) y su contrapartida molecular, el reordenamiento molecular *PML-RAR α* , ha permitido el desarrollo de una terapia diana que actuando a nivel molecular consigue la diferenciación terminal de las células leucémicas. El resultado es una altísima tasa de remisiones, con una elevada SLE y una escasa toxicidad^{35,36,37,38,39,40,41}. Más recientemente, el desarrollo de nuevos inhibidores frente a las proteínas tirosín-quinasa (FLT3, BCR-ABL, quinasas de la familia SRC) también está dando resultados muy alentadores^{42,43,44,45,46,47,48,49}. En el caso concreto de los inhibidores de FLT3, como se detallará más adelante, existe un gran entusiasmo ante la posibilidad de que estas pequeñas moléculas puedan cambiar el panorama de tratamiento de un amplio número de pacientes con LMA. Esto se debe a varias razones: hay un gran número de inhibidores en desarrollo, inhibidores que van a ir dirigidos a las diferentes mutaciones *FLT3*; están apareciendo inhibidores más potentes y más selectivos, como quizartinib, que parecen tener también mejores propiedades farmacocinéticas que los que inicialmente se desarrollaron; y porque posiblemente, estas nuevas estrategias terapéuticas acaben consiguiendo reducir la utilización de los intensos esquemas de tratamiento con quimioterapia. La inhibición de FLT3 representa uno de los más frecuentes esquemas de trabajo en hematología y oncología durante los últimos años, consistente en identificar una diana terapéutica, desarrollar agentes dirigidos frente a dicha diana, y analizar la existencia de posibles biomarcadores que puedan informar sobre si el fármaco está teniendo el efecto deseado sobre la población adecuada. Como se ha mencionado, dentro de las leucemias agudas, la LPA representa el paradigma de combinar agentes dirigidos con quimioterapia habiendo dado excelentes resultados, por lo que encaminar el tratamiento de los pacientes con LMA y mutaciones de *FLT3* en el mismo sentido parece algo lógico.

1.2. ALTERACIONES MOLECULARES EN LMA

Durante la última década, los estudios moleculares han sufrido una importante revolución con la aparición de nuevos sistemas de detección: primero con las técnicas de array (CGH/SNP/Expresión-array) y más recientemente con las técnicas de secuenciación masiva (NGS) que permiten de una manera más rápida y fiable estudiar todo el genoma. En el año 2008, el grupo liderado por el Dr. Timothy Ley de la Universidad de Washington, publicó el primer caso de LMA cuyo genoma fue secuenciado mediante NGS, demostrando que éste era un método válido para la detección de nuevas alteraciones en esta enfermedad^{50,51}. Más recientemente, en el año 2013 se acaba de publicar la secuenciación masiva de 200 adultos de LMA dentro del proyecto Cancer Genome Atlas (TCGA) (<http://tcga-data-nci.nih.gov/tcg>)⁵². De estos resultados se desprende que la NGS es un método muy útil para la identificación de mutaciones (2585 mutaciones en región codificante). Sin embargo, muchas mutaciones ocurren en único paciente y pocas son recurrentes, siendo la gran mayoría casi exclusivas de cada paciente o de baja frecuencia. Según este estudio, un total de 23 genes se encuentran significativamente mutados en la LMA: *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH2*, *IDH1*, *TET2*, *RUNX1*, *TP53*, *NRAS*, *WT1*, *PTPN11*, *KIT*, *U2AF1*, *KRAS*, *SMC1A*, *SMC3*, *PHF6*, *STAG2*, *RAD21*, *FAM5C*, *EZH2*, *HNRNPK*.

INTRODUCCIÓN

Otra de las alteraciones frecuentes en la LMA es la desregulación de la expresión en ciertos genes, como *BAALC*, cuya sobreexpresión es un factor pronóstico adverso independiente en cuanto a la resistencia a la terapia de inducción, supervivencia global (SG) y riesgo de recaída (RR)^{53,54,55,56,57,58,59}, *EVII1*, asociado comúnmente con un pésimo pronóstico con muy mala respuesta a la quimioterapia^{60,61,62,63}, o *WT1*, cuya sobreexpresión a pesar de la asociación con las duplicaciones parciales en tándem de *FLT3* (*FLT3*-Internal Tándem Duplication; *FLT3*-ITD) muestra valor pronóstico independiente⁶⁴ y un impacto desfavorable en la probabilidad de recaída⁶⁵, aunque en otros trabajos se sugiere un mejor resultado en el caso de los pacientes con LMA no M3⁶⁶.

Este notable avance en la caracterización genética y molecular además de permitir profundizar en la etiopatogénesis de la LMA ha conducido a la identificación de distintas entidades con comportamientos clínicos absolutamente diferentes tal como refleja la revisión de la clasificación de la OMS para las neoplasias mieloides⁶⁷. Ante esta perspectiva, en la LMA los estudios moleculares son importantes porque permiten una mejor clasificación diagnóstica, constituyen la principal herramienta pronóstica para estratificar en función del riesgo las terapias actuales además de abrir el camino al desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra las dianas moleculares. Aunque estos marcadores son prometedores, no evitan que los actuales esquemas de clasificación sigan necesitando de una mayor precisión. En la actualidad, de todas las mutaciones mencionadas, sólo las que afectan a ***FLT3***, ***NPM1*** y ***CEBPA*** tienen repercusión en la práctica clínica mientras que las restantes deben ser consideradas desde un punto de vista investigacional^{68,69,70,71}.

1.2.1. Mutaciones del gen *CEBPA*

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia “CCAAT/enhancer binding protein” (CEBP) participan en el equilibrio entre proliferación celular y detención mitótica del crecimiento durante la diferenciación terminal. Dentro de esta familia de proteínas destaca *CEBPA*, proteína que regula un programa de genes críticos para el establecimiento de la identidad y diferenciación mieloide^{72,73,74,75}.

El gen *CEBPA* se encuentra localizado en 19q31. Las mutaciones que afectan a este gen, causando la inactivación del mismo, ocurren en un 15-19% de los pacientes con LMA de cariotipo normal y en un 5-14% del total de casos de esta patología y han sido asociadas con pronóstico relativamente favorable, ganando interés como marcador pronóstico⁷⁶. Los primeros estudios clínicos, revelaron que los pacientes con mutaciones de *CEBPA* presentaban mejor SLE y SG a los 5 años que el resto de pacientes del grupo de riesgo citogenético intermedio o con cariotipo normal^{71,72,77,78,79}. Por el contrario, las tasas de remisión completa (RC) no parecen diferir entre los pacientes con y sin mutaciones de *CEBPA*.

Dos clases prototípicas de mutaciones son las más frecuentes. Las mutaciones en la región N-terminal, y las mutaciones en la región del dominio básico de leucina (bZIP) C-terminal^{73,80}. Los pacientes con dos mutaciones

INTRODUCCIÓN

(bi*CEBPA*) presentan una mejor mediana de SG cuando se comparan con pacientes sin mutaciones en *CEBPA* (wt*CEBPA*)^{73,81}, observándose también que el hecho de presentar dos mutaciones, no se asocia nunca con *NPM1* mutado y raramente con *FLT3*-ITD. Mientras que, los pacientes con una sola mutación (mo*CEBPA*), presentan una frecuencia similar de *NPM1* mutado y una asociación significativamente mayor con *FLT3*-ITD en comparación con los pacientes sin mutaciones en *CEBPA*.

1.2.2. Mutaciones del gen *FLT3*

La diferenciación y crecimiento de las células hematopoyéticas es el resultado de la interacción de diversos factores de crecimiento y sus respectivos receptores. Entre estos receptores se encuentra el receptor tirosín-quinasa FMS-like (*FLT3*), que pertenece a la familia de los receptores tirosín-quinasa de clase III. La expresión de este receptor es importante para el desarrollo de las células hematopoyéticas pero también para el sistema inmune⁸².

Los receptores tirosín-quinasa son el componente central de las redes de señalización celular y desempeñan un papel crucial tanto en procesos fisiológicos habituales como en otros más específicos (embriogénesis y desarrollo). Las redes de estos receptores ejercen un control fundamental de la proliferación y supervivencia celular, así como del ciclo celular, del metabolismo e incluso de la

INTRODUCCIÓN

forma y el movimiento de las células. Hasta la fecha, se han descrito numerosos receptores de membrana, basando su clasificación en la preferencia por el ligando, la inducción de respuestas biológicas y su estructura primaria. Las proteínas tirosín-quinasa, se caracterizan por tener una actividad proteín-quinasa intrínseca que cataliza la transferencia del γ -fosfato del ATP hasta los residuos de tirosina presentes en los sustratos proteicos. Al igual que otros receptores tirosín-quinasa de clase III, FLT3 está compuesto por cinco dominios extracelulares inmunoglobulina “like”: un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana, dos dominios tirosín-quinasa intracelulares y un dominio C-terminal intracelular (Fig.2).

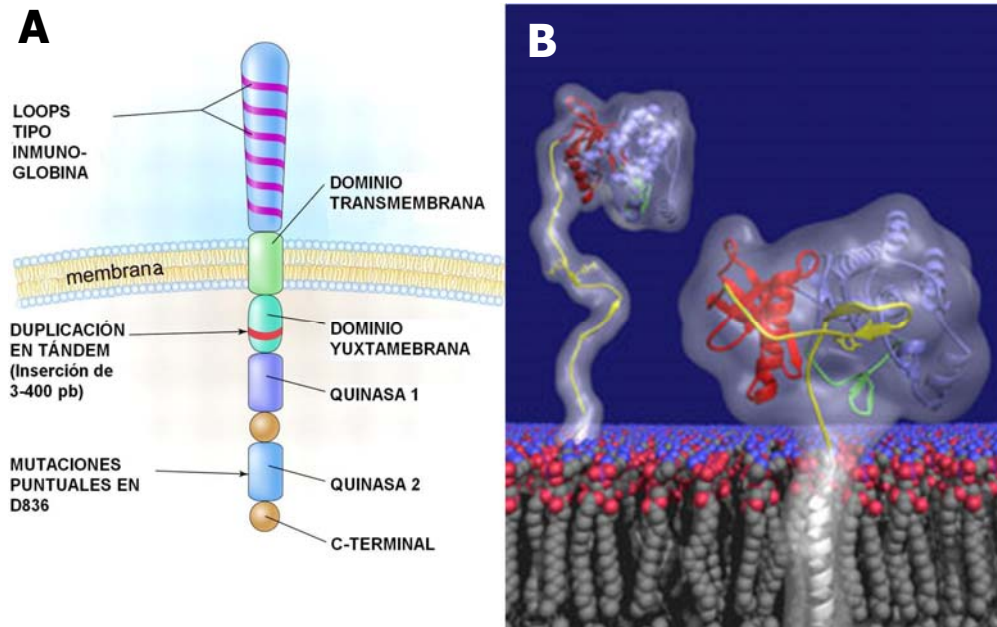


Figura 2. (A) Estructura de la proteína FLT3 (adaptada de Kenneth Probst. From Litzow, MR. Blood 106:3331, 2005). **(B) Modelos propuestos para las estructuras tridimensionales de las formas “wild-type” o inactiva (derecha) y mutada o activa (izquierda)** (adaptada de Molecular Cell).

INTRODUCCIÓN

El receptor FLT3 se presenta en forma monomérica y no fosforilada activándose mediante la unión con su ligando, que se caracteriza por ser una proteína transmembrana. Dicho ligando promueve su homodimerización lo que activa su capacidad tirosín-quinasa y el reclutamiento de una serie de proteínas intracelulares (proteínas SHC, GRB2, GAB2, SHIP, CBL, CBLB). Estas proteínas son activadas, iniciándose la cascada de fosforilación que resulta en la activación de mediadores secundarios tales como los pertenecientes a las rutas MAP quinasa, STAT y AKT/P13. Dichos mediadores son transportados al núcleo celular por medio de la proteína HSP90, donde regulan la transcripción de diversos genes que intervienen en la proliferación, diferenciación y apoptosis de los precursores hematopoyéticos^{83,84,85,86} (Fig.3).

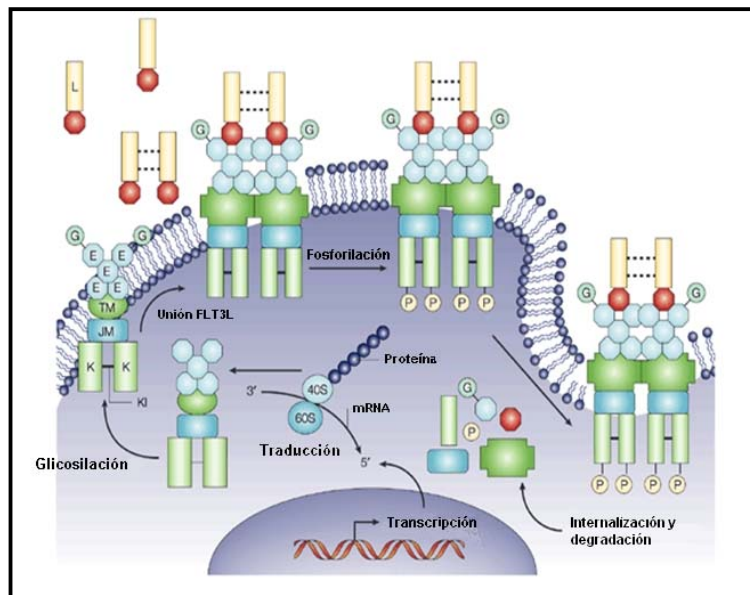


Figura 3. Interacción entre FLT3 y su ligando (adaptada de Stirewalt DL *et al*, Nature Reviews Cancer 2003;3:650-665). La parte citoplasmática de FLT3 se somete a glicosilación (G), lo cual promueve la localización del receptor en la membrana. FLT3 “wild-type” permanece en forma monomérica, como proteína inactiva en la superficie celular hasta que el ligando (L), probablemente en forma dimérica, se une al receptor induciendo su dimerización. Este hecho, promueve la fosforilación (P) de los dominios tirosín-quinasa, activando así tanto al receptor como a los efectores “downstream”. Los receptores dimerizados, son rápidamente internalizados y degradados.

INTRODUCCIÓN

El gen que codifica FLT3 se encuentra localizado en el cromosoma 13 (13q12) y está constituido por 24 exones. Se han descrito mutaciones asociadas a LMA que dan como resultado una activación constitutiva del receptor (Fig.4). La presencia de estas mutaciones de *FLT3* ha sido implicada, *in vitro*, en la leucemogénesis⁸⁷. Dianas de esta actividad intrínseca tirosín-quinasa son STAT5 y la ruta de Ras/MAPKs, incluyendo C-jun y C-raf, lo que conduce al fenotipo maligno.

La expresión de *FLT3* en la médula ósea normal queda restringida a los progenitores hematopoyéticos tempranos, entre los que se incluyen las células CD34+ con altos niveles de expresión de CD117 (c-KIT), y progenitores mieloides y linfoides ya comprometidos, con expresión variable en el más maduro linaje monocítico⁸⁸. Sin embargo, también se puede encontrar expresado, y en altos niveles, en un gran número de patologías hematológicas, como por ejemplo la mayoría de los subtipos de LMA, en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B, en determinadas LLA de células T, así como en la crisis blástica de la leucemia mieloide crónica (LMC)^{89,90}.

INTRODUCCIÓN

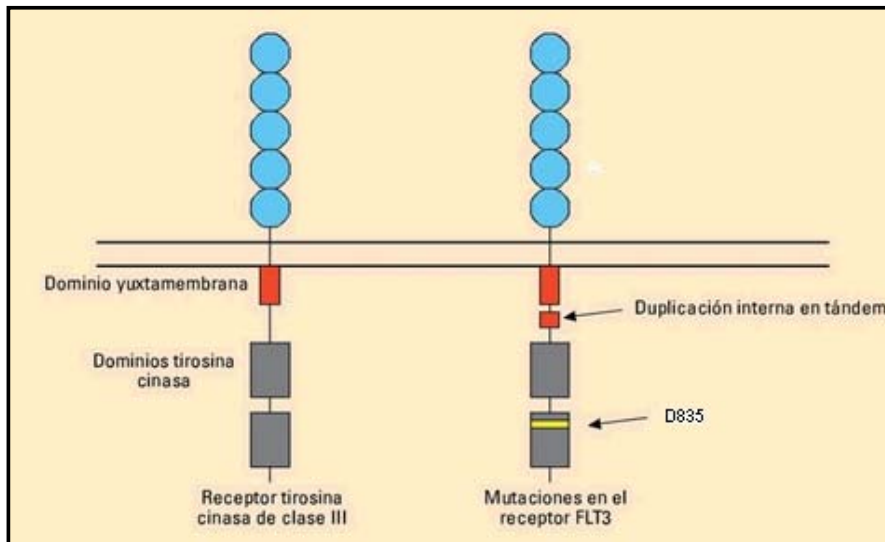


Figura 4. Localización de las principales mutaciones de la proteína FLT3 (adaptada de Torres Gómez A *et al*, Medicine. 2008;10:1390-401).

Las mutaciones de *FLT3*, son de una especial gran importancia en la LMA, debido a que frecuentemente, sirven de guía para la toma de decisiones terapéuticas dado su claro componente como marcadores de mal pronóstico^{91,92}.

Entre las alteraciones más importantes, destacan por su frecuencia e implicación pronóstica las *FLT3*-ITD (Fig. 5). Las *FLT3*-ITD resultan de la duplicación de un fragmento en la región codificante del dominio yuxtamembrana de *FLT3*. El grupo del Dr. Nakao fue el primero en describir estas alteraciones en una alta proporción de pacientes con LMA⁹³. Se trata de una de las alteraciones más frecuentes en las patologías hematológicas, pues aparece en los pacientes con LMC (5-10%), SMD (5-10%) y LMA (15-35%). A nivel de LMA pediátrica, estas alteraciones son menos frecuentes, aunque pasan a darse de un 5% a un 10% en el corto periodo de edad comprendido entre los 5 y 10 años, continuando con un

INTRODUCCIÓN

20% en adultos jóvenes y superando el 35% en los pacientes con LMA que tienen más de 55 años^{94,95,96,97,98,99}. La longitud puede variar entre 3 y 400 nucleótidos y, aunque en ocasiones se acompaña de la inserción de algunos nucleótidos, no suele afectar a la pauta de lectura¹⁰⁰.

La duplicación segmental del dominio yuxtamembrana de FLT3 promueve la autodimerización y la autofosforilación del receptor, que en consecuencia pasa a estar constitutivamente fosforilado activando a AKT^{101,102}. Uno de los efectos característicos de las *FLT3*-ITD, es que la proliferación de las células ITD transducidas está mediada por las rutas RAS y STAT5, algo que contrasta con el hecho de que la activación mediada por ligando de FLT3 normal no permite ni la activación de STAT5 ni su unión al ADN¹⁰³.

El otro tipo de alteraciones encontradas son las mutaciones puntuales en el dominio tirosín-quinasa de FLT3 (*FLT3*-TKD). Éstas suceden con una frecuencia en torno al 5-10% en los pacientes con LMA, y raramente coexisten con las *FLT3*-ITD¹⁰⁴. La mayoría de las *FLT3*-TKD tienen lugar en el exón 835 con una sustitución de ácido aspártico a tirosina (D835Y o asp835Tyr), sin embargo, además de ésta, se han descrito otras mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, tanto en este mismo codón como en los adyacentes^{98,101,103,105} (Fig.6). Las *FLT3*-TKD promueven una proliferación independiente de ligando a través de la autofosforilación y la activación constitutiva del receptor, al igual que las *FLT3*-ITD, aunque con ciertas diferencias biológicas significativas. Promueven la activación de diferentes efectores *downstream* desencadenando diferentes respuestas biológicas^{106,107}.

INTRODUCCIÓN

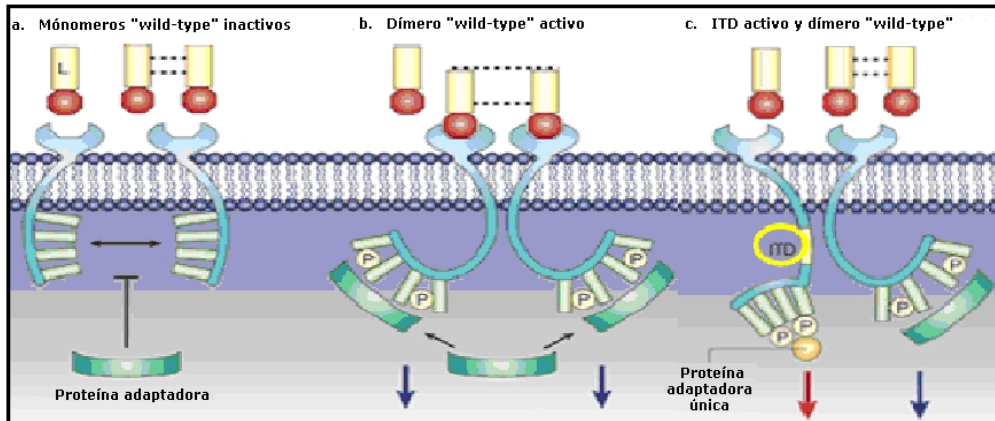


Figura 5. Esquema de localización de las duplicaciones internas en tándem en la proteína FLT3. (adaptada de Stirewalt DL *et al*, Nature Reviews Cancer 2003;3:650-665).

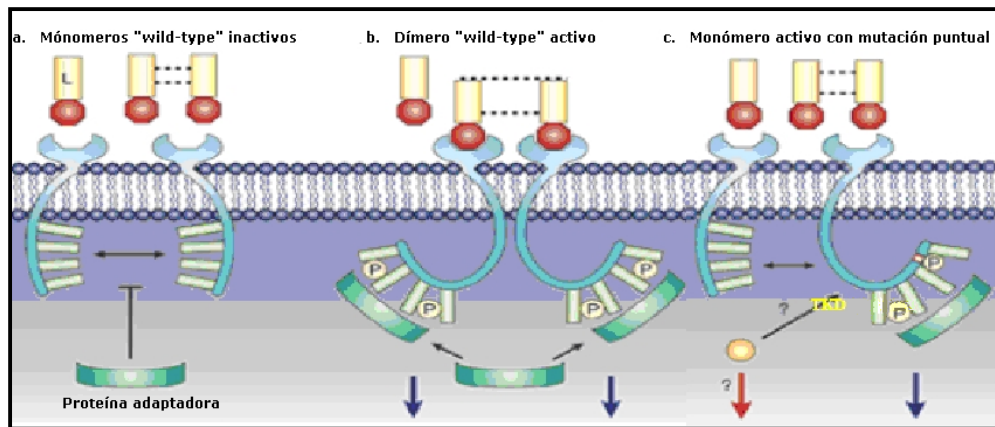


Figura 6. Esquema de localización de mutación puntual en la posición 835 (dominio tirosín-quinasa) de la proteína FLT3. (adaptada de Stirewalt DL *et al*, Nature Reviews Cancer 2003;3:650-665).

Desde el punto de vista pronóstico diversos estudios han demostrado que la mutación *FLT3*-ITD conlleva un pronóstico adverso^{98,108}. Existe una relación entre la presencia de mutaciones *FLT3* y determinadas características biológicas de la LMA al diagnóstico. Así, los pacientes con *FLT3*-ITD suelen debutar con una

INTRODUCCIÓN

cifra mayor de leucocitos totales y con un porcentaje de blastos, tanto en sangre periférica como en médula ósea, mayor que el de los pacientes *FLT3*-ITD negativos.

El grupo del Dr. Kottaridis examinó la prevalencia y el significado pronóstico de las duplicaciones en más de 840 pacientes adultos con LMA¹⁰⁹ detectándolas en el 27% de los pacientes, confirmando lo descrito previamente al encontrar asociación tanto con leucocitosis como con el cariotipo normal. Asimismo, la incidencia de *FLT3*-ITD parece ser menor en los pacientes con LMA secundaria⁹⁶.

En general, la tasa de RC es inferior en los pacientes con *FLT3*-ITD, aunque realmente ningún estudio ha demostrado que tales diferencias sean significativas. Pero por otro lado, sí que se ha visto que la peor evolución que tienen los pacientes portadores de las mutaciones *FLT3* parece estar fundamentada en un mayor RR y una menor SLE^{96,97,98,110,111,112,113}, o como es el caso del anteriormente citado trabajo de Kottaridis *et al.*¹⁰⁹, donde además encontraron que en el análisis multivariante, las *FLT3*-ITD constituían el factor pronóstico más significativo con respecto a estas dos variables. En otros estudios, las tasas de supervivencia para los pacientes con *FLT3*-ITD, eran del 20-30% comparadas con las del 50% que presentaban los pacientes sin mutación.

De manera adicional, se ha sugerido también que el tamaño de la región amplificada en la ITD (que puede variar de 3 a cientos de nucleótidos) podría tener importancia pronóstica, aunque es algo que no queda claro, ya que igual que hay trabajos que han encontrado un peor pronóstico cuanto mayor sea la amplificación

INTRODUCCIÓN

(>40 nucleótidos)¹⁰⁰, en otros estudios se observan resultados contrarios en los que los pacientes con grandes amplificaciones (>70 nucleótidos) presentan mejor supervivencia¹¹⁴.

Sin embargo, lo que realmente está siendo un importante tema de discusión y debate en la actualidad debido a la incertidumbre que existe en torno al mismo, es el valor pronóstico que puede tener la cantidad de blastos portadores de la mutación *FLT3*-ITD, que parece estar confiriendo un pronóstico desfavorable, que podría incluso acentuarse cuanto mayor sea dicha cantidad. Diversos estudios muestran como los pacientes en los que el ratio alelo mutado/alelo wild-type es elevado, presentan un pronóstico desfavorable en cuanto a SLE y SG^{99,110,111,115}, siendo este pronóstico particularmente desfavorable en los pacientes en los que no se detecta *FLT3 wild-type* (ratio>2), razón por la cual, algunos protocolos de tratamiento han decidido incorporar la determinación de este ratio en los pacientes con LMA, para poder inferir en base al mismo su pronóstico y, en consecuencia, su tratamiento. La incertidumbre comentada viene marcada por varios factores, entre ellos el que no haya un valor claramente definido para establecer un punto de corte, ya que mientras que ciertos trabajos consideran como tal la mediana del ratio que presenta su correspondiente serie, otros toman valores previamente definidos, como 0.8 ó 0.5^{99,111}, lo cual puede hacer que el conjunto de pacientes que queden por encima o por debajo de dicha cifra pueda variar significativamente, influyendo de esta manera en el posible valor pronóstico de este parámetro. Otra muestra más, es que la propia clasificación de la OMS, sigue sin contemplar el ratio *FLT3* en su clasificación de la LMA en adultos⁶⁷. Esto hace evidente que a pesar de que ciertos grupos hayan defendido el valor

INTRODUCCIÓN

pronóstico que puede estar confiriendo el ratio *FLT3*, en la actualidad siguen existiendo grandes diferencias en los criterios para establecer algoritmos de estratificación del riesgo de estos pacientes⁹⁰. Por todo esto, se hace muy necesario seguir trabajando en clarificar la importancia pronóstica real que tiene este parámetro, validándolo en series amplias de pacientes, con el fin de esclarecer si puede ser de utilidad como marcador pronóstico para seguir así optimizando el tratamiento de los pacientes con LMA. Es importante además, trabajar en determinar cuál debe ser el punto de corte para considerar qué pacientes son los que tienen un ratio elevado, y cuál es el método más adecuado para detectar los alelos *FLT3*-ITD mutados y wild-type, ya que hasta el momento, la mayor parte de la metodología utilizada, ha resultado ineficaz para detectar con precisión la presencia de clones con mutaciones ITD cuando éstos se presentaban en niveles mínimos o residuales, algo que como cabe esperar, ha podido influir incluso en la detección cualitativa de la mutación, con las considerables consecuencias que esto conlleva para el devenir de estos pacientes.

Por otro lado, a pesar de que los datos son en ocasiones contradictorios y el análisis dificultoso por su baja incidencia, las mutaciones *FLT3*-D835 parecen acompañarse también de un pronóstico adverso en los pacientes de riesgo citogenético intermedio o cariotipo normal^{104,116}. Existen evidencias de que aunque ambas alteraciones suponen una activación constitutiva del receptor, la cascada de señales que originan y, por tanto, las vías sobre las que actúan, no son equivalentes^{104,116}.

INTRODUCCIÓN

En lo referente a los esquemas terapéuticos, como ya se ha comentado, existe amplia experiencia, al menos en forma de ensayos clínicos fase I y II, con inhibidores de la proteína FLT3, inhibidores dirigidos tanto a las mutaciones *FLT3*-ITD como a las *FLT3*-TKD. Un claro ejemplo es midostaurina, un inhibidor tirosín-quinasa multidiaria activo frente a ambos tipos de mutaciones *FLT3* (Fig.7), estudiado en combinación con quimioterapia con objeto de analizar su posible efecto aditivo sobre la citotoxicidad de estos agentes. En este sentido, destaca un trabajo en el que se analiza la combinación con 5-azacitidina en pacientes con LMA y SMD con *FLT3* mutado, en el que se observan medianas de duración de remisión de superiores a las que presentan los pacientes que no son tratados con el inhibidor¹¹⁷, y un ensayo fase I, en pacientes de edad avanzada donde no se espera beneficio de la quimioterapia de inducción estándar, pero en el que se observa que a pesar de tener una actividad clínica moderada, el tratamiento de manera secuencial con este inhibidor y 5-azacitidina, permite tener un perfil de seguridad tolerable que abre la puerta a continuar el desarrollo de esta combinación con nuevos estudios⁴⁵. Otro inhibidor ampliamente investigado es sorafenib. Se ha sugerido que los pacientes con expresión anormal de *FLT3* podrían beneficiarse de tratamientos individualizados mediante la adición de sorafenib al régimen busulfan+clofarabina+fludarabina, dando lugar de esta manera a una terapia pre-trasplante individualizada para cada uno de ellos¹¹⁸. No obstante, hay un problema persistente a lo largo de estos años, y es el de la aparición y desarrollo de resistencias a los inhibidores tirosín-quinasa^{119,120}, como el proporcionado por las células del estroma, que actúan a modo de santuario protegiendo a las células progenitoras leucémicas de la acción de los inhibidores de primera generación¹²¹, aunque se continúa trabajando para poder solventar este tipo de barreras o

INTRODUCCIÓN

mecanismos. En esta línea y en relación con sorafenib, se ha determinado por ejemplo que fluvastatin, un fármaco utilizado en el tratamiento de la hipercolesterolemia, tiene potencial para revertir la resistencia al mismo e incrementar su actividad inhibidora¹²².

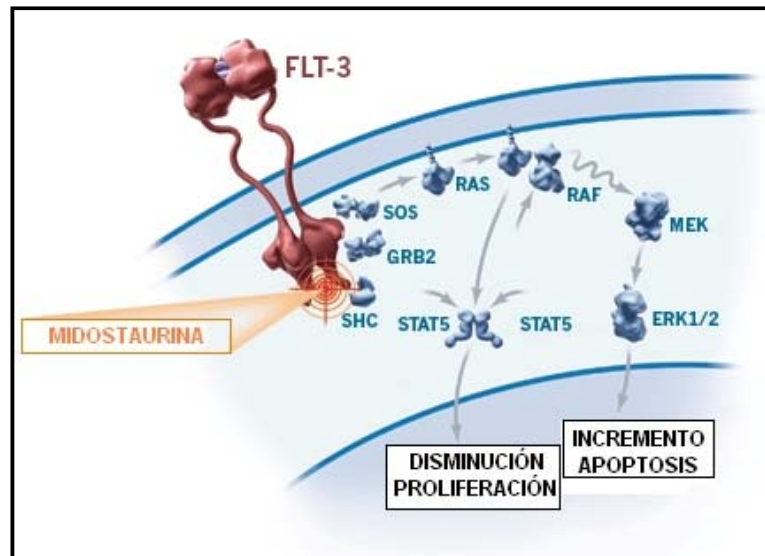


Figura 7. Esquema de funcionamiento del inhibidor *midostaurin* sobre la proteína FLT3 mutada (adaptada de www.novartisoncology.com). Como resultado de esta inhibición, la proliferación de la célula leucémica disminuye al tiempo que se favorece su entrada en apoptosis.

Varios compuestos han sido estudiados desde hace tiempo, demostrando en algunos casos una moderada actividad antileucémica, como semaxanib (SU5416) y SU5614, que inhiben la transducción de la señal mediante las rutas MAPK y STAT¹²³, pero abriendo camino al desarrollo de nuevas moléculas. Inhibidores dual de FLT3 y JAK2 están en desarrollo, puesto que se ha observado que la sobreexpresión de JAK2 que se da en las células resistentes a inhibidores tirosín-

INTRODUCCIÓN

quinasa, podría constituir realmente un mecanismo para dicha resistencia^{124,125}. Mencionar a lestaurtinib (CEP-701), un inhibidor con potente actividad contra la autofosforilación de FLT3 wild-type y de la forma constitutivamente activada de FLT3 gracias a la inhibición que efectúa sobre las dianas ERK y STAT5^{126,127}, que consigue altas tasas de remisión aunque falla en conseguir un aumento de supervivencia en combinación con citarabina o idarubicina en pacientes jóvenes con LMA refractaria o en recaída^{128,129}. También destaca quizartinib (AC220), una selectiva molécula¹³⁰ que ha mostrado reducciones en los blastos de médula ósea en pacientes con LMA refractaria o en recaída con mutaciones *FLT3-ITD*¹³¹; pacritinib (SB1518), con eficacia demostrada en pacientes de LMA refractaria en ensayos de fase I¹³², y que en combinación con un inhibidor de histonas deacetilasas como es el pracinostato (SB939), ha mostrado un efecto sinérgico tanto para la reducción del tumor como de la señalización mediada por JAK2 y FLT3¹³³; TG02, que inhibe las CDKs 1,2,7 y 9 igualmente en la señalización de JAK2 y FLT3¹³⁴; PLX3397 y CCT137690, un inhibidor FLT-Aurora quinasa^{135,136,137} o DCC2036 y CCT241736, con datos *in vitro* muy prometedores para el tratamiento de la LMA *FLT3-ITD*¹³⁸; sunitinib (SU11248)¹³⁹, y tandutinib (MLN518), también con actividad frente a la autofosforilación de *FLT3-ITD*¹⁴⁰. Inhibidores que, como ya se ha comentado en el caso de midostaurina, están siendo analizados en combinación con quimioterapia^{47,141,142,143,144}, siguiendo el camino marcado por la adición de ATRA a las altas dosis de antraciclinas, que tan buenos resultados ha conseguido en el tratamiento de los pacientes con LPA.

INTRODUCCIÓN

Por todo ello, desde el punto de vista terapéutico, las mutaciones de *FLT3*, son un campo en continuo avance. Se ha demostrado, *in vitro*, que la coexistencia de mutaciones ITD y puntuales del dominio de activación confieren resistencia a los inhibidores de FLT3 gracias a la hiperfosforilación constitutiva de STAT5, pero esta resistencia es reversible en combinación con rapamicina¹⁴⁵. Además, estudios recientes prueban que la actividad antileucémica de los inhibidores tirosín-quinasa, puede potenciarse a través de la combinación con una pequeña proapoptótica, Nutlin-3, que inhibe la interacción MDM2/p53^{146,147}.

1.2.3. Mutaciones del gen *NPM1*

La nucleofosmina-1 (*NPM1*; B23) es una fosfoproteína pleiotrópica, que se traslada de una manera constante entre el núcleo y el citoplasma celular y que, en condiciones normales, tiene una localización predominantemente nucleolar. Se trata de una proteína implicada en diversos procesos celulares tales como, la biogénesis del ribosoma, maduración del centrosoma, mantenimiento de la estabilidad genómica, prevención de la agregación de proteínas en el nucléolo, regulación de la transcripción o la modulación de factores de transcripción supresores de tumores (ruta ARF/p53)^{148,149,150,151,152,153,154,155,156} (Fig.8).

INTRODUCCIÓN

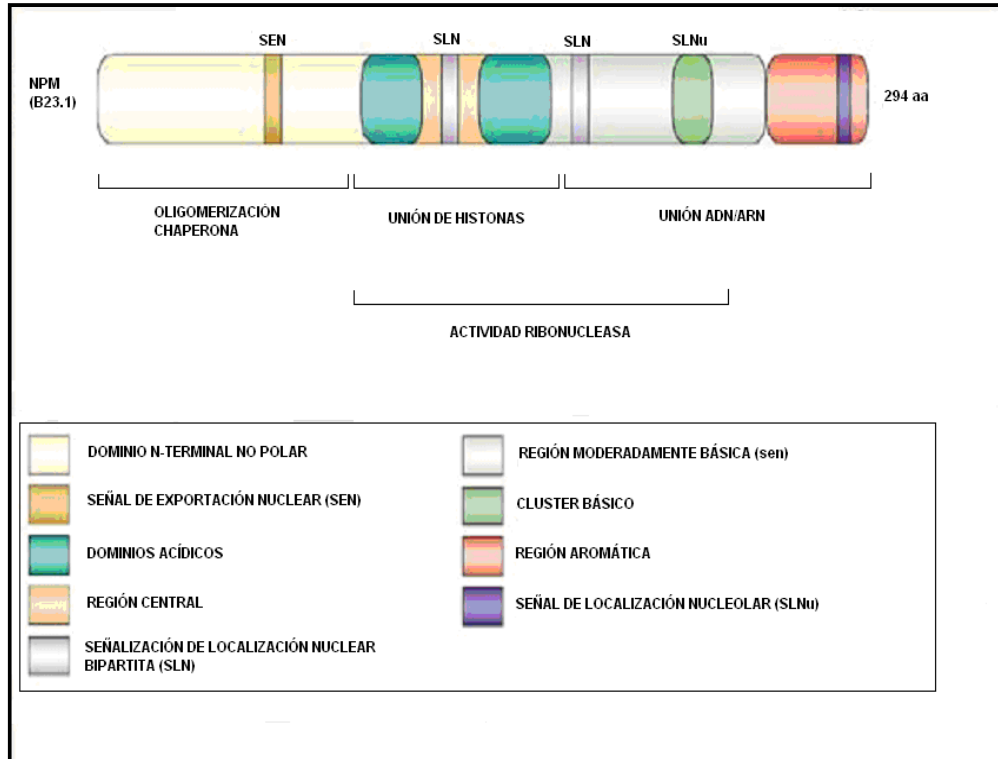


Figura 8. Estructura de la proteína NPM (adaptada de Grisendi S *et al*, Nat Rev Cancer. 2006 Jul;6(7):493-505). Comenzando desde el extremo N-terminal, la proteína contiene un segmento hidrofóbico con actividad chaperona implicado en oligomerización, seguido de dos tramos acídicos importantes para la unión de las histonas. La porción central comprendida entre estos dos tramos y la porción C-terminal, que contiene regiones básicas implicadas en la unión de ácidos nucleicos, son requeridas para la actividad ribonucleasa que posee la proteína. Los clusters básicos son seguidos de un tramo aromático que contiene dos residuos de triptófano (288 y 290) que se requieren para la localización nucleolar de la proteína. Además de esto, como factores implicados en la localización celular, NPM incluye también una señal de localización nuclear (SLN) y una señal de exportación nuclear (SEN).

INTRODUCCIÓN

La repercusión de la localización de la proteína NPM1 ha sido ya analizada en diversos trabajos destacando el del Dr. Falini, quien estudió la localización subcelular de la proteína NPM1 mediante métodos inmunohistoquímicos en 591 pacientes con LMA *de novo*¹⁴⁸. Era el año 2005, cuando en este trabajo se determinó que el 35% de los pacientes adultos con LMA presentaban expresión aberrante de NPM en el citoplasma de las células leucémicas, como resultado de inserciones en el exón 12 del gen *NPM1*. Se trata de una de las alteraciones genéticas recurrentes más frecuentes en la LMA con una prevalencia que asciende desde ese valor en torno al 35% a un rango comprendido entre el 45-64% de los adultos con LMA y cariotipo normal.

La NPM1 citoplasmática se encontró en el momento del diagnóstico y de la recaída en 25 pacientes analizados en estos dos momentos y apareció en todos los subtipos FAB excepto M3, M4Eo y M7, asociándose a una baja expresión de los antígenos CD34 y CD133. La presencia de NPM1 citoplasmática fue especialmente frecuente en los pacientes con cariotipo normal (142 de 230 pacientes; 62%), no se observó en los casos de anomalías citogenéticas específicas y mostró una clara asociación con las *FLT3*-ITD que se presentaron con el doble de prevalencia con respecto a las otras LMA.

INTRODUCCIÓN

Excepto en un paciente, en todos los casos en los que se observaba un patrón de NPM1 citoplasmática se encontraban mutaciones en el exón 12 del gen *NPM1*, dando como consecuencia un cambio en la pauta de lectura y una proteína anormalmente alargada que era retenida en el citoplasma (Fig.10).

Aunque inicialmente se describieron 6 mutaciones distintas, posteriormente se ha demostrado la existencia de nuevos tipos, aunque eso sí, con una incidencia inferior¹⁵⁴. En aproximadamente el 80% de las LMA con *NPM1* mutado, la mutación consiste en la duplicación de una secuencia de 4 bases en las posiciones 956-959 del gen, normalmente TCTG, mutación comúnmente denominada como tipo A, que da como resultado una proteína más larga con una secuencia aminoacídica diferente en el extremo C-terminal. Estas variaciones a nivel de C-terminal son las responsables de la localización citoplasmática de la proteína resultante, a través de la generación de dos nuevos motivos SEN y a través de la pérdida de dos residuos de triptófano en las posiciones 288 y 290 que posibilitan el desplegamiento del dominio C-terminal y con ello la pérdida de la capacidad de mantenerse unida al nucléolo^{153,159,160}. Las mutaciones rara vez tienen lugar en otros exones como el exón 9 o el exón 11. En estos casos no obstante, las proteínas mutadas se localizan igualmente en el citoplasma en un proceso regulado por el mismo mecanismo que rige el que tiene lugar con las mutaciones del exón 12^{161,162}.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas NPM1 mutadas citoplasmáticas contribuyen al desarrollo de la LMA a través de la inactivación de p19Arf mediante la deslocalización de la proteína supresora de tumores. El resultado es una actividad reducida para p19Arf, tanto en el caso de la dependiente de p53 como en el de la independiente. La estabilidad de p19Arf se ve comprometida con la proteína NPM1 mutada, capaz de ejercer un efecto regulador debilitador sobre la detención del ciclo celular dependiente de p53^{163,164}. A su vez, la proteína NPM1 mutada puede unirse a NF-kappaB, deslocalizarla al citoplasma e inducir su inactivación. Esta inactivación, parece ser la responsable de las altas tasas de respuesta a la quimioterapia que caracteriza a los pacientes con LMA y *NPM1* mutado^{165,166}.

Así, los 3 tipos de mutaciones más frecuentes en el gen *NPM1* son: i) inserción de 4 nucleótidos en la posición 959; ii) deleciones de 4-5 nucleótidos + inserciones de 9 nucleótidos; iii) deleciones de 9 nucleótidos + inserciones de 14 nucleótidos. Prácticamente todas estas mutaciones suponen la ganancia de 4-5 nucleótidos que alteran la pauta de lectura en la región C-terminal de la proteína resultante, como consecuencia de la pérdida de 1-2 residuos de triptófano esenciales para la localización nuclear. Todas estas variantes finalizan con la misma secuencia de 5 aminoácidos, VSLRK, y el genotipo de todos los pacientes portadores de estas mutaciones es heterocigoto ^{148,153,159}. Existen evidencias de que estas alteraciones son un evento anterior a la adquisición de mutaciones *FLT3*, sugiriendo que puedan ser un evento primario en la leucemogénesis¹⁶⁷. Se postulan como la lesión genética primaria en el 60% de las LMA, en cooperación con otras alteraciones secundarias que serían las de mayor peso en la

INTRODUCCIÓN

leucemogénesis¹⁶⁸, tales como aberraciones cromosómicas (en el 15% de los casos)¹⁴⁷ y mutaciones (en el 60% de los casos) en los genes *FLT3* (*FLT3-ITD* y *FLT3-TKD*) *NRAS*, *IDH1* y *TET2*. En el caso concreto de las mutaciones *FLT3-ITD* y *FLT3-TKD*, se ha visto que son menos estables que la mutación *NPM1*, perdiéndose en las recaídas en aproximadamente el 9% y 50% de los casos respectivamente^{169,170}.

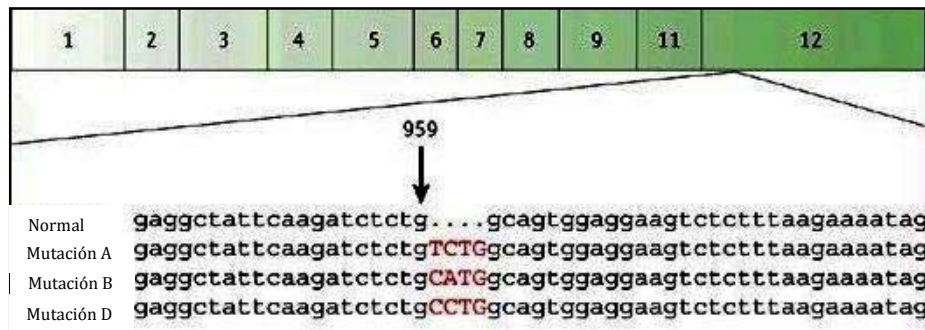


Figura 10. Secuencia de las mutaciones/inserciones de *NPM1* más frecuentes en LMA (adaptada de Grisendi *Set al*, Nat Rev Cancer. 2006 Jul;6(7):493-505).

Varios trabajos han analizado el impacto de las mutaciones de *NPM1* en el pronóstico de los pacientes con LMA, así como su relación con las distintas características clínico-biológicas. La incidencia de mutaciones de *NPM1* oscila entre 25 y 53% de las LMA, siendo significativamente la anomalía genética más frecuente en los pacientes con cariotipo normal (entre 45 y 64%). Las mutaciones de *NPM1* suelen tener una cifra de leucocitos más alta, presentarse con más frecuencia en mujeres, y asociarse a una cifra de plaquetas más elevada, a una cifra mayor de blastos en médula ósea y a una expresión menor de CD34^{171,172,173,174,175}.

INTRODUCCIÓN

Previamente analizada ha sido la posible correlación entre la presencia de las mutaciones *NPM1* y la presencia de mutaciones en otros genes¹⁶⁹. Así, mientras que las mutaciones de *CEBPA* ocurren con una incidencia similar en pacientes con y sin mutaciones de *NPM1*, y la asociación con duplicaciones parciales en tándem de *MLL* (*MLL*-PTD) es extremadamente rara, existe una clara correlación con las mutaciones *FLT3*-ITD. Desde el descubrimiento de la LMA con mutaciones *NPM1* en 2005 y su inclusión como entidad provisional en la clasificación de las neoplasias mieloides de la OMS en 2008⁶⁷, siguen habiendo sin embargo diversas controversias que precisan ser clarificadas. Entre ellas el que pueda ser considerada como una entidad independiente. Ciertos trabajos¹⁷⁶ sugieren que pueda ser considerada como tal, ya que se ha observado que la mutación es capaz de influir la hematopoyesis en modelos experimentales, que la alteración está ya presente en las células madre de los pacientes con este tipo de leucemias y que son mutuamente exclusivas de otras mutaciones, como las bialélicas de *CEBPA*. La mutación *NPM1* define un subgrupo de LMA con un patrón de expresión génica diferente^{177, 178}, con unas características genéticas, clínicas, patológicas, inmunofenotípicas y citogenéticas que difieren de las de otros tipos de LMA¹⁷².

Desde el punto de vista de la evolución de los pacientes, la mayoría de trabajos han otorgado siempre un papel favorable a las mutaciones *NPM1*^{167,168,169,170,171}. No obstante, ese pronóstico favorable se observa fundamentalmente en los pacientes con mutaciones *NPM1* pero sin *FLT3*-ITD, que alcanzan tasas de RC, SLE y SG netamente superiores a las observadas en pacientes con mutaciones concomitantes de *NPM1* y *FLT3*-ITD^{179,180}. Hay trabajos que por el

INTRODUCCIÓN

contrario otorgan un pronóstico desfavorable a las mutaciones *NPM1*, al parecer y aunque todavía está por definir, debido a la influencia del inmunofenotipo de las células leucémicas, como el recientemente publicado por el Dr. Chien-Yuan Chen¹⁸¹, en el que se observa que los pacientes con el patrón de expresión antigénica HLADR(+) CD34(+) CD7(+) presentan una menor mediana de SLR y SG que los que presentan CD34(-)/CD7(-) con expresión variable de HLADR (SLR, 3 vs. 23 meses, $p = 0.006$; SG, 11 vs. 40 meses, $p = 0.02$).

Ciertos estudios no describen el pronóstico favorable de las mutaciones *NPM1*, algo que puede deberse a que en dichos trabajos, el grupo de pacientes con mutaciones *NPM1* pero sin *FLT3*-ITD no fue analizado de manera específica^{182,183}. Con estas premisas, se hace necesario determinar si la influencia que están ejerciendo las mutaciones *FLT3*-ITD podría venir de alguna manera condicionada por el ratio de alelos mutados y normales de dicho gen, mediante la validación en una serie amplia de pacientes, contribuyendo a esclarecer el auténtico valor pronóstico y el comportamiento que tienen las mutaciones *NPM1* en la LMA.

La caracterización de las mutaciones en el gen *NPM1* está recomendada hoy en día como parte de la rutina del diagnóstico genético de la LMA. Por el hecho de que estas alteraciones representan la anomalía genética más frecuente conocida en esta patología y por el hecho de conllevar significación pronóstica, desde el momento en el que el perfil genético *NPM1* mutado / *FLT3*-ITD wild-type identifica pacientes con mejor respuesta a la quimioterapia^{147,166,170,178}. Estos factores convierten a la mutación *NPM1* en una atractiva diana para el desarrollo de estrategias terapéuticas que busquen aumentar la eficacia de esa respuesta¹⁷⁴,

INTRODUCCIÓN

como lo ha sido por ejemplo la incorporación del ATRA a los regímenes de tratamiento¹⁸⁴, o la utilización de inhibidores específicos de la oligomerización de NPM1, como NSC348884, capaces de sensibilizar en mayor grado a las células leucémicas hacia el proceso de apoptosis en presencia de la combinación ATRA más citarabina¹⁸⁵.

1.2.3.1. *NPM1* como posible marcador de enfermedad mínima residual (EMR)

Algo que cobra especial interés en la LMA con cariotipo normal es la posibilidad de utilizar los reordenamientos moleculares como marcadores de EMR. Las mutaciones, en la mayoría de los casos, no se han podido utilizar como tal debido a la heterogeneidad que existe de las mismas entre los diferentes pacientes y por las limitaciones de sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas para la detección de los alelos normal y mutado. Entre las mutaciones que podrían considerarse como buenos marcadores de EMR, dada su prevalencia y gran estabilidad durante el curso de la enfermedad, están precisamente las del gen *NPM1*, cuya mutación tipo A está presente en el 75-80% de los casos de LMA. Sin embargo, el método, que ha sido descrito por Gorello *et al*¹⁸⁶, no ha sido todavía trasladado a la clínica. Tampoco se conoce qué valor podrían tener estas mutaciones en comparación con otros previamente descritos a tal efecto, como *WT1*, cuya expresión se da en un 80-93% de las LMA^{187,188,189,190,191,192,193,194}. Varios estudios contemplan a *WT1* como un marcador leucémico con valor pronóstico tras la inducción^{195,196}, encontrando incluso una total concordancia entre los niveles de *WT1* y el estatus de la LMA antes y después del TPH alogénico;

INTRODUCCIÓN

basándose en estos resultados se ha llegado a postular que aquellos casos con incremento en los niveles de *WT1* después del trasplante y sin enfermedad injerto contra huésped, podrían ser buenos candidatos para terapias de discontinuación de la inmunosupresión y/o de infusión de linfocitos del donante¹⁹⁷. Una consideración de *WT1* como marcador de EMR que podría ser también cuestionable, puesto que su expresión no es específica de las células leucémicas al estar presente también de manera residual en células de médula ósea sanas.

El análisis por tanto de cada uno de estos puntos puede ser de gran utilidad para determinar la inclusión de manera sistemática de *NPM1* y su método de análisis como marcador de EMR, en el diagnóstico molecular de esta patología.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Las mutaciones de *NPM1* y *FLT3* son alteraciones moleculares implicadas en la leucemogénesis. Por ello, cabe suponer que la presencia de estas alteraciones moleculares pudiera definir un patrón de comportamiento biológico del clon leucémico, lo que tendría implicaciones en el curso de la enfermedad.

La investigación de estos nuevos marcadores, presentes en un amplio espectro de LMA, permitirá el mejor conocimiento de la patogénesis y del pronóstico en la LMA, lo que eventualmente pudiera tener diversas repercusiones:

- En la clasificación y definición de nuevos grupos de riesgo en la LMA
- Utilización de marcadores moleculares específicos para monitorizar EMR
- Establecimiento de regímenes terapéuticos ajustados al riesgo de los pacientes
- Desarrollo de tratamientos terapéuticos que tengan como diana específica estos marcadores.

2.2. OBJETIVOS

1. Incidencia de las mutaciones *FLT3* y *NPM1* y asociación con características clínico-biológicas
 - a) Puesta a punto de métodos de detección de mutaciones *FLT3*, cualitativa y cuantitativa (ratio), y mutaciones *NPM1*
 - b) Incidencia de las mutaciones *FLT3* y *NPM1* en la LMA
 - c) Relación de *FLT3* y *NPM1* con las características demográficas y clínicas de los pacientes (subtipo FAB, leucocitos, grupos de riesgo citogenético, etc.).

2. Valor pronóstico de las mutaciones *FLT3* y *NPM1*
 - a) Análisis del valor pronóstico de la detección cualitativa y cuantitativa (ratio) de las mutaciones *FLT3* en una serie amplia de pacientes con LMA tratados en España
 - b) Análisis del impacto pronóstico conferido por la combinación de mutaciones *FLT3* y *NPM1*

3. Estudio del posible valor de *NPM1* como marcador de EMR. Comparación con el previamente descrito de *WT1*

3. PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

3.1. PACIENTES

El tamaño de la serie global considerada en la presente tesis ascendió a un total de 424 pacientes con LMA *de novo* incluidos en los protocolos PETHEMA LMA96, LMA99, LMA2007 y LMA2010 (Tabla 1). 311 pacientes recibieron quimioterapia y 52 pacientes recibieron una alternativa terapéutica (tratamiento de soporte, otros tratamientos o no fueron tratados). La procedencia correspondió a los siguientes centros: Hospital Universitario La Fe (Valencia), Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia), Hospital General Universitario (Valencia), Hospital General Universitario (Alicante), Hospital General Universitario (Castellón), Hospital General Universitario Santa Lucía (Cartagena), Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia), Hospital General Universitario (Albacete).

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Tabla 1. Características generales de la serie de pacientes con LMA *de novo*.

PACIENTES						
CARACTERÍSTICA	Total		Tratados con quimioterapia		Otros tratamientos/ Tratamiento de soporte/ No tratados/Oral	
	Mediana (rango)	n (%)	Mediana (rango)	n (%)	Mediana (rango)	n (%)
Total		424 (100)		311 (100)		52 (100)
Edad, años	62		58		77	
≤ 65	(17-93)	274 (65)	(17-78)	234 (75)	(20-93)	10 (19)
> 65		145 (35)		77 (25)		42 (81)
Sexo						
Masculino		239 (56)		181 (58)		30 (58)
Femenino		184 (44)		130 (42)		22 (42)
Leucocitos, × 10⁹/L	15		15		13	
≤ 50	(1-396)	254 (73)	(1-324)	220 (73)	(1-396)	33 (73)
> 50		93 (27)		81 (27)		12 (27)
Blastos, %	70		70		69	
≤ 70	(5-100)	158 (51)	(5-100)	138 (50)	(12-100)	20 (53)
> 70		155 (49)		136 (50)		18 (47)
GOT, UI	21		22		21	
≤ 40	(8-400)	151 (84)	(9-400)	118 (82)	(8-212)	33 (92)
>40		29 (16)		26 (18)		3 (8)
GTP, UI	21		23		18	
≤ 40	(6-172)	149 (81)	(6-172)	119 (79)	(8-84)	30 (86)
> 40		36 (19)		31 (21)		5 (14)
Creatinina, mg/dl	1.0		1.0		1.1	
≤ 1.2	(0.5-3.9)	145 (77)	(0.5-3.8)	124 (82)	(0.6-3.9)	21 (57)
> 1.2		44 (23)		28 (18)		16 (43)
Bilirrubina, mg/dl	0.7		0.6		0.7	
≤ 1.2	(0.2-9.4)	162 (88)	(0.2-9.4)	136 (91)	(0.3-3.3)	26 (77)
> 1.2		22 (12)		14 (9)		8 (23)
LDH, mg/dl	630		597		867	
≤ 600	(121-25000)	88 (47)	(121-25000)	77 (51)	(233-5882)	11 (32)
> 600		98 (53)		75 (49)		23 (68)
ECOG						
0-1		204 (69)		195 (73)		8 (30)
≥2		91 (31)		72 (27)		19 (70)
FAB						
M0		20 (7)		17 (8)		3 (8)
M1		62 (23)		50 (23)		9 (24)
M2		73 (27)		59 (26)		9 (24)
M4		56 (20)		44 (19)		9 (24)
M4eo		2 (1)		1 (1)		1 (3)
M5		40 (15)		31 (14)		5 (14)
M6		13 (5)		12 (5)		1 (3)
M7		9 (2)		8 (4)		0 (0)
Citogenética						
Favorable		29 (8)		23 (8)		5 (11)
Intermedio		265 (73)		219 (74)		29 (65)
Desfavorable		67 (19)		55 (18)		11 (24)
FLT3 -ITD						
Positivo		95 (24)		68 (24)		8 (19)
Negativo		294 (76)		221 (76)		34 (81)
NPM1						
Mutado		145 (40)		101 (37)		12 (33)
No mutado		221 (60)		173 (63)		24 (67)

3.2. TRATAMIENTO

Todos los pacientes fueron incluidos en ensayos sucesivos de quimioterapia intensiva (protocolos PETHEMA LMA96, PETHEMA LMA99 y PETHEMA LMA2007 y PETHEMA LMA2010) (<http://www.pethema.org/>) en los que la terapia de inducción consistió en combinaciones estándar de antraciclinas más citarabina, con o sin etopósido. La terapia de post-remisión incluyó 1-2 ciclos de quimioterapia de consolidación con dosis medias/altas de citarabina y TPH autólogo si el caso lo permitía. Pacientes de alto riesgo con donante eran seleccionados para TPH alogénico de células progenitoras. Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo considerando en primer lugar los pacientes que recibieron tratamiento intensivo con quimioterapia, y adicionalmente, en los pacientes que recibieron opciones terapéuticas diferentes a la quimioterapia o que no fueron tratados. Los pacientes que no presentaban citogenética de riesgo intermedio fueron excluidos de dichos análisis.

3.3. MATERIALES

3.3.1. Soluciones y reactivos

3.3.1.1. Soluciones

Extracción de ARN

1. Tampón de lisis de hematíes: Cloruro amónico 0.155 M, KHCO_3 10 mM, Na_2EDTA 0,1 mM, H_2O csp 1000ml
2. Solución de tiocianato de guanidinio: tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, N-laurilsarcosina 0,5% (p/v), 2-mercaptoetanol 0,1 M
3. Acetato sódico 2 M pH=4: acetato sódico anhidro 2 M, ácido acético glacial 0,25%
4. Cloroformo-Alcohol isoamílico (49:1): Cloroformo 49v, alcohol-isoamílico 1v
5. EtOH 70%: EtOH 100% (Carlo Erba), H_2O libre de ARNasa (Promega) 30%

Extracción de ADN

Cloruro de sodio saturado (NaCl) 6N (Merck)

EtOH 70%: EtOH 100% (Carlo Erba), H_2O estéril (Promega) 30%

Electroforesis de ácidos nucleicos en agarosa

1. Agarosa para testado de ARN: 1% agarosa (p/v) en tampón Tris-EDTA-Borato x1.
2. Agarosa para testado de productos de PCR: 1.5-3% agarosa (p/v) en tampón Tris-EDTA-Borato x1.
3. Tampón Tris-EDTA-Borato x10: Tris 0,89 M pH= 8, EDTA 25 mM, Acido Bórico 0,89 M.
4. Azul de Bromofenol: Sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25%.
5. Bromuro de Etidio: Bromuro de etidio 10 mg/ml en tampón Tris-EDTA-Borato x1.

3.3.1.2. Reactivos

Extracción de ADN

EtOH 100% (Carlo Erba); H₂O estéril (Promega)

Extracción de ARN

Tiocianato de guanidinio (Fluka); fenol (Labgen); cloroformo (Merck); alcohol isoamílico (Sigma); isopropanol (Merck); EtOH 100% (Carlo Erba); H₂O libre de ARNasas (Promega); kit comercial RNAeasy Mini Kit (Qiagen).

Transcripción reversa

Taqman Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystems)

PCR

dCTP, dTTP, dGTP, dATP (Pharmacia); AmpliTaq Gold (Perkin Elmer); Buffer AmpliTaq Gold 10X (Perkin Elmer); MgCl₂ 25 mM (Perkin Elmer); cebadores y sondas (TIB MOLBIOL); Taqman Universal Master Mix 2X (Applied Biosystems), LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Molecular Biochemicals).

Secuenciación

ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing ready reactions kit (Applied Biosystems); formamida (Clontech); EXOSAP-IT 500 reacciones USB Corporation (Amersham).

Electroforesis en agarosa

Agarosa MP (Roche Ref: 1388983 100 g); Azul de Bromofenol (Merck); Bromuro de etidio (Sigma); Marcador de tamaños moleculares: λ X174 DNA/HinfI Marker (MBI Fermentas, #SM0261).

Electroforesis capilar

3130 POP-7™ (Applied Biosystems, P/N:4352759); Gene Scan™-500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems, Part N° 401734); 3130-Avant™ Genetic Analyzer Capillary Array, 36 cm (Applied Biosystems).

3.3.1.3. Equipos y software

ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop®, Wilmington, Delaware, USA)

Termociclador Eppendorff MasterCycler (Eppendorf)

3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

LightCycler Instrument (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)

Programas de análisis

Gene Mapper Analysis 4.0

Sequencing Analysis 5.2

Lightcycler software 3.0

3.3.2. Procesado y almacenamiento de las muestras

Las muestras de partida fueron aspirados de médula ósea (MO) y sangre periférica (SP) en pacientes diagnosticados de LMA *de novo*. Tras la recepción de las muestras, y en el caso de muestras externas al hospital, en un tiempo inferior a 24 h, tuvo lugar el procesamiento de las mismas para la posterior extracción de ADN y ARN. En el caso del ADN, la extracción se realizó a partir de sangre, de MO o del *pellet* celular obtenido a partir de las mismas. En el caso del ARN, la extracción se realizó directamente a partir de dicho *pellet*.

3.3.2.1. Obtención del *pellet* celular

El protocolo a seguir, en este caso, consistió en resuspender en primer lugar los elementos formes de la sangre mediante varias inversiones suaves de la muestra anticoagulada con EDTA, a continuación se añadió un máximo de 5 ml a tubos conteniendo 7 ml de tampón de lisis, se mezcló efectuando 5-7 inversiones (sin *vortex*) y se incubó la mezcla en baño de hielo durante 15 min para favorecer el proceso de hemólisis. Durante el tiempo de incubación se efectuaron varias inversiones del tubo observando la desaparición de la opalescencia inicial y la aparición progresiva de un color rojo translúcido a medida que transcurría el proceso hemolítico.

El siguiente paso fue centrifugar a 300 g durante 5 min a 15-16°C, decantando el sobrenadante y eliminando los restos del mismo mediante un papel de filtro. Tras esta primera centrifugación, se observaba la formación de un botón blanco correspondiente en su mayoría a blastos junto con leucocitos normales remanentes, aún contaminados con hemoglobina y hematíes no hemolizados.

Se añadían entonces 7 ml más de tampón de lisis y se resuspendía el *pellet* realizando varias aspiraciones con la ayuda de una pipeta *Pasteur* desechable. De nuevo, se incubaba la muestra en el baño de hielo pero esta vez durante 7 min para que pudiera completarse el proceso de hemólisis y asegurar la obtención de un *pellet* más puro.

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

El *pellet* era entonces lavado con 5 ml de solución salina fisiológica estéril y se centrifugaba a 200 g durante 5 min desechando el sobrenadante resultante y eliminando los restos que pudiesen quedar con papel de filtro.

El proceso de lavado se realizaba dos veces.

Una vez finalizado el proceso de lavado, el *pellet* se transfería a un tubo Eppendorf, se homogeneizaba, se añadía tampón de lisis para favorecer la lisis celular y se almacenaba a -20°C ó -80°C hasta el momento de la extracción.

3.3.2.2. Extracción de ADN

El ADN se aisló mediante el denominado “método salino” en el cual se precipitan las proteínas de la muestra de sangre mediante la adición de cloruro sódico saturado (NaCl 6N) para a continuación aplicar sobre el sobrenadante resultante, EtOH 100% frío, que aísla el ADN genómico. El ADN obtenido es lavado con EtOH 70%, centrifugado para sedimentar el que haya precipitado, para ser finalmente eluído en H₂O estéril.

3.3.2.3. Extracción de ARN

A partir del *pellet* celular obtenido se procedió a la extracción de ARN mediante el procedimiento fenol-cloroformo descrito por Chomczynski *et al*¹⁹⁸, y el kit comercial RNAeasy Mini Kit (Qiagen).

Método de Chomczynski y Sacchi

El procedimiento se fundamenta en una extracción del ARN celular utilizando tiocianato de guanidinio seguida de precipitación con isopropanol.

El *pellet* celular se resuspendió en 1 ml de tiocianato de guanidinio se descongelaron y se mantuvieron en hielo para una mejor conservación. Se homogenizaron repetidas veces con una jeringa para favorecer el proceso de lisis celular y se les añadió 0.1 ml de acetato sódico 2M pH=4.1, seguido de 1 ml de fenol y 0.2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Se mezcló convenientemente la muestra con los reactivos invirtiendo varias veces los tubos y se dejó incubando en hielo durante 15 min. Seguidamente, se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 20 min a 4°C recogiendo la fase acuosa y transfiriéndola a otro tubo en el que se añadió isopropanol (1:1), dejándolo entonces incubar 30 min para que precipitara el ARN. Se centrifugó el ARN precipitado a 10.000 g durante 20 min a 4°C y se lavó el *pellet* resultante con EtOH al 70%. Tras dejar secando al vacío durante 15-30 min se resuspendió el ARN en 30 µl de agua libre de ARNasa.

Extracción de ARN con el kit comercial RNAeasy Mini Kit (Qiagen)

El kit permite extraer ARN de manera eficaz de un máximo de 1×10^7 células.

Una vez obtenido el *pellet* celular siguiendo el protocolo de procesamiento de muestras leucocitarias para extracción de ARN, se añadieron 350 μL de buffer RLT con β -mercaptoetanol en el caso de *pellet* pequeños ($<5 \times 10^6$ células) y 600 μL para *pellet* grandes ($5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células). El mismo, se resuspendió con la ayuda de una jeringa de insulina aspirando y soltando unas 20 veces para lisar por completo las células, y se añadió el mismo volumen de EtOH 70% frío libre de ARNasa que el de buffer RLT con β -mercaptoetanol añadido previamente (350 ó 600 μL).

A continuación, se transfirieron 700 μL de muestra a la columna de extracción de ARN y se centrifugaron a 11.200 g durante 30 s. El filtrado resultante se desechó y se añadieron 700 μL de buffer de lavado RW1 para volver a centrifugar a 11.200 g durante 30 s y desechar el filtrado. Tras esto, las columnas se transfirieron a un nuevo tubo de 2 mL, se añadieron 500 μL de buffer RPE y las muestras se volvieron a centrifugar a 11.200 g durante 30 s desechando el filtrado. Los posibles restos de buffer RPE que pudieron quedar en las muestras, se eliminaron con un nuevo proceso de centrifugación a 11.200 g durante 1 min.

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Finalmente, las columnas se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se añadió a cada una de ellas 30-40 μ L de H₂O libre de ARNasa y centrifugaron 1 min a 11.200 g para eluir el ARN.

Calidad, cantidad y almacenamiento del ARN

La concentración del ARN obtenido así como la determinación de su grado de pureza se evaluó efectuando lecturas espectrofotométricas de 1 μ l de ARN en el sistema *ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop®, Wilmington, Delaware, USA), observando que el cociente 260/280 se mantuviera en un rango comprendido entre 1,8-2. De manera adicional se procedió al testado del ARN extraído en gel de agarosa al 1% para verificar su integridad mediante la presencia de las bandas ribosomales *18S* y *28S*.

Obtención del ADNc mediante retrotranscripción

La retrotranscripción (RT) para la obtención del ADN complementario (ADNc) se realizó sometiendo 0.5 μ g de ARN a una transcripción reversa mediante Taqman Gold RT-PCR Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.4. ESTUDIOS CLÍNICOS

Los estudios aquí realizados fueron aprobados por el comité ético para la investigación clínica institucional. Un consentimiento informado escrito de acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la Conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales, fue obtenido de todos y cada uno de los pacientes.

La recogida de datos clínicos se realizó mediante el diagnóstico, seguimiento y evaluación clínica de los pacientes durante el ingreso y seguimiento en consultas externas y mediante la revisión de la historia clínica previa.

La evaluación clínica incluyó analítica rutinaria (hemograma y bioquímica) así como aspirado y/o biopsia de médula ósea al diagnóstico y al día 15 tras el inicio de la terapia de inducción en el caso de los pacientes tratados.

Por otro lado, los pacientes fueron clasificados según la propuesta FAB (French-American-British) y la clasificación de la OMS¹⁹⁹. Todos los datos se almacenaron para su posterior análisis en una base de datos MS Access (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU).

3.5. ESTUDIOS CITOGÉNÉTICOS

A partir de muestras de aspirado de médula ósea se practicó un cultivo, a corto plazo, según las recomendaciones del International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2005)²⁰⁰. Se estudiaron, al menos, 20 metafases por muestra. Se establecieron grupos de riesgo citogenético para los pacientes diagnosticados de LMA de acuerdo con los criterios de MRC²⁰¹.

3.6. ESTUDIOS MOLECULARES

Los métodos de estudio molecular realizados han sido: PCR convencional, RT, PCR cuantitativa en tiempo real (*qPCR*), DNA *fingerprinting* con endonucleasas de restricción, secuenciación automática de ácidos nucleicos y análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar.

3.6.1. Detección de mutaciones

3.6.1.1. Detección de mutaciones *NPM1*

Para la detección de las mutaciones de *NPM1* se siguió el método de qPCR descrito por Schnittger *et al.*¹⁷², utilizando cebadores y sondas de hibridación marcadas con fluorógenos (Tabla 2). Para detectar las mutaciones se utilizó ADNc como muestra. En cada ensayo se incluyeron las muestras a analizar, controles

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

positivos y un control de reactivos en el que se sustituyó la muestra por H₂O. Para cada muestra se utilizaron 9 µl de mezcla de reactivos + 1 µl de ADNc (Tabla 3).

Tabla 2. Cebadores y sondas utilizados en la detección de las mutaciones de *NPM1*.

<i>NPM1</i> (GenbankAcc N° 40353732)					
	SECUENCIAS	POSICIÓN	TAMAÑO (pb)	% GC	T_m (oC)
Cebadores					
<i>NPM1</i> -F	5'TCCCAAAGTGAAGCC 3'	879-895	16	56.3	53
<i>NPM1</i> -R	5'GGAAAGTTCTCACTCTGC 3'	1067-1085	18	50	50.5
Sondas					
<i>NPM1</i> Anchor	5'CGGATGACTGACCAAGAGGCTATTCA--FL 3'	925-951	26	50	59.5
<i>NPM1</i> Sensor	5'RED640-ATCTCTGGCCGTGGAGG—PH 3'	953-970	17	64.7	46.5

Tabla 3. Composición de la mezcla de reactivos empleada para la detección de las mutaciones de *NPM1*. Se detalla el volumen y concentración final de los mismos en la reacción de PCR.

MEZCLA DE REACTIVOS	Volumen [µl]	[Final]
H₂O esteril	3.2	
MgCl₂ (25 mM)	1.2	3mM
<i>NPM1</i> F (5µM)	1	0.5µM
<i>NPM1</i> R (5µM)	1	0.5µM
<i>NPM1</i> anchor (5µM)	0.8	0.4µM
<i>NPM1</i> sensor (5µM)	0.8	0.4µM
LightCycler Fast Start Hyb Probes	1	x1
ADNc	1	
Volumen Total	10	

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

La qPCR se realizó en el sistema LightCycler® siguiendo un programa que constaba de 3 etapas: desnaturalización (Programa 1), amplificación (Programa 2), análisis de curvas de fusión o de *melting* (Programa 3) y enfriamiento (Programa 4) siguiéndose parámetros adaptados al sistema LightCycler® (Tabla 4).

Tabla 4. Programa de amplificación para el sistema LightCycler®. Las adquisiciones de fluorescencia se realizaron en el segmento 2 de la amplificación de forma puntual y en el segmento 3 del programa de fusión de forma continua.

Parámetros	Programa 1	Programa 2			Programa 3			Programa 4
Denominación	Desnaturalización	Amplificación			Fusión			Enfriamiento
Nº ciclos	1	45			1			1
		Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 1
Temperatura [°C]	95	95	55	72	95	34	70	40
Tiempo de incubación [s]	600	1	8	10	0	1	0	30
Tasa de transición de temperatura [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.25	20
Modo de adquisición	No	No	Puntual F2/F1	No	No	No	Cont	No

El método se basa en trabajar en la misma reacción con un par de sondas de hibridación específicas (sondas anchor o donadora y sensor o receptora) para detectar todas las mutaciones.

Cada una de las sondas lleva incorporado un fluorocromo (Red 640 en el caso de la sonda sensor, y fluoresceína en el caso de la sonda anchor), e hibridan con el producto de PCR específico. Al ser excitado, el donador absorbe la luz y

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

transfiere su energía al fluorocromo receptor que, a su vez, produce una emisión de luz medible que monitoriza el lector del equipo respecto al incremento de temperatura, generando una curva melting.

El incremento de temperatura disocia las sondas, disminuyendo la intensidad de emisión. La temperatura a la cual la sonda sensor se disocia, depende de la presencia/ausencia de mutación en el ADN analizado. Si la mutación está presente, existirá una zona de “mismatch” o desapareamiento que producirá una variación en la temperatura de fusión o melting (T_M) del híbrido formado. Concretamente, el alelo *NPM1* normal presentaba siempre una T_M de 53°C mientras que los alelos mutados presentaban T_M inferiores (que variaban desde los 39 hasta los 45°C) (Fig. 11).

La inserción TCTG que constituía el Tipo A mayoritario (75% de las mutaciones) presentaba un pico con una T_M característica a 45°C, sin embargo, en el resto de mutaciones la T_M observada para el alelo mutado no resultaba lo suficientemente discriminatoria para identificar el tipo de mutación presente; por lo que en todos estos casos después de la qPCR se realizó la secuenciación de la región insertada utilizando *NPM1*-F como cebador (Fig. 12).

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

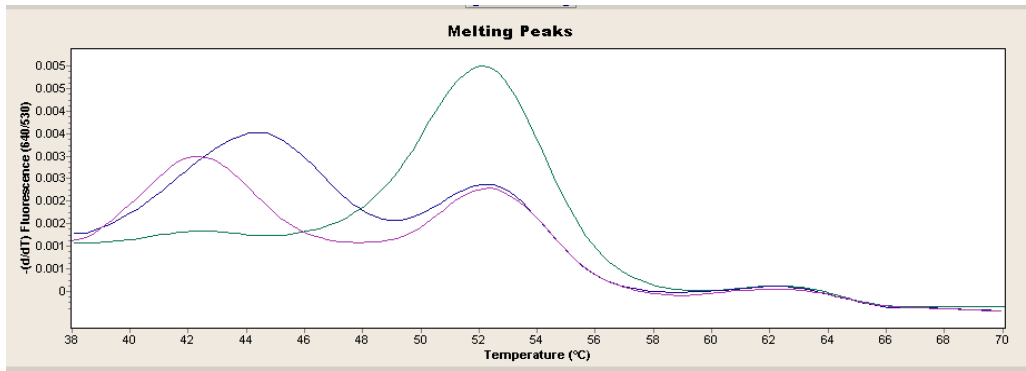


Figura 11. Curvas de fusión del genotipo normal (verde) y mutado (morado y violeta). El alelo normal origina un pico a 53°C, mientras que el alelo mutado presenta un pico a una T_M menor, la cual varía dependiendo del tipo de mutación que presenta. En este caso, en la figura se puede observar una muestra positiva/portadora para la mutación tipo A (morado) y otra muestra para la mutación tipo D (violeta). Posteriormente a la PCR en tiempo real, se caracteriza y confirma la mutación en las muestras positivas mediante secuenciación.

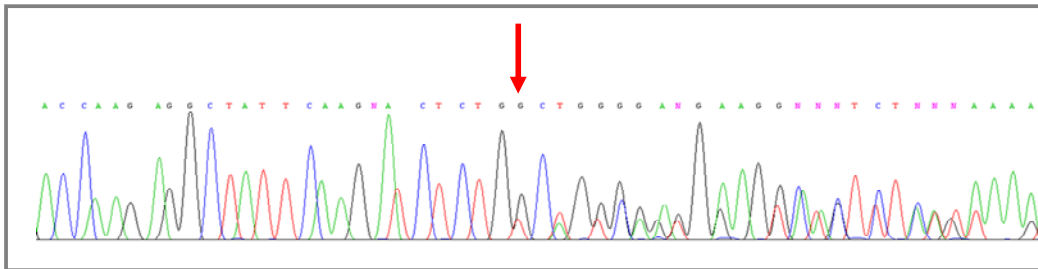


Figura 12. Electroferograma de una mutación tipo obtenido tras la secuenciación del amplificado utilizando un cebador interno correspondiente al exón 12.

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

El protocolo que se siguió para la secuenciación fue el siguiente:

A) Preparación de la muestra:

Para la secuenciación se amplificó el exón 12 con los cebadores *NPM1-F* y *NPM1-R* en un termociclador convencional Eppendorf *Mastercycler personal*. Se tomaron 8 µl del producto de esta amplificación, y se le añadieron 2 µl del enzima EXOSAP (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Tras mezclar bien se incubó a 37°C durante 15 min y después 15 min más a 80°C. Esta digestión no requería purificación posterior.

B) Marcaje con nucleótidos fluorescentes:

A 5 µl de la mezcla DNA-Exosap se añadió 1µl de BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-24 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), 1 µl cebador *NPM1-F* 3.2 µM y 3 µl de H₂O. Los 10 µl de volumen total fueron amplificados en un termociclador Eppendorf *Mastercycler personal*. La reacción consistió en una amplificación de 25 ciclos con 10 s de desnaturalización a 96°C, 5 s de hibridación a 50°C y 4 min de elongamiento a 60°C. Esta reacción de secuencia se almacenó a 4°C hasta el momento de la precipitación.

C) Precipitación de la reacción de secuenciación:

El volumen total de la reacción (10 µl) se diluyó con 40 µl de H₂O destilada y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se añadieron 5 µl de acetato sódico 3M pH=5.2 (10% sales) mezclando con la pipeta y 100 µl (2 volúmenes) de EtOH 100%. El acetato y el EtOH debían estar a temperatura ambiente.

La mezcla resultante se agitó con el *vortex* y se dejó incubando a temperatura ambiente 5-10 min. Seguidamente, se centrifugó 20 min a 10.000 g (los tubos se dispusieron siempre en la misma posición para minimizar el riesgo de desprendimiento del *pellet*) y se procedió a la decantación evitando que quedaran restos de EtOH en las paredes.

Se añadieron 250 µl de EtOH 70% a temperatura ambiente, se centrifugó 5 min a 10.000 g y se eliminó posteriormente el sobrenadante cuidadosamente con una aguja de insulina evitando tocar la pared externa donde quedaba adherido el *pellet* (de aparecer gotas en el tubo, este paso podía repetirse cuantas veces se considerara necesario). Se incubó a 37°C 5-10 min y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

D) Análisis de la secuencia

El *pellet* resultante de la precipitación se resuspendió en 20 µl de formamida. A continuación se desnaturalizó la mezcla mediante incubación a 95°C durante 3-5 min y finalmente se transfirió al equipo 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)

3.6.1.2. Detección de las mutaciones *FLT3*

3.6.1.2.1. Detección de duplicaciones internas en tándem de FLT3 (FLT3-ITD)

La detección de este tipo de mutaciones se efectuó siguiendo el método de Thiede *et al.*⁹⁹, en el que se amplificaban los exones 11 y 12 del gen *FLT3* mediante PCR convencional empleando los cebadores ITD-11F e ITD-12R (Tabla 5). Para la amplificación, se utilizaron 2 µl de ADN genómico en un volumen total de 50 µl (Tabla 6) siguiendo el programa descrito por Thiede⁹⁹ (Tabla 7). El alelo normal originaba una única banda de 329 pb, mientras que la presencia de ITD daba lugar a la aparición de una o varias bandas de mayor tamaño. (Fig. 13A). Los casos ITD positivos fueron secuenciados con el equipo 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), siguiendo el protocolo de secuenciación anteriormente descrito. (Fig. 13B).

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Tabla 5. Secuencias de los cebadores empleados para la detección de las mutaciones del gen *FLT3*-ITD.

Nombre	Secuencia	Mutación
ITD-11F	5'-GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC-3'	<i>FLT3</i> -ITD
ITD-12R	5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC -3'	<i>FLT3</i> -ITD

Tabla 6. Reactivos utilizados para la detección de las duplicaciones internas en tándem de *FLT3* (*FLT3*-ITD).

Reactivo	V (µl)	[] inicial	[] final
H₂O estéril	28.8	----	----
Tampón TaqGold	5	10x	1x
MgCl₂	3	25 mM	1.5 mM
Cebador ITD-11F	5	5 µM	0.5 µM
Cebador ITD-12R	5	5 µM	0.5 µM
dNTPs	1	10 mM	0.2 mM
AmpliTaqGold	0.2	5 U/µl	1 U/50 µl
ADN genómico	2	----	≈50 ng
Volumen Total	50		

Tabla 7. Programa de PCR para la detección de las duplicaciones internas en tándem de *FLT3* (*FLT3*-ITD).

Etapa		T (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		95	11 minutos
X35 ciclos	Desnaturalización	94	30 segundos
	Hibridación	57	1 minuto
	Elongamiento	72	1 minuto

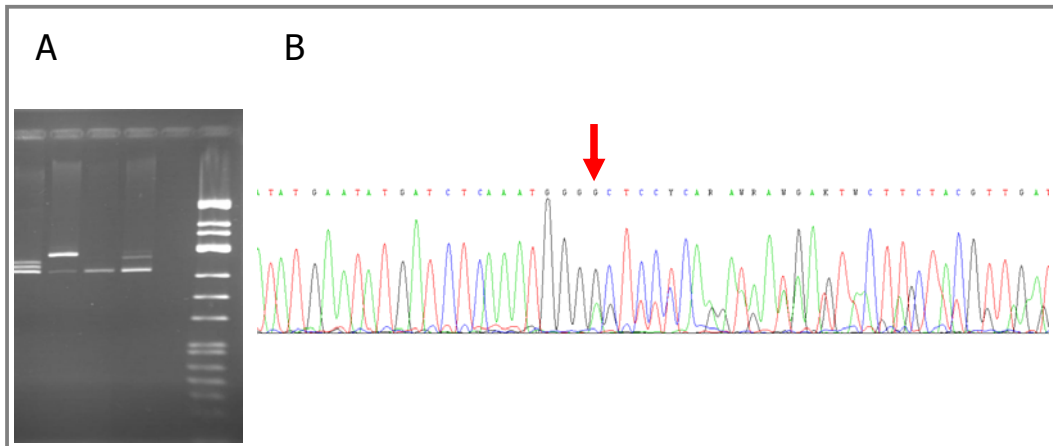


Figura 13. (A) Electroforesis en gel de agarosa Nusieve al 3% para la detección de fragmentos de distinto tamaño de *FLT3*-ITD tras PCR específica: 1,2,4) *FLT3* mutado; 3) *FLT3* normal; 5) Blanco; 6) Marcador de pesos moleculares λ X174 DNA/*Hind*flMarker. **(B)** Electroferograma obtenido tras la secuenciación de una de las duplicaciones empleando el cebador ITD11F localizado en el exón 11 del gen *FLT3* en el que se puede observar la presencia de la duplicación con el consecuente desplazamiento en la pauta de lectura.

3.6.1.2.2. Detección de mutaciones en la posición 835 (*FLT3*-D835, *FLT3*-TKD)

Las mutaciones en la posición 835, correspondiente al segundo dominio tirosín-quinasa de la proteína *FLT3*, se detectaron mediante un nuevo método por PCR en tiempo real con el sistema LightCycler®, utilizando los cebadores descritos por Yamamoto *et al*¹⁰⁴. Se diseñaron dos sondas de hibridación marcadas fluorescentemente (TIBMOLBIOL), contra el alelo normal. Con este nuevo método, se confería mayor rapidez a igualdad de especificidad que los métodos convencionales (PCR seguida de digestión con enzimas de restricción).

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

En cada ensayo se incluyeron las muestras a analizar, controles positivos y un control de reactivos en el que se sustituyó la muestra por H₂O. Para cada muestra se utilizaron 9 µl de mezcla de reactivos + 1 µl de ADN (Tabla 8).

Tabla 8. Composición de la mezcla de reactivos empleada para la detección de las mutaciones de *FLT3*-D835. Se detalla el volumen y concentración final de los mismos en la reacción de PCR.

MEZCLA DE REACTIVOS	Volumen [µl]	[Final]
H ₂ O esteril	3.9	
MgCl ₂ (25 mM)	1.2	3mM
17-F (5µM)	1	0.5µM
17-R (5µM)	1	0.5µM
<i>FLT3</i> anchor (5µM)	0.45	0.2µM
<i>FLT3</i> sensor (5µM)	0.45	0.2µM
LightCycler Fast Start Hyb Probes	1	x1
ADN	1	
Volumen Total	10	

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

La amplificación se realizó en el termociclador LightCycler® y el programa constó de las etapas de desnaturalización (Programa 1), amplificación (Programa 2), análisis de curvas de fusión o de melting (Programa 3) y enfriamiento (Programa 4), siguiendo los parámetros tal y como se indica a continuación (Tabla 9).

Tabla 9. Programa de amplificación para el sistema LightCycler®. Las adquisiciones se realizaron en segmento 2 de la amplificación y en el segmento 5 del programa de fusión.

Parámetro	Prog. 1	Prog. 2			Prog. 3					Prog. 4
Denominación	Desnat.	Amplificación			Fusión					Enfriamiento
Nº ciclos	1	45			1					1
		Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 4	Seg 5	Seg 1
Temperatura [°C]	95	95	58	72	95	60	45	40	75	40
Tiempo de incubación [s]	600	5	10	15	20	30	30	60	0	60
Tasa de transición de temperatura [°C/s]	20	20	20	20	20	20	20	20	0,15	20
Modo de adquisición	No	No	Punt. F2/F1	No	No	No	No	No	Cont	No

Las T_M específicas (Tabla 10), permitieron detectar la presencia de alelos *FLT3-D835* normales a una T_M de 63°C y alelos mutados con una T_M menor respecto a la del alelo normal, siendo 54°C la T_M del alelo mutado mayoritario (Fig. 14).

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Tabla 10. (A) Cebadores y Sondas empleados en la amplificación de ADNc. (B) Cebadores y Sondas empleados en la amplificación de ADN genómico.

A

<i>FLT3 (GenbankAcc N° 409572)</i>					
	SECUENCIAS	POSICIÓN	TAMAÑO (pb)	% GC	Tm (°C)
Cebadores					
17-F	5'CCGCCAGGAACGTGCTTG 3'	2495-2512	18	66.7	67.54
17-Rc (ADNc)	5' GCAGACGGGCATTGCCCC 3'	608-2591	18	72.2	70.13
Sondas					
<i>FLT3</i> Anchor	5' LC640AAGTCACATATCTTCACCACTTTCCCGT --PH 3'	2519-2546	28	42.9	68.94
<i>FLT3</i> Sensor	5' TCATGATATCTCGAGCCAATCC--FL 3'	2569-2548	22	45.5	62.78

B

<i>FLT3 (GenbankAcc N° 12666292)</i>					
	SECUENCIAS	POSICIÓN	TAMAÑO (pb)	% GC	Tm (°C)
Cebadores					
17-F	5'CCGCCAGGAACGTGCTTG 3'	1824-1807	18	66.7	67.54
17-R (ADN)	5' GCAGCCTCACATTGCCCC 3'	1711-1728	18	66.7	67.42
Sondas					
<i>FLT3</i> Anchor	5' LC640AAGTCACATATCTTCACCACTTTCCCGT --PH 3'	2519-2546	28	42.9	68.94
<i>FLT3</i> Sensor	5' TCATGATATCTCGAGCCAATCC--FL 3'	2569-2548	22	45.5	62.78

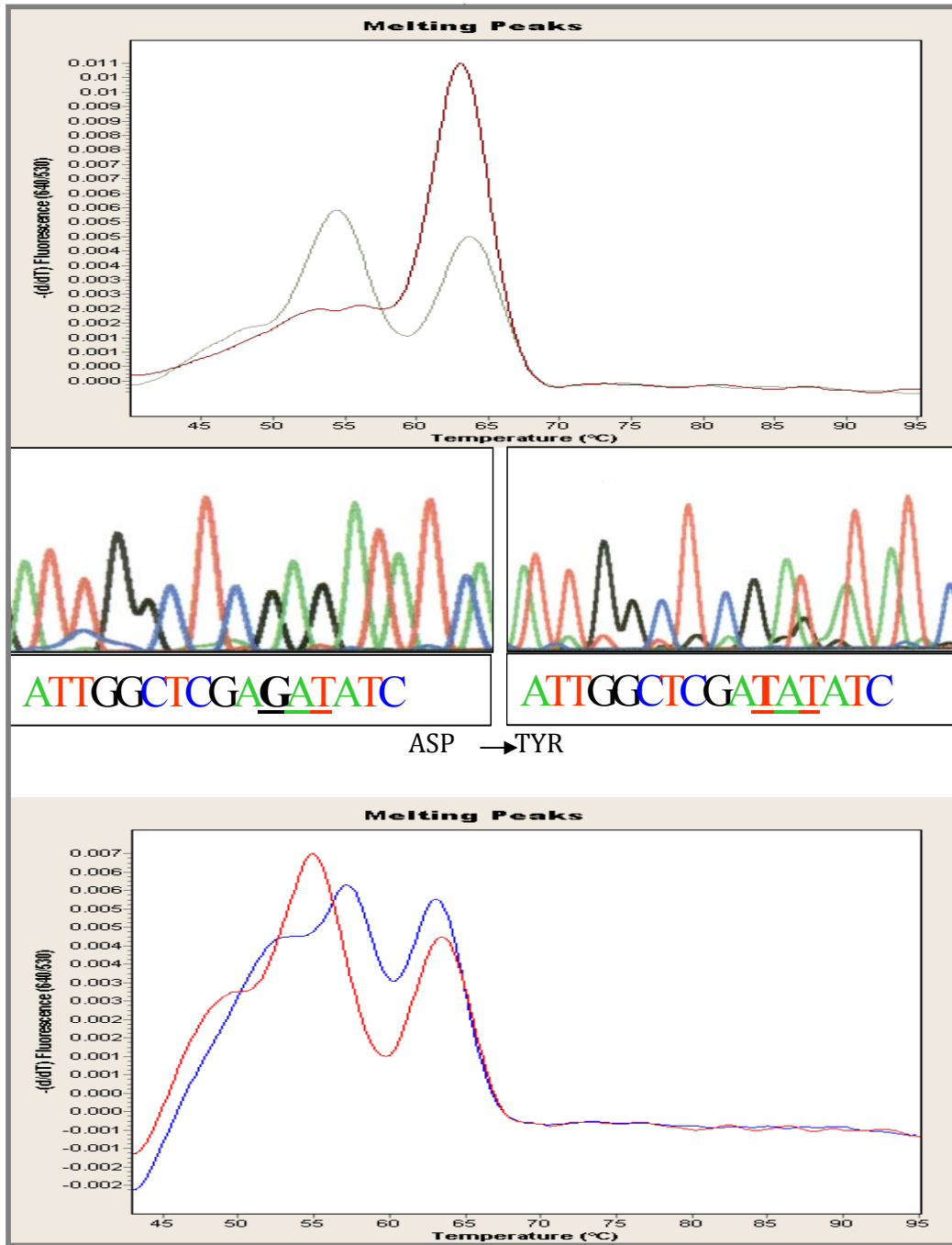


Figura 14.(A) Curvas de fusión del genotipo normal (**rojo**) y mutado (**gris**). El alelo normal origina un pico a 63°C, mientras que el alelo mutado, presenta un pico a 54°C. En este caso la mutación correspondería a una sustitución en el codón 835 de una guanina por una timina, incorporándose el aminoácido tirosina en lugar del ácido aspártico (D835Y). (B) Secuenciación de la mutación D835Y. (C) Curvas de fusión de los dos tipos de mutaciones más frecuentes. Mutación D835Y (**rojo**) presenta el pico normal a 63°C y el mutado a 54°C, la mutación D835V (**azul**) presenta el pico del alelo normal a 63°C y el mutado a 57°C.

3.6.1.2.3. *Análisis del ratio FLT3 mutado/FLT3 normal*

Las muestras donde se detectaron mutaciones para el gen *FLT3* fueron analizadas mediante electroforesis capilar, utilizando el cebador ITD-11F marcado con 6-FAM (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) para las *FLT3*-ITD y el cebador 17-F marcado con HEX (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) para las mutaciones *FLT3*-D835.

Para las *FLT3*-ITD, las mutaciones se amplificaron mediante reacciones de PCR, idénticas a la detección cualitativa, pero empleando 5 ng de ADN genómico para evitar la saturación del lector láser en el análisis posterior, disminuyendo el número de ciclos y añadiendo una extensión final a 60°C de 45 min para evitar el efecto de poliadenilación. En el caso de las mutaciones *FLT3*-D835, estas condiciones fueron consideradas realizando la amplificación a partir del método de Yamamoto *et al.*¹⁰⁴ con el cebador 17-F marcado, para a continuación realizar una digestión enzimática. El ensayo de restricción se realiza con 10 µl de producto de PCR a los que se añade: 1µl (20U) EcoRV (New England Biolabs, Frankfurt, Germany) + 2,5 µl Buffer 3 1X + 0.25 µl BSA + 11.25 µl H₂O, incubando a 37°C durante 1 h.

En el siguiente paso, para ambos tipos de mutaciones, se mezcló 1 µl del producto de PCR con 12 µl de formamida y 0.5 µl del estándar de tamaño molecular GS ROX 500 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). La mezcla se desnaturalizó mediante una incubación a 95°C durante 3-5 min y se transfirió al

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

sistema 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), según las siguientes condiciones:

Polímero: POP7; longitud de capilar: 36 cm; tiempo de inyección: 12 s; tiempo de carrera: 30 min.

Como resultado de estos análisis, para *FLT3*-ITD se observó un pico de 329 pb correspondientes al alelo normal y picos de más de 329 pb correspondientes a los alelos mutados (tamaño variable en función de la duplicación insertada) (Fig. 15A). Para *FLT3*-D835 se observaba un pico 80 pb para el alelo normal y un pico de 129 pb en el caso de que presentara la mutación (Fig. 15B).

Para determinar la abundancia relativa del alelo *FLT3* mutado se calculó el ratio de *FLT3* dividiendo el área del pico correspondiente al alelo mutado y el área del pico del alelo normal:

$$\text{ratio } FLT3 = \frac{\text{área del pico del alelo } FLT3 \text{ mutado}}{\text{área del pico del alelo } FLT3 \text{ normal}}$$

El análisis de los resultados se efectuó mediante el software Genemapper v4.0 (PE AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Para asegurar la calidad y

reproducibilidad de los resultados se han seguido las recomendaciones de análisis descritas por Thiede *et al.*²⁰²

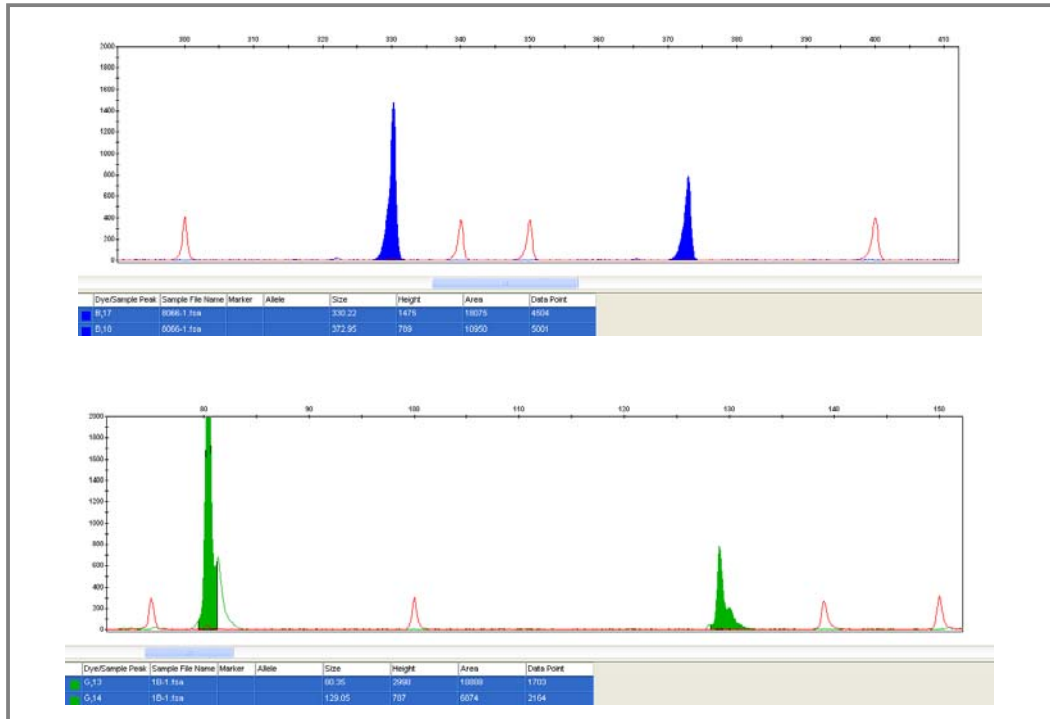


Figura 15. Electroferogramas de las mutaciones *FLT3* obtenidos mediante el análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Las figuras muestran los picos correspondientes a los diferentes alelos y el cálculo del área de cada uno de ellos. Los picos de color rojo representan el estándar de tamaños empleado, GS ROX 500. **(A)** Picos de color azul (6-FAM) uno de 329 pb correspondiente al alelo *FLT3*-ITD normal y otro de 373 pb correspondiente a un alelo *FLT3*-ITD mutado. **(B)** Picos de color verde (HEX) uno de 80 pb correspondiente al alelo *FLT3*-D835 normal y otro de 129 pb correspondiente al alelo *FLT3*-D835 mutado.

3.6.2. Estudio de la expresión de *NPM1* mutado como marcador de EMR

Para el seguimiento de EMR se cuantificó la expresión de *NPM1* mutado siguiendo el método descrito por Gorello *et al.*¹⁸⁶. Este método se basa en utilizar una sonda MGB (que hibrida en la zona de unión de los exones 11 y 12 del gen *NPM1*) y un cebador directo común a todas las mutaciones, así como un cebador reverso que es específico para detectar cada una de ellas.

En este estudio, nos centramos en la detección de la mutación tipo A por ser la mayoritaria y cubrir gran parte del total del espectro de mutaciones en estos pacientes, comparando su valor como marcador de EMR con el del gen *WT1*. Como gen de control se utilizó el gen de la β -glucoronidasa (*GUS*).

La detección y cuantificación de la expresión de ambos genes, se llevó a cabo mediante una amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real en el sistema LightCycler® utilizando ADNc como muestra y los cebadores *cNPM1-F* y *cNPM1AR* en el caso de la mutación A de *NPM1* y los descritos previamente por la Dra. Eva Barragán⁶⁴ en lo referente a *WT1* (Tabla 11), en un volumen total de 10 μ l (Tabla 12).

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Tabla 11. Cebadores y sondas utilizados en el estudio de *NPM1* y *WT1* como marcadores de EMR.

ESTUDIO DE <i>NPM1</i> COMO MARCADOR DE EMR		
SECUENCIAS		GEN
CEBADORES		
<i>NPM1_390_F</i>	5' - GGT CTT AAG GTT GAA GTG TGG T - 3'	<i>NPM1</i>
<i>NPM1_1043_R</i>	5' - TCA ACT GTT ACA GAA ATG AAA TAA GAC G - 3'	<i>NPM1</i>
<i>cNPM1-F</i>	5' - GAA GAA TTG CTT CCG GAT GAC T - 3'	<i>NPM1</i>
<i>cNPM1AR</i>	5' - CTT CCT CCA CTG CCA GAC AGA - 3'	<i>NPM1</i>
<i>WT1A</i>	5' - AGC TGT CGG TGG CCA AGT TGT C - 3'	<i>WT1</i>
<i>WT1B</i>	5' - TGC CTG GGA CAC TGA ACG GTC - 3'	<i>WT1</i>
ENF1102	5' - GAA AAT ATG TGG TTG GAG AGC TCA TT - 3'	<i>GUS</i>
ENF1162	5' - CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A - 3'	<i>GUS</i>
SONDAS		
<i>NPM1-MGB</i>	5' - 6FAM-ACC AAG AGG CTA TTC AA-MGB - 3'	<i>NPM1</i>
<i>WT1M</i>	6FAM-ACC CCT CAA AGC GCC AGC TGG AGT-XT p	<i>WT1</i>
ENP1142	5' - 6FAM- CCA GCA CTC TCG TCG GTG ACT GTT CAXTp - 3'	<i>GUS</i>

Tabla 12. Reactivos empleados en la cuantificación de la expresión del gen *NPM1* mutado por PCR en tiempo real. En el caso de la cuantificación de los genes *WT1* y *GUS*, el protocolo es similar al utilizado para *NPM1* cambiando únicamente los cebadores y la sonda por los correspondientes (*WT1A*, *WT1B*, *WT1M*, ENF1102, ENF1162, y ENP1142 respectivamente).

Reactivo	V (µl)	[] inicial	[] final
H2O estéril	3	----	----
FastStart DNA Master Plus HybProbe	2	----	----
<i>cNPM1-F</i>	1	5 µM	0.5 µM
<i>cNPM1R</i>	1	5 µM	0.5 µM
Sonda <i>NPM1-MGB</i>	1	2 µM	0.2 µM
cADN	2	----	----
Volumen Total	10	----	----

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

El programa de PCR se estableció siguiendo los parámetros adaptados al sistema LightCycler® (Tabla 13). En cada ensayo esta amplificación permitió calcular las copias de los genes *WT1* y *NPM1* a través de una curva patrón. Las curvas patrón para la expresión de *WT1* y *GUS* fueron generadas a partir de muestras de pacientes amplificadas por PCR utilizando los cebadores previamente descritos⁶⁴. Los productos de estas PCR fueron clonados en el vector pCR® II-TOPO, siguiendo las instrucciones proporcionadas en el kit TOPOTM Cloning®, dando así lugar a los plásmidos pCR II-TOPO^{WT1} y pCR II-TOPO^{GUS}. En el caso de *NPM1*, la curva patrón se obtuvo a partir del inserto comercial proporcionado por Ipsogen, Stamford, CT, USA (Fig. 16A). Las curvas estándar fueron preparadas mediante diluciones seriadas de cada uno de los plásmidos clonados en ADN de esperma de salmón (1 µg en 25 µl H₂O), en un rango comprendido entre 1.3×10^6 - 1.3×10^2 para el plásmido pCR II-TOPO^{WT1}, 2×10^4 - 2×10^2 para el plásmido pCR II-TOPO^{GUS} y 1×10^5 - 1×10^1 para la mutación A de *NPM1*.

Para el cálculo del ciclo umbral (C_t ; C_p ; Crossing Point) se utilizó el software del Lightcycler®, donde cada punto de la curva patrón se identificaba con un número de copias conocido en base a un valor C_t determinado, de tal manera que para cada muestra se pudo calcular el número de copias existente en función del valor C_t que presentaban (Fig. 16B). El coeficiente de regresión obtenido para las curvas estándar de *WT1* y *NPM1* mutado fue 0.99. Para *WT1*, la media \pm desviación estándar estimada fue de -3.53 ± 0.1 para la pendiente, y 42.01 ± 0.93 para la ordenada. En el caso de *NPM1*, para la pendiente se obtuvo una media \pm desviación estándar estimada de -3.47 ± 0.18 , y de 41.79 ± 0.97 para la ordenada.

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Las copias de los genes *NPM1* y *WT1* se normalizaron tomando como referencia las copias del gen de control *GUS* calculadas a partir de su correspondiente curva patrón (Fig. 16B). Los resultados fueron descritos como número de copias normalizadas (NCN), parámetro que se obtiene a partir del número de copias del gen diana de interés, en este caso *NPM1* o *WT1*, en relación con 10^4 copias del gen de control *GUS*. Las muestras para las cuales el C_t de *GUS* era > 30 ciclos, fueron excluidas. La máxima sensibilidad que se detectó durante los ensayos, correspondió a 1.25 NCN de *WT1* y 1.12 NCN de *NPM1*.

Las cuantificaciones se realizaron en tubos independientes para cada gen y por duplicado para cada muestra, tomándose como valor C_t el promedio de las dos réplicas de cada muestra para averiguar el número de copias existentes.

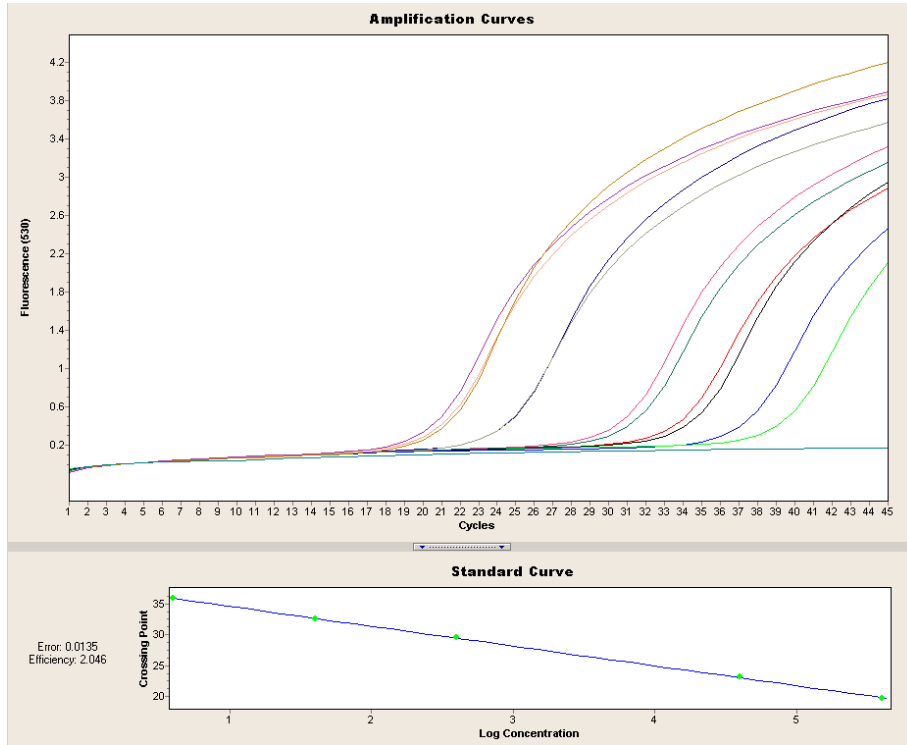
PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

Tabla 13. Programa de PCR adaptado al sistema LightCycler® para la cuantificación de la expresión de los genes *GUS*, *WT1* y *NPM1* mutado. El ciclo umbral (C_t) indica el instante en el que el sistema comienza a detectar el incremento de la señal de fluorescencia asociada con el crecimiento exponencial del producto de PCR.

Parámetros	Programa 1	Programa 2			Programa 4
Denominación	Desnaturalización	Cuantificación Ciclos Taqman			Enfriamiento
Nº ciclos	1	45			1
		Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 1
Temperatura [°C]	95	95	55	72	40
Tiempo de incubación [s]	600	1	35	20	30
Tasa de transición de temperatura [°C/s]	20	20	20	20	20
Modo de adquisición	No	No	Puntual F2/F1	No	No

PACIENTES Y MÉTODOS DE ESTUDIO

A



B

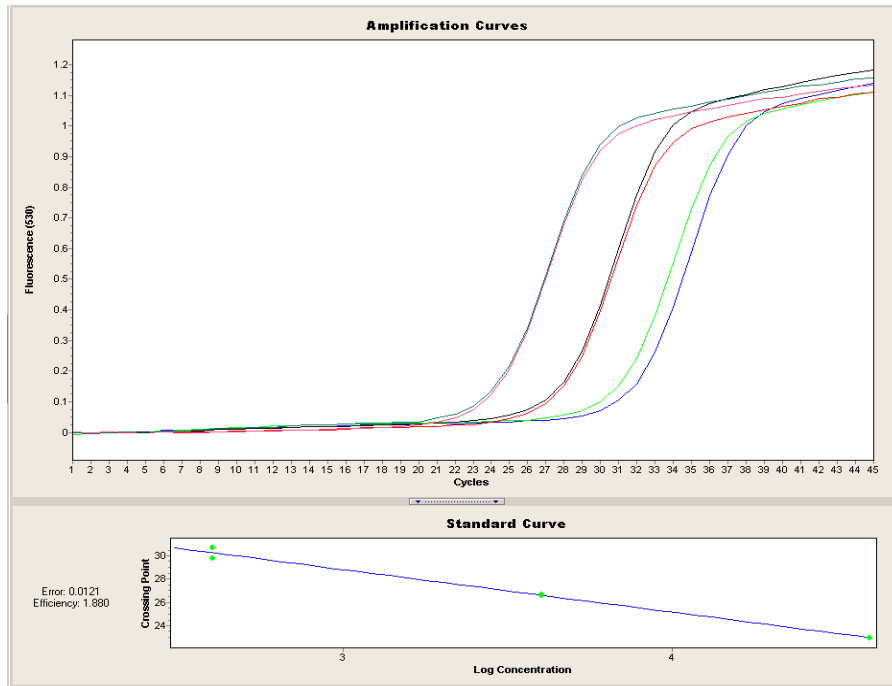


Figura 16. Curvas de amplificación y curvas patrón de los genes *NPM1* (A) y *GUS* (B) obtenidas en el sistema LightCycler®.

3.7. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Para analizar las diferencias en la distribución de las variables categóricas entre grupos de individuos se utilizó el test Chi-cuadrado, con la corrección de Yates si era necesario. El test t-Student, se utilizó para analizar variables continuas con una distribución normal, y los tests Kruskal Wallis y U Mann-Whitney, para aquellos datos donde fallaba la prueba de normalidad.

La estimación de la SG, SLR y SLE, se calculó mediante el método de Kaplan-Meier, utilizando el test log-rank para comparaciones entre grupos.

Para todas las estimaciones en las cuales el evento recaída, fuera considerado como una variable de valoración, tanto la recaída molecular como la hematológica, se consideraron como eventos no censurados.

Para establecer la tasa de SG, se consideró el porcentaje de pacientes vivos y el porcentaje de muertes en el intervalo de tiempo comprendido desde la fecha del diagnóstico hasta el momento de la muerte por cualquier causa. La SLR se calculó considerando el intervalo de tiempo comprendido desde la desde la fecha en la que se alcanza la RC hasta la recaída. En el análisis de SLE, la recaída y la muerte fueron consideradas eventos no censurados, cualquiera ocurriendo primero después de la RC.

El análisis multivariante se realizó según el modelo de riesgos proporcionados de Cox, considerando diferencias significativas entre grupos

cuando $p < 0.05$ en un test de dos colas. Las características seleccionadas para la inclusión en el análisis multivariante, fueron aquellas para las cuales había alguna indicación de asociación significativa en el análisis univariante ($p < 0,1$), así como, aquellas disponibles para las cuales estudios previos, han demostrado una posible asociación.

Para la realización de los análisis estadísticos se utilizó la plataforma SPSS 13.0 Statistical package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

3.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los datos clínicos, muestras biológicas y participación en ensayos clínicos terapéuticos que se han recogido en esta memoria, requirieron el consentimiento informado de los pacientes y el dictamen favorable por parte de los Comités Éticos de Investigación Clínica de los Centros participantes (Hospital Universitario La Fe, Valencia; Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia; Hospital General Universitario, Valencia; Hospital General Universitario, Alicante; Hospital General Universitario, Castellón; Hospital General Universitario Santa Lucía, Cartagena; Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia; Hospital General Universitario, Albacete).

4. RESULTADOS

4.1. DETECCIÓN E INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES *FLT3*-ITD Y *FLT3*-D835

La detección cualitativa de la mutación *FLT3*-ITD se llevó a cabo en un total de 389 pacientes. La mutación fue detectada en 95 pacientes (24%). Cuando se consideraron únicamente los pacientes con citogenética de riesgo intermedio (n=245), la mutación *FLT3*-ITD se detectó en el 29% de los casos (n=71).

Por lo que respecta a la mutación *FLT3*-D835, la determinación se realizó en 276 pacientes, resultando positiva en 19 de ellos (7%). En los pacientes con cariotipo intermedio (n=173), la mutación se detectó en el 5% de los casos (n=15).

Cuatro pacientes presentaron simultáneamente la mutación *FLT3*-ITD y *FLT3*-D835, por lo que fueron 110 pacientes de la serie global, un 28%, los que presentaron al menos una mutación activante en *FLT3*.

El análisis de la secuencia llevado a cabo en 20 muestras *FLT3*-ITD positivas y 10 muestras con la mutación D835, mostró que en todos los casos, la mutación ITD consistía en duplicaciones que mantenían el marco de lectura en el exón 11, mientras que las mutaciones D835, correspondían a una sustitución del residuo de aspártico por tirosina (8 casos) o por histidina (2 casos).

RESULTADOS

En 86 muestras positivas para la mutación *FLT3*-ITD y en 15 muestras positivas para la mutación *FLT3*-D385, se procedió a determinar el ratio *FLT3 mutado/FLT3 normal* mediante análisis por Genescan.

El rango del ratio de la mutación *FLT3*-ITD quedó comprendido entre 0.06 y 10.55 con una mediana de 0.80. La mediana de longitud de las inserciones fue de 42 pb (rango: 9-177). En el 91% de los casos, se detectó un único tamaño para el alelo mutado, sin embargo, en el 9% restante de las muestras, el análisis mostró dos subpoblaciones celulares que diferían en la correspondiente longitud para dicho alelo.

En el caso de *FLT3*-D385, se obtuvo un rango entre 0.12 y 0.97, con una mediana de 0.36.

4.2. ASOCIACIÓN DE LAS MUTACIONES *FLT3* CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS AL DIAGNÓSTICO

Las principales características clínicas, demográficas y biológicas de los pacientes en función de las mutaciones *FLT3*-ITD y del ratio al diagnóstico, están recogidas en las tablas 14, 15 y 16.

Al analizar la mutación *FLT3*-ITD cualitativa en relación con las características clínico-biológicas de los pacientes de nuestra serie (Tabla 14), se encontró que los pacientes con esta alteración al diagnóstico, presentaban un recuento elevado de leucocitos ($p<0.001$), blastos en médula ósea ($p<0.001$), niveles elevados de GOT ($p=0.018$), y de LDH ($p<0.001$). El análisis mostró igualmente asociación de *FLT3*-ITD con un ECOG \geq 2 ($p=0.008$), con los subtipos FAB M1 y M4 ($p=0.011$), citogenética de riesgo intermedio ($p=0.001$) así como con las mutaciones *NPM1* ($p=0.025$).

RESULTADOS

Tabla 14. Asociación de las características clínico-biológicas de los pacientes con LMA *de novo* y el estado mutacional de *FLT3*-ITD al diagnóstico.

PACIENTES			
CARACTERÍSTICA	Total		p
	<i>FLT3</i> -ITD Positivos	<i>FLT3</i> -ITD Negativos	
	n (%)	n (%)	
Total	95 (25)	294 (75)	
Edad, años			
≤ 65	68 (72)	190 (65)	0.315
> 65	27 (28)	101 (35)	
Mediana (rango)	59 (20-81)	62 (17-93)	
Sexo			
Masculino	48 (51)	172 (59)	0.191
Femenino	47 (49)	122 (41)	
Leucocitos, × 10⁹/L			
≤ 50	29 (40)	204 (83)	<0.001
> 50	43 (60)	43 (17)	
Mediana (rango)	59 (2-342)	7 (1-396)	
Blastos MO, %			
≤ 70	15 (23)	129 (58)	<0.001
> 70	51 (77)	95 (42)	
Mediana (rango)	90 (23-100)	67 (5-100)	
GOT, UI			
≤ 40	21 (68)	115 (87)	0.018
>40	10 (32)	18 (13)	
Mediana (rango)	30 (15-212)	21 (8-400)	
GTP, UI			
≤ 40	23 (72)	112 (82)	0.225
> 40	9 (28)	25 (18)	
Mediana (rango)	26 (11-156)	20 (6-172)	
Creatinina, mg/dl			
≤ 1,2	22 (67)	109 (78)	0.175
> 1,2	11 (33)	30 (22)	
Mediana (rango)	0,9 (0,4-3,9)	0,9 (0,5-3,8)	
Bilirrubina, mg/dl			
≤ 1,2	28 (88)	118 (87)	1,000
> 1,2	4 (12)	18 (13)	
Mediana (rango)	0,6 (0,2-3,3)	0,7 (0,2-7,6)	
LDH, mg/dl			
≤ 600	2 (7)	76 (55)	<0.001
> 600	29 (93)	63 (45)	
Mediana (rango)	1314 (427-6762)	543 (130-25000)	
ECOG			
0-1	35 (56)	155 (74)	0.008
≥2	28 (44)	56 (26)	
FAB			
M0	3 (6)	15 (7)	0.011
M1	18 (38)	41 (20)	
M2	5 (10)	65 (32)	
M4	13 (27)	36 (18)	
M4eo	0 (0)	2 (1)	
M5	6 (13)	29 (14)	
M6	0 (0)	11 (5)	
M7	3 (6)	5 (3)	
Citogenética			
Favorable	2 (3)	26 (10)	0.001
Intermedio	71 (90)	174 (69)	
Desfavorable	6 (7)	54 (21)	
<i>NPM1</i>			
Mutado	44 (49)	98 (36)	0.025
No mutado	45 (51)	176 (64)	

RESULTADOS

Por lo que respecta a la detección cuantitativa de las mutaciones *FLT3*-ITD, no se encontraron diferencias en ninguna variable clínico-biológica entre los pacientes con ratio ≤ 0.8 y los pacientes con ratio > 0.8 (Tabla 15).

RESULTADOS

Tabla 15. Características clínico-biológicas de los pacientes con LMA *de novo* en función del ratio *FLT3*-ITD.

PACIENTES			
CARACTERÍSTICA	Total		p
	<i>FLT3</i> -ITD Ratio ≤ 0.8	<i>FLT3</i> -ITD Ratio > 0.8	
	n (%)	n (%)	
Total	53 (62)	33 (38)	
Edad, años			
≤ 65	35 (66)	26 (79)	0.315
> 65	18 (34)	7 (21)	
Mediana (rango)	62 (20-81)	58 (23-77)	
Sexo			
Masculino	30 (57)	14 (42)	0.268
Femenino	23 (43)	19 (58)	
Leucocitos, × 10⁹/L			
≤ 50	19 (44)	6 (29)	0.282
> 50	24 (56)	15 (71)	
Mediana (rango)	56 (4-342)	75 (2-324)	
Blastos MO, %			
≤ 70	10 (26)	4 (21)	1,000
> 70	29 (74)	15 (79)	
Mediana (rango)	90 (28-100)	90 (23-100)	
GOT, UI			
≤ 40	14 (70)	6 (60)	0.690
>40	6 (30)	4 (40)	
Mediana (rango)	30 (16-212)	34 (15-73)	
GTP, UI			
≤ 40	14 (70)	8 (73)	1,000
> 40	6 (30)	3 (27)	
Mediana (rango)	29 (11-156)	21 (11-68)	
Creatinina, mg/dl			
≤ 1,2	14 (67)	7 (64)	1,000
> 1,2	7 (33)	4 (36)	
Mediana (rango)	0,9 (0,5-3,9)	1,1 (0,7-2,0)	
Bilirrubina, mg/dl			
≤ 1,2	17 (81)	10 (100)	0.277
> 1,2	4 (19)	0 (0)	
Mediana (rango)	0,6 (0,2-9,4)	0,6 (0,3-1,1)	
LDH, mg/dl			
≤ 600	1 (5)	0 (0)	1,000
> 600	19 (95)	10 (100)	
Mediana (rango)	1203 (502-5882)	2606 (1068-6462)	
ECOG			
0-1	24 (65)	9 (47)	0.257
≥2	13 (35)	10 (53)	
FAB			
M0	2 (7)	0 (0)	0.772
M1	8 (27)	6 (46)	
M2	4 (13)	1 (8)	
M4	10 (33)	3 (23)	
M4eo	0 (0)	0 (0)	
M5	4 (13)	2 (15)	
M6	0 (0)	0 (0)	
M7	2 (7)	1 (8)	
Citogenética			
Favorable	1 (2)	1 (3)	0.570
Intermedio	36 (88)	28 (94)	
Desfavorable	4 (10)	1 (3)	
<i>NPM1</i>			
Mutado	24 (45)	17 (55)	0.499
No mutado	29 (55)	14 (45)	

RESULTADOS

Sin embargo, cuando se consideraron todos los pacientes se observó un incremento progresivo en el número de leucocitos ($p < 0.001$), los niveles de GOT ($p = 0.027$) y los niveles de LDH ($p < 0.001$) en pacientes sin mutación *FLT3*, con mutación *FLT3* ratio ≤ 0.8 y mutación ratio > 0.8 (Tabla 16).

RESULTADOS

Tabla 16. Asociación de las características clínico-biológicas en pacientes negativos para *FLT3*-ITD, pacientes con ratio *FLT3*-ITD \leq 0.8 y pacientes con ratio *FLT3*-ITD $>$ 0.8.

PACIENTES				
CARACTERÍSTICA	Total			p
	<i>FLT3</i> -ITD Negativos	<i>FLT3</i> -ITD Ratio \leq 0.8	<i>FLT3</i> -ITD Ratio $>$ 0.8	
Total	n (%)	n (%)	n (%)	
Edad, años				
\leq 65	190 (65)	35 (66)	26 (79)	0.296
$>$ 65	101 (35)	18 (34)	7 (21)	
Mediana (rango)	62 (17-93)	62 (20-81)	58 (23-77)	
Sexo				
Masculino	172 (59)	30 (57)	14 (42)	0.209
Femenino	122 (41)	23 (43)	19 (58)	
Leucocitos, $\times 10^9/L$				
\leq 50	204 (83)	19 (44)	6 (29)	<0.001
$>$ 50	43 (17)	24 (56)	15 (71)	
Mediana (rango)	7 (1-396)	56 (4-342)	75 (2-324)	
Blastos MO, %				
\leq 70	129 (58)	10 (26)	4 (21)	<0.001
$>$ 70	95 (42)	29 (74)	15 (79)	
Mediana (rango)	67 (5-100)	90 (28-100)	90 (23-100)	
GOT, UI				
\leq 40	115 (87)	14 (70)	6 (60)	0.027
$>$ 40	18 (13)	6 (30)	4 (40)	
Mediana (rango)	21 (8-400)	30 (16-212)	34 (15-73)	
GTP, UI				
\leq 40	112 (82)	14 (70)	8 (73)	0.396
$>$ 40	25 (18)	6 (30)	3 (27)	
Mediana (rango)	20 (6-172)	29 (11-156)	21 (11-68)	
Creatinina, mg/dl				
\leq 1,2	109 (78)	14 (67)	7 (64)	0.306
$>$ 1,2	30 (22)	7 (33)	4 (36)	
Mediana (rango)	0,9 (0,5-3,8)	0,9 (0,5-3,9)	1,1 (0,7-2,0)	
Bilirrubina, mg/dl				
\leq 1,2	118 (87)	17 (81)	10 (100)	0.341
$>$ 1,2	18 (13)	4 (19)	0 (0)	
Mediana (rango)	0,7 (0,2-7,6)	0,6 (0,2-9,4)	0,6 (0,3-1,1)	
LDH, mg/dl				
\leq 600	76 (55)	1 (5)	0 (0)	<0.001
$>$ 600	63 (45)	19 (95)	10 (100)	
Mediana (rango)	543 (130-25000)	1203 (502-5882)	2606 (1068-6462)	
ECOG				
0-1	155 (74)	24 (65)	9 (47)	0.042
\geq 2	56 (26)	13 (35)	10 (53)	
FAB				
M0	15 (7)	2 (7)	0 (0)	0.182
M1	41 (20)	8 (27)	6 (46)	
M2	65 (32)	4 (13)	1 (8)	
M4	36 (18)	10 (33)	3 (23)	
M4eo	2 (1)	0 (0)	0 (0)	
M5	29 (14)	4 (13)	2 (15)	
M6	11 (5)	0 (0)	0 (0)	
M7	5 (3)	2 (7)	1 (8)	
Citogenética				
Favorable	26 (10)	1 (2)	1 (3)	0.008
Intermedio	174 (69)	36 (88)	28 (94)	
Desfavorable	54 (21)	4 (10)	1 (3)	
<i>NPM1</i>				
Mutado	98 (36)	24 (45)	17 (55)	0.069
No mutado	176 (64)	29 (55)	14 (45)	

RESULTADOS

En cuanto a la mutación *FLT3*-D835 y al ratio *FLT3*-D835, no se encontraron asociaciones significativas con ninguna de las características clínico-biológicas de los pacientes.

4.3. IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS MUTACIONES *FLT3*

4.3.1. Influencia de las mutaciones *FLT3* en la respuesta terapéutica

No se encontró asociación significativa entre la mutación *FLT3*-ITD y el resultado de la inducción. De igual manera tampoco se observaron diferencias en la respuesta terapéutica entre los pacientes con ratio *FLT3*-ITD \leq 0.8 y los pacientes con ratio $>$ 0.8 (Tabla 17).

En cuanto a la mutación *FLT3*-D835, tampoco se encontraron asociaciones significativas con el resultado del tratamiento de inducción.

RESULTADOS

Tabla 17. Resultado del tratamiento en la población analizada, en función del estado mutacional y del ratio *FLT3*-ITD.

PACIENTES				
RESPUESTA A LA INDUCCIÓN	Tratados con quimioterapia			<i>p</i>
	<i>FLT3</i> -ITD Negativos	<i>FLT3</i> -ITD Ratio ≤ 0.8	<i>FLT3</i> -ITD Ratio > 0.8	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Total	211 (100)	34 (100)	20 (100)	
REMISIÓN COMPLETA	147 (70)	22 (64)	12 (60)	0.839
RESISTENCIA	37 (18)	6 (18)	5 (25)	
MUERTE	27 (12)	6 (18)	3 (15)	

4.3.2. Influencia de las mutaciones *FLT3* en la supervivencia

La SG, SLE y SLR en la serie a los 5 años fue 31%, 34% y 46% respectivamente.

El análisis univariante mostró que las variables que modificaban el pronóstico en el caso de la SG fueron los niveles de LDH ($p=0.027$), la edad ($p<0.001$), el subtipo FAB ($p<0.001$), la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD ($p=0.011$), el estado mutacional combinado de *FLT3* y *NPM1* ($p=0.047$) y el cariotipo ($p<0.001$). En lo que respecta a la SLE eran la edad ($p<0.001$), las mutaciones *FLT3*-ITD ($p=0.008$), la carga alélica *FLT3*-ITD ($p=0.030$), el estado mutacional combinado de *FLT3* y *NPM1* ($p=0.027$) y la citogenética ($p=0.011$). Los factores que modificaban el pronóstico en cuanto a SLR fueron la edad ($p<0.001$), las mutaciones *FLT3* ($p=0.002$), la carga alélica *FLT3*-ITD ($p=0.004$), el estado

RESULTADOS

mutacional combinado de *FLT3* y *NPM1* ($p=0.005$) y el cariotipo ($p=0.025$) (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis univariante de factores pronóstico para SG, SLE y SLR

PACIENTES			
CARACTERÍSTICA	SUPERVIVENCIA		
	SG	SLE	SLR
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
LEUCOCITOS	0.104	0.507	0.263
LDH	0.027	0.102	0.139
BLASTOS M.O.	0.428	0.361	0.797
EDAD	<0.001	<0.001	<0.001
FAB	<0.001	0.565	0.530
SEXO	0.263	0.555	0.576
MUTACIONES <i>FLT3</i> -ITD	0.011	0.008	0.002
RATIO <i>FLT3</i> -ITD	0.056	0.030	0.004
MUTACIONES <i>NPM1</i>	0.153	0.873	0.956
COEXISTENCIA <i>FLT3</i> - <i>NPM1</i>	0.047	0.027	0.005
CARIOTIPO	<0.001	0.011	0.025

Dada la importante asociación entre las mutaciones de *FLT3* y el grupo de riesgo citogenético intermedio, se procedió a analizar estas mismas variables seleccionando de manera específica esta cohorte de pacientes (Tabla 19). Los factores que modificaban el pronóstico en lo que respecta a la SG fueron la edad ($p<0.001$), el subtipo FAB ($p<0.001$), el estado mutacional combinado de *FLT3* y

RESULTADOS

NPM1 (p=0.005), la presencia de mutaciones *FLT3* (p=0.001) y la carga alélica *FLT3*-ITD (p=0.004) (Fig.17A y 17B). En el caso de la SLE y la SLR, fueron la edad (SLE p=0.002; SLR p<0.001), las mutaciones *FLT3*-ITD (SLE p=0.009; SLR p=0.006) (Fig.17C y 17E), la carga alélica *FLT3*-ITD (SLE p=0.021; SLR p=0.005) (Fig.17D y 17F) y el estado mutacional combinado de *FLT3* y *NPM1* (SLE p=0.036; SLR p=0.019).

Tabla 19. Análisis univariante de factores pronóstico para SG, SLE y SLR en pacientes con citogenética de riesgo intermedio

PACIENTES CITOGÉNÉTICA RIESGO INTERMEDIO			
CARACTERÍSTICA	SUPERVIVENCIA		
	SG	SLE	SLR
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
LEUCOCITOS	0.088	0.314	0.267
LDH	0.051	0.075	0.110
BLASTOS M.O.	0.272	0.748	0.706
EDAD	<0.001	0,002	<0.001
FAB	<0.001	0.843	0.589
SEXO	0.502	0.345	0.429
MUTACIONES <i>FLT3</i> -ITD	0.001	0.009	0.006
RATIO <i>FLT3</i> -ITD	0.004	0.021	0.005
MUTACIONES <i>NPM1</i>	0.080	0.385	0.620
COEXISTENCIA <i>FLT3</i> - <i>NPM1</i>	0.005	0.036	0.019

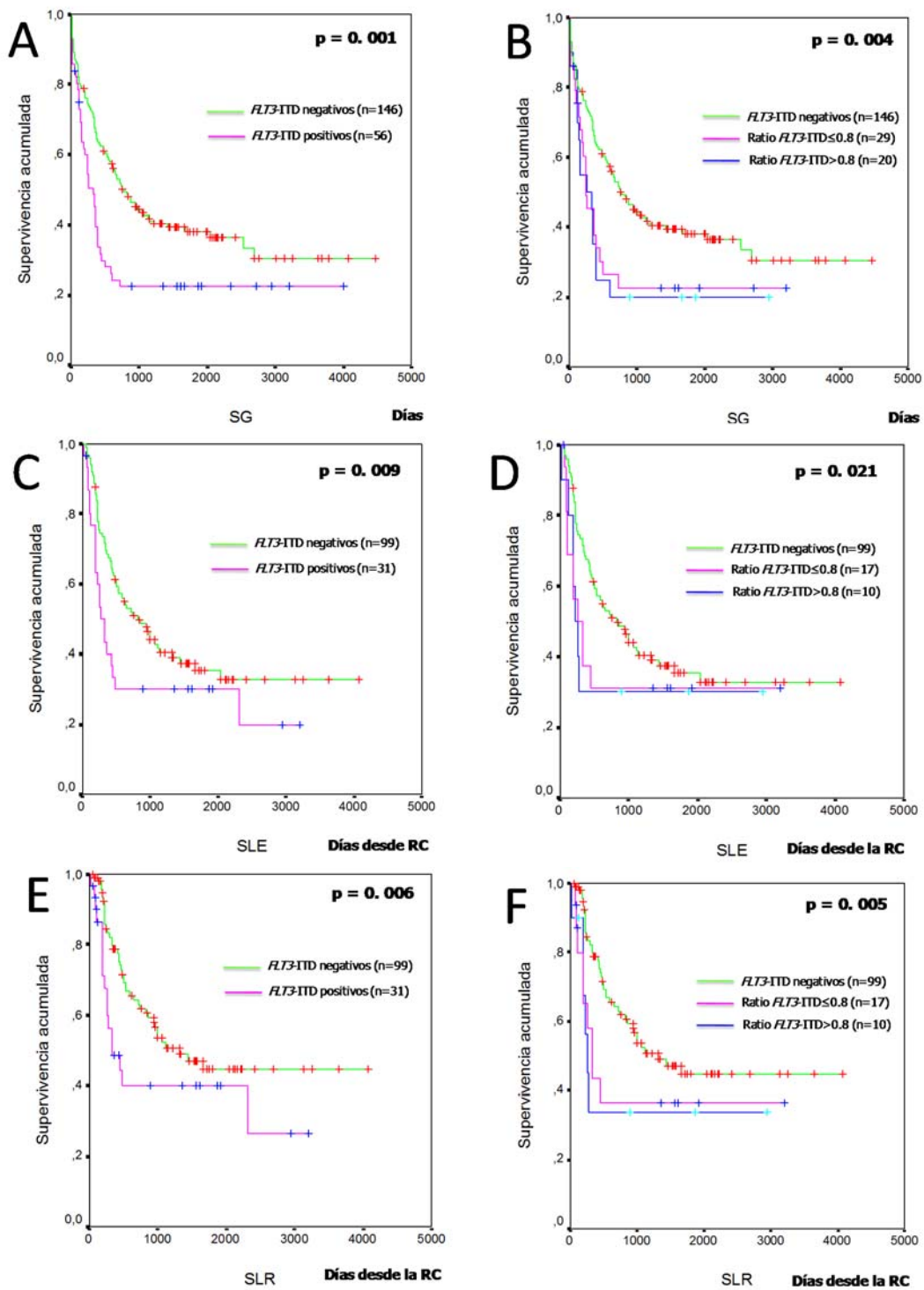


Figura 17. Influencia pronóstica de las mutaciones $FLT3$ -ITD [(A) SG, (C) SLE, (E) SLR] y el ratio $FLT3$ -ITD [(B) SG, (D) SLE, (F) SLR] en los pacientes con citogenética de riesgo intermedio.

RESULTADOS

Para eliminar la posible influencia del trasplante, se realizó el mismo análisis en los pacientes de riesgo citogenético intermedio considerando sólo los sometidos a tratamiento intensivo con quimioterapia o TPH autólogo, encontrando igualmente que la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD confería un pronóstico desfavorable en términos de SG, SLE, y SLR (SG $p < 0.001$; SLE $p < 0.001$; SLR $p < 0.001$). En lo que respecta al ratio *FLT3*-ITD, el mejor pronóstico correspondió a los pacientes negativos para la mutación tanto para SG, como SLE y SLR, con peor supervivencia conforme aumentaba la carga alélica *FLT3*-ITD en los pacientes (SG $p < 0.001$; SLE $p < 0.001$; $p < 0.001$).

En los pacientes sometidos a trasplante alogénico no se encontraron diferencias en función del estado mutacional o la carga alélica de *FLT3*-ITD.

4.4. DETECCIÓN E INCIDENCIA DE LAS MUTACIONES *NPM1*

La determinación de la presencia de mutaciones *NPM1* se llevó a cabo en 366 pacientes con LMA *de novo*. Las mutaciones fueron detectadas en 145 casos (40%). 114 pacientes (79%) presentaron la mutación tipo A (ins TCTG), 17 pacientes (12%) la mutación tipo B (ins CATG), 9 pacientes (6%) la mutación tipo D (ins CCTG), y 5 pacientes (3%) la mutación P (ins TACCTTCC). Cuando se consideraba únicamente a los pacientes con cariotipo de riesgo intermedio (n=235), las mutaciones de *NPM1* fueron detectadas en el 44% de los casos (n=103). La mutación tipo A se detectó en el 81% los casos (n=83), la tipo B en el 13% (n=14) y la mutación tipo D en el 6% (n=6) de este grupo de pacientes.

4.5. *NPM1* EN RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICO-BIOLÓGICAS

Las características clínicas y biológicas de los pacientes con LMA *de novo* en función del estado mutacional de *NPM1* al diagnóstico, están recogidas en la tabla 20. En el total de pacientes de la serie, las mutaciones *NPM1* se asociaron con la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD (p=0.025), el sexo femenino (p=0.041), recuentos bajos de leucocitos (p<0.001), alto número de blastos en médula ósea (p<0.001), bajos niveles de creatinina (p=0.022), niveles elevados de LDH (p<0.001), los subtipos FAB M1, M2, M4 y M5 (p=0.036), y el cariotipo de riesgo intermedio (p<0.001).

RESULTADOS

Tabla 20. Características clínicas y biológicas de los pacientes con LMA *de novo* en función del estado mutacional de *NPM1* al diagnóstico.

PACIENTES			
CARACTERÍSTICA	Total		p
	<i>NPM1</i> Positivos	<i>NPM1</i> Negativos	
	n (%)	n (%)	
Total	145 (40)	221 (60)	
Edad, años			
≤ 65	93 (66)	150 (68)	0.649
> 65	49 (34)	71 (32)	
Mediana (rango)	61 (28-93)	62 (17-91)	
Sexo			
Masculino	72 (49)	134 (61)	0.041
Femenino	73 (51)	87 (39)	
Leucocitos, × 10⁹/L			
≤ 50	61 (58)	154 (80)	<0.001
> 50	45 (43)	38 (20)	
Mediana (rango)	33 (1-396)	7 (1-342)	
Blastos MO, %			
≤ 70	36 (37)	100 (58)	0.001
> 70	62 (63)	73 (42)	
Mediana (rango)	85 (10-100)	66 (5-100)	
GOT, UI			
≤ 40	46 (78)	80 (85)	0.282
>40	13 (22)	14 (15)	
Mediana (rango)	21 (12-400)	21 (8-212)	
GTP, UI			
≤ 40	44 (75)	80 (81)	0.424
> 40	15 (25)	19 (19)	
Mediana (rango)	21 (6-156)	21 (6-172)	
Creatinina, mg/dl			
≤ 1,2	39 (65)	83 (83)	0.022
> 1,2	21 (35)	18 (17)	
Mediana (rango)	1.0 (0.5-3.8)	0.9 80.5-3.9)	
Bilirrubina, mg/dl			
≤ 1,2	51 (86)	87 (89)	0.801
> 1,2	8 (14)	11 (11)	
Mediana (rango)	0.6 (0.2-9.4)	0.7 (0.3-7.6)	
LDH, mg/dl			
≤ 600	15 (26)	58 (58)	<0.001
> 600	43 (74)	42 (42)	
Mediana (rango)	873 (290-25000)	501 (130-8500)	
ECOG			
0-1	63 (66)	118 (72)	0.325
≥2	32 (34)	45 (28)	
FAB			
M0	2 (2)	13 (9)	0.036
M1	25 (30)	29 (19)	
M2	15 (18)	51 (34)	
M4	20 (24)	25 (16)	
M4eo	1 (1)	1 (1)	
M5	15 (19)	19 (12)	
M6	2 (2)	9 (6)	
M7	3 (4)	5 (3)	
Citogenética			
Favorable	3 (3)	21 (10)	<0.001
Intermedio	103 (94)	132 (66)	
Desfavorable	4 (4)	48 (24)	
FLT3-ITD			
Positivo	44 (31)	45 (20)	0.025
Negativo	98 (69)	176 (80)	

4.6. IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS MUTACIONES *NPM1*

4.6.1. Influencia de las mutaciones *NPM1* en la respuesta terapéutica

Los pacientes que presentaban mutaciones *NPM1* llevaban asociada una mayor tasa de RC ($p < 0.001$). El análisis para la coexistencia de mutaciones *NPM1* y *FLT3* mostró un mayor número de RC y menos resistencias al tratamiento en los casos *NPM1* positivos y *FLT3*-ITD negativos ($p = 0.018$) (Tabla 21).

Tabla 21. Respuesta terapéutica en los pacientes tratados con quimioterapia intensiva en función del estado mutacional *NPM1* y *FLT3*.

PACIENTES							
RESPUESTA A LA INDUCCIÓN	Tratados con quimioterapia		<i>p</i>	Tratados con quimioterapia			<i>p</i>
	<i>NPM1</i> Positivos	<i>NPM1</i> Negativos		<i>FLT3</i> -ITD negativo & <i>NPM1</i> negativo	<i>FLT3</i> -ITD negativo & <i>NPM1</i> POSITIVO	<i>FLT3</i> -ITD POSITIVO & <i>NPM1</i> positivo o negativo	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	n (%)	
Total	97 (100)	161 (100)		137 (100)	61 (100)	62 (100)	
REMISIÓN COMPLETA	72 (74)	105 (65)	<0.001	92 (67)	47 (77)	39 (63)	0.018
RESISTENCIA	5 (5)	40 (25)		31 (23)	3 (5)	11 (18)	
MUERTE	20 (21)	16 (10)		14 (10)	11 (18)	12 (19)	

4.6.2. Impacto de la asociación entre *NPM1* y *FLT3* en la supervivencia. Influencia del ratio *FLT3*-ITD

Para analizar el impacto pronóstico de la coexistencia de mutaciones *NPM1* y *FLT3*-ITD, consideramos los grupos *FLT3*-/*NPM1*-, *FLT3*-/*NPM1*+, y *FLT3*+/*NPM1*- ó *FLT3*+/*NPM1*+ no sometidos a TPH alogénico. El análisis mostró mayor SG, SLE y SLR en los pacientes *NPM1* positivos sin mutación *FLT3*-ITD, tanto en la serie global de pacientes (SG $p=0.004$; SLE $p=0.002$; SLR $p<0.001$), como cuando se seleccionaron específicamente los pacientes de riesgo intermedio (SG $p=0.002$; SLE $p=0.008$; SLR $p=0.004$) (Fig. 18).

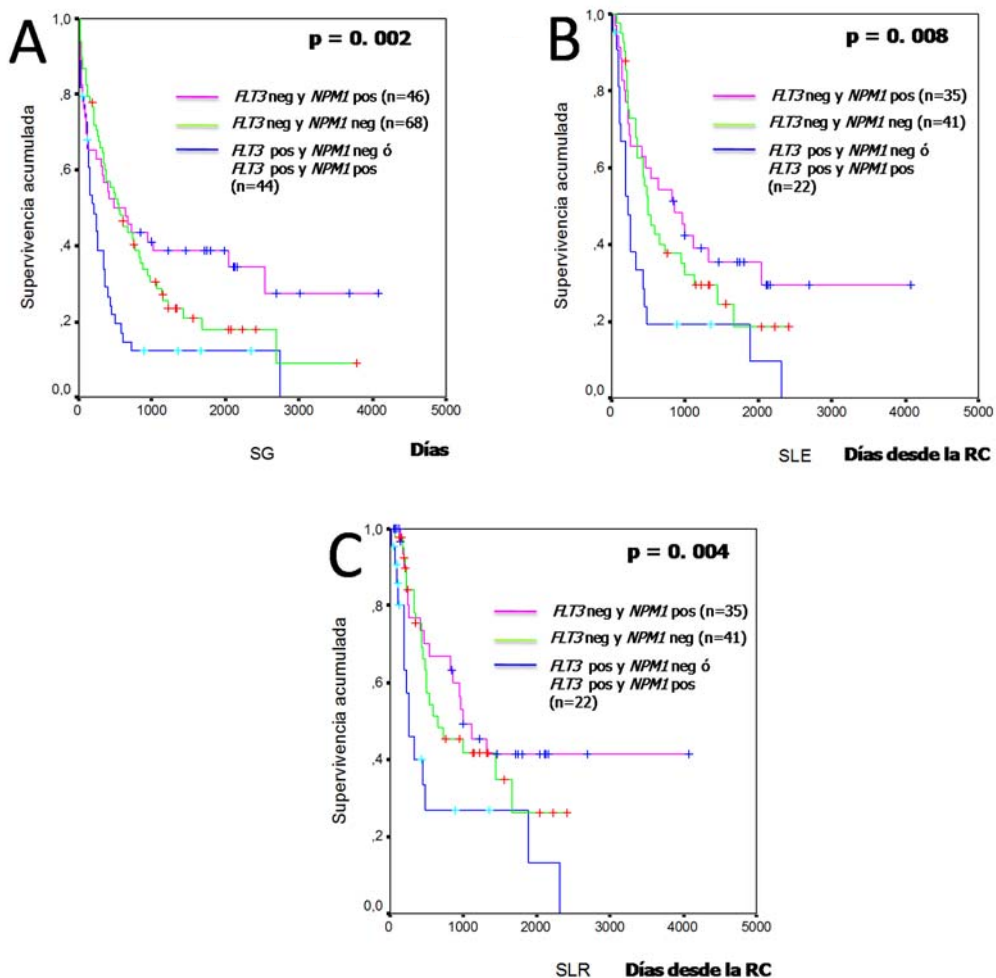


Figura 18. Impacto pronóstico de la coexistencia de mutaciones *NPM1* y *FLT3* en pacientes con citogenética de riesgo intermedio. (A) SG, (B) SLE, (C) SLR.

Cuando el análisis se restringió específicamente a la cohorte de pacientes con mutaciones *NPM1*, encontramos que los pacientes sin mutaciones *FLT3*-ITD eran los de mejor pronóstico en cuanto a SLE y SLR a los 3 años, tanto en la serie global de pacientes (SLE $p=0.026$; SLR $p=0.002$), como en los de riesgo intermedio pacientes (SLE $p=0.045$; SLR $p=0.024$). Los pacientes *NPM1* positivos de ratio *FLT3*-ITD bajo mostraron un pronóstico ligeramente mejor que los pacientes *NPM1* positivos de ratio *FLT3*-ITD elevado (Fig. 19).

RESULTADOS

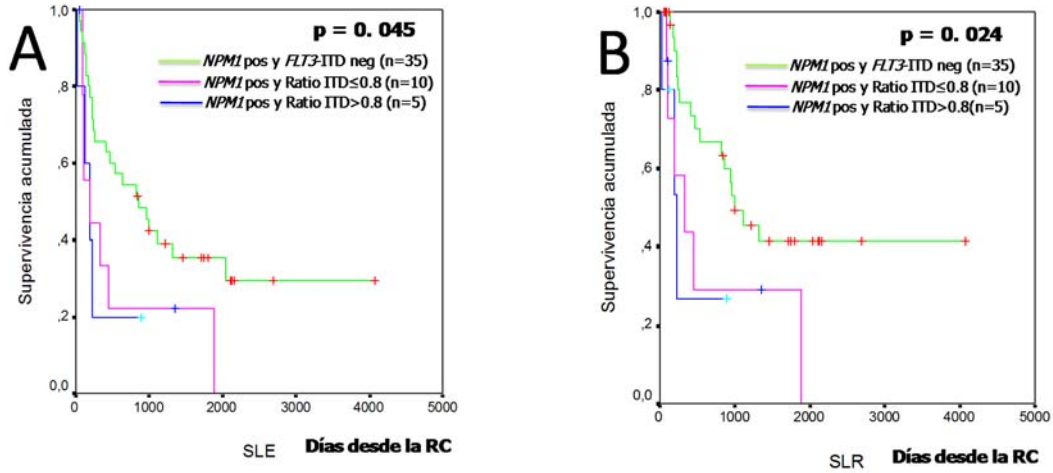


Figura 19. Valor pronóstico de la carga alélica *FLT3*-ITD en pacientes con mutaciones *NPM1* y citogenética de riesgo intermedio. (A) SLE, (B) SLR.

En los pacientes sometidos a TPH alogénico, el análisis no mostró diferencias significativas en lo que se refiere al pronóstico conferido por las mutaciones *NPM1* y la carga alélica de *FLT3*-ITD.

4.7. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICO

Para determinar qué variables podrían considerarse factores pronóstico independientes para la supervivencia, realizamos un análisis multivariante mediante el modelo de regresión de Cox considerando: leucocitos, edad, sexo, citogenética, estado mutacional de *FLT3*-ITD, ratio *FLT3*-ITD, estado mutacional de *NPM1*, y el estado mutacional combinado de *FLT3* y *NPM1*.

En la serie global de pacientes se mantuvieron como factores pronóstico independientes para SG ser menor de 65 años (HR 2.30 (1.65-3.21), $p < 0.001$), el riesgo citogenético (HR 2.13 (1,52-2.99), $p < 0.001$) y la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD (HR 1.84 (1.27-2.65), $p = 0.001$). Para la SLE y la SLR también se mantuvo como factor independiente ser menor de 65 años (SLE: HR 2.11 (1.33-3.33), $p = 0.001$; SLR: HR 2.70 (1.58-4.62), $p < 0.001$) y la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD (SLE: HR 1.84 (1.11-3.05), $p = 0.018$; SLR: HR 2.58 (1.46-4.55), $p = 0.001$).

En el análisis restringido a los pacientes de riesgo citogenético intermedio, se mantuvieron como factores pronóstico independientes para la SG y la SLE ser menor de 65 años (SG: HR 2.49 (1.71-3.62), $p < 0.001$; SLE: HR 2.39 (1.11-4.03), $p = 0.001$) y la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD (SG: HR 2.77 (1.89-4.06), $p < 0.001$; SLE: HR 1.95 (1.12-3.40), $p < 0.018$), mientras que la carga alélica de *FLT3*-ITD fue el factor pronóstico independiente para la SLR en esta cohorte (HR 1.91 (1.29-2.83), $p = 0.001$) junto con la edad [2.71 (1.49-4.92), $p = 0.001$]. Cuando

RESULTADOS

en este subgrupo de pacientes se seleccionaron los que presentaban una edad inferior a 65 años, la carga alélica *FLT3*-ITD apareció como el único factor pronóstico independiente para la SG (HR 1.55 (1.14-2.10), p=0.005) y la SLR (HR 1.82 (1.18-2.81), p=0.007). Para la SLE se mantuvo la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD (HR 1.81 (1.001-3.27), p=0.050) (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis multivariante para la SG, SLE y la SLR en toda la serie de pacientes, en pacientes de cariotipo de riesgo intermedio y en pacientes con cariotipo de riesgo intermedio y edad hasta 65 años.

FACTOR	HR (IC95%)	p-valor
SERIE GLOBAL		
<u>SG</u>		
Edad (≤65 años vs.> 65 años)	2.30 (1.65-3.21)	<0.001
Riesgo citogenético (Favorable vs. Intermedio vs. Desfavorable)	2.13 (1.52-2.99)	<0.001
Mutaciones <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativo vs. <i>FLT3</i> -ITD positivo)	1.84 (1.27-2.65)	0.001
<u>SLE</u>		
Edad (≤65 años vs.> 65 años)	2.11 (1.33-3.33)	0.001
Mutaciones <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativo vs. <i>FLT3</i> -ITD positivo)	1.84 (1.11-3.05)	0.018
<u>SLR</u>		
Edad (≤65 años vs.> 65 años)	2.70 (1.58-4.62)	<0.001
Mutaciones <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativo vs. <i>FLT3</i> -ITD positivo)	2.58 (1.46-4.55)	0.001
GRUPO DE RIESGO CITOGENÉTICO INTERMEDIO		
<u>SG</u>		
Edad (≤65 años vs.> 65 años)	2.49 (1.71-3.62)	<0.001
Mutaciones <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativo vs. <i>FLT3</i> -ITD positivo)	2.77 (1.89-4.06)	<0.001
<u>SLE</u>		
Edad (≤65 años vs.> 65 años)	2.39 (1.11-4.03)	0.001
Mutaciones <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativo vs. <i>FLT3</i> -ITD positivo)	1.95 (1.12-3.40)	0.018
<u>SLR</u>		
Edad (≤65 años vs.> 65 años)	2.71 (1.49-4.92)	0.001
Ratio <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativos vs. Ratio≤0.8 vs. Ratio>0.8)	1.91 (1.29-2.83)	0.001
MENORES DE 65		
<u>SG</u>		
Ratio <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativos vs. Ratio≤0.8 vs. Ratio>0.8)	1.55 (1.14-2.10)	0.005
<u>SLE</u>		
Mutaciones <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativo vs. <i>FLT3</i> -ITD positivo)	1.81 (1.01-3.27)	0.050
<u>SLR</u>		
Ratio <i>FLT3</i> -ITD (<i>FLT3</i> -ITD negativos vs. Ratio≤0.8 vs. Ratio>0.8)	1.82 (1.18-2.81)	0.007

4.8. ANÁLISIS DEL VALOR DE *NPM1* COMO MARCADOR DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN PACIENTES CON LMA

4.8.1. Características generales de los pacientes para seguimiento de EMR

Para determinar valor de *NPM1* como marcador de EMR, se analizaron 97 muestras correspondientes a distintos momentos de evolución de 24 pacientes con LMA *de novo* diagnosticados en nuestro hospital. Todos estos pacientes presentaban la mutación *NPM1* tipo A en el momento del diagnóstico. La mediana de tiempo de seguimiento fue de 6 meses (rango: 0.7-70). Durante el diagnóstico y el seguimiento, se recogieron un total de 92 muestras de médula ósea y cinco de sangre periférica. Las muestras de sangre periférica se procesaron únicamente cuando no había disponibilidad de muestras de médula ósea en el momento del diagnóstico o la recaída. De manera adicional, y como control de los niveles de transcritos *NPM1* mutados, se analizaron 14 muestras de sangre periférica y 10 muestras de médula ósea procedentes de donantes sanos.

4.8.2. *NPM1* mutado en el momento del diagnóstico

El análisis de expresión de *NPM1* mutado en el momento del diagnóstico permitió ver que en los controles sanos, no se detectaba expresión alguna en ninguna de las muestras procedentes de sangre periférica y/o médula ósea, algo que no ocurrió con *WT1*, puesto que, aunque a bajos niveles, su expresión se detectó en cuatro de las 14 muestras procedentes de sangre periférica (con una mediana de copias de *WT1* de 1.5 NCN) y en 10 muestras procedentes de médula ósea (con una mediana de 12 NCN, rango [0-87]).

Por lo que respecta a las 24 muestras de pacientes en el momento de diagnóstico, la mediana de copias detectada para *NPM1* fue de 45000 NCN (rango 3000-195000) y de 900 NCN (rango 3-10000) para *WT1*. Los resultados mostraron que todos los pacientes presentaban altos niveles de expresión de *NPM1* mutado en el momento del diagnóstico, con más de 3000 NCN en todos los casos, mientras que para *WT1* sólo 12 pacientes mostraron altos niveles de expresión, con una mediana en este caso de 2000 NCN (rango 1100-9800). Los 12 pacientes restantes mostraron una marcada baja expresión de *WT1*, con una mediana de 300 NCN (rango 3-900).

4.8.3. *NPM1* mutado en la remisión y recaída

Los 19 pacientes que continuaron en RC (con una mediana de seguimiento de 6 meses, rango 0.7-40), mostraron una mediana de 319 NCN (rango 0-34090) de *NPM1* y de 1.8 NCN (rango 0-580) de *WT1* después del tratamiento de inducción, analizándose además 17 pacientes después de la terapia de consolidación, en los que se encontró una mediana de 32 NCN (rango 0-3890) de *NPM1* y una mediana de 8.5 NCN (rango 0-340) para *WT1*.

En las seis recaídas que tuvieron lugar en cinco de los pacientes (con una mediana de RC de 7 meses, rango [5-65]) encontramos una mediana de expresión para *NPM1* mutado y *WT1* de 120,000 NCN (rango 77000–176000) y 3200 NCN (rango 1100–8200), respectivamente.

El número de copias en el momento de la recaída resultó ser significativamente mayor que el observado en el momento del diagnóstico (*NPM1* mutado: 120000 vs 45000, $p=0.004$; *WT1*: 3200 vs 900, $p=0.03$). En cuatro de las seis muestras, recogidas 1, 2, 3, y 5 meses antes de la recaída, observamos como el número de copias de *NPM1* y *WT1* se incrementaba respecto a valores anteriores en una media de 40 veces (rango 16-60) y 25 veces (rango 4-45), respectivamente. No se observaron dichos incrementos en las dos muestras restantes, recogidas 1 y 6 meses antes de que tuviera lugar la recaída hematológica.

RESULTADOS

Cuatro de los cinco pacientes que tuvieron recaída, mostraron altos niveles de expresión de *WT1* al diagnóstico. El paciente restante, presentó bajos niveles de expresión desde el momento del diagnóstico y los mantuvo durante todo su seguimiento hasta la recaída, momento en el que se produjo un incremento de 100 veces en los mismos.

4.8.4. Cinética de variación de la expresión de *NPM1* mutado en el tiempo

Por lo que respecta a la disminución en el número de transcritos de *NPM1* mutado en función del tratamiento, observamos una reducción media de 141 veces después del tratamiento de inducción, reducción que llegó a ser de una media de 1400 veces después de la consolidación.

Los siete pacientes que estuvieron en RC durante más de 10 meses mantuvieron muy bajos niveles de *NPM1* mutado o llegaron incluso a ser negativos para la expresión de la mutación. Los cinco pacientes que recayeron, mostraron un incremento de los transcritos de manera previa o en el mismo momento de presentar este evento. Uno de estos pacientes, que fue resistente al tratamiento, permaneció con altos niveles de *NPM1* a lo largo de su evolución (Fig. 20).

RESULTADOS

WT1 por su parte mostró una evolución similar a la de *NPM1* a lo largo del seguimiento de los pacientes, aunque las cinéticas de desaparición fueron diferentes. La reducción media observada después de la terapia de inducción fue de 500 veces, dando unos niveles residuales que no siguieron disminuyendo después de la terapia de consolidación. Los siete pacientes que estuvieron en RC durante más de 10 meses, aunque bajos, sí que mantuvieron ciertos niveles de expresión de *WT1*. Los cinco pacientes en recaída, sin embargo, mostraron un claro incremento en los niveles de *WT1*, que se mantuvo en los pacientes resistentes (Fig. 20).

RESULTADOS

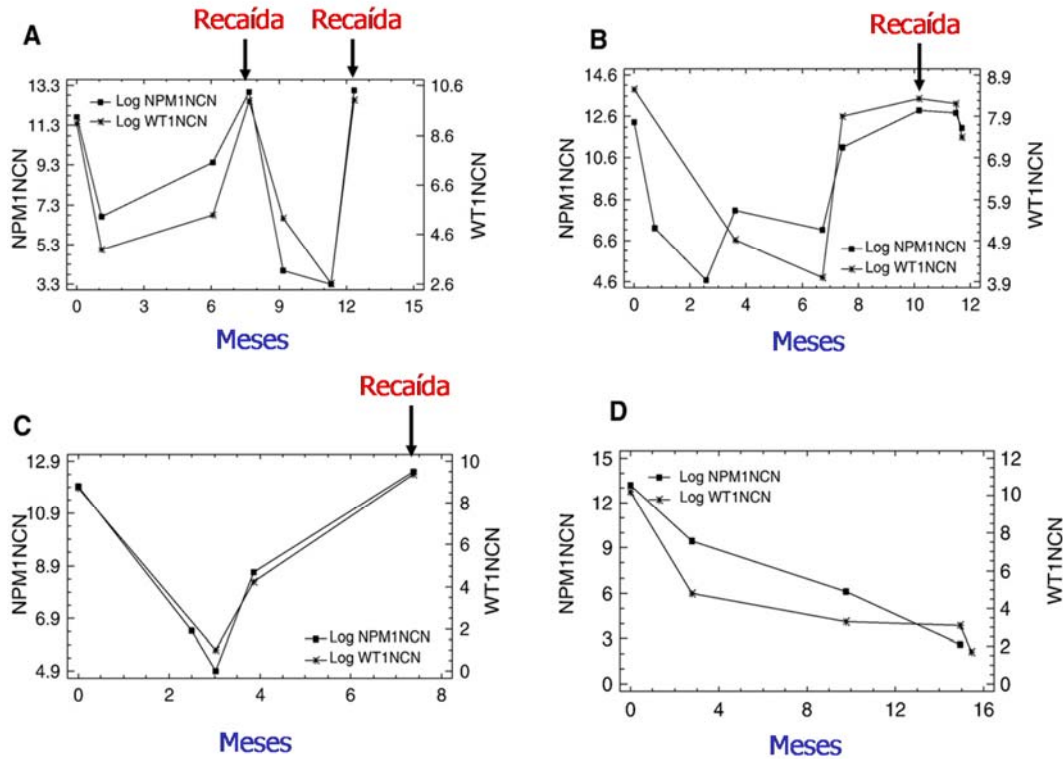


Figura 20. Monitorización simultánea de *WT1* y *NPM1* mutado en cuatro pacientes con LMA durante el transcurso de la enfermedad. El eje vertical a la izquierda representa en escala logarítmica a *NPM1* NCN mientras que el eje a la derecha representa lo correspondiente a *WT1* NCN. El panel A muestra a un paciente que experimentó un repentino incremento de los transcritos de ambos genes antes de sufrir una recaída. El tratamiento intensivo posterior redujo los niveles de transcritos en el momento en el que alcanzó la RC, pero tres meses después dichos niveles aumentaron de nuevo y el paciente volvió a recaer. El panel B muestra un progresivo incremento de *NPM1* mutado y *WT1* después de la terapia de inducción que se relacionó con una recaída hematológica a los 10 meses. Los niveles de transcritos no se redujeron durante el tratamiento posterior y el paciente no pudo alcanzar la remisión. El paciente del panel C, alcanzó unos niveles mínimos de transcritos *NPM1* mutado y *WT1* después del tratamiento de inducción, que se incrementaron posteriormente hasta su recaída. El caso del panel D es el de un paciente en el que los niveles de ambos transcritos disminuyeron significativamente después de la inducción manteniéndose a niveles muy bajos o incluso de manera inexistente negativos durante su seguimiento.

RESULTADOS

La correlación de los niveles de expresión de *WT1* y *NPM1* mutado fue analizada en 93 pares de muestras. Los resultados mostraron una fuerte correlación positiva entre ambas variables ($r = 0.81$; $p < 0.0001$) (Fig. 21). Esta fuerte correlación, se vio incrementada en mayor medida cuando solamente se consideraron las muestras de pacientes con altos niveles de *WT1*.

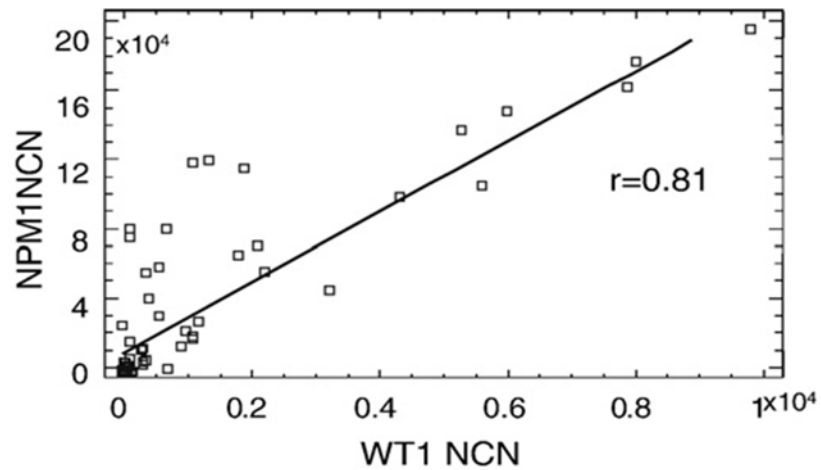


Figura 21. Correlación entre la expresión de *NPM1* mutado y *WT1* en la LMA. El eje X representa a *WT1* NCN y el eje Y a *NPM1* NCN. El coeficiente de correlación ($r=0.81$) indica una fuerte correlación entre la expresión de ambos genes.

5. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

El avance en el conocimiento de la genética molecular durante los últimos años, ha permitido la identificación de numerosos reordenamientos y mutaciones en la LMA, los cuales, además de constatar la heterogeneidad que tiene esta enfermedad, han abierto la puerta a una mejor caracterización de la misma. Estas alteraciones no sólo han contribuido a poder determinar de una manera más óptima el pronóstico de la patología, sino que además permiten identificar dianas moleculares sobre las que desarrollar y dirigir tratamientos específicos.

El trabajo que hemos desarrollado en esta tesis permite profundizar en el conocimiento biológico de dos alteraciones moleculares con valor pronóstico, las mutaciones *FLT3* y las mutaciones *NPM1*, analizando la utilidad clínica que tiene el realizar una detección y caracterización más minuciosa mediante la cuantificación de las mismas.

DETECCIÓN DE MUTACIONES *FLT3*. INCIDENCIA Y ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS.

Nuestro trabajo en esta tesis demuestra que la detección de las alteraciones moleculares de *FLT3* mediante PCR y electroforesis capilar constituye un método eficaz para la caracterización y definición del patrón de comportamiento biológico del clon leucémico, el cual puede tener implicaciones en el curso de la enfermedad. Este método de detección permite detectar las duplicaciones internas en tándem (ITD) y las mutaciones puntuales (D835), así como el cálculo preciso de un ratio entre los alelos *FLT3* mutados y normales, aportando mayor precisión y

DISCUSIÓN GENERAL

sensibilidad en la detección de la pérdida alélica que la clásica detección cualitativa.

La incidencia de las mutaciones *FLT3*-ITD en nuestra serie es de un 24% cuando consideramos a todos los pacientes de la misma, y del 29% cuando seleccionamos a los pacientes con citogenética de riesgo intermedio, unos valores consistentes con los previamente descritos en la literatura^{109, 203}. La incidencia de mutaciones *FLT3*-D835 es de un 7% (5% cuando se consideran únicamente las LMA citogenética de riesgo intermedio) coincidiendo también con lo previamente descrito¹⁰⁴. Tal y como sucede en otros trabajos¹²⁸, la presencia simultánea de mutaciones *FLT3*-D835 y *FLT3*-ITD en nuestra serie, es prácticamente nula, dándose solamente en 4 pacientes, con cerca de una tercera parte (28%) presentando cualquiera de las dos mutaciones *FLT3* aquí mencionadas.

En nuestra serie de pacientes, al igual que en los trabajos iniciales de Kiyoi *et al.*²⁰³, las mutaciones *FLT3*-ITD se asocian con hiperleucocitosis, pero no con la edad. Otras variables con las que encontramos asociación de estas alteraciones son el recuento elevado de blastos en médula ósea, altos niveles de GOT y de LDH, ECOG ≥ 2 , presentar subtipo FAB M1 o M4, la citogenética de riesgo intermedio y la presencia de mutaciones *NPM1*, parámetros también encontrados en los trabajos de Kottaridis *et al.*¹⁰⁹ o de Pratcorona *et al.*¹¹¹.

A diferencia de las mutaciones *FLT3*-ITD, no encontramos asociación de las mutaciones *FLT3*-D835 con ninguna variable clínico-biológica, en consonancia con lo encontrado, aunque de manera aislada, en trabajos previos²⁰⁴.

DISCUSIÓN GENERAL

Por lo que respecta a la detección cuantitativa, uno de los principales puntos de trabajo de esta tesis, encontramos una considerable heterogeneidad en el ratio *FLT3* mutado/*FLT3* normal. En los pacientes con mutaciones *FLT3*-ITD la mediana fue de 0.8 (rango: 0.06-10.55). Estos valores son consistentes con los reportados en estudios previos (mediana de 0.78 en el trabajo de Thiede *et al*⁹⁹; 0.61 en el estudio de Pratcorona *et al*¹¹¹). Por lo que respecta a las mutaciones *FLT3*-D835 la mediana fue de 0.36 (rango: 0.12-0.97), no habiendo estudios previos que reporten la cuantificación de esta mutación.

Cuando comparamos exclusivamente los pacientes con ratio *FLT3*-ITD \leq 0.8 con los que presentan ratio $>$ 0.8, no encontramos diferencias significativas en lo que respecta a ninguna variable clínico-biológica. Sin embargo, cuando consideramos los pacientes negativos para la mutación, los de ratio \leq 0.8 y ratio $>$ 0.8, observamos que la mediana del número de leucocitos, así como los niveles de GOT y LDH aumentaba en relación a la carga alélica de la alteración. Esta misma asociación en lo relativo al número de leucocitos fue reportada por Pratcorona *et al*¹¹¹.

No se encontró ninguna asociación del ratio *FLT3*-D835 con las características clínico-biológicas.

VALOR PRONÓSTICO MUTACIONES *FLT3*

No encontramos diferencias en la respuesta a la terapia de inducción en función la presencia o ausencia de mutación *FLT3*-ITD ni en función de su expresión categórica por encima o debajo de la mediana de expresión establecida en 0,8. Sin embargo, la supervivencia de los pacientes sí que se vio afectada por la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD. En el grupo de riesgo citogenético intermedio se observó de manera muy significativa que la presencia de mutaciones *FLT3*-ITD confiere un pronóstico desfavorable en términos de SG, SLE y SLR. Estos resultados concuerdan con los trabajos previos que conferían un pronóstico adverso a las mutaciones de *FLT3*^{82,84,97}.

Nuestros resultados en cuanto a la utilidad del ratio sugieren que la carga alélica *FLT3*-ITD es un factor pronóstico independiente desfavorable en el grupo de riesgo citogenético intermedio en términos de SLR. Estos resultados apoyarían los datos reportados por otros autores, como los de Thiede *et al*⁹⁹, donde los pacientes con ratio más elevado (>2), signo de pérdida del alelo normal, presentaban tasas de SG y SLE significativamente menores que los pacientes con ratio más bajo (el 93% de estos pacientes no sobrevivían más allá de los 12 meses), o los de Pratcorona *et al*¹¹¹. donde los pacientes con ratio>0.5 presentan un mayor RR que los pacientes con más presencia del alelo normal, algo que ya encontró en el año 2001 el Dr. Whitmann²⁰⁵, sugiriendo ya en ese momento la necesidad de inhibidores tirosín-quinasa para tratar a estos pacientes. En esta línea, trabajos realizados en modelos de ratones knock-in demuestran que la inducción del fenotipo mieloide y de la expansión de progenitores granulocíticos-monocíticos

DISCUSIÓN GENERAL

y progenitores Lin(-)Sca1(+)c-Kit(+), son procesos que podrían estar tomando parte en la pérdida del alelo *FLT3* normal²⁰⁶.

Dado que la terapia post-remisión (quimioterapia intensiva, trasplante autólogo, alogénico) puede influir sobre el pronóstico se consideraron separadamente los pacientes sometidos a TPH alogénico y se observó que en estos trasplantes, ni las mutaciones *FLT3*-ITD ni el ratio confieren valor pronóstico, lo que demuestra que el TPH alogénico al ser un tratamiento más curativo, permite obviar el pronóstico adverso que confieren estas mutaciones, independientemente de cuál sea la carga alélica del paciente. Estos resultados concuerdan con los encontrados por el grupo de Schlenk et al²⁰⁷, en cuyo trabajo se describe que el TPH alogénico mejora la supervivencia de los pacientes con ratio *FLT3*-ITD elevado por lo que sería la terapia de elección en estos casos.

DETECCIÓN DE MUTACIONES *NPM1*. INCIDENCIA Y ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS

Otro punto de trabajo importante desarrollado en esta tesis es el que tiene que ver con las mutaciones *NPM1*. Se han puesto a punto dos métodos, uno para la detección cualitativa y caracterización de las mutaciones *NPM1*, y otro que permite cuantificar la mutación. No se ha planteado la cuantificación de las mutaciones de *NPM1* en el diagnóstico, porque ya está bien establecido en la literatura que a diferencia de *FLT3*, la mayoría de los pacientes con *NPM1* mutado presentan ratios

DISCUSIÓN GENERAL

elevados lo cual sugiere que *NPM1* sería un evento primario en la leucemogenesis que se encontraría en todos los blastos leucémicos²⁰⁸.

En nuestra serie, la incidencia de estas mutaciones es de un 40%, similar a la descrita en la literatura, y de un 44% cuando se consideran los pacientes con citogenética de riesgo intermedio, incidencia ligeramente inferior a la establecida previamente en este subgrupo de pacientes (45-64%)¹⁴⁸. El método cualitativo permite detectar de forma rápida y específica los diferentes tipos de mutación, siendo la isoforma mayoritaria el tipo A (81%) tal como se describe en otros trabajos previos^{148,174,209}.

En nuestro trabajo, encontramos asociación de las mutaciones de *NPM1* con las mutaciones *FLT3-ITD*, con el sexo femenino, hiperleucocitosis, blastos en médula ósea, bajos niveles de creatinina, niveles elevados de LDH, los subtipos FAB M1, M2, M4 y M5, y el cariotipo de riesgo intermedio. Esta asociación con las mutaciones *FLT3-ITD*, con la hiperleucocitosis, el alto número de blastos y los altos niveles de LDH ya ha sido descrita previamente²¹⁰, al igual que con el cariotipo de riesgo intermedio^{96, 152, 153, 165}.

VALOR PRONÓSTICO MUTACIONES *NPM1*

Ampliamente demostrado ha sido el buen pronóstico conferido por las mutaciones *NPM1*, predictoras de una mejor respuesta a la terapia de inducción y una SG más favorable, aunque en ausencia de mutaciones *FLT3-ITD*¹⁷¹. Es conocido

DISCUSIÓN GENERAL

que la presencia de ambos tipos de alteraciones, impacta negativamente en el pronóstico de la LMA, en los que ha quedado demostrada una menor tasa de respuesta a la terapia de inducción en comparación con la que se observa en los pacientes que sólo presentan mutaciones *NPM1* (63% frente a 86%), con una significativa diferencia en cuanto a supervivencia también a favor de estos últimos (60% frente a un 30%)^{171,211}. El campo de investigación de los mecanismos que rigen la influencia de la interacción entre ambos tipos de mutaciones en el pronóstico de la LMA sigue abierto, posicionando a las diferentes isoformas de p53 como uno de los elementos clave en la misma, ya que se ha encontrado que las isoformas β y γ de esta proteína, caracterizadas por una mejor respuesta a las antraciclinas y a la citarabina, predominan en presencia de mutaciones *NPM1*, siendo la isoforma completa, asociada con resistencia al tratamiento, la que lo hace en presencia de *FLT3*-ITD²¹².

En nuestro trabajo, además de verificar la asociación de las mutaciones *NPM1* con estas otras alteraciones, encontramos asociación con el sexo femenino, hiperleucocitosis, blastos en médula ósea, bajos niveles de creatinina, niveles elevados de LDH, los subtipos FAB M1, M2, M4 y M5, y el cariotipo de riesgo intermedio.

Nuestros resultados muestran que la presencia de las mutaciones *NPM1* influye significativamente en el resultado obtenido con el tratamiento. Presentar estas mutaciones en ausencia de mutaciones *FLT3*-ITD se asocia con mejores tasas de RC y menos resistencias. Unos resultados que siguen la línea de los que describen valor pronóstico para las mutaciones *NPM1*^{152,213}, y que contradicen los

DISCUSIÓN GENERAL

resultados de Pastore *et al.* quienes concluyen que las mutaciones *NPM1* no tienen impacto en la supervivencia en los pacientes con citogenética de riesgo intermedio²¹⁴.

Cuando comparamos los pacientes que no presentan ninguna de estas alteraciones, con los que presentan únicamente mutaciones de *NPM1* y con los que presentan mutaciones de *FLT3*, independientemente de que presenten *NPM1* mutado o no, nuestros resultados muestran que el mejor pronóstico en cuanto a SG, SLE y SLR corresponde a los pacientes *NPM1* positivos sin mutación *FLT3*-ITD, tanto en la serie global de pacientes como en la cohorte de riesgo intermedio, algo que va en consonancia con resultados previamente publicados, como el de Hefazi *et al.*²¹⁵, donde el genotipo *NPM1*+/*FLT3*- se asocia un pronóstico favorable independiente de la edad y de que hayan sido tratados con quimioterapia intensiva.

Cuando analizamos el peso que tiene la carga alélica *FLT3*-ITD en el pronóstico que confieren las mutaciones *NPM1*, vemos el mejor pronóstico en cuanto a SLE y SLR en los pacientes *NPM1* mutados sin *FLT3* mutado, pero, al menos en nuestra serie, no encontramos diferencias significativas en lo que respecta a presentar ratios *FLT3*-ITD por encima o por debajo de 0.8, en contraposición con lo descrito por Pratcorona *et al.* que afirma que los pacientes *NPM1* positivos con ratio *FLT3*-ITD elevado presentan peor pronóstico¹¹¹.

NPM1 COMO MARCADOR DE EMR

Otro de los objetivos de esta tesis ha sido analizar el valor de las mutaciones *NPM1* como marcadores de EMR. No se ha considerado utilizar las mutaciones *FLT3*-ITD en este sentido debido a que en un mismo paciente, las repeticiones en tándem pueden variar a lo largo de su evolución, algo que se traduciría en la posibilidad de estar evaluando alteraciones que no se corresponderían con las inicialmente detectadas. Recientemente han aparecido varios trabajos que analizan el posible valor de las mutaciones *FLT3*-ITD como marcadores de EMR, sin embargo, parecen precisar todavía de un mayor refinamiento tanto en lo referente a las técnicas moleculares utilizadas, como en el tamaño de las series analizadas^{216,217}

La EMR en la LMA ha demostrado ser clínicamente relevante, tanto para la determinación de la respuesta al tratamiento, como para la detección temprana de recaídas^{218,219,220}. Reordenamientos genéticos específicos tales como *PML/RAR α* , *AML1/ETO*, y *CBF β /MYH11* han sido utilizados para monitorizar la EMR. Sin embargo, estos reordenamientos aunque frecuentes, juntos con otros que no lo son tanto, son aplicables únicamente al 20-30% de los pacientes con LMA²²¹. Por otro lado, el paralelismo existente entre el comportamiento de genes de fusión específicos y el del gen del tumor de Wilms (*WT1*) ha hecho que la expresión de este último haya sido también sugerida como marcador, incluso universal, de EMR en la LMA²²², dado que además se sobreexpresa en la mayoría de los casos de esta

DISCUSIÓN GENERAL

patología^{223,224,225}. Lapillonne *et al.*²²⁶ propusieron la determinación de la expresión de *WT1* al final del tratamiento de inducción como una importante herramienta para medir la EMR en la LMA pediátrica. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes que tiene esta consideración, es que existe expresión residual de *WT1* en células de médula ósea sanas, lo que hace que no sea específica de las células leucémicas²¹⁸.

En el trabajo de Falini *et al.*¹⁵⁹ se identificó la presencia de las mutaciones de *NPM1* en aproximadamente el 35% de las LMA *de novo*, y de manera particular, en las LMA con cariotipo normal, donde su presencia se elevaba hasta un 50%, lo que las convertía en un potencial buen marcador de EMR para los pacientes con esta enfermedad, algo que se ve reforzado por el hecho de que la mutación *NPM1*, a diferencia de la mutación *WT1*, si es específica de las células leucémicas.

En nuestra serie, la expresión de *WT1* en los pacientes con LMA al diagnóstico es más alta que la que presentan las muestras control, sin embargo esa situación de altos niveles de expresión, necesaria para llevar a cabo una monitorización fiable, sólo se da en la mitad de los casos, por lo que realmente sólo esos pacientes son los que están beneficiándose de la utilización de este marcador. De manera contraria, la mutación de *NPM1*, además de ser específica de células leucémicas, sí que se presenta con alta expresión en todos los casos en el momento del diagnóstico, haciendo de este un marcador más robusto que *WT1*. La fuerte correlación que encontramos entre los dos marcadores, se acentúa además cuando se seleccionan los pacientes con altos niveles de expresión de *WT1*, lo que vuelve a sugerir nuevamente que la monitorización de la EMR por medio de la

DISCUSIÓN GENERAL

cuantificación de *WT1* es fiable únicamente en los pacientes con altos niveles de expresión de este gen en el momento del diagnóstico, acorde a lo descrito previamente^{214, 227}.

La monitorización molecular de *NPM1* y *WT1*, muestra que ambos marcadores cambian paralelamente, aunque la expresión de *NPM1* es siempre más elevada que la de *WT1* en todas las muestras (en siete pacientes la expresión de *WT1* es tan baja, mediana de ratio *WT1/GUS* 0.012 con rango 0.0003-0.03, que no permite su utilización como marcador de EMR). Otra diferencia entre ambos es la cinética de desaparición. *WT1* disminuye rápidamente después del tratamiento de inducción pero mantiene niveles residuales después de la terapia de consolidación, mientras que *NPM1*, comienza con una reducción más moderada después de la inducción, y pasa a ser indetectable en los pacientes con larga supervivencia. La mayor sensibilidad del método de PCR en tiempo real para *NPM1*, estaría indicando que la expresión de *WT1* en estos pacientes no refleja las células leucémicas residuales, como cabe esperar de un buen marcador de EMR, sino la expresión constitutiva que tiene este gen, haciendo de *NPM1* una opción en este sentido.

En la serie que analizamos, el número de transcritos *NPM1* Tipo A mutados se correlaciona estrechamente tanto con la carga tumoral al diagnóstico como con la respuesta a la terapia de inducción. Al diagnóstico, el número de copias *NPM1* mutado es superior a 3000 NCN en todos los pacientes, disminuyendo paulatinamente conforme alcanzan RC, y aumentando significativamente en

DISCUSIÓN GENERAL

aquellos casos en los que se da recaída, tal y como se había publicado previamente para *WT1*²²⁸.

La sensibilidad del método queda aún más de manifiesto, cuando en cuatro de las seis muestras de recaída, la monitorización puede predecir este evento a través del incremento en los niveles de los dos marcadores, incremento que se detecta en muestras previas a la aparición del mismo, siendo mayor el que se da para *NPM1* que el que tiene lugar para *WT1*. En los dos casos restantes, no se observa dicho incremento. Nuestra técnica nos permite observar además que cuatro de los cinco pacientes que recaen, presentan altos niveles de expresión de *WT1* al diagnóstico y en el momento de la recaída, resultados que son consistentes con los descritos en otros trabajos, como el publicado previamente por nuestro grupo, en los que se sugiere un pronóstico desfavorable para los pacientes con altos niveles de *WT1* en el momento en el que se les diagnostica⁶⁴.

Así pues, la línea de investigación desarrollada en esta tesis nos ha permitido validar la importancia como marcador pronóstico que tiene el ratio en las mutaciones *FLT3*, profundizando de esta manera en el papel que desempeñan estas alteraciones durante la leucemogénesis, y al mismo tiempo, demostrar que el método de monitorización de EMR a través de la cuantificación de *NPM1* mutado, es una excelente herramienta para detectar la presencia, persistencia y reaparición de células leucémicas en pacientes con LMA y citogenética de riesgo intermedio, aportando información más útil para poder definir más claramente grupos de riesgo y en consecuencia, modificar, desarrollar y/o dirigir más eficazmente estrategias terapéuticas específicas de cara a mejorar el pronóstico de estos pacientes.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La detección de las alteraciones moleculares de *FLT3* y la determinación del ratio *FLT3 mutado/FLT3 normal* mediante PCR cuantitativa y electroforesis capilar, es un método eficaz para caracterizar y definir el patrón de comportamiento biológico del clon leucémico, y sus implicaciones en el curso de la enfermedad
2. Las variables asociadas a las mutaciones *FLT3-ITD* son hiperleucocitosis, recuento elevado de blastos en médula ósea, niveles elevados de GOT, y LDH, ECOG ≥ 2 , subtipos FAB M1 y M4, presencia de mutaciones *NPM1* y citogenética de riesgo intermedio.
3. Las medianas del recuento de leucocitos, los niveles de GOT y de LDH, aumentan proporcionalmente con la carga alélica de *FLT3-ITD* en el paciente
4. Ni la mutación *FLT3-ITD* ni el ratio *FLT3-ITD* tienen impacto en la respuesta al tratamiento
5. La carga alélica de *FLT3-ITD* estratificada en pacientes negativos, pacientes con ratio ≤ 0.8 y pacientes con ratio > 0.8 tiene valor pronóstico independiente para la SLR en los pacientes con LMA y citogenética de riesgo intermedio
6. El pronóstico adverso conferido por las mutaciones *FLT3-ITD* y la carga alélica *FLT3-ITD* se puede anular sometiendo a los pacientes a TPH alogénico
7. No se ha encontrado asociación del ratio *FLT3-D835* con ninguna variable clinico-biológica o la supervivencia de los pacientes

CONCLUSIONES

8. La principal asociación de las mutaciones *NPM1* en los pacientes de riesgo citogenético intermedio es con las mutaciones *FLT3*-ITD
9. La presencia de mutaciones *NPM1* en ausencia de mutaciones *FLT3*-ITD se asocia con mejores tasas de RC y menos resistencias
10. En los pacientes *NPM1* positivos no hay diferencias en el pronóstico entre los de ratio *FLT3*-ITD bajo y elevado
11. El método de PCR en tiempo real desarrollado para detectar y cuantificar la mutación *NPM1* Tipo A es eficaz para monitorizar la EMR en aproximadamente un tercio de los pacientes adultos con LMA
12. La cuantificación de *NPM1* para monitorizar EMR en LMA, resulta más adecuada que la cuantificación de *WT1*, ya que su expresión es siempre más elevada y su detección es específica de célula leucémica

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹Lowenberg B, Down JR, Burnett A. Acute myeloid leukaemia. *N Eng J Med*. 1999; 341:1051-62.
- ²Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Löwenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD; International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003 Dec 15; 21 (24):4642-9.
- ³Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Mar; 20 (1):29-37.
- ⁴Vardiman J, Reichard K. Acute Myeloid Leukemia with myelodysplasia-related changes. *Am J Clin Pathol*. 2015 Jul;144(1):29-43.
- ⁵Czader M, Orazi A. Acute Myeloid Leukemia and other types of disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2015 Aug; 144(2):188-206.
- ⁶Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2014 Nov; 89(11):1063-81.
- ⁷Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech*. 2014 Aug; 7(8):941-51.
- ⁸Bhatnagar B, Garzon R. The use of molecular genetics to refine prognosis in acute myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014 Jun; 9(2):148-57.
- ⁹Smirnova OA. Myeloid leukemia risk assessment and dynamics of the granulocytopoietic system in acutely and continuously irradiated humans: modeling approach. *Health Phys*. 2015 May;108(5):492-502.
- ¹⁰Heck JE, ParkAS, Qiu J, Cockburn M, Ritz B. Risk of leukemia in relation to exposure to ambient air toxics in pregnancy and early childhood. *Int J Hyg Environ Health*. 2014 Jul; 217(6):662-8.
- ¹¹Thomas R, Hubbard AE, McHale CM, Zhang L, Rappaport SM, Lan Q, Rothman N, Vermeulen R, Guyton KZ, Jinot J, Sonawane BR, Smith MT. Characterization of changes in gene expression and biochemical pathways at low levels of benzene exposure. *PLoS One*. 2014 May 1; 9(5).
- ¹²Crump C, Sundquist J, Sieh W, Winkleby MA, Sundquist K. Perinatal risk factors for acute myeloid leukemia. *Eur J Epidemiol*. 2015. Jun 26. [Epub ahead of print].

¹³Irons RD, Chen Y, Wang X, Ryder J, Kerzic PJ. Acute myeloid leukemia following exposure to benzene more closely resembles de novo than therapy related-disease. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Oct; 52(10):887-94.

¹⁴Stenehjem JS, Kjærheim K, Bråtveit M, Samuelsen SO, Barone-Adesi F, Rothman N, Lan Q, Grimsrud TK; UK Inflammatory Breast Cancer Working group. Benzene exposure and risk of lymphohaematopoietic cancers in 25 000 offshore oil industry workers. *Br J Cancer*. 2015 Apr 28; 112(9):1603-12.

¹⁵Orsi L, Rudant J, Ajrouche R, Leverger G, Baruchel A, Nelken B, Pasquet M, Michel G, Bertrand Y, Ducassou S, Gandemer V, Lutz P, Saumet L, Moreau P, Hemon D, Clavel J. Parental smoking, maternal alcohol, coffee and tea consumption during pregnancy, and childhood acute leukemia: the ESTELLE study. *Cancer Causes Control*. 2015 Jul; 26(7):1003-17.

¹⁶Talbott EO, Xu X, Youk AO, Rager JR, Stragand JA, Malek AM. Risk of leukemia as a result of community exposure to gasoline vapors: a follow-up study. *Environ Res*. 2011 May; 111(4):597-602.

¹⁷Reckzeh K, Bereshchenko O, Mead A, Rehn M, Kharazi S, Jacobsen SE, Nerlov C, Cammenga J. Molecular and cellular effects of oncogene cooperation in a genetically accurate AML mouse model. *Leukemia*. 2012 Jul; 26(7):1527-36.

¹⁸Schardt JA, Mueller BU, Pabst T. Activation of the unfolded protein response in human acute myeloid leukemia. *Methods Enzymol*. 2011; 489:227-43.

¹⁹Ghiaur G, Wroblewski M, Loges S. Acute myelogenous leukemia and its microenvironment: a molecular conversation. *Semin Hematol*. 2015 Jul; 52(3):200-6.

²⁰Heesch S, Neumann M, Schwartz S, Bartram I, Schlee C, Burmeister T, Hänel M, Ganser A, Heuser M, Wendtner CM, Berdel WE, Gökbuget N, Hoelzer D, Hofmann WK, Thiel E, Baldus CD. Acute leukemias of ambiguous lineage in adults: molecular and clinical characterization. *Ann Hematol*. 2013 Jun; 92(6):747-58.

²¹Daver N, Cortes J, Ravandi F, Patel KP, Burger JA, Konopleva M, Kantarjian H. Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia. *Blood*. 2015 May 21; 125(21):3236-45.

²²Weinberg OK, Ohgami RS, Ma L, Seo K, Ren L, Gotlib JR, Seetharam M, Cherry A, Arber DA. Acute myeloid leukemia with monosomal karyotype: morphologic, immunophenotypic, and molecular findings. *Am J Clin Pathol*. 2014 Aug; 142(2):190-5.

²³Foucar K, Anastasi J. Acute myeloid leukemia with recurrent cytogenetic abnormalities. *Am J Clin Pathol*. 2015 Jul; 144(1):6-18.

²⁴Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D,

Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European Leukemia Net. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010; 115:453-74.

²⁵Bodini M, Ronchini C, Giacò L, Russo A, Melloni GE, Luzi L, Sardella D, Volorio S, Hasan SK, Ottone T, Lavorgna S, Lo-Coco F, Candoni A, Fanin R, Toffoletti E, Iacobucci I, Martinelli G, Cignetti A, Tarella C, Bernard L, Pelicci PG, Riva L. The hidden genomic landscape of acute myeloid leukemia: subclonal structure revealed by undetected mutations. *Blood*. 2015 Jan 22; 125(4):600-5.

²⁶Bhatnagar B, Garzon R. The use of molecular genetics to refine prognosis in acute myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014 Jun; 9(2):148-57. Review.

²⁷Marchesi V. Genetics: the AML mutational landscape. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Jun; 10(6):305.

²⁸Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev*. 2013 Jan; 27(1):13-22.

²⁹Brunet S, Martino R, Sierra J. Hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia with internal tandem duplication of FLT3 gene (FLT3/ITD). *Curr Opin Oncol*. 2013 Mar; 25(2):195-204.

³⁰Port M, Böttcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, Neumann A, Pouryamout L. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol*. 2014 Aug; 93(8):1279-86.

³¹How J, Sykes J, Minden MD, Gupta V, Yee KW, Schimmer AD, Schuh AC, Kamel-Reid S, Brandwein JM. The prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutations in patients with relapsed acute myeloid leukemia and intermediate-risk cytogenetics. *Blood Cancer J*. 2013 May 24; 3:e116.

³²Bueso-Ramos CE, Kanagal-Shamanna R, Routbort MJ, Hanson CA. Therapy-related myeloid neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 2015 Aug; 144(2):207-18.

³³Bose P, Grant S. Rational combinations of targeted agents in AML. *J Clin Med*. 2015 Apr 10; 4(4):634-64.

³⁴Kadia TM, Ravandi F, Cortes J, Kantarjian H. Toward individualized therapy in acute myeloid leukemia: A contemporary review. *JAMA Oncol*. 2015 Sep 1; 1(6):820-8.

³⁵Rego EM, Kim HT, Ruiz-Argüelles GJ, Undurraga MS, UriarteMdel R, Jacomo RH, Gutiérrez-Aguirre H, Melo RA, Bittencourt R, Pasquini R, Pagnano K, Fagundes EM,

Chauffaille M de L, Chiattonne CS, Martinez L, Meillón LA, Gómez-Almaguer D, Kwaan HC, Garcés-Eisele J, Gallagher R, Niemeyer CM, Schrier SL, Tallman M, Grimwade D, Ganser A, Berliner N, Ribeiro RC, Lo-Coco F, Löwenberg B, Sanz MA. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. *Blood*. 2013 Mar 14; 121(11):1935-43.

³⁶Lucena-Araujo AR, Kim HT, Jacomo RH, Melo RA, Bittencourt R, Pasquini R, Pagnano K, Fagundes EM, Chauffaille M de L, Chiattonne CS, Lima AS, Ruiz-Argüelles G, Undurraga MS, Martinez L, Kwaan HC, Gallagher R, Niemeyer CM, Schrier SL, Tallman MS, Grimwade D, Ganser A, Berliner N, Ribeiro RC, Lo-Coco F, Löwenberg B, Sanz MA, Rego EM. Internal tandem duplication of the FLT3 gene confers poor overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study. *Ann Hematol*. 2014 Dec; 93(12):2001-10.

³⁷Sanz MA, Iacoboni G, Montesinos P. Acute promyelocytic leukemia: do we have a new front-line standard of treatment? *Curr Oncol Rep*. 2013 Oct;15(5):445-9.

³⁸Sanz MA, Montesinos P, Kim HT, Ruiz-Argüelles GJ, Undurraga MS, Uriarte MR, Martínez L, Jacomo RH, Gutiérrez-Aguirre H, Melo RA, Bittencourt R, Pasquini R, Pagnano K, Fagundes EM, Vellenga E, Holowiecka A, González-Huerta AJ, Fernández P, De la Serna J, Brunet S, De Lisa E, González-Campos J, Ribera JM, Krsnik I, Ganser A, Berliner N, Ribeiro RC, Lo-Coco F, Löwenberg B, Rego EM; IC-APL and PETHEMA and HOVON Groups. All-trans retinoic acid with daunorubicin or idarubicin for risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukaemia: a matched-pair analysis of the PETHEMA LPA-2005 and IC-APL studies. *Ann Hematol*. 2015 Aug; 94(8):1347-56.

³⁹Lo-Coco F, Hasan SK, Montesinos P, Sanz MA. Biology and management of therapy-related acute promyelocytic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2013 Nov; 25(6):695-700.

⁴⁰Sanz MA, Montesinos P. Risk-adapted treatment for low- and intermediate- risk acute promyelocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2010 Oct; 10 Suppl 3:S130-4.

⁴¹Röllig C, Schäfer-Eckardt K, Hänel M, Kramer M, Schaich M, Thiede C, Oelschlägel U, Mohr B, Wagner T, Einsele H, Krause SW, Bodenstein H, Martin S, Stuhlmann R, Ho AD, Bornhäuser M, Ehninger G, Schuler U, Platzbecker U. Two cycles of risk-adapted consolidation therapy in patients with acute promyelocytic leukemia. Results from the SAL-AIDA2000 trial. *Ann Hematol*. 2015 Apr; 94(4):557-63.

⁴²Grunwald MR, Levis MJ. FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition as a Paradigm for Targeted Drug Development in Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol*. 2015 Jul; 52(3):193-9.

-
- ⁴³Kiyoi H. FLT3 inhibitors: recent advances and problems for clinical application. *Nagoya J Med Sci.* 2015 Feb; 77(1-2):7-17. Review.
- ⁴⁴Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, Galinsky I, Estey E, Lanza C, Fox E, Ehninger G, Feldman EJ, Schiller GJ, Klimek VM, Nimer SD, Gilliland DG, Dutreix C, Huntsman-Labed A, Virkus J, Giles FJ. Phase IIB trial of oral midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 1; 28(28):4339-45.
- ⁴⁵Cooper BW, Kindwall-Keller TL, Craig MD, Creger RJ, Hamadani M, Tse WW, Lazarus HM. A Phase I Study of midostaurin and azacitidine in relapsed and elderly AML patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015 Jul; 15(7):428-432.
- ⁴⁶Ravandi F, Alattar ML, Grunwald MR, Rudek MA, Rajkhowa T, Richie MA, Pierce S, Daver N, Garcia-Manero G, Faderl S, Nazha A, Konopleva M, Borthakur G, Burger J, Kadia T, Deltasala S, Andreeff M, Cortes J, Kantarjian H, Levis M. Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT3 internal tandem duplication mutation. *Blood.* 2013 Jun 6; 121(23):4655-62.
- ⁴⁷Stone RM, Fischer T, Paquette R, Schiller G, Schiffer CA, Ehninger G, Cortes J, Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Huntsman-Labed A, Dutreix C, del Corral A, Giles F. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012 Sep; 26(9):2061-8.
- ⁴⁸Estey E. Why is progress in acute myeloid leukemia so slow? *Semin Hematol.* 2015 Jul; 52(3):243-8.
- ⁴⁹Leung AY, Man CH, Kwong YL. FLT3 inhibition: a moving and evolving target in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2013 Feb; 27(2):260-8.
- ⁵⁰Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature.* 2008 Nov 6; 456(7218):66-72.
- ⁵¹Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T,

Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G, Alonso S, Ayala B, Baboud J, Backus M, Barletta SP, Berton DL, Chu AL, Girshik S, Jensen MA, Kahn A, Kothiyal P, Nicholls MC, Pihl TD, Pot DA, Raman R, Sanbhadti RN, Snyder EE, Srinivasan D, Walton J, Wan Y, Wang Z, Issa JP, Le Beau M, Carroll M, Kantarjian H, Kornblau S, Bootwalla MS, Lai PH, Shen H, Van Den Berg DJ, Weisenberger DJ, Link DC, Walter MJ, Ozenberger BA, Mardis ER, Westervelt P, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013 May 30; 368(22):2059-74.

⁵²The Cancer Genome Atlas Research Network Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013 May 30; 368(22):2059-74.

⁵³Yoon JH, Kim HJ, Shin SH, Yahng SA, Lee SE, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Lee S, Min CK, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Park CW, Lim JH. BAALC and WT1 expressions from diagnosis to hematopoietic stem cell transplantation: consecutive monitoring in adult patients with core-binding-factor-positive AML. *Eur J Haematol.* 2013 Aug; 91(2):112-21.

⁵⁴Bock J, Mochmann LH, Schlee C, Farhadi-Sartangi N, Göllner S, Müller-Tidow C, Baldus CD. ERG transcriptional networks in primary acute leukemia cells implicate a role for ERG in deregulated kinase signaling. *PLoS One.* 2013; 8(1):e52872. doi: 10.1371/journal.pone.0052872. Epub 2013 Jan 3.

⁵⁵Xiao SJ, Shen JZ, Huang JL, Fu HY. Prognostic significance of the BAALC gene expression in adult patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol.* 2015 Jul; 3(4):880-888.

⁵⁶Eid MA, Attia M, Abdou S, El-Shazly SF, Elahwal L, Farrag W, Mahmoud L. BAALC and ERG expression in acute myeloid leukemia with normal karyotype: impact on prognosis. *Int J Lab Hematol.* 2010 Apr; 32(2):197-205.

⁵⁷Nolte F, Hecht A, Reinwald M, Nowak D, Nowak V, Hanfstein B, Faldum A, Büchner T, Spiekermann K, Sauerland C, Hofmann WK, Lengfelder E. In acute promyelocytic leukemia (APL) low BAALC gene expression identifies a patient group with favorable overall survival and improved relapse free survival. *Leuk Res.* 2013 Apr; 37(4):378-82.

⁵⁸Santamaría C, Chillón MC, García-Sanz R, Pérez C, Caballero MD, Mateos MV, Ramos F, de Coca AG, Alonso JM, Giraldo P, Bernal T, Queizán JA, Rodríguez JN, Puig N, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, Díaz-Mediavilla J, San Miguel J, González M. BAALC is an important predictor of refractoriness to chemotherapy and poor survival in intermediate-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol.* 2010 May; 89(5):453-8.

⁵⁹Schwind S, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, Margeson D, Becker H, Whitman SP, Wu YZ, Metzeler KH, Powell BL, Kolitz JE,

Carter TH, Moore JO, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2010 Dec 16; 116(25):5660-9.

⁶⁰Haferlach C, Bacher U, Grossmann V, Schindela S, Zenger M, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Three novel cytogenetically cryptic EVI1 rearrangements associated with increased EVI1 expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Dec; 51(12):1079-85.

⁶¹Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, Kayser S, Valk PJ, van Zelderen-Bhola SL, Jan Ossenkuppele G, Vellenga E, van den Berg-de Ruyter E, Schanz U, Verhoef G, Vandenberghe P, Ferrant A, Köhne CH, Pfreundschuh M, Horst HA, Koller E, von Lilienfeld-Toal M, Bentz M, Ganser A, Schlegelberger B, Jotterand M, Krauter J, Pabst T, Theobald M, Schlenk RF, Delwel R, Döhner K, Löwenberg B, Döhner H. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 20; 28(24):3890-8.

⁶²Gröschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwien K, Goudswaard C, van Putten WJ, Kayser S, Verdonck LF, Lübbert M, Ossenkuppele GJ, Germing U, Schmidt-Wolf I, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Löwenberg B, Döhner K, Delwel R. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 20; 28(12):2101-7.

⁶³Glass C, Wuertzer C, Cui X, Bi Y, Davuluri R, Xiao YY, Wilson M, Owens K, Zhang Y, Perkins A. Global Identification of EVI1 Target Genes in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One*. 2013 Jun 27; 8(6).

⁶⁴Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martin G, Fernandez P, Collado R, Sayas MJ, Sanz MA. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; 89(8):926-33.

⁶⁵Yi-Ning Y, Xiao-rui W, Chu-xian Z, Chun W, You-wen Q. Prognostic significance of diagnosed WT1 level in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Ann Hematol*. 2015 Jun; 94(6):929-38.

⁶⁶Aref S, Sharawy SE, Sabry M, Azmy E, Raouf DA, Menshawy NE. Wilms tumor 1 gene mutations in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Turk J Haematol*. 2014 Jun; 31(2):143-8.

⁶⁷Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point of care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008 Jan; 22(1):14-22.

⁶⁸Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144:27-40.

⁶⁹Paguirigan AL, Smith J, Meshinchi S, Carroll M, Maley C, Radich JP. Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2015 Apr 1; 7(281).

⁷⁰Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD, Lamprecht TL, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton RS, McLellan MD, Dooling DJ, Wallis JW, Chen K, Harris CC, Schmidt HK, Kalicki-Veizer JM, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin MD, McMichael JF, Delehaunty KD, Fulton LA, Magrini VJ, McGrath SD, Demeter RT, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie TN, Walker JR, Watson MA, Heath SE, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Payton JE, Baty JD, Kulkarni S, Klco JM, Tomasson MH, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012 Jul 20; 150(2):264-78.

⁷¹Mehdipour P, Santoro F, Minucci S. Epigenetic alterations in acute myeloid leukemias. *FEBS J.* 2015 May; 282(9):1786-800.

⁷²Song G, Wang L, Bi K, Jiang G. Regulation of the C/EBP α signaling pathway in acute myeloid leukemia. *Oncol Rep.* 2015 May; 33(5):2099-106.

⁷³Sarojam S, Raveendran S, Vijay S, Sreedharan J, Narayanan G, Sreedharan H. Characterization of CEBPA mutations and polymorphisms and their prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(9):3785-92.

⁷⁴Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, Benthaus T, Sauerland MC, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Braess J, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K. 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.

⁷⁵Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol.* 1998 Jul; 18(7):4301-14.

⁷⁶Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, Jeromin S, Grossmann V, Eder C, Weissmann S, Dicker F, Kohlmann A, Schindela S, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia.* 2014 Apr; 28(4):794-803.

⁷⁷Snaddon J, Smith ML, Neat M, Cambal-Parrales M, Dixon-McIver A, Arch R, Amess JA, Rohatiner AZ, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutations of CEBPA in acute myeloid

leukemia FAB types M1 and M2. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 May; 37(1):72-8.

⁷⁸Song G, Wang L, Bi K, Jiang G. Regulation of the C/EBP α signaling pathway in acute myeloid leukemia. *Oncol Rep*. 2015 May; 33(5):2099-106.

⁷⁹Wen XM, Lin J, Yang J, Yao DM, Deng ZQ, Tang CY, Xiao GF, Yang L, Ma JC, Hu JB, Qian W, Qian J. Double CEBPA mutations are prognostically favorable in non-M3 acute myeloid leukemia patients with wild-type NPM1 and FLT3-ITD. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Sep 15; 7(10):6832-40.

⁸⁰Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijer J, van Oosterhoud S, van Putten WL, Valk PJ, BernaBeverloo H, Tenen DG, Löwenberg B, 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.

⁸¹Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. 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.

⁸²Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev*. 2012 Apr 17;6(1):e8. Review.

⁸³Lyman SD. Biology of FLT3 ligand and receptor. *Int J Hematol*. 1995 Aug; 62(2):63-73. Review.

⁸⁴Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:220-6.

⁸⁵Zhang S, Mantel C and Broxmeyer HE. FLT3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with GRB2 and SHC in BAF3/FLT3 cells. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 372-380.

⁸⁶Lavagna-Sevenier C, Marchetto S, Birnbaum D and Rosnet O. The CBL-related protein CBLB participates in FLT3 and interleukin-7 receptor signal transduction in pro-B cells. *J BiolChem* 1998; 273: 14962-14967.

⁸⁷Moore MA. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol* 2005; 33:719-37.

⁸⁸Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M and Jacobsen SE. Identification of FLT3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 2005; 121: 295-306.

⁸⁹Stirewalt DL and Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 650-665.

⁹⁰Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, Kato T, Yamamoto E, Suzuki K, Chen F, Asou N, Ohtake S, Miyawaki S, Miyazaki Y, Sakura T, Ozawa Y, Usui N, Kanamori H, Kiguchi T, Imai K, Uike N, Kimura F, Kitamura K, Nakaseko C, Onizuka M, Takeshita A, Ishida F, Suzushima H, Kato Y, Miwa H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Naoe T. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2014 Aug;28(8):1586-95.

⁹¹Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A and Dohner H. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-1918.

⁹²Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O and Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366: 1079-1089.

⁹³Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T and Misawa S. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-1918.

⁹⁴Sharawat SK, Bakhshi R, Vishnubhatla S, Gupta R, Bakhshi S. FLT3-ITD mutation in relation to FLT3 expression in pediatric AML: a prospective study from India. *Pediatr Hematol Oncol*. 2014 Mar; 31(2):131-7.

⁹⁵Takahashi S. Identification of Flt3 internal tandem duplications downstream targets by high throughput immunoblotting protein array system. *Am J Hematol*. 2006 Sep; 81(9):717-9.

⁹⁶Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman S, Bloomfield C. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukaemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007; 109(2):431-448.

⁹⁷Govedarovic N, Marjanovic G. Frequency and prognostic impact of FLT3-ITD mutation in patients with acute myeloid leukaemia. *J BUON*. 2011 Jan-Mar; 16(1):108-11.

⁹⁸Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, Srirangan S, Wheatley K, Burnett A, Lynch DC. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute

promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 2005;106(10):3658-3665.

⁹⁹Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. 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(12):4326-4335.

¹⁰⁰Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL and Radich JP. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724-3726.

¹⁰¹Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H and Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 2002; 21: 2555-2563.

¹⁰²Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J and Saxena K. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004; 13: 169- 178.

¹⁰³Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Muller C, Gruning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Buchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE and Serve H. FLT3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the RAS and STAT5 pathways. *Blood* 2000; 96: 3907-3914.

¹⁰⁴Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R and Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97: 2434-2439.

¹⁰⁵Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W and Schnittger S. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100: 3423-3425.

¹⁰⁶Lim Y, Gondek L, Li L, Wang Q, Ma H, Chang E, Huso DL, Foerster S, Marchionni L, McGovern K, Watkins DN, Peacock CD, Levis M, Smith BD, Merchant AA, Small D, Matsui W. Integration of Hedgehog and mutant FLT3 signaling in myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2015 Jun 10;7(291):291ra96.

¹⁰⁷Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C and Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005; 105: 4792-4799.

¹⁰⁸Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Loffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T and Hiddemann W. 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: 59-66.

¹⁰⁹Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH and Linch DC. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-1759.

¹¹⁰Blau O, Berenstein R, Sindram A, Blau IW. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 Jan; 54(1):145-52.

¹¹¹Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O, Bargay J, Pedro C, Martí JM, Torrebaddell M, Díaz-Beyá M, Camós M, Colomer D, Hoyos M, Sierra J, Esteve J; Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013 Apr 4; 121(14):2734-8.

¹¹²Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, Metzeler KH, Schwind S, Wu YZ, Kohlschmidt J, Pettenati MJ, Heerema NA, Block AW, Patil SR, Baer MR, Kolitz JE, Moore JO, Carroll AJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 20; 30(36):4515-23.

¹¹³Alpermann T, Kern W, Schnittger S, Schmid C, Kreuzer KA, Serve H, Pielken HJ, Schmitz N, Wendtner CM, Haferlach C, Haferlach T. Evaluation of the proposed reporting system of the European LeukemiaNet and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2013 Feb; 37(2):197-200.

¹¹⁴Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Batai A, Csacsovszki O, Lehoczky E, Adam E, Kozma A, Lovas N, Sipos A, Krahling T, Dolgos J, Remenyi P, Fekete S, Masszi T, Tordai A, Andrikovics H. Medium-sized FLT3 internal tandem duplications confer worse prognosis than short and long duplications in a non-elderly acute myeloid leukemia cohort. *Leuk Lymphoma*. 2014 Jul;55(7):1510-7

¹¹⁵Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK and Linch DC. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 2776-2784.

¹¹⁶Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*. 2008 Feb 1; 111(3):1552-9.

¹¹⁷Strati P, Kantarjian H, Ravandi F, Nazha A, Borthakur G, Daver N, Kadia T, Estrov Z, Garcia-Manero G, Konopleva M, Rajkhowa T, Durand M, Andreeff M, Levis M, Cortes J. Phase I/II trial of the combination of midostaurin (PKC412) and 5-azacytidine for patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol*. 2015 Apr; 90(4):276-81.

¹¹⁸Song G, Valdez BC, Li Y, Liu Y, Champlin RE, Andersson BS. Synergistic cytotoxicity of sorafenib with busulfan and nucleoside analogs in human FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplications-positive acute myeloid leukemia cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Nov; 20(11):1687-95.

¹¹⁹Scholl S, Spies-Weissbart B, Klink A, Muegge LO, Fricke HJ, Hochhaus A. Secondary resistance to sorafenib in two patients with acute myeloid leukemia (AML) harboring FLT3-ITD mutations. *Ann Hematol* 2011; 90: 473-475.

¹²⁰Pallis A, Briasoulis E, Linardou H, Papadimitriou C, Bafaloukos D, Kosmidis P and Murray S. Mechanisms of resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small-cell lung cancer: clinical and molecular considerations. *Curr Med Chem* 2011; 18: 1613-1628.

¹²¹Parmar A, Marz S, Rushton S, Holzwarth C, Lind K, Kayser S, Döhner K, Peschel C, Oostendorp RA and Gotze KS. Stromal niche cells protect early leukemic FLT3-ITD+ progenitor cells against first generation FLT3 tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res* 2011; 71: 4696-4706.

¹²²Williams AB, Li L, Nguyen B, Brown P, Levis M and Small D. Fluvastatin inhibits FLT3 glycosylation in human and murine cells and prolongs survival of mice with FLT3-ITD leukemia. *Blood* 2012; 120: 3069-3079.

¹²³O'Farrell AM, Yuen HA, Smolich B, Hannah AL, Louie SG, Hong W, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Karp JE, Albitar M, Cherrington JM, Giles FJ. Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2004 Jul; 28(7):679-89.

¹²⁴Lou YJ. Novel targeted therapy for acute myeloid leukemia with a dual FLT3 and JAK2 inhibitor. *Acta Pharmacol Sin*. 2012 Feb; 33(2):212-3.

¹²⁵Cook AM, Li L, Ho Y, Lin A, Li L, Stein A, Forman S, Perrotti D, Jove R, Bhatia R. Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and

maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2014 May 1; 123(18):2826-37.

¹²⁶Levis M, Allebach J, Tse KF, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2002 Jun 1; 99(11):3885-91.

¹²⁷Shabbir M, Stuart R. Lestaurtinib, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor: from bench to bedside. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010 Mar; 19(3):427-36.

¹²⁸Mead AJ, Gale RE, Kottaridis PD, Matsuda S, Khwaja A, Linch DC. Acute myeloid leukaemia blast cells with a tyrosine kinase domain mutation of FLT3 are less sensitive to lestaurtinib than those with a FLT3 internal tandem duplication. *Br J Haematol*. 2008 May; 141(4):454-60.

¹²⁹Levis M, Ravandi F, Wang ES, Baer MR, Perl A, Coutre S, Erba H, Stuart RK, Baccarani M, Cripe LD, Tallman MS, Meloni G, Godley LA, Langston AA, Amadori S, Lewis ID, Nagler A, Stone R, Yee K, Advani A, Douer D, Wiktor-Jedrzejczak W, Juliusson G, Litzow MR, Petersdorf S, Sanz M, Kantarjian HM, Sato T, Tremmel L, Bensen-Kennedy DM, Small D, Smith BD. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood* 2011; 117: 3294-3301.

¹³⁰Wander SA, Levis MJ, Fathi AT. The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther Adv Hematol*. 2014 Jun; 5(3):65-77.

¹³¹Ostronoff F, Estey E. The role of quizartinib in the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013 Dec; 22(12):1659-69.

¹³²Hart S, Goh KC, Novotny-Diermayr V, Tan YC, Madan B, Amalini C, Ong LC, Kheng B, Cheong A, Zhou J, Chng WJ, Wood JM. Pacritinib (SB1518), a JAK2/FLT3 inhibitor for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2011; 1: e44.

¹³³Novotny-Diermayr V, Hart S, Goh KC, Cheong A, Ong LC, Hentze H, Pasha MK, Jayaraman R, Ethirajulu K, Wood JM. The oral HDAC inhibitor pracinostat (SB939) is efficacious and synergistic with the JAK2 inhibitor pacritinib (SB1518) in preclinical models of AML. *Blood Cancer J* 2012; 2: e69.

¹³⁴Basavapathruni A, Jin L, Daigle SR, Majer CR, Therkelsen CA, Wigle TJ, Kuntz KW, Chesworth R, Pollock RM, Scott MP, Moyer MP, Richon VM, Copeland RA, Olhava EJ. Conformational adaptation drives potent, selective and durable inhibition of the human protein methyltransferase DOT1L. *Chem Biol Drug Des* 2012; 80: 971-980.

¹³⁵Smith CC, Perl AE, Lasater E, Zhang C, Jeschke GR, Damon LE, Carroll M, Shah NP. PLX3397 is an Investigational selective FLT3 inhibitor that retains activity against the clinically relevant FLT3-ITD/F691L "gatekeeper" mutation in vitro. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2011; 118: 764.

-
- ¹³⁶Grundy M, Seedhouse C, Shang S, Richardson J, Russell N, Pallis M. The FLT3 internal tandem duplication mutation is a secondary target of the aurora B kinase inhibitor AZD1152- HQPA in acute myelogenous leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 661-672.
- ¹³⁷Burton E, Wong B, Zhang J, West B, Bollag G, Habets G, Galanis A, Nguyen H, Arowojolu O, Rajhova T, Levis MJ. The Novel Inhibitor PLX3397 Effectively Inhibits FLT3-Mutant AML. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2011; 118: 3632.
- ¹³⁸Fiskus W, Smith CC, Smith J, Wise SC, Lasater E, Damon LE, Salerno S, Fleming A, Reyes R, Ganguly S, Berger MS, Rutkoski TJ, McGuirk J, Shah N and Bhalla KN. Activity of allosteric, switch-pocket, ABL/FLT3 kinase inhibitor DCC2036 against cultured and primary AML progenitors with FLT3-ITD or FLT3 kinase domain mutations. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2011; 118: 2611.
- ¹³⁹Baker SD, Zimmerman EI, Wang YD, Orwick S, Zatechka DS, Buaboonnam J, Neale GA, Olsen SR, Enemark EJ, Shurtleff S, Rubnitz JE, Mullighan CG, Inaba H. Emergence of polyclonal FLT3 tyrosine kinase domain mutations during sequential therapy with sorafenib and sunitinib in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 15; 19(20):5758-68.
- ¹⁴⁰Schittenhelm MM, Kampa KM, Yee KW, Heinrich MC. The FLT3 inhibitor tandutinib (formerly MLN518) has sequence-independent synergistic effects with cytarabine and daunorubicin. *Cell Cycle*. 2009 Aug 15; 8(16):2621-30.
- ¹⁴¹Adès L, Guerci A, Raffoux E, Sanz M, Chevallier P, Lapiere S, Recher C, Thomas X, Rayon C, Castaigne S, Tournilhac O, de Botton S, Ifrah N, Cahn JY, Solary E, Gardin C, Fegeux N, Bordessoule D, Ferrant A, Meyer-Monard S, Vey N, Dombret H, Degos L, Chevret S, Fenaux P; European APL Group. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood*. 2010; 115: 1690–6.
- ¹⁴²Serve H, Krug U, Wagner R, Sauerland MC, Heinecke A, Brunnberg U, Schaich M, Ottmann O, Duyster J, Wandt H, Fischer T, Giagounidis A, Neubauer A, Reichle A, Aulitzky W, Noppeney R, Blau I, Kunzmann V, Stuhlmann R, Krämer A, Kreuzer KA, Brandts C, Steffen B, Thiede C, Müller-Tidow C, Ehninger G, Berdel WE. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 1; 31(25):3110-8.
- ¹⁴³Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, Janning M, Krauter J, Schittenhelm M, Götze K, Weber D, Göhring G, Teleanu V, Thol F, Heuser M, Döhner K, Ganser A, Döhner H, Schlenk RF. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br J Haematol*. 2015 Jun; 169(5):694-700.
- ¹⁴⁴Macdonald DA, Assouline SE, Brandwein J, Kamel-Reid S, Eisenhauer EA, Couban S, Caplan S, Foo A, Walsh W, Leber B. A phase I/II study of sorafenib in

combination with low dose cytarabine in elderly patients with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome from the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: trial IND.186. *Leuk Lymphoma*. 2013; 54:760–6.

¹⁴⁵Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, Eichenlaub S, Reindl C, Ellwart JW, Hiddemann W, Spiekermann K. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* 2005; 105:3679-85.

¹⁴⁶Zauli G, Celeghini C, Melloni E, Voltan R, Ongari M, Tiribelli M, di Iasio MG, Lanza F and Secchiero P. The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of the FLT3 and p53 status. *Haematologica* 2012; 97: 1722-30.

¹⁴⁷Tzakos AG, Fokas D, Johannes C, Moussis V, Hatzimichael E and Briasoulis E. Targeting oncogenic protein-protein interactions by diversity oriented synthesis and combinatorial chemistry approaches. *Molecules* 2011; 16: 4408-4427.

¹⁴⁸Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *New Engl Med* 2005; 352: 254-266.

¹⁴⁹Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and Cancer. *Nat Rev Canc* 2006; 6: 493-505.

¹⁵⁰Brady SN, Yu Y, Maggi LB Jr, Weber JD. ARF impedes NPM/B23 Shuttling in an Mdm2-Sensitive Tumor Suppressor Pathway. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9327-9338.

¹⁵¹Poletto M, Lirussi L, Wilson DM 3rd, Tell G. Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins. *Mol Biol Cell*. 2014 May; 25(10):1641-52.

¹⁵²Shahab S, Shamsi TS, Ahmed N. Prognostic involvement of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(10):5615-20.

¹⁵³Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci*. 2013 May; 22(5):545-56.

¹⁵⁴Boonthimat C, Thongnoppakhun W, Auewarakul CU. Nucleophosmin mutation in southeast asian acute myeloid leukemia: eight novel variants, FLT3 coexistence and prognostic impact of NPM1/FLT3 mutations. *Haematologica* October 2008 93: 1565-1569.

-
- ¹⁵⁵Gallagher SJ, Kefford RF, Rizos H. The ARF tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1637-1641.
- ¹⁵⁶Reboutier D, Troadec MB, Cremet JY, Fukasawa K, Prigent C. Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J Cell Biol* 2012; 197: 19-26.
- ¹⁵⁷Quan J, Gao YJ, Yang ZL, Chen H, Xian JR, Zhang SS, Zou Q, Zhang L. Quantitative detection of circulating nucleophosmin mutations DNA in the plasma of patients with acute myeloid leukemia. *Int J Med Sci.* 2015 Jan 1; 12(1):17-22.
- ¹⁵⁸Perry AM, Attar EC. New insights in AML biology from genomic analysis. *Semin Hematol.* 2014 Oct; 51(4):282-97.
- ¹⁵⁹Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109: 874-885.
- ¹⁶⁰Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 2008; 283: 23326- 23332.
- ¹⁶¹Albiero E, Madeo D, Bolli N, Giaretta I, Bona ED, Martelli MF, Nicoletti I, Rodeghiero F, Falini B. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. *Leukemia* 2007; 21: 1099- 1103.
- ¹⁶²Pitiot AS, Santamaria I, Garcia-Suarez O, Centeno I, Astudillo A, Rayon C, Balbin M. A new type of NPM1 gene mutation in AML leading to a C-terminal truncated protein. *Leukemia* 2007; 21: 1564-1566.
- ¹⁶³Cuomo ME, Knebel A, Morrice N, Paterson H, Cohen P, Mitnacht S. p53-Driven apoptosis limits centrosome amplification and genomic instability downstream of NPM1 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2008 Jun;10(6):723-30.
- ¹⁶⁴Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, Volorio S, Bernard L, Pruneri G, Alcalay M, Pelicci PG. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia associated NPM mutant. *Cancer Res* 2006; 66: 3044-3050.
- ¹⁶⁵Peterlin P, Renneville A, Ben Abdelali R, Nibourel O, Thomas X, Pautas C, de Botton S, Raffoux E, Cayuela JM, Boissel N, Terré C, Celli-Lebras K, Castaigne S, Preudhomme C, Gardin C, Dombret H. Impact of additional genetic alterations on the outcome of patients with NPM1-mutated cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2015 May;100(5):e196-9.
- ¹⁶⁶Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F, Milano F, Pierangeli S, Mulas F, Pacini R, Tabarrini A, Pettirossi V, Rossi R, Vetro C, Brunetti L, Sportoletti P, Tiacci E, Di

Raimondo F, Falini B. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1 mutated AML cells. *Blood*. 2015 May 28;125(22):3455-65

¹⁶⁷Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107(10):4011-4020.

¹⁶⁸Sportoletti P, Varasano E, Rossi R, Bereshchenko O, Cecchini D, Gionfriddo I, Bolli N, Tiacci E, Intermesoli T, Zanghì P, Masciulli A, Martelli MP, Falzetti F, Martelli MF, Falini B. The human NPM1 mutation A perturbs megakaryopoiesis in a conditional mouse model. *Blood*. 2013 Apr 25; 121(17):3447-58.

¹⁶⁹Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, Kuo MC, Lai CL, Hsu HC. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002; 100(7):2387-2392.

¹⁷⁰Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008; 22(5):915-931.

¹⁷¹Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106(12):3740-3746.

¹⁷²Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005;106(12):3733-3739.

¹⁷³Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106(12):3747-3754.

¹⁷⁴Falini B, Sportoletti P, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2009 Nov; 21(6):573-81.

¹⁷⁵Greiner J, Schneider V, Schmitt M, Götz M, Döhner K, Wiesneth M, Döhner H, Hofmann S. Immune responses against the mutated region of cytoplasmic NPM1 might contribute to the favorable clinical outcome of AML patients with NPM1 mutations (NPM1mut). *Blood*. 2013 Aug 8; 122(6):1087-8.

¹⁷⁶Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, Haferlach T.

Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1109-20.

¹⁷⁷Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Paschka P, Powell BL, Carter TH, Koltz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):596-604.

¹⁷⁸Jongen-Lavrencic M1, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Löwenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111(10):5078-5085.

¹⁷⁹Chou WC, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, Wu SJ, Huang CF, Chiou RJ, Tseng MH, Lin DT, Lin KH, Chen YC, Tien HF. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 2006; 66: 3310-3316.

¹⁸⁰Falini B, Gionfriddo I, Cecchetti F, Ballanti S, Pettirossi V and Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): any hope for a targeted therapy? *Blood Rev* 2011; 25: 247-254.

¹⁸¹Chen CY, Chou WC, Tsay W, Tang JL, Yao M, Huang SY, Tien HF. Hierarchical cluster analysis of immunophenotype classify AML patients with NPM1 gene mutation into two groups with distinct prognosis. *BMC Cancer*. 2013 Mar 8; 13:107.

¹⁸²Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Ueda R, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Oct 15; 106(8):2854-61.

¹⁸³Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, Tigaud I, Castaigne S, Raffoux E, De Botton S, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005 Nov 15; 106(10):3618-20.

¹⁸⁴Schlenk RF, Dohner K, Kneba M, Gotze K, Hartmann F, Del Valle F, Kirchen H, Koller E, Fischer JT, Bullinger L, Habdank M, Spath D, Groner S, Krebs B, Kayser S, Corbacioglu A, Anhalt A, Benner A, Frohling S, Dohner H. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* 2009; 94: 54-60.

¹⁸⁵Balusu R, Fiskus W, Rao R, Chong DG, Nalluri S, Mudunuru U, Ma H, Chen L, Venkannagari S, Ha K, Abhyankar S, Williams C, McGuirk J, Khoury HJ, Ustun C, Bhalla KN. Targeting levels or oligomerization of nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1. *Blood* 2011; 118: 3096-3106.

¹⁸⁶Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, Roti G, Rosati R, Martelli MF, Diverio D, Lo Coco F, Biondi A, Saglio G, Mecucci C, Falini B. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying NPM1 gene mutation. *Leukemia* 2006; 20: 1103-1108.

¹⁸⁷Gray JX, McMillen L, Mollee P, Paul S, Lane S, Bird R, Gill D, Saal R, Marlton P. WT1 expression as a marker of minimal residual disease predicts outcome in acute myeloid leukemia when measured post-consolidation. *Leuk Res.* 2012 Apr; 36(4):453-8.

¹⁸⁸Sakamoto Y, Mariya Y, Sasaki S, Teshiromori R, Oshikiri T, Segawa M, Ogura K, Akagi T, Kubo K, Kaimori M, Funato T. WT1 mRNA level in peripheral blood is a sensitive biomarker for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Tohoku J Exp Med.* 2009 Oct;219(2):169-76.

¹⁸⁹Nowakowska-Kopera A, Sacha T, Florek I, Zawada M, Czekalska S, Skotnicki AB. Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2009 Aug; 50(8):1326-32.

¹⁹⁰Candoni A, Toffoletti E, Gallina R, Simeone E, Chiozzotto M, Volpetti S, Fanin R. Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transplant.* 2011 Mar-Apr; 25(2):308-16.

¹⁹¹Kwon M, Martínez-Laperche C, Infante M, Carretero F, Balsalobre P, Serrano D, Gayoso J, Pérez-Corral A, Anguita J, Díez-Martín JL, Buño I. Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012 Aug; 18(8):1235-42.

¹⁹²Polak J, Hajkova H, Haskovec C, Cechova H, Marinov I, Mikulenková D, Markova J, Markova M, Vitek A, Valkova V. Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - a useful tool for early detection of minimal residual disease. *Neoplasma.* 2013; 60(1):74-82.

¹⁹³Polák J, Hájková H, Maalaufová-Soukupová J, Marková J, Sálek C, Schwarz J, Haškovec C. Estimation of molecular upper remission limit for monitoring minimal residual disease in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients by WT1 expression. *Exp Ther Med.* 2012 Jan; 3(1):129-133.

¹⁹⁴Rossi G, Carella AM, Minervini MM, Savino L, Fontana A, Pellegrini F, Greco MM, Merla E, Quarta G, Loseto G, Capalbo S, Palumbo G, Cascavilla N. Minimal residual disease after allogeneic stem cell transplant: a comparison among multiparametric flow cytometry, Wilms tumor 1 expression and chimerism status (Complete chimerism versus Low Level Mixed Chimerism) in acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 Dec; 54(12):2660-2666.

¹⁹⁵Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 1; 27(31):5195-201.

¹⁹⁶Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, Franke GN, Cross M, Scholz M, Leiblein S, Al-Ali HK, Edelmann J, Thiery J, Niederwieser D. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*. 2011 Mar; 25(3):498-505.

¹⁹⁷Candoni A, Tiribelli M, Toffoletti E, Cilloni D, Chiarvesio A, Michelutti A, Simeone E, Pipan C, Saglio G, Fanin R. Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2009 Jan; 82(1):61-8.

¹⁹⁸Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.

¹⁹⁹Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30; 114(5):937-51.

²⁰⁰Brothman AR, Persons DL, Shaffer LG. Nomenclature evolution: Changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 127(1):1-4.

²⁰¹Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. 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 Oct 1;92(7):2322-33.

²⁰²Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T,

Neubauer A, Ehninger G. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*. 2001 Feb; 15(2):293-302.

²⁰³Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999 May 1; 93(9):3074-80.

²⁰⁴Wang LH, Wang M, Zhou CL, Chen S, Zhang XW, Xing HY, Wang JX. Detection of point mutation at second tyrosine kinase domain of FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2005 Jun; 26(6):335-8.

²⁰⁵Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. 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 Oct 1; 61(19):7233-9.

²⁰⁶Kharazi S, Mead AJ, Mansour A, Hultquist A, Böiers C, Luc S, Buza-Vidas N, Ma Z, Ferry H, Atkinson D, Reckzeh K, Masson K, Cammenga J, Rönstrand L, Arai F, Suda T, Nerlov C, Sitnicka E, Jacobsen SE. Impact of gene dosage, loss of wild-type allele, and FLT3 ligand on FLT3-ITD-induced myeloproliferation. *Blood*. 2011 Sep 29; 118(13):3613-21.

²⁰⁷Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, Held G, Brossart P, Lübbert M, Salih HR, Kindler T, Horst HA, Wulf G, Nachbaur D, Götze K, Lamparter A, Paschka P, Gaidzik VI, Teleanu V, Späth D, Benner A, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K; German-Austrian AML Study Group. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*. 2014 Nov 27; 124(23):3441-9.

²⁰⁸Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschürtz F, Gaidzik VI, Kühn MW, Rücker FG, Holzmann K, Paschka P, Kapp-Schwörer S, Späth D, Kindler T, Schittenhelm M, Krauter J, Ganser A, Göhring G, Schlegelberger B, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Jul 4; 122(1):100-8.

²⁰⁹Alpermann T, Schnittger S, Eder C, Dicker F, Meggendorfer M, Kern W, Schmid C, Aul C, Staib P, Wendtner CM, Schmitz N, Haferlach C, Haferlach T. Molecular subtypes of NPM1 mutations have different clinical profiles, specific patterns of accompanying molecular mutations and varying outcome in intermediate risk acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015 Oct 15. pii: haematol.2015.133819. [Epub ahead of print]

- ²¹⁰Dunna NR, Rajappa S, Digumarti R, Vure S, Kagita S, Damineni S, Rao VR, Yadav SK, Ravuri RR, Satti V. Fms like tyrosine kinase (FLT3) and nucleophosmin 1 (NPM1) mutations in de novo normal karyotype acute myeloid leukemia (AML). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010; 11(6):1811-6.
- ²¹¹Ostronoff F, Othus M, Lazenby M, Estey E, Appelbaum FR, Evans A, Godwin J, Gilkes A, Kopecky KJ, Burnett A, List AF, Fang M, Oehler VG, Petersdorf SH, Pogossova-Agadjanyan EL, Radich JP, Willman CL, Meshinchi S, Stirewalt DL. Prognostic significance of NPM1 mutations in the absence of FLT3-internal tandem duplication in older patients with acute myeloid leukemia: a SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council report. *J Clin Oncol*. 2015 Apr 1; 33(10):1157-64.
- ²¹²Ånensen N, Hjelle SM, Van Belle W, Haaland I, Silden E, Bourdon JC, Hovland R, Taskén K, Knappskog S, Lønning PE, Bruserud Ø, Gjertsen BT. Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2012 Mar 22; 31(12):1533-45.
- ²¹³Jain P, Kantarjian H, Patel K, Faderl S, Garcia-Manero G, Benjamini O, Borthakur G, Pemmaraju N, Kadia T, Daver N, Nazha A, Luthra R, Pierce S, Cortes J, Ravandi F. Mutated NPM1 in patients with acute myeloid leukemia in remission and relapse. *Leuk Lymphoma*. 2014 Jun; 55(6):1337-44.
- ²¹⁴Pastore F, Greif PA, Schneider S, Ksienzyk B, Mellert G, Zellmeier E, Braess J, Sauerland CM, Heinecke A, Krug U, Berdel WE, Buechner T, Woermann B, Hiddemann W, Spiekermann K. The NPM1 mutation type has no impact on survival in cytogenetically normal AML. *PLoS One*. 2014 Oct 9; 9(10):e109759.
- ²¹⁵Hefazi M, Siddiqui M, Patnaik M, Wolanskyj A, Alkhateeb H, Zblewski D, Elliott M, Hogan W, Litzow M, Al-Kali A. Prognostic impact of combined NPM1+/FLT3-genotype in patients with acute myeloid leukemia with intermediate risk cytogenetics stratified by age and treatment modalities. *Leuk Res*. 2015 Sep 3. pii: S0145-2126(15)30372-6. doi: 10.1016/j.leukres.2015.09.001. [Epub ahead of print].
- ²¹⁶Thol F, Kölking B, Damm F, Reinhardt K, Klusmann JH, Reinhardt D, von Neuhoff N, Brugman MH, Schlegelberger B, Suerbaum S, Krauter J, Ganser A, Heuser M. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Jul; 51(7):689-95.
- ²¹⁷Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, Nibourel O, Gardin C, Rousselot P, Castaigne S, Gruson B, Berthon C, Soua Z, Renneville A. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2012 Mar;36(3):316-23.
- ²¹⁸Gallagher RE, Yeap BY, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Rao S, Bloomfield CD, Appelbaum FR, Tallman MS, Slack JL, Willman CL. Quantitative real-time RT-PCR

analysis of PML-RAR alpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood*. 2003 Apr 1; 101(7):2521-8.

²¹⁹Perea G, Lasa A, Aventín A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano MP, Llorente A, Juncà J, Palacios C, Fernández C, Gallart M, Font L, Tormo M, Florensa L, Bargay J, Martí JM, Vivancos P, Torres P, Berlanga JJ, Badell I, Brunet S, Sierra J, Nomdedéu JF; Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mieloblásticas. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia*. 2006 Jan; 20(1):87-94.

²²⁰Schüler F, Dölken G. Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR. *Clin Chim Acta* 2006; 363:147-56.

²²¹Liu Yin JA. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15:119-35.

²²²Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, Rege-Cambrin G, Guerrasio A, Divona M, Lo Coco F, Saglio G. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*. 2002 Oct;16(10):2115-21.

²²³Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Masaoka T, Nasu K. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 1994 Nov 1; 84(9):3071-9.

²²⁴Brieger J, Weidmann E, Maurer U, Hoelzer D, Mitrou PS, Bergmann L. The Wilms' tumor gene is frequently expressed in acute myeloblastic leukemias and may provide a marker for residual blast cells detectable by PCR. *Ann Oncol* 1995; 8:811-6.

²²⁵Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004;125:590-600.

²²⁶Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C, Lai JL, Ballerini P, Mazingue F, Fasola S, Dehée A, Bellman F, Adam M, Labopin M, Douay L, Leverger G, Preudhomme C, Landman-Parker J. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2006 Apr 1;24(10):1507-15.

²²⁷Trka J, Kalinová M, Hrusák O, Zuna J, Krejčí O, Madzo J, Sedláček P, Vávra V, Michalová K, Jarosová M, Starý J; For Czech Paediatric Haematology Working Group. Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children

BIBLIOGRAFÍA

with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*. 2002 Jul; 16(7):1381-9.

²²⁸Tamaki H, Ogawa H, Inoue K, Soma T, Yamagami T, Miyake S, Oka Y, Oji Y, Tatekawa T, Tsuboi A, Tagawa S, Kitani T, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H, Miwa H, Kita K. Increased expression of the Wilms tumor gene (WT1) at relapse in acute leukemia. *Blood*. 1996 Dec 1; 88(11):4396-8.