

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Medicina

Programa de Medicina



**ESTUDIO DEL GEN *WT1* EN LA
LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Irene Luna del Valle

Dirigida por:

Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Dra. Esperanza Such Taboada



VNIVERSITAT D VALÈNCIA
Departament de Medicina

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

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

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: “ESTUDIO DEL GEN *WT1* EN LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA”, ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Irene Luna del Valle**, Licenciada en Medicina, y reúne, a nuestro juicio condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de **Doctor**.

Valencia, 3 febrero de 2016

Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Dr. Esperanza Such Taboada

AGRADECIMIENTOS

Con estas palabras me gustaría agradecer a todas las personas que me han acompañado y han permitido que esta Tesis vea la luz, acompañándome en mi carrera profesional durante mis años en el Servicio de Hematología del Hospital La Fe.

Mi más sincero agradecimiento al Prof. Miguel Angel Sanz, mi director de Tesis así como mi jefe durante la mayor parte de mi carrera profesional, gracias por haberme permitido formar parte de este excelente equipo y haber confiado en mí durante todos estos años.

A mi co-directora de Tesis la Dra. Esperanza Such, por ser mi amiga, por enseñarme a organizarme en un laboratorio, por tener paciencia infinita con mis ""escasos"" estudios estadísticos realizados en este proyecto. Espero poder seguir compartiendo mis logros contigo y por supuesto confío en que seguiremos siendo amigas para siempre.

Gracias al Dr. Jose Cervera por aceptarme en el club de las "Citog's" y haberme enseñado con mucha paciencia todo lo que he aprendido sobre citogenética, haber sido un gran "jefe" y haberme permitido desarrollar todos los experimentos de este proyecto con total libertad.

Gracias a la Dra. Eva Barragán por su esfuerzo en la mejora de esta Tesis y por iniciarme en el conocimiento de *WT1*.

A mis compañeras de laboratorio durante estos años, porque gracias a vosotras el trabajo se convirtió en un lugar al que desear ir los lunes por la mañana, por las horas incontables de comidas en los sótanos sin luz, por hacerme reír y ayudarme en los momentos difíciles. Especialmente a María López, por lo que tú ya sabes y por seguirme la corriente con las teorías de la conspiración y los proyectos pirómanos. Por supuesto también a mi compañera de nombre (Irenés) por todos estos años enseñándome tantas cosas de la ciencia y de la vida, aunque no supieras quien era Yoko Ono. A Mariam por estar siempre dispuesta a ayudar, a enseñarme el trabajo de bancada y a lidiar con el HRM en sus inicios. A M^a Angeles Silla, nuestra "mami" del laboratorio, por cuidarnos tan bien. Y como no agradecer a todos los técnicos de laboratorio (Bea, Iván, Ana, Desi...) su colaboración en este trabajo.

Al Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital La Fe, por todo lo vivido durante estos años y también gracias a mis nuevos compañeros en el Hospital General, por ayudarme a crecer en mi trayectoria profesional.

A mi familia por su apoyo y amor incondicional, especialmente a mi padre Daniel, por prestarme su ordenador gigante y a mi madre Gloria, por acogerme de nuevo en casa tantas tardes. A mis hermanos por estar siempre a mi lado.

Y especialmente a mi compañero de vida, a Jorge "papá", por aguantarme todo este tiempo, quererme tal cual soy y ser el mejor padre del mundo. A mi hijo Jorge, por ser el motor de mi vida y a mi futuro hijo Daniel, por acelerar el fin de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	I
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	V
GLOSARIO DE GENES	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Leucemia Mieloide Aguda.....	3
1.1.1. Epidemiología	3
1.1.2. Etiología	4
1.1.3. Patogénesis.....	4
1.1.4. Clasificación de la LMA.....	12
1.1.5. Factores pronóstico en la LMA	14
1.1.6. Tratamiento	25
1.2. El gen del tumor de Wilms (WT1).....	26
1.2.1. Estructura y funciones	26
1.2.2. WT1 en la leucemia aguda	28
2. HIPÓTESIS	35
3. OBJETIVOS	39
4. MATERIAL Y MÉTODOS	43
4.1. Pacientes.....	45
4.2. Controles	46
4.3. Estudio citogenético	46
4.3.1. Citogenética convencional.....	46
4.3.2. FISH	47
4.4. Estudio de las alteraciones moleculares	47
4.4.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	47
4.4.2. Retrotranscripción del RNA	49
4.4.3. Caracterización molecular de los pacientes.....	49

4.5.	Estudio del gen <i>WT1</i>	50
4.5.1.	Expresión total de <i>WT1</i>	50
4.5.2.	Análisis de variantes genéticas de <i>WT1</i>	50
4.5.3.	Análisis de las isoformas de <i>WT1</i>	54
4.5.4.	Análisis de los miRNA	56
4.6.	Análisis estadístico	57
4.6.1.	Descriptivo	57
4.6.2.	Supervivencia	58
5.	RESULTADOS	59
5.1.	Características de los pacientes.	61
5.1.1.	Características clínicas	63
5.1.2.	Citogenética	63
5.1.3.	Alteraciones moleculares	64
5.2.	Estudio del gen <i>WT1</i>	65
5.2.1.	Expresión total de <i>WT1</i>	65
5.2.2.	Variantes genéticas de <i>WT1</i>	67
5.2.3.	Expresión de las isoformas de <i>WT1</i>	73
5.2.4.	miRNA <i>WT1</i>	78
5.3.	Correlación de las alteraciones en el gen <i>WT1</i>	82
5.4.	Análisis de supervivencia en la serie global	90
5.4.1.	Características clínico biológicas	90
5.4.2.	Gen <i>WT1</i>	91
5.4.3.	Análisis mediante riesgos competitivos (Fine-Gray)	99
5.4.4.	Análisis mediante regresión de Cox (Multivariante) ...	101
5.5.	Análisis de supervivencia por subgrupos	102
5.5.1.	Subgrupo de Cariotipo Normal	102
5.5.2.	Subgrupo menor de 60 años	106
5.5.3.	Subgrupos FAB	110
5.5.4.	Riesgo citogenético	122
5.5.5.	Análisis de supervivencia según los miRNA	131
6.	DISCUSIÓN	133
6.1.	Expresión total de <i>WT1</i>	136
6.2.	Expresión de las isoformas principales	137
6.3.	Mutaciones en el gen <i>WT1</i>	140

6.4. SNP rs 16754 de <i>WT1</i>	142
6.5. Expresión de los miRNA relacionados con <i>WT1</i>	144
6.6. Asociaciones	145
7. CONCLUSIONES	147
8. BIBLIOGRAFÍA.....	151
9. ANEXO	179

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- DNA** = Ácido desoxirribonucleico
- RNA** = Ácido ribonucleico
- CALGB** = Cancer and Leukemia Group B
- CBF** = Core-binding factor
- CGH** = Hibridación genómica comparada
- CIR** = cumulative incidence of relapse
- CMH** = Células madre hematopoyéticas
- CN** = Cariotipo normal
- CV** = Coeficiente de variación
- DMSO** = Dimetilsulfóxido
- DPT** = Duplicaciones en tándem de MLL
- EBMT** = European Group for Blood and Marrow Transplantation
- ELN** = European leukemia net
- ERM** = Enfermedad residual mínima
- FAB** = Franco-Americano-Británico
- FISH** = Fluorescence in situ hybridization
- GEP** = Perfiles de expresión génica
- HOVON-SAKK** = The Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group and the Swiss Group for Clinical Cancer Research
- HRM** = High Resolution Melting
- ISCN** = Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica
- KDa** = Kilodaltons
- LMA** = leucemia mieloide aguda
- MO** = Médula ósea
- MRC** = Medical Research Council
- Mut** = Mutado
- Neg** = Negativo
- NGS** = Next-generation sequencing
- OMS** = Organización Mundial de la Salud
- PCR** = Polymerase chain reaction
- Pos** = positivo

QT = Quimioterapia
RC = Remisión completa
SCU = Sangre de cordón umbilical
SG = Supervivencia global
SLE = Supervivencia libre de enfermedad
SNP = Single Nucleotide Polymorphism
SP = Sangre periférica
SSP = sequence-specific primer
STR = short tandem repeat
SWOG/ECOG = Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative
Oncology Group
TPH = trasplante de progenitores hematopoyéticos
UPD = disomía uniparental
WES = Whole Exome Sequencing
wt = Wild-type

GLOSARIO DE GENES

ABL = Abelson

BAALC = Brain and acute leukemia, citoplasmático

BCOR = BCL6 corepresor

CCNE1 = Ciclina D1

CEBPA = CCAAT enhancer binding protein alpha

DNMT3A = DNA methyltransferase 3A

ERG = ETS-related-gene

EVI1 = ecotropic virus integration-1

FLT3 = Fms-like Tyrosine kinase

GUS = Beta-glucoronidasa

HOX = Homeobox

IDH = Isocitrate deshidrogenasa

NPM1 = Nucleofosmina

MDR1 = Multidrug resistance

MLL = Mixed Lineage Leukemia

MN1 = meningioma 1

PRAME = preferentially expressed antigen in melanoma

RAS = Rat Sarcoma

RUNX1 = Runt-related transcription factor 1

TET2 = ten-eleven-translocation 2

WT1 = Gen del tumor de Wilms

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación FAB de la LMA	12
Tabla 2. Clasificación de las neoplasias mieloides agudas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2008)*	13
Tabla 3. Factores pronóstico adversos en la LMA	15
Tabla 4. Clasificación pronostica de la LMA según las anomalías citogenéticas en los diferentes grupos cooperativos	16
Tabla 5. Nuevas variaciones genéticas recurrentes en adultos con LMA: Significado biológico y clínico.....	19
Tabla 6. Secuencias de cebadores para el estudio de las mutaciones de <i>WT1</i>	51
Tabla 7. Programa de amplificación de la PCR por HRM.....	52
Tabla 8. Características principales de la serie global de pacientes con LMA <i>de novo</i>	61
Tabla 9. Comparación de características basales de los pacientes según la expresión del gen <i>WT1</i>	66
Tabla 10. Mutaciones encontradas en el gen <i>WT1</i>	69
Tabla 11. Comparación de características basales de los pacientes según el estado mutacional del gen <i>WT1</i>	70
Tabla 12. Comparación de características basales de los pacientes de los genotipos <i>WT1^{AA}</i> y <i>WT1^{AG}</i>	72
Tabla 13. Porcentaje de expresión de las distintas isoformas de <i>WT1</i> en las líneas celulares leucémicas.....	75
Tabla 14. Expresión de <i>WT1</i> total en función de las variaciones en la secuencia del gen <i>WT1</i>	83
Tabla 15. Relación entre el fenotipo del <i>SNP</i> de <i>WT1</i> y la expresión relativa de sus cuatros isoformas principales	83

Tabla 16. Expresión de los miRNA en función de las variaciones en la secuencia del gen <i>WT1</i>	85
Tabla 17. Expresión de los miRNA en función de la expresión de cada una de las isoformas principales de <i>WT1</i>	87
Tabla 18. Expresión de los miRNA en función de la expresión de <i>WT1</i> total.....	89
Tabla 19. Análisis univariante de la serie global	90
Tabla 20. Análisis univariante para la expresión total de <i>WT1</i> en distintos puntos de corte	92
Tabla 21. Análisis de supervivencia en la serie global en función de la expresión de las isoformas de <i>WT1</i>	94
Tabla 22. Análisis de supervivencia en la serie global en función de las variaciones genéticas de <i>WT1</i>	94
Tabla 23. Análisis univariante completo en función de la baja o alta expresión de los distintos miRNA estudiados	96
Tabla 24. Análisis de Incidencia Acumulada de la serie global	99
Tabla 25. Análisis multivariante mediante regresión de Cox de la serie global.....	102
Tabla 26. Análisis univariante en el subgrupo de CN	103
Tabla 27. Incidencia acumulada en el subgrupo de cariotipo normal para las variables significativas.....	105
Tabla 28. Análisis multivariante mediante regresión de Cox del subgrupo de cariotipo normal.....	106
Tabla 29. Análisis univariante en el subgrupo de pacientes menores de 60 años.....	107
Tabla 30. CIR en el subgrupo de pacientes menores de 60 años.....	109
Tabla 31. Análisis multivariante en el subgrupo de pacientes menores de 60 años.....	110
Tabla 32. CIR en el subgrupo FAB M0.....	111

Tabla 33. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M0	111
Tabla 34. CIR en el subgrupo FAB M1.....	113
Tabla 35. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M1	114
Tabla 36. CIR en el subgrupo FAB M2.....	116
Tabla 37. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M2	117
Tabla 38. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M4	119
Tabla 39. Análisis univariante en el subgrupo FAB M5	119
Tabla 40. CIR en el subgrupo FAB M5.....	121
Tabla 41. CIR en el subgrupo de citogenética favorable	123
Tabla 42. Análisis univariante en el grupo de riesgo citogenético intermedio	125
Tabla 43. CIR en el grupo de riesgo citogenético intermedio	127
Tabla 44. Análisis multivariante en el grupo de riesgo citogenético intermedio	128
Tabla 45. CIR en el grupo de riesgo citogenético adverso	130
Tabla 46. Resumen de los hallazgos encontrados en el análisis de supervivencia de los miRNA.....	132
Tabla 47. Comparación de características en los pacientes de acuerdo a la expresión de las isoformas de <i>WT1</i>	181
Tabla 48. Comparación de características basales de los pacientes según la expresión de los miRNA	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de las alteraciones cromosómicas más comunes	64
Figura 2. Estatus mutacional <i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i>	65
Figura 3. Resultados de las curvas de fusión derivadas del análisis de HRM	68
Figura 4. Detalle de las diferentes curvas de fusión encontradas en el análisis por HRM	70
Figura 5. Análisis de fragmentos obtenido mediante PCR Multiplex de las isoformas de <i>WT1</i>	73
Figura 6. Expresión relativa de cada isoforma de <i>WT1</i> en la serie control CD34+	74
Figura 7. Expresión relativa de cada isoforma de <i>WT1</i> en la serie de pacientes	76
Figura 8. Expresión de <i>WT1</i> total y patrón de expresión de cada isoforma en el grupo control y en la serie de pacientes	77
Figura 9. Dendrogramas de un análisis de clustering supervisado	79
Figura 10. Análisis de componentes principales donde se observa el agrupamiento de las muestras por su similitud	79
Figura 11. Comparación de la expresión de los distintos miRNA en la serie de casos frente a los controles de CD34+ y SP	81
Figura 12. Expresión relativa de cada isoforma en los subgrupo de pacientes <i>WT1</i> ^{AA} y <i>WT1</i> ^{AG}	84
Figura 13. Curvas de SG, SLR y SLE en función de la expresión total de <i>WT1</i> según los puntos de corte en A) P25; B) P50; y C) P75	92
Figura 14. Curvas de SV en la serie global en función de la expresión de la isoforma D	93
Figura 15. Curvas de SG, SLE y SLR en función de la presencia o no de mutaciones en el gen <i>WT1</i>	95

Figura 16. Curvas de SG, SLR y SLE en función del genotipo del SNP <i>rs16754</i>	95
Figura 17. Curvas de SV de la serie global	97
Figura 18. Curvas de incidencia acumulada de los miR-425, miR-500 y miR-1307	101
Figura 19. Curvas de SV en el subgrupo de CN	104
Figura 20. Curvas de CIR en el subgrupo de CN de los miR-324, miR-500 y miR-1307	105
Figura 21. Curvas de SV en el subgrupo de pacientes menores de 60 años	108
Figura 22. Curvas de CIR en el subgrupo de menores de 60 años de los miR-425, miR-500 y miR-1307	109
Figura 23. Curvas de SV en el subgrupo FAB M0	110
Figura 24. Curva de CIR en el subgrupo FAB M0 para la expresión de <i>WT1</i> total	111
Figura 25. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la expresión de la isoforma D	112
Figura 26. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la expresión del miR-503	112
Figura 27. Curva de CIR en el subgrupo FAB M1 para la expresión del miR-503	113
Figura 28. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la expresión de los miRNA	115
Figura 29. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la presencia de mutaciones en <i>WT1</i>	116
Figura 30. Curva de CIR en el subgrupo FAB M2 para los miR-132 y miR-193	117
Figura 31. Curvas de SV en el subgrupo FAB M4 según la expresión de la isoforma D	118

Figura 32. Curvas de SV en el subgrupo FAB M4 según la expresión de los miRNA	118
Figura 33. Curvas de SV en el subgrupo FAB M5	120
Figura 34. Curvas de CIR en el subgrupo FAB M5 para los miR-188, miR-193, miR-324, miR-424, miR-425, miR-500, miR-941 y miR-1307	122
Figura 35. Curvas de SV en el subgrupo de citogenética favorable ...	123
Figura 36. Curva de CIR en el subgrupo de citogenética favorable para la presencia de mutaciones en el gen <i>WT1</i>	124
Figura 37. SG para la isoforma C en el grupo de riesgo citogenético intermedio	125
Figura 38. Curvas de supervivencia en el grupo de riesgo citogenético intermedio	126
Figura 39. Curvas de CIR en el subgrupo de riesgo citogenético intermedio para los miR132, miR-324, miR-425, miR-500 y miR-1307	128
Figura 40. Curvas de supervivencia en el grupo de riesgo citogenético adverso según la expresión de las isoformas A) A y B) D de <i>WT1</i>	129
Figura 41. Curvas de supervivencia en el grupo de riesgo citogenético adverso según la expresión de los miRNA	130
Figura 42. Curvas de CIR en el subgrupo de riesgo citogenético desfavorable para la expresión de la isoforma D y los miR-424 y miR-425.....	131

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Leucemia Mieloide Aguda

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

1.1.1. Epidemiología

En los países occidentales, la LMA tiene una incidencia estimada de 3 casos nuevos por 100.000 habitantes al año, produciéndose un incremento progresivo con la edad, hasta alcanzar un pico de 12,6 por 100.000 habitantes/año en pacientes mayores de 65 años (Parkin *et al*, 2005). Se estima que en Europa el 0,6% de todas las formas de cáncer corresponden a LMA, lo que equivale a unos 18.000 casos nuevos al año, suponiendo para una población como la española entre 900 y 1000 nuevos casos anuales. Esta enfermedad comprende el 80% de las leucemias agudas en adultos y el 15-20% de las pediátricas, siendo la neoplasia más frecuente en neonatos. Dentro de la totalidad de los procesos neoplásicos, la LMA es la causante del 1,2% de la mortalidad global por cáncer.

1.1.2. Etiología

Pese a que en la gran mayoría de los casos la causa de la LMA se desconoce, se sabe que hay diversos factores que predisponen a sufrir esta enfermedad y que podrían explicar hasta un 5% de los casos. Entre ellos destacan los factores genéticos, las inmunodeficiencias, ciertos factores ambientales y los virus.

Varios hechos apoyan la participación de factores genéticos en el desarrollo de las LMA. Por ejemplo, se ha demostrado que la probabilidad de que un hermano gemelo de un sujeto afecto sufra esta enfermedad es superior a la de la población sana (Higgins *et al*, 2001). Además, la LMA se ha descrito con una mayor incidencia en pacientes con cromosopatías (como el síndrome de Down), (Hasle *et al*, 2000) con los síndromes caracterizados por una reparación defectuosa del DNA (Taylor, 2001) o con el síndrome plaquetario familiar (Minelli *et al*, 2004).

Por otro lado, se ha visto que ciertos factores ambientales influyen en la génesis de las LMA, siendo la neoplasia que más a menudo se asocia a las radiaciones ionizantes, como por ejemplo accidentes nucleares o procedimientos médicos (Bolufer *et al*, 2007; Guillem *et al*, 2007). Además, en modelos animales se ha demostrado la acción de los virus en el desarrollo de las leucemias, e incluso a día de hoy, se dispone de modelos experimentales de leucemias inducidas por virus (Zuber *et al*, 2009).

1.1.3. Patogénesis

La LMA es una enfermedad heterogénea a nivel molecular. En las últimas dos décadas ha tenido lugar un importante avance en el conocimiento del sustrato biológico de esta enfermedad, derivado fundamentalmente de la introducción de tecnologías de gran alcance, como el cariotipo convencional, el análisis por FISH, los perfiles de expresión génica y de microRNAs, arrays de hibridación genómica

comparativa (a-CGH) y arrays de SNP y, muy recientemente, la secuenciación de última generación [NGS; incluyendo la secuenciación de todo el exoma (WES) y la RNA-seq]. En esta sección, se resumirán los hallazgos más importantes que han surgido de dichos análisis.

1.1.3.1 Citogenética

Se pueden detectar anomalías en el cariotipo en aproximadamente un 50-60% de los pacientes diagnosticados de LMA. Generalmente están representadas por alteraciones estructurales como las translocaciones cromosómicas balanceadas que a menudo resultan en reordenamientos génicos (Vardiman *et al*, 2009) y/o por alteraciones numéricas: monosomías, trisomías o deleciones de parte o la totalidad de algún cromosoma (Martens & Stunnenberg, 2010).

1.1.3.2 Factores moleculares

En modelos experimentales se ha establecido que las anomalías citogenéticas primarias por sí solas son insuficientes para inducir leucemia (salvo excepciones), por lo que se consideran necesarias otras alteraciones adicionales. Las anomalías moleculares incluyen las mutaciones/duplicaciones parciales y la expresión anormal de los genes patogénicos.

1.1.3.2.1 Mutaciones génicas

Los esfuerzos de secuenciación completa han revelado que la mayoría de leucemias albergan múltiples mutaciones ocurridas secuencialmente en una única línea celular para generar un clon leucémico dominante. Las mutaciones que confieren una ventaja proliferativa a las células leucémicas se llaman 'conductoras', mientras que las mutaciones que no tienen ningún efecto sobre sus características de crecimiento se denominan '*pasajeras*'. La progresión clonal es un proceso evolutivo en el cual las mutaciones proporcionan diversidad genética a una línea celular y la selección conduce a la expansión de los subclones más adecuados. La identificación de las alteraciones subclonales no es sólo importante para comprender la

biología de la leucemia, sino también por sus posibles implicaciones terapéuticas. Sin embargo, esta clasificación binaria de las mutaciones en conductoras y pasajeras depende del contexto. Los subclones tumorales compiten entre sí y con las células normales por el espacio y los recursos dentro del microentorno del tejido. Los cambios impuestos en este ecosistema alterarán la competitividad relativa de los subclones tumorales. Por ejemplo, después de la quimioterapia, los subclones minoritarios capaces de sobrevivir al tratamiento pueden regenerar la malignidad (Anderson *et al*, 2011; Ding *et al*, 2012). Por el contrario, las mutaciones que confieren resistencia a determinados fármacos pueden estar en desventaja en ausencia de tratamiento (Skaggs *et al*, 2006).

Entre las alteraciones más frecuentemente observadas en pacientes con LMA se encuentran aquellas que afectan a los receptores tirosín-kinasa (*FLT3*, *cKIT* o las mutaciones del gen *RAS*). Estas mutaciones suponen una activación constitutiva de diversas proteínas (tirosín-kinasas) que, en última instancia, activan la transcripción en el núcleo y estimulan la proliferación celular, escapando de los procesos de regulación del ciclo celular (Kottaridis *et al*, 2001). Además, las tirosín-kinasas activadas pueden transmitir señales de proliferación por afectación de familias proteicas, como es el caso de los genes de la familia *RAS* (Valk *et al*, 2004), provocando un aumento en la capacidad de invasión y metástasis, y una disminución de la apoptosis. Las mutaciones de *FLT3* pueden ser de dos tipos: mutaciones del dominio tirosín-kinasa (TKD) y duplicaciones internas en tándem (ITD). *FLT3*-ITD afecta a la región yuxtamembrana en el 20-27% de los pacientes con LMA y cariotipo normal (LMA-CN), mientras que *FLT3*-TKD están representados por mutaciones puntuales, pequeñas inserciones o eliminaciones, principalmente en los codones 835 y 836, en el 5-10% de las LMA (Kottaridis *et al*, 2001; Yamamoto *et al*, 2001; Schnittger *et al*, 2002; Thiede *et al*, 2002).

Como ejemplo de mutaciones 'pasajeras' se encontrarían determinados factores de transcripción, como son *NPM1*, *CEBPA* o *MLL*. *NPM1* es una fosfoproteína nucleolar que actúa como lanzadera entre el núcleo y el citoplasma. Al regular la estabilidad y la actividad

transcripcional de P53, *NPM1* puede tener una función potencial como supresor de tumores, jugando un papel crítico en la transformación celular maligna durante la leucemogénesis. La presencia de mutaciones en el exón 12 del gen *NPM1* se encuentran en un 30% de los pacientes con LMA, llegando incluso hasta un 50% en los pacientes con cariotipo normal, por lo que se considera la mutación más recurrente en la LMA (Falini *et al*, 2005). Estos casos suelen ser LMA *de novo*, con predominio femenino y características mielomonocíticas.

Por otro lado, *CEBPA* participa en la maduración de los granulocitos y está especialmente sobreexpresado durante este proceso, ejerciendo una regulación negativa de MYC, a la vez que activa transcripcionalmente a los promotores de diversos factores de crecimiento (Williams *et al*, 1997; Williamson *et al*, 1998). Las mutaciones de *CEBPA* se encuentran predominantemente en la LMA de cariotipo normal (Koschmieder *et al*, 2009) y pueden ser de dos tipos: las mutaciones sin sentido que afectan a la región N-terminal y resultan en una isoforma truncada de *CEBPA* con propiedades dominante negativo, o mutaciones “*in-frame*” en la región C-terminal que resulta en una actividad disminuida de dimerización o unión al DNA. Se han descrito mutaciones de *CEBPA* en pacientes con LMA-CN con una frecuencia entre el 7 y el 11% y resultan en una pérdida de función de *CEBPA*, que facilita la leucemogénesis por un bloqueo en la diferenciación.

MLL es una proteína activadora que puede asociarse con secuencias específicas de DNA, sobre todo con promotores del gen *HOX*. La expresión de *HOX* se asocia con un incremento en la autorreplicación de las células hematopoyéticas. Además, los reordenamientos de *MLL* impiden la acetilación y la activación de p53, un hecho que puede afectar al ciclo celular, la apoptosis y la estabilidad genómica (Licht, 2005).

Más recientemente se han encontrado por NGS otras mutaciones recurrentes en la LMA que inducen una alteración en la regulación epigenética (Dombret, 2011): Las mutaciones de *IDH1* se

detectan en un 11-14% de casos con citogenética normal y las de *IDH2* en el 13-19% de los casos (Mardis *et al*, 2009; Marcucci *et al*, 2010; Thol *et al*, 2010; Paschka *et al*, 2010) y son mutuamente excluyentes. *DNMT3A*, un transcrito con actividad metiltransferasa, se encuentra mutado en aproximadamente el 20-22% de las LMA *de novo* de adultos (Ley *et al*, 2010). La alteración en la metilación de citosinas puede contribuir al desarrollo de tumores mediante la disminución de la expresión de genes supresores tumorales que se encuentran hipermetilados en las células neoplásicas. De hecho, la inhibición de las DNA metiltransferasas es uno de los mecanismos de acción de fármacos como la 5-azacitidina o la decitabina. Las mutaciones de *TET2* se han descrito en un 12-17% de LMA *de novo* (Bacher *et al*, 2010; Nibourel *et al*, 2010; Abdel-Wahab *et al*, 2009). Las mutaciones de *BCOR* son relativamente recurrentes (17,1%) en pacientes sin mutaciones de *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD*, *IDH1* ni *MLL-DPT*, mientras que raramente se detectan en LMA-CN no seleccionadas (3,8%) y están prácticamente ausentes en los otros subgrupos (Grossmann *et al*, 2011).

1.1.3.2.2 Alteraciones en la expresión génica

Los perfiles de expresión génica se han relacionado con la sobreexpresión de varios genes en la LMA, entre los que destacan por su frecuencia y posible impacto pronóstico los genes: *MDR1* (Nooter *et al*, 1990), *WT1* (Inoue *et al*, 1994), *BAALC* (Tanner *et al*, 2001), *MN1* (Langer *et al*, 2009), *ERG*, *EVI1* y *PRAME*. Se describirán más detalladamente en el apartado de factores pronósticos moleculares.

1.1.3.3 Factores epigenéticos

A pesar de los eventos ya conocidos, en la LMA existe una recurrente ausencia de correlación entre la presencia de mutaciones y los datos clínico-patológicos, lo que lleva a pensar que debe existir algún otro mecanismo implicado en la leucemogénesis. El papel de la regulación epigenética en la diferenciación mielopoyética normal y patológica hace que las modificaciones epigenéticas sean muy

importantes en la etiología, prevención y tratamiento de la leucemia (Galm *et al*, 2006).

1.1.3.3.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA es un proceso esencial en la regulación epigenética que consiste en la incorporación de un grupo metilo en la citosina de un dinucleótido CpG. Participa en la regulación de las etapas tempranas del desarrollo así como en la represión de la expresión de transposones, manteniendo una mayor estabilidad. La metilación del DNA normalmente reprime la transcripción, pero a veces puede activarla debido a que puede impedir la unión al DNA de factores represivos. Aunque el mecanismo por el que ocurre la metilación aberrante no se entiende del todo, su participación en procesos patológicos fue demostrada ya en 1990.

La hipermetilación aberrante de las regiones promotoras de algunos genes es una alteración epigenética bien caracterizada que afecta virtualmente a todo tipo de neoplasias humanas y que se asocia a un inapropiado silenciamiento transcripcional de los genes afectados (Baylin *et al*, 2000; Jones & Laird, 1999). Además, la lista de genes candidatos a genes supresores de tumores silenciados por hipermetilación de sus regiones promotoras en ciertas formas de cáncer crece constantemente. En las neoplasias hematológicas, la hipermetilación aberrante del DNA parece tener un papel fundamental en la leucemogénesis (Issa *et al*, 1997; Galm *et al*, 2006).

1.1.3.3.2 Modificación de histonas

Un mecanismo clave en la regulación de la transcripción son las modificaciones covalentes en el extremo amino terminal de las histonas, concretamente en el octámero de los nucleosomas. Estas modificaciones postraduccionales incluyen fosforilaciones, acetilaciones, sumoilaciones, ADPribosilaciones, glicosilaciones, ubicuinitaciones y metilaciones. El papel fundamental de la organización de la cromatina y modificaciones epigenéticas en el desarrollo mielóide es cada vez más evidente.

1.1.3.3.3 MicroRNAs

Los microRNAs (miRNA o miR) son pequeñas moléculas de entre 18 y 24 nucleótidos que se encuentran codificados en genes, se transcriben del DNA pero no codifican para proteínas. Aparecen involucrados en varios procesos celulares incluyendo el desarrollo, apoptosis y regulación del ciclo celular. Se estima que los miRNA regulan la expresión del 30% al 90% de los genes humanos, uniéndose al RNA mensajero de forma complementaria e inhibiendo su traducción a proteína (Gordanpour *et al*, 2012). Se ha descrito que esta regulación puede llevarse a cabo por varios mecanismos: 1) degradación de la proteína durante la traducción, 2) inhibición de la elongación de la traducción, 3) terminación prematura de la traducción (disgregación de los ribosomas) o 4) inhibición de la iniciación de la traducción.

El papel de los miRNA en los procesos tumorales ya está siendo estudiado y se sabe que se encuentran de forma frecuente en regiones genómicas asociadas al cancer y en regiones conocidas como frágiles (Calin *et al*, 2004). Los miRNA pueden actuar como oncogenes y como genes supresores de tumores (He *et al*, 2005; O'Donnell *et al*, 2005; Calin & Croce, 2006). El primer estudio que se realizó sobre el papel de los miRNA en la diferenciación hematopoyética data del año 2004 (Chen *et al*, 2004), y se vio que los miR-142, miR-181 y miR-223 se encontraban significativamente sobreexpresados en las células hematopoyéticas y que su expresión estaba regulada durante la hematopoyesis precoz. Otro estudio de Felli y cols. al año siguiente demostró que los niveles de los miR-221 y miR-222 se encontraban sobreexpresados en células progenitoras CD34+ y disminuían de forma gradual durante la diferenciación y la maduración (Felli *et al*, 2005).

La diferenciación de los granulocitos humanos está controlada por el circuito regulador donde está implicado el miR-223 y dos factores de transcripción: NFI-A y CEBPA. Estos dos factores de transcripción compiten por los sitios de unión de la secuencia promotora del gen MIRN223 (miR-223). La unión de NFI-A inhibe la expresión del miR-223 mientras que la unión de CEBPA lo sobreexpresa. La competencia con

CEBPA y la diferenciación granulocítica está favorecida por un *feed-back* negativo en el que miR-223 reprime la traducción de NFI-A (Fazi *et al*, 2005). Otro estudio de 2007 (Georgantas *et al*, 2007) propuso a los miR-221, miR-222 y miR-223 como controladores del desarrollo hematopoyético en estadios finales. La expresión ectópica de miR-223 es suficiente para reprogramar la diferenciación mieloide programada en diferentes subtipos de leucemia (Fazi *et al*, 2007). También en el 2008, un grupo inglés intentó relacionar la expresión de microRNAs con los diferentes cariotipos de la LMA, descubriendo que, efectivamente, existe un importante potencial de clasificación de los microRNAs y que, por tanto, están jugando un papel importante en la etiología de la leucemia (Dixon-Mclver *et al*, 2008).

Los perfiles de expresión de los miRNA han conseguido clasificar a distintos cánceres humanos (Lu *et al*, 2005; Li *et al*, 2008). Los perfiles de expresión de miRNA reflejan de esta forma el origen del desarrollo del tumor, convirtiéndolos en una herramienta capaz de clasificar mejor a las leucemias al identificar distintas vías oncogénicas: determinadas firmas específicas de miRNA se correlacionan con características clínicas tales como LLA vs. LMA, o células malignas vs. células sanguíneas normales (Li *et al*, 2008). Se ha reportado una firma de miRNA que se asocia con resultados clínicos en pacientes con LMA y características moleculares de alto riesgo (*FLT3*-ITD, *NPM1* no mutado o ambos) (Marcucci *et al*, 2008). Este subgrupo de alto riesgo constituye aproximadamente el 65% de los pacientes con cariotipo normal y un tercio de todos los pacientes con LMA menores de 60 años (Larson, 2010). Recientemente, Schwind y cols. del grupo CALGB reportaron la sobreexpresión del miR-181 en 187 pacientes menores de 60 años diagnosticados de LMA-CN *de novo*. Encontraron que la sobreexpresión del miR-181 se asociaba significativamente a un mayor porcentaje de blastos en sangre, fenotipo FAB M1/M2, sin enfermedad extramedular, mayores niveles de hemoglobina al diagnóstico, mutaciones de *CEBPA*, *NPM1* normal y bajos niveles de expresión de *ERG* y *BAALC* (Schwind *et al*, 2010).

1.1.4. Clasificación de la LMA

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

Tabla 1. Clasificación FAB de la LMA

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

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

Sin embargo, la baja reproducibilidad de esta clasificación y los avances en el conocimiento biológico de la LMA pusieron de manifiesto la necesidad de incorporar nuevos parámetros para una correcta agrupación. La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incorpora e interrelaciona la morfología, la citogenética y las alteraciones moleculares, buscando ser, no sólo una herramienta útil para el diagnóstico, sino también en la clínica al correlacionarse de una forma más precisa con el pronóstico (Harris *et al*, 1999; Vardiman *et al*,

2002). La versión revisada del año 2008 de esta clasificación se muestra en la Tabla 2 (Arber *et al*, 2008).

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

1. LMA con anomalías genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LMA con t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i> (M3c y M3v)**
LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL†</i>
LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA con inv(3)(q21q26) o t(3;3)(q21;26); <i>RPN1-EVI1</i>
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
Entidad Provisional : LMA con mutaciones <i>NPM1</i>
Entidad Provisional : LMA con mutaciones <i>CEBPA</i>
2. LMA con cambios relacionados con mielodisplasia‡
3. LMA relacionada con tratamientos citotóxicos§
4. LMA no especificada de otro modo
LMA mínimamente diferenciada (M0)**
LMA sin maduración (M1)**
LMA con maduración (M2)**
Leucemia aguda mielomonocítica (M4)**
Leucemia aguda monoblástica o monocítica (M5a y M5b)**
Leucemia aguda eritroide (M6)
Leucemia eritroide pura
Eritroleucemia
Leucemia aguda megacarioblástica (M7)**
Leucemia aguda basofílica
Panmielosis aguda con mielofibrosis (sinónimos: mielofibrosis aguda,

mieloesclerosis aguda)
5. Sarcoma mielóide
6. Proliferación mielóide relacionada con el síndrome de Down
Mielopoyesis anormal transitoria
LMA/SMD relacionada con el síndrome de Down
7. Neoplasia de célula dendrítica plasmocitoide blástica
8. Leucemias agudas de linaje ambiguo
Leucemia aguda indiferenciada
Leucemia aguda fenotípicamente mixta con t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR/ABL</i> 1
Leucemia aguda fenotípicamente mixta con t(v;11q23); <i>MLL</i> reordenado
Leucemia aguda fenotípicamente mixta (mielóide / linfóide B), (NOS)

LMA: leucemia mieloblástica aguda.

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

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

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

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

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

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

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

1.1.5. Factores pronóstico en la LMA

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

Tabla 3. Factores pronóstico adversos en la LMA

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

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

Las alteraciones citogenéticas y moleculares permiten identificar diferentes subgrupos dentro de las LMA que se caracterizan por presentar un fenotipo y un curso clínico similares.

1.1.5.1 Alteraciones citogenéticas

El análisis citogenético de la LMA *de novo* en el momento del diagnóstico revela alguna anomalía citogenética numérica y/o estructural en torno al 50% de los pacientes (Mrózek *et al*, 2004) y constituye uno de los factores pronóstico más importantes (Grimwade, 1998; 2001; Mrózek *et al*, 2004). De esta manera, la citogenética

distingue tres grupos de diferente pronóstico (Tabla 4) con repercusión en cuanto a las tasas de remisión completa (RC) y supervivencia: favorable, intermedio y desfavorable (Grimwade, 1998; Slovak *et al*, 2000; Byrd *et al*, 2002; Frohling, 2005).

Tabla 4. Clasificación pronostica de la LMA según las anomalías citogenéticas en los diferentes grupos cooperativos

Grupo de riesgo	SWOG/ECOG n = 609 (Slovak, 2000)	CALGB n = 1213 (Byrd, 2002)	MRC n = 5876 (Grimwade, 2010)
Favorable	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)/del(16q)	t(8;21) inv(16)/t(16;16)	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
Intermedio	Normal +8 +6 -Y del(12p)	Normal -Y del(5q) t(6;9) t(6;11) -7/del(7q) +8 aislada o con otra anomalía del(9q) t(9;11) +11 del(11q) t(11;19)(q23;p13) +13 del(20q) +21	Anomalías no clasificadas como favorable o desfavorable
Desfavorable	abn(3q) -5/del(5q) -7/del(7q) t(6;9) t(9;22) 9q 11q 20q 21q 17p complejo (≥ 3 anomalías no relacionadas)	inv(3)/t(3;3) abn(12p) complejo (≥ 3 anomalías no relacionadas)	abn(3q)[excepto t(3;5)(q21-25;q31-35)] inv(3)(q21q26)/t(3;3) add(5q)/del(5q)/-5 add(7q)/del(7q)/-7 t(6;11)(q27;q23) t(10;11)(p11-13;q23) t(11q23)[excepto t(9;11)(p21-22;q23) t(11;19)(q23;p13)] t(9;22)(q34;q11) -17/abn(17p) complejo (≥ 4 anomalías no relacionadas)

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

Aproximadamente, el 25% de los pacientes presentan citogenética favorable, categoría que se observa especialmente en pacientes jóvenes con LMA *de novo* y se asocia a tasas de RC de alrededor del 90% con una SG a los 5 años del 65%.

En un lugar intermedio queda un grupo muy heterogéneo, que incluye la mayoría de LMA (45-60%), constituido fundamentalmente por los pacientes con cariotipo normal junto con todas aquellas alteraciones que no pueden incluirse en los grupos de riesgo favorable o adverso. Es importante destacar que las alteraciones del grupo intermedio acompañadas de alteraciones moleculares de buen pronóstico pasan a ser consideradas como favorables y lo contrario ocurre cuando se acompañan de alteraciones moleculares de mal pronóstico que pasan a ser desfavorables.

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

tienen una frecuencia significativa menor de mutaciones en los genes *NPM1* y en *FLT3-ITD*, lo que podría implicar una biología de la enfermedad diferente (Kayser *et al*, 2012). Por último, se ha sugerido que estos pacientes podrían beneficiarse de un tratamiento más intensivo (Oran *et al*, 2011).

1.1.5.2 Alteraciones moleculares

Como se ha comentado previamente, durante los últimos 15 años se han identificado diversas alteraciones moleculares en los pacientes con LMA, principalmente en aquellos que presentan un cariotipo normal. Entre ellas destacan por su papel pronóstico las alteraciones de los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*.

Pese a algunas discrepancias, casi todos los estudios coinciden en otorgar un pronóstico adverso a la presencia de *FLT3-ITD* (Whitman *et al*, 2001; Stirewalt *et al*, 2004; Reindl *et al*, 2006; Schittenhelm *et al*, 2006). En contraste, las mutaciones de *FLT3-D835* no parecen acompañarse de un pronóstico adverso en los pacientes de riesgo citogenético intermedio o cariotipo normal (Gale *et al*, 2005; Heidel *et al*, 2006; Bornhäuser *et al*, 2007).

Las mutaciones en *NPM1* se asocian con un pronóstico favorable y altas tasas de RC en pacientes con cariotipo normal que carecen de mutaciones *FLT3-ITD* (Thiede *et al*, 2006). Cabe destacar que aproximadamente el 40% de las LMA con mutaciones de *NPM1* presentan además la mutación *FLT3-ITD*, cayendo así a la categoría pronóstica de alto riesgo molecular (Larson, 2010).

La mayoría de las mutaciones en *CEBPA* se caracterizan por la combinación de una mutación en la región N-terminal y otra mutación en la región Bzip, cada una en un alelo diferente. Pese a que se han descrito mutaciones heterocigotas en un único alelo (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003a), se ha visto que tan solo las mutaciones bialélicas son las que confieren un pronóstico favorable a los pacientes portadores (Lin *et al*, 2005; Wouters *et al*, 2009; Dufour *et al*, 2010). Sin embargo, al igual que ocurre con las mutaciones de

NPM1, parece que el valor pronóstico favorable de las mutaciones de *CEBPA* se pierde cuando éstas se acompañan de *FLT3-ITD* en un mismo paciente (Mrozek *et al*, 2007; Mrózek *et al*, 2009).

Las mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA* permiten una clasificación pronóstica de los pacientes LMA con cariotipo normal. De hecho, las mutaciones de *NPM1* o *CEBPA* se han incluido ya en la clasificación de la OMS 2008 como subentidades provisionales, ya que ambas alteraciones parecen ser eventos genéticos primarios con un papel causal de la enfermedad (Arber *et al*, 2008).

Otras alteraciones recurrentes de genes recientemente asociados con la LMA parecen jugar un papel pronóstico en esta enfermedad (Tabla 5)(Marcucci *et al*, 2011; Walker & Marcucci, 2011; Ley *et al*, 2010; Yan *et al*, 2011).

Tabla 5. Nuevas variaciones genéticas recurrentes en adultos con LMA: Significado biológico y clínico.

Gen	Frecuencia de mutaciones	Implicación clínica
IDH1/IDH2	16% LMA (<i>IDH1</i> 6%; <i>IDH2</i> , 8%). Asociadas con LMA-CN (<i>IDH1</i> 11-14%; <i>IDH2</i> , 13-19%).	Asociación con las mutaciones en <i>NPM1</i> ^{mut} / <i>FLT3-ITD</i> ^{neg} confiriendo un mayor riesgo de recaída y una SG inferior. Las mutaciones en <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> son mutuamente excluyentes. Papel del SNP <i>rs11554137</i> de <i>IDH1</i>
KIT	25-30% de LMA-CBF.	Las mutaciones se asocian con peor evolución. Ensayos clínicos evaluando los inhibidores de <i>KIT</i> .
DNMT3	Mutaciones encontradas en 20-22% de LMA de novo.	Se asocian con LMA de riesgo intermedio. Papel pronóstico adverso. (Ley <i>et al</i> y Yan <i>et al</i>)
RUNX1	5-13% de LMA. Asociado con trisomía 13, trisomía 21 y cariotipo	Mutaciones asociadas con <i>MLL-PTD</i> ; correlación inversa con la presencia de mutaciones en <i>CEBPA</i> y

Gen	Frecuencia de mutaciones	Implicación clínica
	normal.	<i>NPM1</i> . Asociado a una menor RC, SLR y SG menor.
MLL-DPT	3-10% de LMA. > 90% de pacientes con trisomía 11.	Asociación con una menor SLR y SLE. No es un factor pronóstico independiente.
NRAS	9-14% de LMA-CN. > 40% de LMA-CBF.	No se ha asociado con ningún factor pronóstico. Podría predecir la sensibilidad al tratamiento.
KRAS	5-17% de LMA-CBF.	No se ha asociado con ningún factor pronóstico.
TP53	56-76% de LMA de cariotipo complejo.	Asociado a cariotipos complejos y con una evolución peor.
TET2	12-17% de LMA.	Significación clínica en investigación.
ASXL1	7 - 30% de LMA <i>de novo</i> .	Significación clínica en investigación.
BCOR	3,8% de LMA-CN. Mayor frecuencia en LMA sin mutaciones de <i>NPM1, CEBPA, FLT3-ITD, IDH1</i> ni <i>MLL-DPT</i> (17,1%)	Se asocian frecuentemente a mutaciones <i>DNMT3</i> . Tienden a asociarse a un menor SG

Abreviaturas: LMA, leucemia mieloide aguda; CN, cariotipo normal; RC, remisión completa; SLR, supervivencia libre de recaída; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; CBF, factor core-binding; DPT, duplicación parcial en tandem.

En cuanto a la desregulación de genes, la hiperexpresión de *EVI1* (Santamaría *et al*, 2009), *ERG* (Santamaría *et al*, 2009) y *BAALC* (Baldus *et al*, 2003b) se ha asociado con un pronóstico desfavorable, mientras que la hiperexpresión de *PRAME* conferiría un pronóstico favorable a los pacientes con LMA y cariotipo normal (Santamaría *et al*, 2009).

El gen *BAALC*, localizado en el cromosoma 8q22.3, codifica una proteína que no tiene homología con otras proteínas ni dominios funcionales conocidos. *BAALC* se expresa en las células CD34+ de la

médula ósea, lo que sugiere que *BAALC* es un marcador de célula progenitora hematopoyética inmadura (Baldus *et al*, 2003a). Las LMA que presentan sobreexpresión de *BAALC* suelen presentar morfología tipo M1 y M2 de la clasificación FAB y es frecuente la coexistencia de otras anomalías genéticas como *FLT3-ITD*, *CEBPA*, *MLL-PTD* y un incremento en la expresión de *ERG* (Langer *et al*, 2008; Metzeler *et al*, 2009). En los pacientes con LMA y citogenética normal se ha demostrado que la sobreexpresión de *BAALC* se asocia a un peor pronóstico (Baldus *et al*, 2003b; Bienz *et al*, 2005; Baldus *et al*, 2006). Pero ésta pierde su impacto pronóstico negativo cuando se asocia a otras anomalías moleculares recurrentes en la LMA como la *FLT3-ITD* o a la expresión elevada de *ERG* (Bienz *et al*, 2005; Langer *et al*, 2008). De forma que se ha sugerido que la sobreexpresión de *BAALC* puede ser un marcador de mal pronóstico en los casos de LMA con citogenética normal sin *FLT3-ITD* ni mutaciones de *CEBPA*. Las LMA con sobreexpresión de *BAALC* presentan un perfil de expresión génica caracterizado por un aumento de expresión de genes relacionados con la “stem cell” hematopoyética (*CD133*, *CD34* y *KIT*), de genes como *NM1*, también asociado a una peor evolución de las LMA, y genes relacionados con mecanismos de resistencia a fármacos, como *ABCB1* (*MDR1*) (Langer *et al*, 2008). Es posible que este fenotipo menos diferenciado y la sobreexpresión de genes asociados con la resistencia a fármacos contribuyan al peor pronóstico de estas leucemias.

El gen *MDR-1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, codifica para una proteína de 170 kDa, también conocida como glicoproteína P (van den Heuvel-Eibrink *et al*, 2001). La expresión de este gen se ha observado en diferentes neoplasias, incluidas las leucemias (Illmer *et al*, 2002; Wells *et al*, 1994). En la LMA la expresión del gen *MDR-1* se ha asociado a un fallo al tratamiento de inducción y por ende a una menor tasa de supervivencia (van den Heuvel-Eibrink *et al*, 2001; Casale *et al*, 2004; Illmer *et al*, 2002; Volm *et al*, 1997). La frecuencia de expresión al diagnóstico es cercana a 33%, sin embargo en la recaída, se ha reportado hasta en un 40%. Actualmente se desconocen los factores que propician el aumento en la expresión de

este gen, sin embargo su sobreexpresión en pacientes en recaída, es un indicativo de pronóstico desfavorable.

El gen *MN1* se localiza en el cromosoma 22q12 y codifica una proteína que actúa como coactivadora de la transcripción del complejo receptor ácido retinoico/receptor retinoico X (RAR/RXR). Fue identificado por primera vez en el caso de un meningioma asociado a la t(4;11), y en neoplasias mieloides se describió inicialmente fusionado con el gen *TEL* en la t(12;22). Se ha descrito que los niveles elevados de *MN1* se asocian con sobreexpresión de *BAALC*, y presentan una relación inversa con las mutaciones *NPM1* (Heuser *et al*, 2006), aunque esto último no se ha confirmado en otro estudio posterior (Langer *et al*, 2009). Todavía no existen muchos datos sobre el significado pronóstico de *MN1* en la LMA con citogenética normal. En dos de los trabajos publicados se investigó el valor pronóstico de *MN1* en el contexto de otros marcadores moleculares y, en ambos, se objetivó que la sobreexpresión de *MN1* fue un factor pronóstico independiente que se asoció a una menor probabilidad de conseguir RC y a una menor supervivencia (Heuser *et al*, 2006; Langer *et al*, 2009; Metzeler *et al*, 2009). Langer y cols. demostraron que la sobreexpresión de *MN1* se asocia con *NPM1* no mutado, sobreexpresión de *BAALC* y peor pronóstico en las LMA-CN independientemente de otros marcadores moleculares (Langer *et al*, 2009).

El gen *ERG*, se localiza en el cromosoma 21q22 y forma parte de la familia de factores de transcripción ETS que están implicados en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Se ha objetivado sobreexpresión de *ERG* en LMA con cariotipos complejos que contienen amplificaciones crípticas del cromosoma 21 que no se detectan con el estudio cariotípico convencional. Pero también se ha descrito una expresión de *ERG* elevada sin amplificación genómica en pacientes con LMA con citogenética normal, lo que se ha sugerido como un posible factor pronóstico adverso en estos pacientes (Mrozek *et al*, 2007). Las LMA con citogenética normal y sobreexpresión de *ERG* suelen presentar un mayor porcentaje de blastos al diagnóstico y una morfología mieloide inmadura o madura (M0-M2). Además, se ha

descrito que tienen una mayor expresión de *BAALC*, de *MN1* y una asociación con la *FLT3-ITD* (Marcucci *et al*, 2007; Metzeler *et al*, 2009). La sobreexpresión de *ERG* tiene un impacto pronóstico negativo en los pacientes con LMA y citogenética normal. Se ha demostrado que estos pacientes presentan un mayor riesgo de recaída y una menor supervivencia, y este peor pronóstico es independiente de la *FLT3-ITD* (Marcucci *et al*, 2007; Metzeler *et al*, 2009). En un estudio reciente en el que se analizó el impacto pronóstico de la sobreexpresión de los genes *BAALC*, *MN1* y *ERG* conjuntamente, se observó una correlación positiva entre los 3 genes, sobre todo entre *BAALC* y *MN1*. La expresión elevada de estos tres genes se asoció con una mayor probabilidad de recaída y una menor SLE y SG, siendo *ERG* el marcador que de forma más significativa se correlacionaba con la supervivencia (Metzeler *et al*, 2009).

El protooncogen *EVI-1* se localiza en el cromosoma 3q26. Está implicado en la patogénesis de las LMA y SMD que presentan reordenamientos que afectan a esta localización y se caracterizan por presentar mal pronóstico. *EVI-1* se expresa en un 8- 10% de LMA sin alteraciones de 3q26 (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b; Lugthart *et al*, 2008; Groschel *et al*, 2010). La sobreexpresión de *EVI-1* en estas LMA se asocia a determinadas anomalías citogenéticas como son la monosomía del cromosoma 7 (sola o con otras anomalías citogenéticas diferentes a cariotipo complejo) y las alteraciones del cromosoma 11q23. Por el contrario, prácticamente no se observa expresión de *EVI-1* en LMA con citogenéticas de buen pronóstico ni con mutaciones de *NPM1* (Groschel *et al*, 2010). La expresión de *EVI-1* en estos pacientes representa un factor de mal pronóstico ya que se asocia a una menor tasa de RC, y a una menor SLR y SLE e incluso a menor SG en algunos estudios (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003a; Lugthart *et al*, 2008; Groschel *et al*, 2010). Este mal pronóstico se hace más evidente en el grupo citogenético de pronóstico intermedio incluyendo a los pacientes con citogenética normal. La expresión de *EVI-1* se ha observado especialmente en el subgrupo de pacientes con citogenética normal y

sin mutaciones de *NPM1* ni *CEBPA* ni presencia de la *FLT3-ITD* (66% sobreexpresión de *EVI-1*) (Groschel *et al*, 2010).

El gen *PRAME*, localizado en el cromosoma 22q11, se identificó a partir de un clon de linfocitos T citotóxicos derivados de una línea celular de melanoma (Ikeda *et al*, 1997). En la LMA se ha descrito una incidencia de sobreexpresión de *PRAME* al diagnóstico del 30-64% (van Baren *et al*, 1998; Steinbach, 2002; Greiner *et al*, 2006; Paydas *et al*, 2005). La sobreexpresión de *PRAME* se asocia con buen pronóstico y mejor supervivencia en la LMA tanto pediátrica (Steinbach *et al*, 2002) como de adultos (Greiner *et al*, 2006). En algunos trabajos la sobreexpresión de *PRAME* se presentó con mayor frecuencia en pacientes portadores de translocaciones con pronóstico favorable como la t(8;21), t(12;21) y t(15;17) (Greiner *et al*, 2006; van Baren *et al*, 1998). Sobre este hallazgo, algunos autores han cuestionado si el factor pronóstico de *PRAME* se deba a este fenotipo favorable o efectivamente su significado clínico es independiente de otros factores (Greiner *et al*, 2006).

1.1.5.3 Alteraciones epigenéticas en los miRNA

El impacto pronóstico de las alteraciones en la expresión de determinados miRNA es un tema aún por desarrollar, aunque existen ya varios artículos al respecto. La infraexpresión en la LMA de los miRNA let7b y miR-9 se ha detectado en pacientes clasificados dentro del grupo de riesgo citogenético favorable (Dixon-McIver *et al*, 2008), mientras que entre los microRNAs que parecen estar relacionados con un pronóstico desfavorable cabe mencionar la sobreexpresión de miR-20a, miR-25, miR-191, miR-199a, and miR-199b (Garzon *et al*, 2008). Otro estudio identificó un conjunto de microRNAs que permiten discriminar subgrupos dentro de las LMA-CN que pertenecen al grupo de alto riesgo molecular (es decir, *NPM1^{wt}/FLT3-ITD^{mut}*). Entre éstos, destacó el aumento de la expresión de miR-181 y miR-181b (Marcucci *et al*, 2008). La mayor expresión de miR-181 se asoció con un pronóstico favorable, incluyendo mejores tasas de RC, y mayores SLE y SG. En el análisis multivariante, la mayor expresión del miR-181,

utilizada como una variable continua, independientemente predijo mayores tasas de RC y SLE/SG más prolongadas. Estos datos sugieren el papel que desempeña miR-181 en la determinación de la agresividad del fenotipo de la enfermedad.

1.1.6. Tratamiento

La estrategia de tratamiento de la LMA puede sistematizarse en dos fases bien definidas. La primera es la quimioterapia de inducción a la RC y su objetivo es producir la mayor destrucción tumoral posible para restaurar la hematopoyesis normal. Se basa en la combinación de una antraciclina con citarabina, con lo que se alcanza RC en el 70% de los pacientes (Tallman *et al*, 2005; Tallman, 2006). Se han sugerido diversas estrategias para aumentar la tasa de RC sin que ninguna haya demostrado hasta el momento una mayor eficacia: modificación de las dosis de antraciclina o adición de terceros fármacos como etopósido, gentuzumab ozogamicina, inhibidores de *FLT3* o fludarabina. La segunda fase del tratamiento es lo que en la actualidad se denomina terapia postremisión y pretende reducir al mínimo posible la enfermedad residual para evitar la recidiva de la enfermedad. Consiste en la administración de un número variable de ciclos de quimioterapia conteniendo diversas combinaciones de citarabina a altas dosis seguida, en los casos pertinentes, por un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), que puede ser autólogo o alogénico a partir de un donante histocompatible. El diseño de esta terapia postremisión se hace en base al concepto “terapia adaptada al riesgo”, atendiendo a múltiples indicadores pronósticos entre los que destaca la citogenética y los marcadores moleculares. Pese a este tratamiento, aproximadamente la mitad de los pacientes que muestran respuesta inicial presentarán una recidiva de su enfermedad, lo que se traduce en la curación de tan sólo una tercera parte de los pacientes que reciben tratamiento estándar. Es posible que el desarrollo de fármacos dirigidos contra dianas moleculares específicas pueda cambiar el panorama actual de

esta enfermedad, por lo que sigue constituyendo un aspecto de gran interés para la investigación en oncohematología.

1.2. El gen del tumor de Wilms (WT1)

1.2.1. Estructura y funciones

El gen *WT1* se encuentra ubicado en el cromosoma 11p13 (Call *et al*, 1990). Está formado por 10 exones que generan un mRNA de 3kb que codifica para múltiples isoformas proteicas, las cuales muestran diferente especificidad en la unión a secuencias de DNA. La proteína WT1 presenta en su extremo amino terminal un dominio de transactivación rico en prolina y glutamina, involucrado en la interacción con el RNA y proteínas, siendo además crítico para la función de WT1 como regulador de la transcripción (Menke *et al*, 1998). En su extremo carboxilo terminal presenta un dominio de unión al DNA formado por 4 dedos de zinc Cys₂-His₂, los cuales permiten la unión a la secuencia de DNA, aunque también participan en las interacciones con el RNA y las proteínas. Durante el proceso de maduración su mRNA puede sufrir dos “splicings” alternativos (procesados); el primero, en el exón 5 donde se insertan/eliminan 17 aminoácidos entre el dominio de transactivación y el dominio de unión al DNA; y el segundo, ocurre entre el exón 9 y 10, donde se insertan/eliminan 3 aminoácidos Lys-Thr-Ser- (KTS). Este “splicing” alternativo da lugar a 4 isoformas de proteínas fundamentales: A (Ex5⁻/KTS⁻), B (Ex5⁺/KTS⁻), C (Ex5⁻/KTS⁺) y D (Ex5⁺/KTS⁺), que representan la presencia o ausencia del exón 5 y el inserto KTS (Haber *et al*, 1991). Además, el uso del promotor localizado por encima del exón 1a, así como el uso del codón de inicio alternativo ATG situado dentro del exón 1 provoca la delección del dominio de represión, cambiando la función de WT1 de represor a transactivador (Hossain *et al*, 2006). Otros estudios han demostrado que las serinas localizadas en las posiciones 365 y 393 del segundo y tercer dedo de zinc de WT1

pueden fosforilarse. Esta modificación bloquea la habilidad de WT1 de unirse al DNA y, por consiguiente, regular la transcripción. Además, la fosforilación de WT1 también da lugar a una retención citoplasmática e impide su translocación nuclear (Ye, 2011; Sakamoto *et al*, 1997). Estos hallazgos representan solo unos pocos de los muchos casos (otros sitios de fosforilación u otros tipos de modificación tales como la acetilación) que pueden alterar la actividad de WT1.

La proteína WT1 actúa como un importante regulador de la transcripción de genes implicados en el crecimiento y el metabolismo celular. La alteración de su función promueve la proliferación de los precursores hematopoyéticos y bloquea la diferenciación celular (King-Underwood & Pritchard-Jones, 1998). Como genes diana se han encontrado *BCL2*, *CMYC* y *CCNE 1*, que parecen cooperar con WT1 en la regulación del crecimiento, sin embargo los efectos de WT1 en sus genes diana parecen ser específicos de cada una de las isoformas. A través de experimentos de transfección, se ha descubierto que WT1 puede aumentar o reprimir la expresión de genes diana específicos. La actuación como represor o activador puede verse influenciada por los niveles de expresión de *WT1*, por la isoforma expresada de *WT1* (principalmente por +KTS o -KTS), por la localización del sitio de inicio de la transcripción en relación al sitio de unión al DNA de *WT1* y por el tipo de célula en la cual se ha llevado a cabo el experimento (Laity *et al*, 2000) (Han *et al*, 2004; Hewitt *et al*, 1995).

En el embrión, *WT1* se expresa primariamente en el sistema urogenital (Menke *et al*, 1998; Rivera & Haber, 2005), mientras que en tejido adulto se expresa fisiológicamente además en el sistema nervioso central y en los tejidos envueltos en la hematopoyesis incluyendo la médula ósea y los ganglios linfáticos (Menke *et al*, 1998). En los tejidos hematopoyéticos, la expresión de *WT1* parece estar inversamente relacionada con el grado de diferenciación. En la médula ósea humana normal, *WT1* tiene un bajo nivel de expresión y se localiza en la población celular CD34+ (Baird & Simmons, 1997; Hosen *et al*, 2002).

Los posibles mecanismos que pueden explicar el crecimiento incontrolado de las células cancerígenas son la pérdida de función de los genes supresores de tumores y/o la activación de los oncogenes (Gilliland, 2002; Steffen *et al*, 2005). Aunque ambas son funciones opuestas que en principio deberían ser mutuamente excluyentes en una misma proteína, existen evidencias de que una misma proteína puede mostrar ambas funciones bajo condiciones celulares diferentes. El gen *WT1* fue reconocido inicialmente como gen supresor de tumores basándose en la presencia de mutaciones con pérdida de función de dicho gen en los nefroblastomas pediátricos (Pelletier *et al*, 1991; Pritchard-Jones *et al*, 1990). La identificación de mutaciones en pacientes con leucemia también sugiere que *WT1* podría actuar como un gen supresor tumoral (Summers *et al*, 2007; Paschka *et al*, 2008; Virappane *et al*, 2008; Renneville *et al*, 2009; Becker *et al*, 2010). Sin embargo, estudios recientes han revelado la función oncogénica de *WT1* ya que se ha encontrado sobreexpresado en muchos tipos de cánceres humanos de origen hematológico/no-hematológico (Keilholz *et al*, 2005; Menssen *et al*, 1995; Miwa *et al*, 1992). Además, el crecimiento de las células leucémicas que expresan *WT1* se inhibe con el tratamiento con oligomeros antisentido de *WT1* (Yamagami *et al*, 1996; Algar *et al*, 1996; Tsuboi *et al*, 2012).

1.2.2. *WT1* en la leucemia aguda

1.2.2.1 *Gen supresor tumoral*

Las mutaciones del gen *WT1* se han descrito en un 10-15% de las LMA con cariotipo normal, y habitualmente son inserciones o deleciones que afectan especialmente a los exones 7 y 9. En el primer trabajo donde se estudiaron las mutaciones de *WT1* en leucemia aguda se observó una frecuencia del 11% en pacientes con cariotipo normal, y además se encontró una asociación a una mayor tasa de resistencia y una menor tasa de remisión completa (King-Underwood & Pritchard-Jones, 1998). Posteriormente, varios grupos realizaron estudios de

mutaciones de *WT1* mediante secuenciación directa en grandes series de pacientes, observando una frecuencia de mutaciones de *WT1* que oscila entre el 5 y el 14% (revisado en (Owen *et al*, 2010)). Se ha sugerido que las mutaciones de *WT1* podrían alterar su habilidad para unirse a sus genes diana, incluyendo a los que codifican proteínas implicadas en la regulación de la hematopoyesis normal (*RARA*, *CSF1*), la apoptosis (*BCL2*, *BCS2A1*, *BAK1*), el ciclo celular (*CCNE1*, *CDKN1A*), la transcripción génica (*MYC*, *PAX2*, *MYB*, *EGR1*) y la proliferación celular (*TGFB1*, *PDGFA*) (Paschka *et al*, 2008).

Las mutaciones de *WT1* se asocian con frecuencia con otras alteraciones moleculares como la *FLT3-ITD*, las mutaciones de *CEBPA* y con una elevada expresión de *ERG* y *BAALC*. Por el contrario se observa una relación inversa con las mutaciones de *NPM1* (Gaidzik *et al*, 2009; Paschka *et al*, 2008; Virappane *et al*, 2008). El significado pronóstico de las mutaciones de *WT1* es controvertido (Summers *et al*, 2007; Paschka *et al*, 2008; Virappane *et al*, 2008; Renneville *et al*, 2009; Becker *et al*, 2010; Hou *et al*, 2010) (Damm *et al*, 2010). En algunos estudios se ha descrito una menor tasa de RC y una menor supervivencia en los pacientes con estas mutaciones (King-Underwood & Pritchard-Jones, 1998; Virappane *et al*, 2008; Paschka *et al*, 2008; Renneville *et al*, 2009; Gaidzik *et al*, 2009; Hollink *et al*, 2010), mientras que en otros, este impacto pronóstico desfavorable, sobre todo sobre la supervivencia, sólo se observó cuando la mutación de *WT1* se asociaba a la *FLT3-ITD* (Summers *et al*, 2007; Gaidzik *et al*, 2009).

Por otro lado, en los últimos años, varias publicaciones han hecho hincapié en el posible impacto pronóstico del polimorfismo (SNP) *rs16754* (dbSNP Build ID: 131) (Database of Single Nucleotide Polymorphisms) en pacientes con LMA tanto pediátricos como adultos, aunque los resultados obtenidos también han sido controvertidos (Ho *et al*, 2011; Renneville *et al*, 2011; Hollink *et al*, 2010; Becker *et al*, 2011; Choi *et al*, 2012). El SNP *rs16754* se encuentra localizado en el exón 7 de *WT1* y consiste en el cambio del nucleótido adenina (A) por guanina (G). De acuerdo al proyecto internacional HapMap, G es el alelo mayor en la población asiática y A es el alelo mayor en la población occidental,

lo cual puede atribuirse a las diferencias étnicas. La frecuencia del genotipo menor ($WT1^{GG}$ y $WT1^{AG}$) se encuentra entre el 26 y el 36% en la raza caucásica (Becker *et al*, 2010; Damm *et al*, 2010).

Damm y cols describieron el impacto pronóstico del polimorfismo SNP *rs16754* situado en el “hotspot” mutacional del gen *WT1* en 249 adultos con LMA-CN tratados intensivamente en dos ensayos clínicos (AML SHG 0199 and 0295). Encontraron que la presencia de uno o dos alelos menores ($WT1^{AG}/WT1^{GG}$) del SNP *rs16754* independientemente predijo un mejor pronóstico para estos pacientes. Este efecto fue más acusado en los pacientes de alto riesgo en cuanto al estado mutacional de *FLT3* y *NPM1* ($FLT3-ITD^{mut}/NPM1^{wt}$) (Damm *et al*, 2010). Ho y cols reportaron una mejor supervivencia para el alelo menor en una serie pediátrica de pacientes predominantemente caucásicos, aunque fue más discriminatorio en el subgrupo de pacientes de bajo riesgo (Ho *et al*, 2011). En la población china, donde G es el alelo mayor, el genotipo homocigoto $WT1^{GG}$ predijo una mejor supervivencia tanto en una serie pediátrica (Chen *et al*, 2012) como de adultos (Luo *et al*, 2014), mientras que Becker y cols encontraron un impacto favorable sólo en un pequeño subgrupo de LMA adultos occidentales con el genotipo $WT1^{GG}$ y alto riesgo para el estado mutacional *NPM1/FLT3* (Becker *et al*, 2011). Por el contrario, otros estudios no han observado un impacto pronóstico favorable de dicho SNP en sus series tanto pediátricas (Hollink *et al*, 2010) como de adultos (Renneville *et al*, 2011; Choi *et al*, 2012).

1.2.2.2 Oncogén

Consistente con la función oncogénica de la proteína *WT1* se ha demostrado que existen elevados niveles de *WT1* en la médula ósea o en la sangre periférica de una gran variedad de leucemias en comparación con la médula ósea normal y con las células progenitoras normales. En general, la expresión de *WT1* varía entre las diferentes formas de leucemia. En la leucemia mieloide crónica, los niveles de *WT1* son bajos en la fase crónica pero incrementa sus niveles en la fase aguda de la enfermedad (Miwa *et al*, 1992; Menssen *et al*, 1995). En la leucemia aguda, hay niveles elevados de *WT1* tanto en la linfoblástica

como en la mieloides. Combinando los resultados de varios estudios, los niveles del RNA de *WT1* se encuentran elevados entre el 48-75% de las LMA (Schmid, 1997; Barragán *et al*, 2004). En los síndromes mielodisplásicos (SMD) los niveles de *WT1* también son elevados. En los SMD el incremento de la expresión de *WT1* está asociado con un aumento del número de blastos y a rápida progresión a LMA.

Los resultados de los estudios relacionados con el impacto pronóstico de los niveles elevados de *WT1* han resultado contradictorios. Varios estudios han correlacionado la sobreexpresión de *WT1* al diagnóstico con un pronóstico desfavorable en términos de tasa de RC, SG y SLE (Inoue *et al*, 1996; Bergmann *et al*, 1997; Barragán *et al*, 2004) promoviendo incluso su uso como biomarcador para formular scores de riesgo pronóstico y poder mejorar la estratificación de la LMA-CN (Damm *et al*, 2011; Lyu *et al*, 2014). En contraste, otros estudios sugieren que la sobreexpresión de *WT1* no está asociado al pronóstico de la enfermedad (Schmid, 1997; Gaiger, 1998; Spassov *et al*, 2011; Miyawaki *et al*, 2010).

Además, los estudios relacionados con la expresión total de *WT1* han analizado también su papel como posible indicador de enfermedad mínima residual (ERM). Aún con algunas diferencias, los estudios que han utilizado métodos de PCR cuantitativa sugieren que la cinética de reducción del transcrito *WT1* tras quimioterapia de inducción y la persistencia de valores elevados tras el tratamiento de consolidación son un factor pronóstico importante para predecir recaída (Cilloni *et al*, 2009; Garg *et al*, 2003; Lapillonne *et al*, 2006; Østergaard *et al*, 2004; Nowakowska-Kopera *et al*, 2009). El seguimiento de la expresión de *WT1* también ha demostrado utilidad para predecir recaídas tras trasplante alogénico (Ogawa, 2002). La European Leukemia Net realizó en 2009 una revisión sistemática para estandarizar la técnica de PCR cuantitativa para el estudio de *WT1* (Cilloni *et al*, 2009). En este estudio se establecieron los niveles de expresión de *WT1* en muestras sanas para distinguir las células leucémicas residuales de las de amplificación normal. Se ha confirmado que la expresión de *WT1* al diagnóstico en pacientes con LMA es suficientemente alta como para permitir

reducciones del número de copias del transcrito de *WT1* de al menos 2 logaritmos, y que la recuperación hematológica post-quimioterapia no tiene impacto en los niveles de *WT1*. Todo ello confirma la aplicabilidad de este marcador en el seguimiento de las LMA. Además, se ha observado una buena correlación entre la expresión de *WT1* y otros transcritos de fusión como AML1-ETO y CBFβ-MYH11 (Østergaard *et al*, 2004; Nowakowska-Kopera *et al*, 2009; Lasa *et al*, 2009).

1.2.2.3 Posibles mecanismos para explicar el papel dual de *WT1*

1.2.2.3.1 Isoformas

Se ha propuesto que las diversas proteínas de *WT1* podrían tener diferentes funciones en la proliferación hematopoyética y diferenciación, e incluso diferentes valores pronósticos. Varios estudios sugieren que la isoforma de *WT1* que carece de la inserción de KTS (*WT1*-KTS) actúa como un factor de transcripción, ya que se une a secuencias específicas de DNA con alta afinidad y puede interactuar con cofactores transcripcionales (Larsson *et al*, 1995). Las isoformas que contiene KTS (*WT1*+KTS) participan presumiblemente en el procesamiento post-transcripcional de mRNA puesto que pueden unirse al mRNA mostrando una afinidad de unión al DNA reducida en comparación con las formas *WT1*-KTS (Laity *et al*, 2000; Caricasole *et al*, 1996; Bor *et al*, 2006). En lo que respecta al “splicing” del exón 5, se ha demostrado que las formas que contienen el segmento de 17aa pueden tener un papel antiapoptótico en la vía intrínseca de apoptosis de las mitocondrias (Ito *et al*, 2006), y podrían estar implicados en la recaída de la leucemia por bloqueo de diferenciación y represión de la apoptosis (Gu *et al*, 2010).

Se cree que el mRNA de empalme de las isoformas se encuentra en proporciones fijas siendo constantes en todos los tejidos que expresan *WT1* durante el desarrollo (Haber *et al*, 1991). Concretamente el síndrome de Frasier, está causado primariamente por mutaciones puntuales en el intrón 9, que suponen la pérdida de la

isoforma KTS- en el alelo mutado. De forma que la ratio de la expresión de las isoformas KTS+/KTS-, que en condiciones normales es siempre 2:1, varía debido a estas mutaciones. Un posible desequilibrio en la proporción de las principales isoformas de *WT1* en la leucemia aguda podría explicar el papel dual de *WT1*. Además, se encuentran defectos de “*splicing*” alternativo como una causa o un factor que contribuye al desarrollo o la progresión de una amplia gama de enfermedades (Barboux *et al*, 1997; Tazi *et al*, 2009) y diversas mutaciones en los sitios de “*splicing*” están implicadas en diferentes enfermedades (Taneri *et al*, 2012; Wang & Cooper, 2007a).

Al considerarse *WT1* una diana terapéutica, es también importante conocer el nivel de expresión de cada una de sus isoformas variantes y su significado pronóstico. Sin embargo, estudios realizados sobre la expresión de las diferentes isoformas muestran discrepancias. Shiel y cols., observaron una mayor proporción de las isoformas Ex5+ en pacientes de LMA (Siehl *et al*, 2004). Pero además de mostrar expresión diferencial, parece que cada una de estas cuatro isoformas lleva a cabo diferentes funciones durante la hematopoyesis y leucemogénesis. La transfección de la isoforma Ex5- /KTS- en la línea celular 32D (una línea celular hematopoyética multipotencial, de origen murino y dependiente de interleucina-3), en presencia de G-CSF, potencia la diferenciación granulocítica reflejada en cambios en la morfología, expresión génica y expresión de antígenos de superficie de maduración (Loeb *et al*, 2003). Por el contrario, cuando estas mismas células se transfectaban con la isoforma Ex5+ /KTS+, no se diferenciaban en respuesta a G-CSF (Inoue *et al*, 1998). La expresión de las isoformas KTS- en la línea celular monoblástica U937, incrementaban la parada del ciclo celular en la fase G1, asociado a un aumento en la actividad del inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina p21^{CIP1}, uno de los genes diana de *WT1*, e inducía la diferenciación mielomonocítica de las células CD34+. La coexpresión de las isoformas KTS- y KTS+ potenciaba estos efectos, pero la isoforma KTS+ por sí sola no era capaz de inducir la diferenciación (Ellisen *et al*, 2001). Además, parece que existe una cooperación de las isoformas

con otros “hits” de la leucemogénesis. Un estudio demostró que ratones transgénicos que expresaba AML1-ETO y la isoforma Ex5+/KTS+ aumentaba la capacidad de proliferación de las colonias derivadas de médula ósea *in vitro*, inhibía su diferenciación y desarrollaban más rápidamente una LMA, en comparación a los ratones salvaje que sólo expresaban AML1-ETO los cuales simplemente mostraban una mielopoyesis anormal pero no una leucemia. La obtención de resultados diferentes podría ser atribuida a las funciones opuestas que presentan las diferentes isoformas.

Por otro lado, las primeras publicaciones sobre la expresión de *WT1* se basaban en la expresión del gen de forma global, mientras que estudios más recientes han comenzado a evaluar los efectos de las isoformas por separado. Tradicionalmente, el método común para la semi-cuantificación de los transcritos ha sido la PCR diseñada para cada sitio del empalme alternativo (Renshaw *et al*, 2004; Wang & Cooper, 2007b).

1.2.2.3.2 Regulación epigenética del gen *WT1*

La alteración de los patrones de expresión de los microRNAs ha sido reconocida recientemente como un mecanismo de regulación epigenética, y se ha descrito su capacidad de inducir cambios en la expresión de diversos genes en cáncer (Chen *et al*, 2006; Fazi *et al*, 2005; Nervi *et al*, 2007). La neutralización de la activación de oncogenes por inhibición epigenética de sus microRNA reguladores supondría el cambio del fenotipo leucémico. Así, la identificación y estudio de las consecuencias moleculares y biológicas producidas por lo microRNAs es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El mRNA de *WT1* podría estar regulado por diversos microRNA que modificaran su expresión, justificando así las controversias encontradas en la literatura con respecto a este gen.

2.HIPÓTESIS

La función del gen *WT1* durante la leucemogénesis no está todavía esclarecida, siendo considerado en la literatura tanto un oncogen como un gen supresor tumoral. Asimismo, el papel de las isoformas, las mutaciones y la regulación epigenética del gen *WT1*, así como su relación con la expresión del gen y el pronóstico de los pacientes con LMA no están bien establecidos. La profundización en el conocimiento de las interrelaciones entre las isoformas, las mutaciones, la expresión y la regulación epigenética, y de todas ellas con el pronóstico, podría eventualmente contribuir a una optimización de los tratamientos mas ajustada al pronóstico de los pacientes con LMA.

3.OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de tesis doctoral son:

1. Caracterización celular y genética exhaustiva de las muestras de pacientes con LMA *de novo*, con especial énfasis en el análisis del gen *WT1*.
2. Análisis de la expresión de *WT1* y de sus isoformas principales en pacientes con LMA .
3. Análisis de las variantes genéticas de *WT1*, incluyendo las mutaciones y el polimorfismo *rs16754*.
4. Estudio de la regulación epigenética del gen *WT1* por miRNA y su potencial implicación en los mecanismos responsables de la desregulación de su expresión.
5. Estudio de la correlación de las isoformas, variantes genéticas y regulación epigenética entre si y su asociación con la expresión del gen *WT1*.
6. Análisis de la relación de las alteraciones anteriormente mencionadas con el pronóstico de los pacientes con LMA

4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Pacientes

Se incluyeron 274 pacientes diagnosticados de LMA no promielocítica *de novo* entre los años 1998 y 2010 en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia. Las muestras de médula ósea fueron obtenidas mediante punción esternal o en cresta ilíaca postero-superior en el momento del diagnóstico. El único criterio limitante de inclusión fue la disponibilidad de DNA y/o RNA al diagnóstico. Los pacientes fueron diagnosticados y clasificados de acuerdo a los criterios morfológicos y citoquímicos de la clasificación FAB (French-American-British criteria) (Bennett *et al*, 1985) y de la clasificación de la OMS (Arber *et al*, 2008).

El tratamiento recibido se ajustó al protocolo vigente en cada momento: LMA 92, PETHEMA 99 y PETHEMA 2007. Todos ellos contemplaban un esquema inicial de quimioterapia de inducción a la remisión que incluía una antraciclina junto con citarabina, asociado o no a etopósido. La terapia post-remisión consistió en 1 ó 2 cursos de quimioterapia de consolidación con citarabina a dosis intermedias/altas, seguido de trasplante autólogo (ATSP) cuando fue posible. Los pacientes que no movilizaron no recibieron tratamiento adicional. Aquellos pacientes clasificados como de alto riesgo que disponían de donante compatible se sometieron a un trasplante alogénico de células madre (AloTPH).

Todas las muestras fueron proporcionadas por el Biobanco del Hospital La Fe. El estudio fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe, y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado en concordancia con las recomendaciones de la Declaración de los Derechos Humanos, la conferencia de Helsinki y las regulaciones institucionales.

4.2. Controles

Se incluyeron 20 muestras de sangre periférica de donantes sanos (SP) y 15 muestras de selección de células CD34+ de sangre de cordón umbilical (SCU), separadas por bolas inmunomagnéticas (Miltenyi Biotec, CA, EE.UU), para su uso como serie control en la comparación con la serie de pacientes. Además, se usó como serie de validación 10 líneas celulares leucémicas humanas: EOL-1 (eosinofílica), KG1a (línea celular de leucemia mieloide aguda), Kasumi-1 (mieloide), KG1 (mieloide), K562 (mielomonocítica), HEL (eritroleucémica), TF1 (eritroleucémica), HL60 (promielocítica), NB4 (promielocítica) y MOLM (megacariocítica). Todas estas líneas celulares fueron cultivadas de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (www.dsmz.de).

4.3. Estudio citogenético

4.3.1. Citogenética convencional

El estudio de citogenética convencional consistió en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células leucémicas obtenidas tras ser cultivadas *in vitro* durante 24 horas mediante métodos convencionales. Los cromosomas se identificaron mediante el método de bandas G con tripsina-Giemsa. Las metafases fueron analizadas usando el programa Ikaros (Metasystems Inc., Alemania). Las anomalías cromosómicas se describieron de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica (Nomenclature *et al*, 2009).

Los casos con menos de 20 metafases analizadas en ausencia de un clon anómalo se clasificaron como “no valorables”. Para hablar de cambio estructural o ganancia cromosómica se precisó su hallazgo en dos o más metafases, y en tres de ellas si se trataba de una pérdida cromosómica.

En función de las alteraciones encontradas, los pacientes se estratificaron en tres grupos de riesgo citogenético según el Medical Research Council trials (MRC) del 2010 (Grimwade *et al*, 2010):

- Favorable: incluye las alteraciones t(8;21), t(15;17) e inv(16), independientemente de las alteraciones citogenéticas adicionales.
- Adverso: incluye add(5q), -5, del(5q), -7, add(7q)/del(7q), abn(3q) [excluyendo t(3;5)(q21~25;q31~35)], inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p11~13;q23), t(11q23) [excluyendo t(9;11)(p21~22;q23) y t(11;19)(q23;p13)], t(9;22)(q34;q11), -17, abn(17p) y cariotipos complejos con al menos 4 anomalías no relacionadas.
- Intermedio: incluye pacientes con cariotipo normal y con alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorable o adversas.

4.3.2. FISH

El estudio de los reordenamientos más frecuentes en la LMA se llevó a cabo mediante hibridación de sondas específicas en las extensiones preparadas tras los cultivos celulares según las recomendaciones de la casa comercial. Las sondas utilizadas fueron –5/del(5q), –7/del(7q), TP53, del(20q), PML/RAR α , AML1(RUNX1)/ETO, MLL y CBFb/MYH11 (Cytocell).

4.4. Estudio de las alteraciones moleculares

4.4.1. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción del DNA se utilizó QIAAmp[®] DNA Mini kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la extracción de RNA total (que incluye el mRNA, miRNA y otros pequeños RNA y que por tanto es necesario para el análisis de los miRNA) se usó el reactivo Trizol (Invitrogen, USA) y posteriormente se extrajo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la muestra se homogeneizó utilizando una jeringuilla de insulina para romper eficientemente la integridad celular. Se añadió 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente con un vórtex y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C para favorecer la separación de dos fases. La fase superior (acuosa) fue transferida a un tubo nuevo y se le añadió el mismo volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la precipitación del RNA. Se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 12.000 g a 4°C. Tras decantar el sobrenadante el pellet de RNA se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% (diluido en agua libre de RNasas) y centrifugando a 7.500 g 5 minutos. El pellet se secó en una bomba de vacío durante 10 minutos y se resuspendió en agua libre de RNasas.

La cantidad, integridad y calidad de los ácidos nucleicos se determinó mediante espectrofotometría, medida como absorbancia a una longitud de onda (λ) de entre 260nm y 280nm (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE), y mediante la migración en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio para visualización del nivel de degradación. Se seleccionaron aquellas muestras con concentraciones superiores a 50ng/ μ L, cuya cantidad total no fuera inferior a 1 μ g y presentaran ratios Abs260/280 de alrededor de 1,8 para el DNA y 2 para el RNA. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Se realizó una amplificación completa del DNA genómico mediante el kit REPLI-g MIDI (Quiagen, GmbH, D40724 Hilden) con el fin de aumentar la cantidad de DNA disponible para los estudios realizados. Para ello, partimos de una cantidad de DNA genómico mayor a 10ng suspendido en tampón Tris-EDTA (TE) hasta obtener un volumen final de 2,5 μ L. En aquellos casos en los que el DNA de partida era de muy buena calidad, se partió de una cantidad de 1-10ng. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se obtuvo una gran cantidad de DNA amplificado uniformemente, con un rendimiento de

aproximadamente 40µg por cada 50µl de reacción. El DNA amplificado se diluyó en TE a una concentración 1:100. De forma general se utilizaron 3µl del DNA diluido para cada PCR.

4.4.2. Retrotranscripción del RNA

Se sintetizó el cDNA a partir de 500ng de RNA empleando el kit Reverse Transcription cDNA synthesis (Qiagen) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Para el análisis de los miRNA, el cDNA se sintetizó a partir de 500ng de RNA total con el kit miScript Reverse Transcription (Qiagen) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La calidad de las muestras de cDNA se evaluó mediante el gen control GUS y sólo se consideró para el análisis aquellas con un Umbral de Ciclos (Ct) < 30.

4.4.3. Caracterización molecular de los pacientes

Dentro de la caracterización molecular de la serie estudiada se realizó el análisis de las alteraciones consideradas de especial relevancia pronóstica y terapéutica:

- *FLT3*: El estudio de la mutación de la duplicación interna en tándem del receptor *FLT3* (*FLT3-ITD*) se realizó por PCR con los cebadores que amplifican la región que codifica el dominio yuxtamembrana del receptor (Nakao *et al*, 1996).
- *NPM1*: La detección de la mutación del gen *NPM1* se realiza con sondas de hibridación diseñados para el alelo normal. Se realiza mediante PCR en tiempo real con el sistema LightCycler® siguiendo el método descrito por Schnittger y cols., (Schnittger *et al*, 2005).
- *CEBPA*: Para detectar las mutaciones en el gen *CEBPA* se amplificaron las regiones TAD1, TAD2, (que codifican los dominios de transactivación) incluyendo la región entre ambos, y BZIP (región básica-cremallera leucina) del gen. Para ello se

realizaron tres PCRs utilizando el método descrito por Fuster y cols. (Fuster *et al*, 2012).

4.5. Estudio del gen *WT1*

4.5.1. *Expresión total de WT1*

La detección cuantitativa del gen *WT1* se realizó mediante PCR en tiempo real siguiendo el método descrito por Barragán y cols, (Barragán *et al*, 2004). Los resultados de la cuantificación se normalizaron tomando como referencia el gen control de la β -glucuronidasa (*GUS*). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo ABI Prism 7300. En un volumen final de 25 μ L se incluyó 2,5 μ L de cDNA, 1X TM master mix (Applied Biosystems), 0,5 μ M de cebadores y 0,2 μ M de sonda. Las reacciones se incubaron en una placa óptica de 96 pocillos a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 50 ciclos a 95°C durante 15 minutos y 60°C durante 1 minuto. El Ct, se determinó usando la línea de base que por defecto asigna el sistema.

4.5.2. *Análisis de variantes genéticas de WT1*

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

Para la detección de las variantes genéticas en el gen *WT1* se usaron cebadores específicos para cada uno de los exones analizados, considerando que para la técnica de HRM el fragmento amplificado por los cebadores no debe ser superior a los 250pb (Tabla 6). La especificidad de los cebadores fue testada con *The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*.

Tabla 6. Secuencias de cebadores para el estudio de las mutaciones de WT1

Gen WT1	Cebador	Secuencia (5' - 3')
Exón 2	Sentido	GCAGGTTACAGCACGGTCACC
	Antisentido	TCGCTTACCCAGCGAGCCCTG
Exón 3	Sentido	CGGTTCTCTCTGCAGGTGAGC
	Antisentido	TCCTACCTGCTGTAGGGCGTC
Exón 4	Sentido	CTGGAAAATGTGGAGGCTTGC
	Antisentido	AGTTACTGTGGAAAGGCAATGG
Exón 5	Sentido	ACTGGGGACTTAGTTCAGCAC
	Antisentido	ATTGCCCCAGGTGCCAGTCAG
Exón 6	Sentido	TGGCGACTGTGAGCCCACTG
	Antisentido	CCCTGATGTTAAAGGAGCCTG
Exón 7	Sentido	GCTTAAAGCCTCCCTTCCTC
	Antisentido	GTCCAGTCTTGGGCAAACAT
Exón 8	Sentido	GAATATGTGTCTTCCCCAAGGTG
	Antisentido	TAGCCCAAGGGAACACAGCTG
Exón 9	Sentido	GCCGAGGCTAGACCTTCTCT
	Antisentido	TCCAATCCCTCTCATCAAA
SNP <i>rs16754</i>	Cebador	Secuencia (5' - 3')
Exón 7	Sentido	CACTCTCCCTCAAGACCT
	Antisentido	TCTCTTATTGCAGCCTGGGTA

La técnica de HRM se basa en la amplificación de la región de interés mediante una PCR asociando intercalantes fluorescentes que se unen específicamente a la doble cadena de DNA. A medida que las dos hebras se van separando se emite una fluorescencia que genera las curvas de fusión características. La temperatura a la que se desnaturaliza la mitad del DNA se conoce como temperatura de

“*Melting*” (T_m) o de fusión y es dependiente de la longitud, secuencia, contenido y distribución en GC del fragmento de DNA a estudio.

La amplificación por PCR y el posterior análisis de las curvas de fusión se llevaron a cabo en un equipo *LightCycler480*[®] (Roche) en placas de 96 pocillos. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado junto con un control positivo y dos negativos por placa. Tanto la PCR como el HRM se efectuaron en una reacción final de 10 μ L, conteniendo 3 μ L de DNA genómico replicado, 5 μ L de *High Resolution Melting Master Mix* (Roche) y 50pmol de los cebadores específicos. El programa de termociclador empleado se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Programa de amplificación de la PCR por HRM

Temperatura	Modo de Adquisición	Tiempo Incubación (seg)	Ratio [°C/s]	[°C/s]
Desnaturalización				
95 °C	Ninguno	600	4,4	
Amplificación (45 ciclos)				
95 °C	Ninguno	10	4,4	
56 - 60°C	Ninguno	13	2,2	
72°C	Simple	14	4,4	
Fusión				
95°C	Ninguno	60	4,4	
40°C	Ninguno	60	1,5	
60°C		1	1	
95°C	Continuo		0,02	0,25
Enfriamiento				
40°C	Ninguno	10	2,2	

El análisis de los datos de amplificación y la especificidad del producto se realizó con el programa *Gene Scanning versión 1.2* (Roche). Con este programa se realiza inicialmente la normalización de

las curvas de fusión estableciendo valores uniformes de fluorescencias inicial y final de todas las muestras. Esto genera en última instancia un gráfico donde las muestras quedan agrupadas en función de sus curvas de fusión.

4.5.2.2 *Determinación de la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad*

En 150 muestras los productos de PCR de los exones 7 y 9 se secuenciaron para confirmar los resultados y poder calcular la sensibilidad y especificidad de la técnica de HRM. Una vez comprobada la eficacia de la técnica sólo se secuenciaron las muestras que presentaban una curva de fusión diferente a los controles normales.

4.5.2.3 *Secuenciación*

Las muestras seleccionadas para su secuenciación se testaron en un gel de agarosa al 2% para confirmar que la amplificación había sido correcta. El producto de PCR de cada una de las muestras se trató con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio USA). Se mezclaron 8µL del producto de PCR obtenido con 3,2µL de ExoSAP-IT y se incubaron a 37°C durante 15 minutos y a 80°C durante 15 minutos. La incubación se llevó a cabo en el termociclador *2720-Thermal Cycler de Applied Biosystems*.

A continuación, se realizó la reacción de secuenciación que consta de una primera fase de amplificación para incorporar los nucleótidos marcados y una segunda fase de purificación de la reacción. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador *2720-Thermal Cycler de Applied Biosystems* comportando una primera etapa de activación de la polimerasa a 94°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos que comprendían, una fase de desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, una fase de hibridación a 50°C durante 6 segundos y una fase de extensión de la cadena a 60°C durante 4 minutos. Todas las PCR de secuenciación fueron amplificadas en una reacción final de 10µL, conteniendo 5µL del producto de la reacción con *ExoSAP-IT*, 1µL

de la enzima del kit *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 3,125pmol del cebador sentido o antisentido de cada exón. La purificación de la reacción de secuenciación se hizo en columnas de filtración (Genycell Biotech España, S.L. Granada, España).

Finalmente, el producto de la reacción fue resuspendido en 20µL de formamida y se secuenciaron usando el *ABIPRISM 3130XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

El análisis de la secuencia se correlacionó con la secuencia del *GeneBank* NM_024426 para *WT1* mediante el programa de análisis *Sequence Scanner* de Applied Biosystems y el programa *MEGA 4.1*.

4.5.3. Análisis de las isoformas de WT1

Para analizar las 4 isoformas principales de *WT1* se desarrolló una PCR multiplex con cebadores marcados capaces de amplificar en una única reacción todas las isoformas y el gen control *ABL-1*. Posteriormente los productos de PCR se sometieron a análisis de fragmentos en un sistema de electroforesis capilar.

4.5.3.1 Amplificación de las isoformas de WT1

Se diseñaron cebadores marcados específicos que abarcaban desde el final del exón 4 hasta el exón 10 de *WT1*, dando lugar a un amplicón de 564pb. Las secuencias de los cebadores fueron 5'-Fam-TCCCAGCTTGAATGCATGACC-3' y 3'-CCGACAGCTGAAGGGCTTTTC-5'. La especificidad fue testada con la herramienta *The Basic Local Alignment Search (BLAST)* de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq). Los cebadores para el gen control *ABL-1* fueron los descritos previamente (Ottone, 2008) marcando uno de los cebadores con el fluorocromo HEX. Se amplificaron 2,5µl de cDNA en un volumen final que contenía el Buffer 10X, 1µM de cada cebador de *WT1* y 0,1µM de los cebadores de *ABL*, 0,2mmol/L de dNTPs, 2,5mmol/L de MgCl₂ y 1,5U de AmpTaqGold. Tras un ciclo de

desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C, se aplicaron 40 ciclos de amplificación a 60°C de temperatura de hibridación seguidos de una fase de elongación final de 30 minutos a 60°C. Los productos de la PCR fueron separados en un gel de agarosa para confirmar la presencia de una banda de aproximadamente 560pb. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. En el caso de las líneas celulares se analizaron 3 cultivos por cada una de las líneas.

4.5.3.2 *Detección de las isoformas mediante electroforesis capilar*

Los productos de PCR obtenidos en el paso anterior se mezclaron con formamida y el marcador de peso molecular GeneScan ROX 600 (Applied Biosystems) para su separación por electroforesis capilar en un *ABIPRISM 3130XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y finalmente analizados usando el software Gene Mapper 4.2 (Applied Biosystems). La fracción relativa de cada isoforma se calculó utilizando la medida del área bajo la curva de cada uno de los picos obtenidos en el análisis de fragmentos.

4.5.3.3 *Determinación de la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad*

Para estimar la sensibilidad y especificidad de la técnica se usó como método de referencia la detección de las isoformas de *WT1* por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) descrito por Kramarzova *et al* (2012).

El umbral de sensibilidad se calculó realizando diluciones seriadas de un cDNA de una muestra positiva en tampón Tris-EDTA (TE).

Se valoró la reproducibilidad calculando el coeficiente de variación (CV) intraensayo testando 20 veces 3 muestras de diferentes concentraciones. Para la reproducibilidad interensayo se testaron las muestras durante 10 días consecutivos por triplicado. Se calculó el CV como Desviación típica (DS) / Media (X) x 100.

4.5.4. Análisis de los miRNA

4.5.4.1 Arrays de miRNA

Con el objetivo de ampliar el conocimiento en este campo y a modo de guía para estudiar los miRNA importantes en la regulación de *WT1*, se hibridaron chips de miRNA de Affymetrix “GeneChip miRNA 2.0 Array” en 10 muestras de pacientes diagnosticados de LMA y seleccionados en función de su nivel de expresión de *WT1* total (5 muestras con hiperexpresión de *WT1* y 5 que no sobreexpresaban *WT1*).

4.5.4.2 Expresión de miRNA mediante qRT-PCR

La qRT-PCR de los miRNA seleccionados (hsa-miR-324-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-424*, hsa-miR-1307, hsa-miR-941, hsa-miR-193b, hsa-miR-425, hsa-miR-503, hsa-miR-500*, hsa-miR-132 y hsa-miR-223) se llevó a cabo usando cebadores comerciales específicos para cada miRNA (miScript Primer Assays) y el kit miScript SYBR Green PCR (Qiagen).

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron por triplicado usando el sistema *LightCycler480*[®] (Roche) en placas de 96 pocillos. Cada reacción contenía 10µl de cDNA, 12,5µl de la master mix Sybr Green PCR (Roche), 0,5µM de cada cebador en un volumen total de 25µl. Los parámetros del termociclador fueron los siguientes: 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos, y un programa de curvas de fusión (60–95°C) con una rampa de temperatura de +0,1°C/s.

Con el objetivo de corregir la variabilidad entre las diferentes muestras en la síntesis de cDNA, los niveles de expresión de cada miRNA diana se normalizaron con los niveles de expresión de un miRNA cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno o gen de referencia). Como gen de referencia se usó el miRNA Hsa-RNU6B_2.

Para cuantificar la expresión de cada miRNA se usó el método de cuantificación relativa 2-delta-delta-Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): se compara entre las diferentes muestras la expresión del miRNA diana medida en función de los valores umbral de ciclo (Ct) respecto a la expresión en Ct del gen de referencia ($\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{U6}$), y posteriormente se comparan los ΔCt de las muestras diana con respecto a la ΔCt mediana de las muestras control.

4.6. Análisis estadístico

4.6.1. Descriptivo

En un primer lugar se realizó un análisis descriptivo de la serie. Se emplearon las pruebas de Kolmorov-Smirnov o Shapiro-Wilk para el estudio de la normalidad. En el caso de variables continuas se analizaron las diferencias entre grupos mediante la t de Student o la U de Mann-Whitney según su distribución. El estudio de variables categóricas se realizó mediante el test Chi-cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher.

Se incluyeron en el estudio datos demográficos básicos (edad y sexo), parámetros hematológicos (nivel de hemoglobina, recuento de leucocitos, neutrófilos y plaquetas y porcentaje de blastos en SP), porcentaje de blastos en MO y alteraciones citogenéticas, grupos de riesgo citogenético según MRC y clasificación FAB.

Además se incluyeron el estado mutacional de *NPM1*, *FLT3-ITD*, *CEBPA* y *WT1*, los genotipos del SNP *rs16754* (*WT1^{AA}*, *WT1^{AG}* o *WT1^{GG}*), el porcentaje de las isoformas de *WT1*, los niveles de expresión de *WT1* total y de los miRNA analizados. Las variables continuas fueron categorizadas de acuerdo al punto de corte más discriminante o al establecido por trabajos previos:

Expresión de *WT1* total: En todos los casos, el punto de corte se estableció en el percentil 75 (P75) de expresión de *WT1* en la serie de casos.

Expresión de las isoformas de *WT1*: En todos los casos se categorizó en función del punto de corte de la mediana de expresión de cada una de las isoformas en la serie de casos.

Expresión de los miRNA: En todos los casos se categorizó en función del punto de corte del percentil 75 de expresión de cada una de los miRNA en la serie de casos.

4.6.2. Supervivencia

El análisis actuarial se hizo mediante el método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 2012), y para comparaciones las pruebas de log-rank (Mantel, 1966). La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue calculada desde la fecha de respuesta completa (RC) hasta la recaída o la muerte en RC, cualquiera que ocurriese primero. La SLR se calculó desde la RC hasta la reaparición de la enfermedad. La supervivencia global fue calculada desde el diagnóstico hasta la muerte o fecha de última visita. El seguimiento de los pacientes para el presente estudio fue actualizado el 1 de febrero de 2012.

El análisis de supervivencia se completó con un análisis multivariante mediante un modelo de regresión de Cox para eventos temporales (observaciones incompletas) (Cox, 1972), incluyéndose las variables con un valor significación estadística de $P < 0,10$ para cada 'end point'. En todos los casos el nivel de significación estadística se estableció con un valor de $P < 0,05$.

El análisis estadístico se realizó usando el programa EZR (Easy R) version 1.31.

5.RESULTADOS

5.1. Características de los pacientes.

Se incluyeron un total de 274 pacientes diagnosticados de LMA *de novo* entre septiembre de 1998 y agosto de 2010 en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. El único criterio limitante fue la disponibilidad de muestra para extracción de ácidos nucleicos (DNA y/o RNA) al diagnóstico.

La mediana de edad de la serie fue de 62 años (extremos: 16 – 91 años), siendo el 53% de los pacientes mayores de 60 años. Ciento cincuenta y seis fueron hombres (57%) y 118 mujeres (43%). La mediana de leucocitos fue de $12,9 \times 10^9/L$ (extremos: 0,1 – 396), la de hemoglobina de 9,1 g/dL (extremos: 4 – 16,6 g/dL) y la de plaquetas de $54,5 \times 10^9/L$ (extremos: 4 – 572). Las características principales de la serie se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Características principales de la serie global de pacientes con LMA *de novo*

Características	Pacientes N (%)
Total	274
Edad, años (rango)	62 (16 - 91)
≥60	143 (52)
<60	131 (48)
Sexo	
Hombre	156 (57)
Mujer	118 (43)
Riesgo Citogenético	
Favorable	21 (9)
Intermedio	160 (70)
Adverso	48 (21)
Cariotipo	
Normal	110 (48)
Con anomalías	119 (52)
FAB	
M0	19 (7)
M1	66 (25)
M2	61 (23)

Características	Pacientes N (%)
M3	4 (1)
M4	52 (20)
M5	36 (14)
M6	15 (6)
M7	2 (1)
Bifenotípica	5 (2)
Sin clasificar	4 (2)
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	
Mediana	12,9
Rango	0 - 396
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	
Mediana	14
Rango	0 - 89
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	
Mediana	54,5
Rango	(4 - 572)
Hemoglobina (g/dL)	
Mediana	9,1
Rango	4 - 16,6
% Blastos SP	
Mediana	39,5
Rango	0 - 100
FLT3-ITD	
Mutado	52 (22)
Wild-type	189 (78)
FLT3-D835	
Mutado	8 (4)
Wild-type	196 (96)
NPM1	
Mutado	74 (32)
Wild-type	155 (68)
FLT3-ITD/NPM1 status	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> pos	17 (12)
<i>FLT3</i> -ITD pos/ <i>NPM1</i> neg	14 (10)
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	29 (20)
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> neg	85 (59)
CEBPA	
Mutado	12 (13)
Wild-type	87 (87)

Pos = positivo, neg = negativo; SP: sangre periférica

5.1.1. Características clínicas

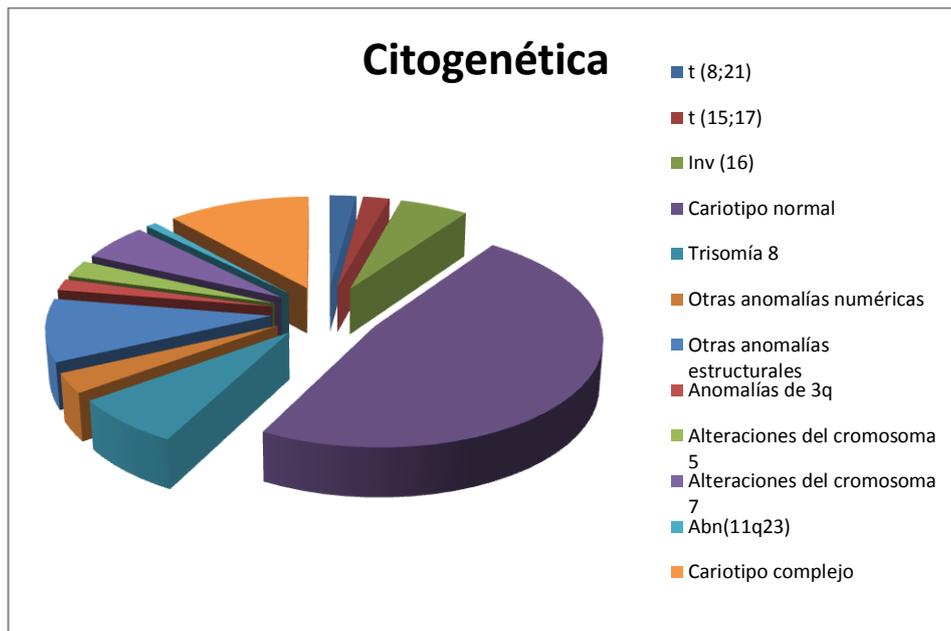
Doscientos seis pacientes (75%) fueron tratados con QT intensiva según los protocolos vigentes en el momento del diagnóstico. Cuarenta y seis pacientes no recibieron tratamiento debido a la edad avanzada o a la presencia de comorbilidades. La remisión completa fue alcanzada en 140 pacientes (63%): 128 pacientes tras el primer ciclo de inducción y 12 tras dos ciclos de inducción. Se realizó trasplante de progenitores hematopoyéticos en 70 pacientes (28 ATPH y 42 AloTPH). Cuarenta y cinco pacientes fueron considerados resistentes tras la QT de inducción, mientras que 37 pacientes fallecieron durante el tratamiento antes de poder evaluar la respuesta.

En el momento del análisis, 74 pacientes habían recaído (28%) y 65 permanecían vivos (24%).

5.1.2. Citogenética

El estudio del cariotipo fue valorable en 229 pacientes (84%), revelando un cariotipo normal en 111 pacientes (48%) y alguna alteración citogenética en 119 pacientes (52%) (Figura 1). El cariotipo no fue valorable en 20 pacientes (7%) debido a que no se obtuvieron metafases, mientras que en 25 pacientes no se pudo realizar el estudio citogenético por falta de muestra (9%). Las alteraciones encontradas en los pacientes permitieron estratificarlos en tres grupos de riesgo citogenético de acuerdo con la clasificación revisada del MRC (2010): 21 pacientes en el grupo favorable (9%), 160 pacientes en el grupo intermedio (70%) y 48 pacientes en el grupo adverso (21%).

Figura 1. Frecuencia de las alteraciones cromosómicas más comunes

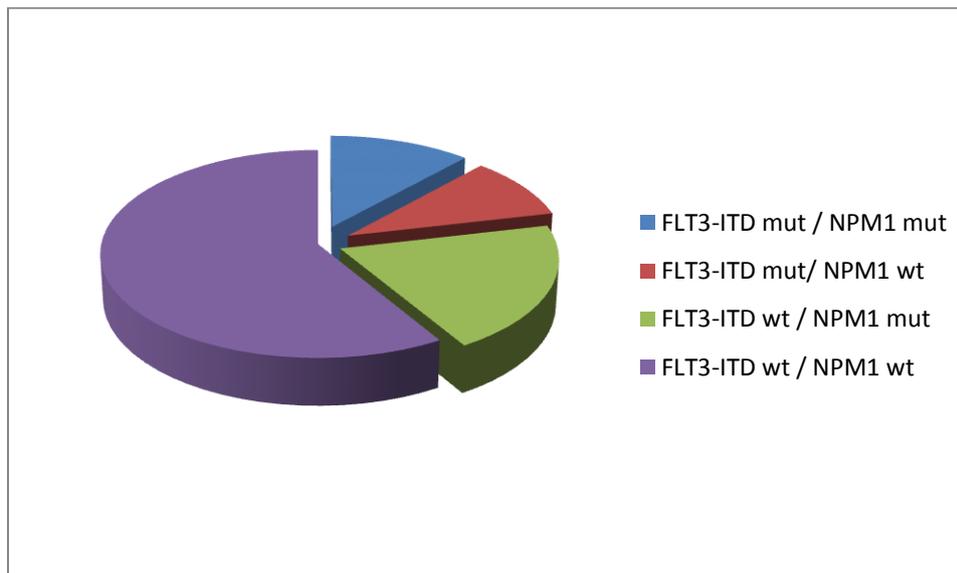


5.1.3. Alteraciones moleculares

Se detectaron 60 mutaciones en el gen *FLT3* en 58 pacientes (24%): 52 pacientes con duplicación en tándem (*FLT3-ITD*) y 8 con la mutación *FLT3-D835* (en dos pacientes se detectaron simultáneamente ambas mutaciones).

El gen *NPM1* se encontró mutado en 74 pacientes (32%) y el gen *CEBPA*, que se estudió en los casos de riesgo citogenético intermedio, fue positivo en 12 pacientes (13%).

El estatus mutacional en función de las alteraciones en *FLT3-ITD* y *NPM1* se describen en la Tabla 8 y en la Figura 2.

Figura 2. Estatus mutacional *FLT3-ITD/NPM1*

Mut = mutado, wt =: wild-type.

5.2. Estudio del gen *WT1*

5.2.1. Expresión total de *WT1*

La expresión total de *WT1* se estudió en 205 pacientes. La mediana fue de 1164 copias de *WT1*/copias de *GUS* x 10⁴. El percentil 25 (P25) fue de 270 copias de *WT1*/copias de *GUS* x 10⁴ y el percentil 75 (P75) de 3531 copias de *WT1*/copias de *GUS* x 10⁴.

Además se cuantificó la expresión total de *WT1* en la serie control de células de SP y CD34+ de SCU. La mediana de expresión de las células CD34+ fue de 102,48 copias de *WT1*/copias de *GUS* x 10⁴ (P25=19,02; P75=295,72). Ninguno de los donantes sanos de sangre periférica expresó niveles detectables de *WT1*.

Las características de los pacientes en función de la expresión de *WT1* se resumen en la Tabla 9, observándose una asociación significativa de la sobreexpresión de *WT1* (>P75) con un mayor porcentaje de blastos al diagnóstico y un mayor número de mutaciones de *FLT3-ITD*.

Tabla 9. Comparación de características basales de los pacientes según la expresión del gen *WT1*

Características	Expresión <i>WT1</i>		P
	Baja	Alta	
Total	142	59	
Edad, años (rango)			
≤60	67 (47)	32 (54)	0,225
>60	75 (53)	27 (46)	
Sexo			0,186
Hombre	86 (61)	31 (53)	
Mujer	56 (39)	28 (47)	
Grupo de riesgo citogenético			0,853
Favorable	11 (10)	4 (8)	
Intermedio	79 (69)	35 (67)	
Adverso	25 (22)	13 (25)	
Cariotipo normal	11 (10)	4 (8)	0,107
FAB			
M0	11 (15)	3 (2)	
M1	25 (34)	23 (13)	
M2	33 (45)	16 (9)	
M4	32 (43)	10 (6)	
M5	18 (24)	2 (1)	
M6	8 (11)	3 (2)	
M7	2 (3)	0	
Bifenotípica	5 (7)	1 (1)	
No clasificada	1 (1)	0	
Recuento leucocitos (×10⁹/L)			0,258
Mediana	10,95	11,7	
Rango	(0-342)	(1-396)	
Recuento plaquetar (×10⁹/L)			0,071
Mediana	58	44	
Rango	(5-572)	(4-225)	
Hemoglobina (g/dL)			0,191
Mediana	9,05	9	
Rango	(5,5-16,6)	(4-13,4)	
% blastos SP			<0,001
Mediana	28	63,5	
Rango	(0-100)	(0-100)	
FLT3-ITD			0,027
Positivo	23 (17)	17 (31)	
Negativo	113 (83)	38 (69)	

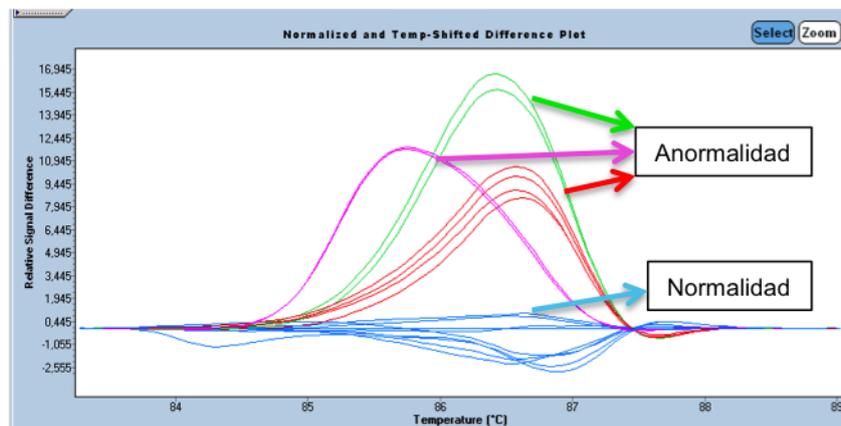
Características	Expresión <i>WT1</i>		<i>P</i>
	Baja	Alta	
SNP rs16754			0,084
<i>WT1</i> ^{AG}	79 (68)	11 (20)	
<i>WT1</i> ^{AA}	37 (32)	43 (80)	
Mutaciones de <i>WT1</i>			0,617
Mutado	4 (4)	1 (2)	
Wild-type	111 (96)	53 (98)	
Expresión <i>WT1</i> Isoforma A			0,164
Mediana	17	19	
Rangos	(0-100)	(0-72)	
Expresión <i>WT1</i> Isoforma B			0,973
Mediana	22,5	23	
Rangos	(0-100)	(0-29)	
Expresión <i>WT1</i> Isoforma C			0,661
Mediana	24	24	
Rangos	(0-100)	(0-30)	
Expresión <i>WT1</i> Isoforma D			0,481
Mediana	31	32	
Rangos	(0-100)	(0-52)	
<i>NPM1</i>			0,493
Mutado	45 (34)	17 (32)	
Wild-type	89 (66)	36 (61)	
<i>FLT3</i>-ITD/<i>NPM1</i> estatus			0,002
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> pos	19 (20)	8 (19)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	3 (3)	10 (24)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	62 (65)	19 (45)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> neg	12 (13)	5 (12)	
<i>CEBPA</i>			0,118
Mutado	11 (16)	1 (4)	
Wild-type	59 (84)	24 (96)	

5.2.2. Variantes genéticas de *WT1*

Para determinar si el papel del gen *WT1* sobre la leucemogénesis y las diferencias de expresión encontradas pudieran estar causados por alteraciones en dicho gen, se estudió la presencia de variaciones genéticas en los exones codificantes 2 al 9 del gen (ambos inclusive) en 175 pacientes. El estudio se realizó mediante el método de cribado de HRM y posterior secuenciación de Sanger.

En la Figura 3 se muestra una imagen con los resultados obtenidos en el HRM donde pueden observarse las diferentes curvas de fusión en función de la secuencia del gen.

Figura 3. Resultados de las curvas de fusión derivadas del análisis de HRM



5.2.2.1 Análisis de las curvas de fusión de WT1

Sesenta y tres de las 175 muestras analizadas mostraron una curva de fusión diferente de la normalidad. Tras la secuenciación de Sanger, se confirmó que 7 (4%) presentaron una variación en alguno de los exones estudiados (Tabla 10): seis de ellas se localizaron en el hotspot del gen *WT1* (exón 7) mientras que la restante se encontró en el exón 6. Las variaciones en el exón 7 se tradujeron en un cambio en la pauta de lectura por pequeñas duplicaciones o deleciones/inserciones. La mutación del exón 6 corresponde a un cambio de una C por una T originando un codón de parada. El SNP *rs16754* fue encontrado en heterocigosis en 54 pacientes (31%). Dos de los pacientes portadores de una mutación en *WT1* presentaban además el SNP *rs16754*. Las 4 muestras restantes con una curva de fusión diferente resultaron tener un SNP en el intrón 6 ya descrito previamente en la literatura (*rs5030274*).

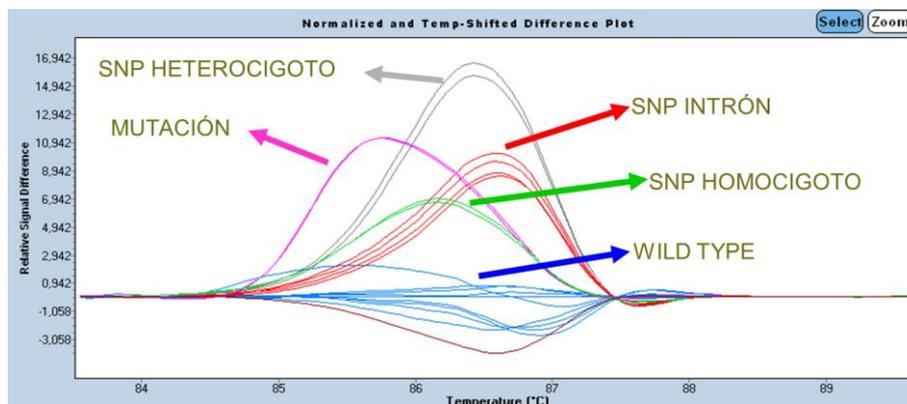
Tabla 10. Mutaciones encontradas en el gen *WT1*

Cambio en el DNA	Cambio en la proteína	Exón	Cariotipo	FAB	Otras alteraciones moleculares
c.1138_1943delCGGTC	R380fs	7	ND	M5	FLT3-ITD
c.907_908insT	V303fs	7	46,XX,inv(16)(p13q22)	M2	-
c.1025_1026insCTC	Q409fs	7	46, XX, t(8;21)(q22;q22), 9qh+	M1	ASXL1+
c.1133_1143dupTTGTACGGTC	S381fs	7	46,XX	M4	NPM1+/FLT3-ITD
c.1114_1120dupCCTGGAG	V374fs	7	46, XY	M5	-
c.1110T>G	R366S	7	46, XX, T(8;21)(q22;q22)	M2	-
c.892C>T	Q298*	6	46, XX, t(3;9;22)(q25;q34;q11)	M2	-

5.2.2.2 Sensibilidad y especificidad

Para confirmar la eficacia, sensibilidad y especificidad del método utilizado se secuenciaron por duplicado todas las muestras de los exones 7 y 9. Se observó una correlación total entre el método de HRM y la secuenciación de Sanger. Una vez comprobada la sensibilidad (100%) y especificidad (100%) de la técnica sólo se secuenciaron las muestras que presentaban una curva de fusión diferente a los controles normales. En la Figura 4 se muestra un ejemplo de la imagen obtenida por la técnica de HRM al correlacionar los resultados con los obtenidos por secuenciación de Sanger.

Figura 4. Detalle de las diferentes curvas de fusión encontradas en el análisis por HRM



5.2.2.3 Características de los pacientes en función del estatus mutacional de *WT1* y del SNP *rs16754*

Las características basales de los pacientes según su estado mutacional y la presencia o no del SNP *rs16754* se resumen en la Tabla 11 y Tabla 12, respectivamente.

Los pacientes con mutación en algún exón de *WT1* fueron mujeres con mayor frecuencia (86%) y pertenecían por igual al grupo de riesgo citogenético favorable e intermedio ($P = 0,022$ y $P = 0,002$; respectivamente).

Tabla 11. Comparación de características basales de los pacientes según el estado mutacional del gen *WT1*

Característica	<i>WT1</i> ^{wt} N (%)	<i>WT1</i> ^{mut} N (%)	<i>P</i>
Total	168 (96)	7 (4)	
Edad, años (rango)	61 (16-88)	60 (41-88)	0,604
≤60	81 (48)	4 (57)	0,468
>60	87 (52)	3 (43)	
Sexo			0,022
Hombre	101 (60)	1 (14)	
Mujer	67 (40)	6 (86)	
Grupo de riesgo citogenético			0,002

Característica	<i>WT1</i> ^{wt} N (%)	<i>WT1</i> ^{mut} N (%)	P
Favorable	9 (6)	3 (50)	
Intermedio	98 (68)	3 (50)	
Adverso	38 (26)	0 (0)	
Cariotipo normal	60 (41)	2 (33)	0,557
FAB			0,904
M0	13 (8)	0 (0)	
M1	42 (25)	1 (14)	
M2	40 (24)	3 (43)	
M4	31 (19)	1 (14)	
M5	21 (13)	2 (29)	
M6	13 (8)	0 (0)	
M7	2 (1)	0 (0)	
Bifenotípica	4 (2)	0 (0)	
No clasificado	1 (0)	0 (0)	
Leucocitos (x10⁹/L)			0,105
Mediana	12,4	35	
Rango	0,6-396	2,4-342	
Plaquetas (x10⁹/L)			0,174
Mediana	54	68	
Rango	5-572	53-175	
Hemoglobina (g/dL)			0,957
Mediana	8,8	9,3	
Rango	4-16,6	6,1-11	
PMN			0,129
Mediana	14	4	
Rango	0-89	0-56	
% Blastos en SP			0,160
Mediana	42	72	
Rango	0-100	20-100	
<i>FLT3-ITD</i>			0,396
Positivo	32 (22)	2 (33)	
Negativo	116 (78)	4 (66)	
<i>NPM1</i>			0,374
Mutado	46 (33)	1 (17)	
Wild-type	95 (66)	5 (83)	
Estatus <i>FLT3-ITD/NPM1</i>			0,602
<i>FLT3-ITD</i> neg/ <i>NPM1</i> pos	27 (22)	0 (0)	
<i>FLT3-ITD</i> pos / <i>NPM1</i> neg	12 (10)	1 (17)	
<i>FLT3-ITD</i> neg / <i>NPM1</i> neg	72 (58)	4 (66)	
<i>FLT3-ITD</i> pos / <i>NPM1</i> pos	13 (10)	1 (17)	
<i>CEBPA</i>			0,550
Mutado	8 (11)	0 (0)	
Wild-type	67 (89)	3 (100)	

Tabla 12. Comparación de características basales de los pacientes de los genotipos $WT1^{AA}$ y $WT1^{AG}$

Características	$WT1^{AA}$ N (%)	$WT1^{AG}$ N (%)	P
Total	121 (69)	54 (31)	
Edad, años (rango)	59 (16-88)	65 (17-88)	0,003
≤60	66 (55)	19 (35)	0,018
>60	55 (45)	35 (65)	
Sexo			0,861
Hombre	70 (58)	32 (59)	
Mujer	51 (42)	22 (41)	
Grupo de riesgo citogenético			0,903
Favorable	9 (8)	3 (7)	
Intermedio	71 (67)	30 (66)	
Adverso	26 (25)	12 (27)	
Cariotipo normal	45 (42)	23 (51)	0,328
FAB			0,430
M0	10 (8)	3 (5)	
M1	32 (27)	11 (20)	
M2	27 (23)	16 (30)	
M4	21 (17)	11 (20)	
M5	15 (12)	8 (15)	
M6	12 (10)	1 (2)	
M7	1 (1)	1 (2)	
Bifenotípica	2 (2)	2 (4)	
No clasificado	0	1 (2)	
Leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,292
Mediana	10,4	19,95	
Rango	0,6-396	1-209	
Plaquetas ($\times 10^9/L$)			0,907
Mediana	54,00	64,65	
Rango	12-572	5-222	
Hemoglobina (g/dL)			0,497
Mediana	9	8,65	
Rango	4-16,6	5,4-13,4	
PMN			0,390
Mediana	12	16	
Rango	0-88	0-89	
% Blastos en SP			0,388
Mediana	44	42	
Rango	0-100	0-100	
FLT3-ITD			0,733
Positivo	24 (23)	10 (20)	
Negativo	81 (77)	39 (80)	

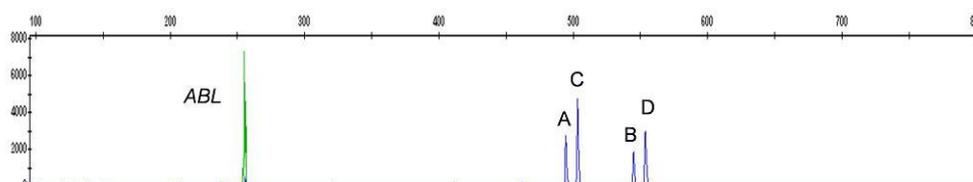
Características	<i>WT1</i> ^{AA} N (%)	<i>WT1</i> ^{AG} N (%)	<i>P</i>
<i>NPM1</i>			0,285
Mutado	36 (30)	11 (26)	
Wild-type	68 (70)	32 (74)	
Estatus <i>FLT3-ITD/NPM1</i>			0,502
<i>FLT3-ITD</i> neg/ <i>NPM1</i> pos	22 (24)	5 (13)	
<i>FLT3-ITD</i> pos / <i>NPM1</i> neg	9 (10)	4 (10)	
<i>FLT3-ITD</i> neg / <i>NPM1</i> neg	50 (55)	26 (67)	
<i>FLT3-ITD</i> pos / <i>NPM1</i> pos	10 (11)	4 (10)	
<i>CEBPA</i>			0,476
Mutado	5 (9)	3 (14)	
Wild-type	52 (91)	18 (86)	

Los pacientes con el genotipo mayoritario (*WT1*^{AA}) para el SNP *rs16754* fueron significativamente más jóvenes que los pacientes con el genotipo heterocigoto *WT1*^{AG} (mediana de edad 59 vs. 65 años; *P*=0,003). No se encontraron otras diferencias en las características al diagnóstico.

5.2.3. Expresión de las isoformas de *WT1*

La cuantificación relativa de las cuatro isoformas principales de *WT1* se llevó a cabo mediante una PCR multiplex. El producto obtenido fue analizado por electroforesis capilar obteniendo un pico por cada una de las cuatro isoformas amplificadas y el gen control *ABL* (Figura 5).

Figura 5. Análisis de fragmentos obtenido mediante PCR Multiplex de las isoformas de *WT1*

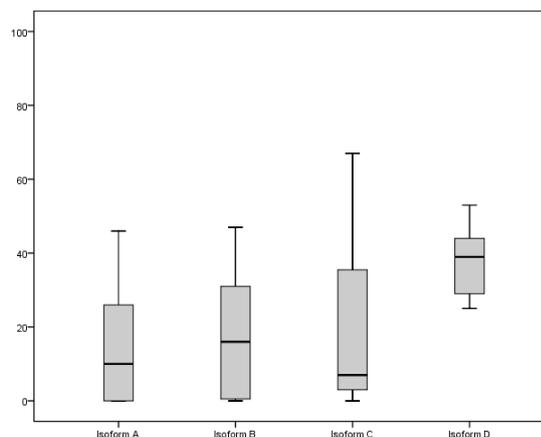


Se analizaron 112 pacientes junto con una serie control de células CD34+ de SCU y 10 líneas celulares leucémicas. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

5.2.3.1 Expresión de las isoformas de *WT1* en la serie control

Todas las muestras de células CD34+ de SCU expresaron al menos una de las isoformas de *WT1*. La mediana de expresión relativa de cada una de las isoformas fue: 10% para la isoforma A (P25=0; P75=26), 16% para la isoforma B (P25=0; P75=32), 7% para la isoforma C (P25=2; P75=37) y 39% para la isoforma D (P25=25; P75=44) (Figura 6).

Figura 6. Expresión relativa de cada isoforma de *WT1* en la serie control CD34+



En relación a las líneas celulares leucémicas, todas ellas expresaron las cuatro isoformas de *WT1* con un predominio de la isoforma D, salvo la línea celular EOL-1 que mostró un mayor predominio de la isoforma C. En la Tabla 13 se detallan las medianas relativas de expresión de las cuatro isoformas obtenidos en cada línea celular estudiada.

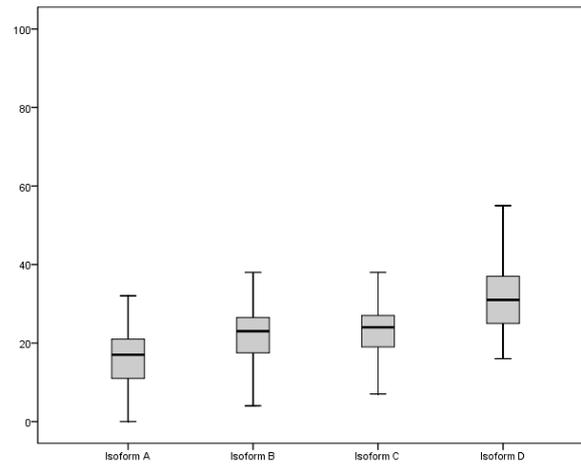
Tabla 13. Porcentaje de expresión de las distintas isoformas de WT1 en las líneas celulares leucémicas

LÍNEA CELULAR	ISOFORMA de WT1 (%)			
	A	B	C	D
EOL-1	22	16	36	26
KG1a	21	27	24	28
KG1	19	21	30	30
HEL	19	24	25	32
TF1	19	24	25	32
HL60	14	27	20	39
MOLM	14	27	20	39
KASUMI-1	22	24	26	29
NB4	20	25	26	29
K562	17	24	27	33

5.2.3.2 Expresión de las isoformas de WT1 en la serie de pacientes

Ciento tres pacientes (92%) expresaron al menos una de las isoformas. La mediana de expresión relativa de cada una de las isoformas en la serie de pacientes fue: 17% para la isoforma A (P25=11; P75=21), 23% para la isoforma B (P25=17; P75=27), 24% para la isoforma C (P25=19; P75=27) y 31% para la isoforma D (P25=25; P75=37) (Figura 7).

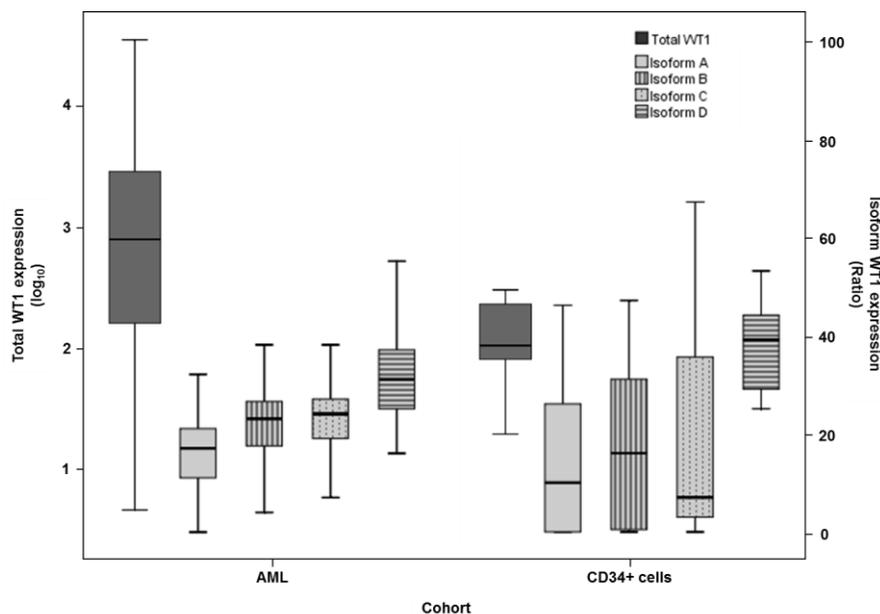
Figura 7. Expresión relativa de cada isoforma de *WT1* en la serie de pacientes



Para poder determinar un punto de corte de sobreexpresión de cada isoforma se estableció la mediana de expresión de cada isoforma obtenida en la cohorte de pacientes como valor normal. Al estratificar los pacientes de acuerdo a este punto de corte se observó que las isoformas A, B y C se encontraban sobreexpresadas en el 78%, 77% y 83% de los pacientes, respectivamente ($P=0,01$, $P=0,01$ y $P=0,001$), mientras que la isoforma D se encontrada sobreexpresada en el 18% de los pacientes ($P=0.01$). En la Figura 8 se encuentran representadas la expresión total y de cada isoforma de *WT1* en la serie de pacientes y en la serie control.

Además, cuando se analizó la posible asociación entre las cuatro isoformas se observó una asociación directa entre la expresión de las isoformas A, B y C ($P<0.001$) y una asociación inversa entre la isoforma A y la D ($P=0.007$).

Figura 8. Expresión de *WT1* total y patrón de expresión de cada isoforma en el grupo control y en la serie de pacientes



5.2.3.3 Sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de la técnica

Para testar la eficiencia del método de análisis de fragmentos para la cuantificación relativa de las cuatro isoformas principales se compararon los resultados con el método de qRT-PCR descrito por Kramarzova *et al* (Kramarzova *et al*, 2012).

Los resultados de ambos métodos fueron equiparables en todas las muestras excepto en 6 casos. Las discrepancias observadas se dieron en las muestras que se encontraban en el límite de detección, es decir, las muestras que sólo expresaron una de las isoformas. De las muestras que no expresaban ninguna de las isoformas por el análisis de fragmentos, una de ellas expresó la isoforma D por la técnica de qPCR. De forma global se alcanzó una sensibilidad del 90% y una especificidad del 80% comparado con la técnica de Kramarzova.

Por otro lado, el límite de sensibilidad para cada isoforma fue delimitada en 10^{-4} para las líneas celulares y en 10^{-1} para el resto de muestras (10^{-2} para la isoforma D).

Las diferencias en los ratios de expresión de las isoformas de *WT1* dentro de la misma muestra fueron muy bajas, demostrando una buena reproducibilidad de los resultados tanto interensayo (CV=5-10%) como intraensayo (CV=3-4%).

5.2.3.4 *Características de los pacientes en función de la expresión de las isoformas*

La sobreexpresión de las isoformas A y B se asoció con un mayor porcentaje de blastos en SP al diagnóstico (57% vs. 22%, $P=0,008$, en la isoforma A y 59% vs. 11,5%, $P=0,001$, en la isoforma B). No se encontraron otras diferencias en cuanto a la expresión de cada isoforma y el resto de variables clínico-biológicas o moleculares.

En la Tabla 47 de la sección Anexos se describen las principales características clínico-biológicas y moleculares de las cuatro isoformas según la expresión baja o alta de cada una.

5.2.4. *miRNA WT1*

5.2.4.1 *Arrays de microRNA*

Se hibridación con chips de microRNAs 5 muestras de LMA con sobreexpresión de *WT1* y 5 muestras de LMA que no sobreexpresaban *WT1*. Una vez realizado el análisis supervisado de los datos se demostró la existencia de un perfil de expresión de microRNAs distinto entre ambos grupos (Figura 9 y Figura 10).

Figura 9. Dendrogramas de un análisis de clustering supervisado

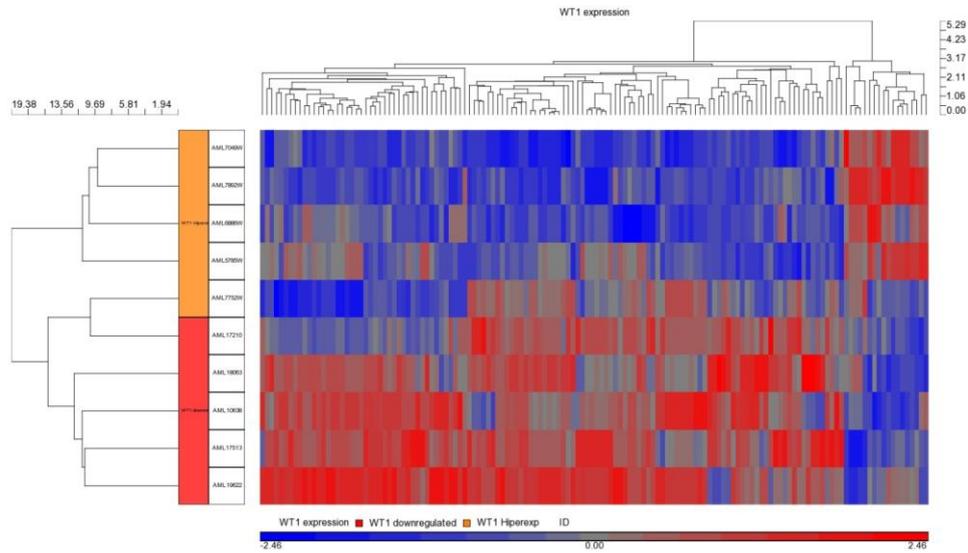
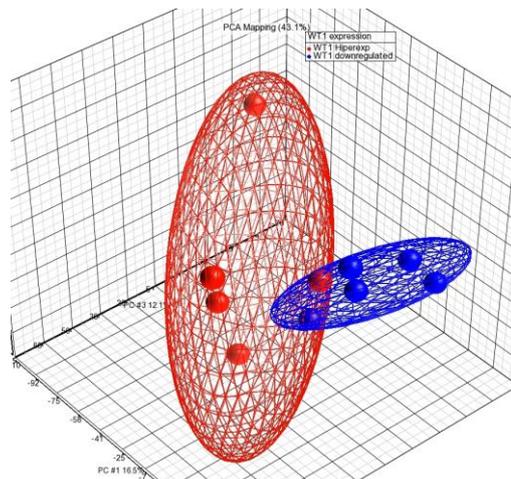


Figura 10. Análisis de componentes principales donde se observa el agrupamiento de las muestras por su similitud



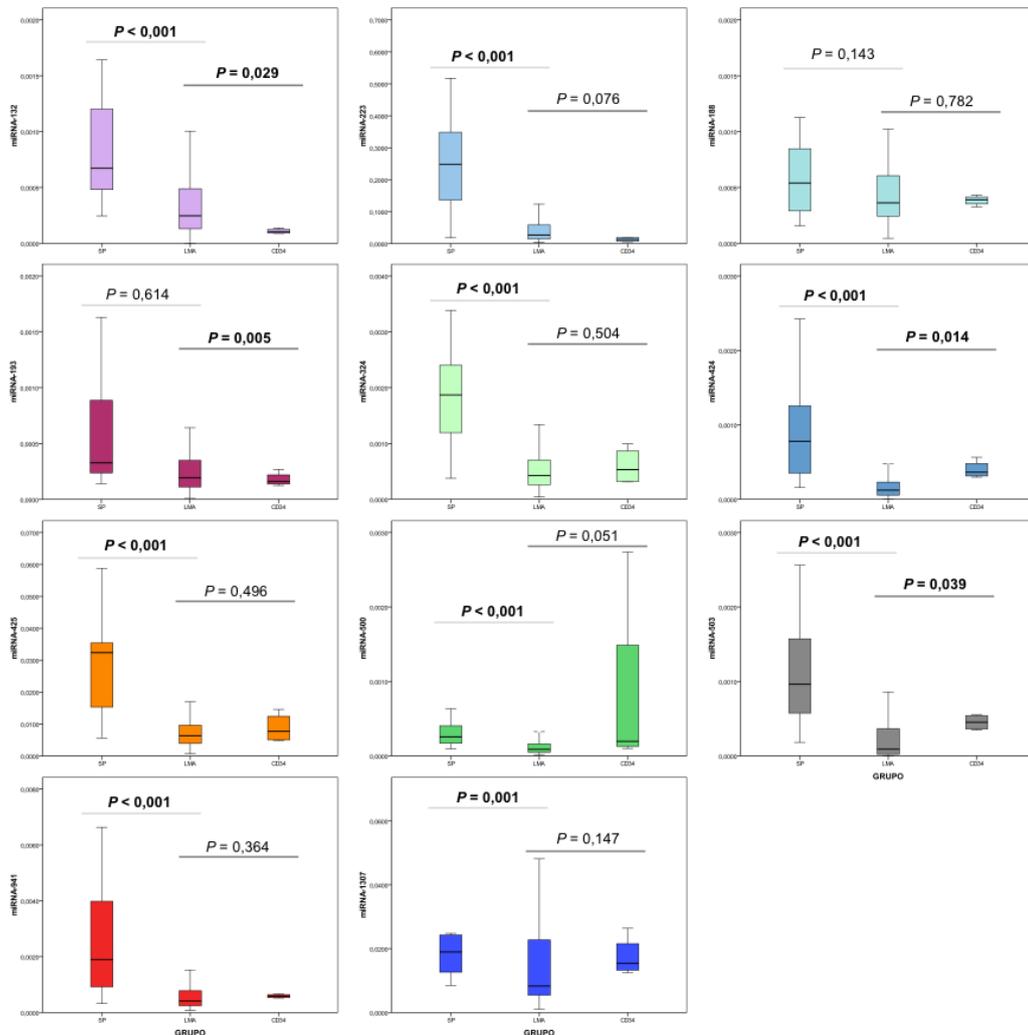
El resultado del análisis reveló la presencia de 9 miRNA con expresión diferencial entre ambos grupos, es decir, con un valor de P menor de 0,05 y una diferencia de medias (“fold-change”) de mínimo 1: hsa-miR-324-5p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-424*, hsa-miR-1307, hsa-miR-941, hsa-miR-193b, hsa-miR-425, hsa-miR-503 y hsa-miR-500*.

5.2.4.2 Expresión de miRNA mediante qRT-PCR

Tras seleccionar los miRNA con expresión diferencial derivados del análisis de arrays de miRNA se realizó la validación de los mismos en la serie de pacientes (n=135) y en 20 muestras de SP y 4 de células CD34+ de SCU. Además, se incluyeron dos miRNA adicionales con relevancia demostrada en el papel de *WT1* y que no estaban incluidos en el panel de miRNA *array*: hsa-miR-132 y hsa-miR-223 (The 5th International Conference on WT1 in Human Neoplasia).

Las medianas de expresión de los 11 miRNA analizados en los tres grupos se encuentran representados en la Figura 11. Los pacientes con LMA mostraron una expresión menor de los miRNA estudiados con respecto a la serie control de SP, salvo para el miR-188, en el que la diferencia no fue estadísticamente significativa. Además, estos pacientes mostraron una mediana de expresión de los miR-424 y miR-1307 significativamente menor que en el grupo control de células CD34+ y una mediana de expresión del miR-132 significativamente mayor que las células CD34+.

Figura 11. Comparación de la expresión de los distintos miRNA en la serie de casos frente a los controles de CD34+ y SP



5.2.4.3 Características de los pacientes en función de la expresión de los miRNA.

Para clasificar a los pacientes en función de la infra o sobreexpresión de los distintos miRNA se estableció como punto de corte el valor mayor o igual al percentil 75. Al estratificar los pacientes de acuerdo a este punto de corte se observó que los pacientes con sobreexpresión de algún miRNA, sobreexpresaban a su vez los demás miRNA de forma significativa (salvo el miR-223, que no alcanzaba

significación estadística para los miR-188, miR-193, miR-424 y miR-500; y los miR-132 y miR-188 en el caso del miR-503). Además, se observó una edad más avanzada (≥ 60 años) en los pacientes que sobreexpresaban frente a los que infraexpresaban los miR-132 (62% vs. 40%; $P=0,032$), miR-223 (62% vs. 40%; mediana de 64 frente a 57 años; $P=0,032$) y miR-500 (mediana de 63 vs. 52 años; $P=0,049$). *NPM1* se halló mutado con menor frecuencia en los casos con sobreexpresión de los miR-223 (25% vs. 46%; $P=0,037$) y miR-503 (7% vs. 52%; $P<0,001$), siendo en éste último miRNA también significativa la asociación con el estatus mutacional *FLT3-ITDneg/NPM1neg* (83% vs. 37%; $P=0,027$). El grupo de riesgo citogenético intermedio se encontró con mayor frecuencia en los pacientes con sobreexpresión de miR-425 (93% vs. 66%; $P=0,015$), miR-500 (89% vs. 68%; $P=0,045$) y miR-1307 (94% vs. 66%; $P=0,011$). Los pacientes con sobreexpresión de miR-503 en comparación con el grupo con infraexpresión presentaron con menor frecuencia un cariotipo normal (15% vs. 85%; $P=0,001$). El recuento de leucocitos fue significativamente mayor en los pacientes con sobreexpresión del miR-425 en comparación a los que lo infraexpresaban (mediana de 42,8 vs. $9,9 \times 10^9/L$; $P=0,001$).

En la Tabla 48 de la sección Anexos se encuentran detalladas las principales características de estos pacientes.

5.3. Correlación de las alteraciones en el gen *WT1*

5.3.1.1 Asociación de las variaciones genéticas (mutaciones y/o SNP) en el gen *WT1* con la expresión total de *WT1*.

Se observó una menor expresión global de *WT1* en los pacientes portadores del SNP *rs16754 WT1^{AG}*, aunque dicha diferencia no alcanzó significación estadística. No se encontraron diferencias de expresión global de *WT1* entre los pacientes con presencia o no de mutación en el gen *WT1* (Tabla 14).

Tabla 14. Expresión de *WT1* total en función de las variaciones en la secuencia del gen *WT1*

Características	<i>WT1</i> ^{AA}	<i>WT1</i> ^{AG}	<i>P</i>	<i>WT1</i> ^{wt}	<i>WT1</i> ^{mut}	<i>P</i>
Expresión <i>WT1</i> total			0,073			0,553
Mediana	1438,6	778		1288,46	981,5	
Rango	0-55348	0-30000		0-55348	0-10575	

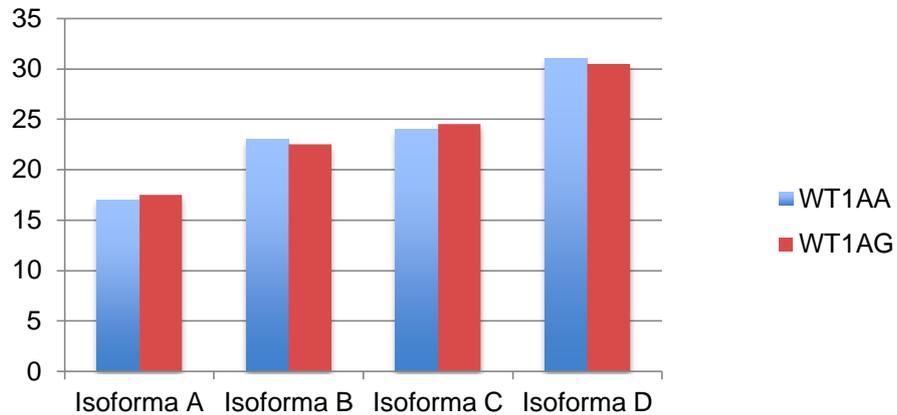
*5.3.1.2 Asociación de las alteraciones (mutaciones y/o SNP) en el gen *WT1* con la expresión de las isoformas principales de *WT1**

No se encontraron diferencias entre los pacientes con o sin presencia del SNP atendiendo a la expresión de cada una de las isoformas (Tabla 15).

Tabla 15. Relación entre el fenotipo del *SNP* de *WT1* y la expresión relativa de sus cuatro isoformas principales

	<i>WT1</i> ^{AA} N (%)	<i>WT1</i> ^{AG} N (%)	<i>P</i>
Total	67	20	
Isoforma A			0,738
mediana	17	17,5	
rangos	0-100	0-55	
Isoforma B			0,927
mediana	23	22,5	
rangos	0-100	0-45	
Isoforma C			0,867
mediana	24	24,5	
rangos	0-100	0-63	
Isoforma D			0,581
mediana	31	30,5	
rangos	0-100	0-55	

Figura 12. Expresión relativa de cada isoforma en los subgrupo de pacientes $WT1^{AA}$ y $WT1^{AG}$



Dado que sólo se disponía de RNA suficiente de uno de los pacientes portadores de una mutación en *WT1* no se pudo realizar el estudio comparativo de la expresión de las isoformas en función de las mutaciones de *WT1*.

5.3.1.3 Asociación de las alteraciones (mutaciones y/o SNP) en el gen *WT1* con la expresión de los miRNA de *WT1*

Se observó una mayor expresión del miR-424 en los pacientes con presencia de una mutación en el gen *WT1* ($P=0,046$) y una mayor expresión de los miR-223, miR-500 y miR-941 en los pacientes portadores del SNP *rs16754* ($P=0,030$; $P=0,036$ y $P=0,025$, respectivamente; Tabla 16).

Tabla 16. Expresión de los miRNA en función de las variaciones en la secuencia del gen WT1

Características	SNP rs16754 WT1		P	Mutaciones gen WT1		P
	WT1 ^{AA}	WT1 ^{AG}		WT1wt	WT1mut	
Total	51	12		60	2	
miR-132			0,278			0,163
Mediana	1,854	2,759		1,912	6,138	
Rangos	0,003-10,47	0,035-28,29		0,003-28,29	2,8-9,48	
miR-223			0,030			0,811
Mediana	2,142	5,187		2,637	4,782	
Rangos	0,339-85,42	1,066-19,86		0,378-85,42	0,339-9,22	
miR-188			0,071			0,061
Mediana	0,846	1,223		0,899	2,679	
Rangos	0,118-7,712	0,6598-3,16		0,118-7,71	1,59-3,766	
miR-193			0,441			0,426
Mediana	0,998	1,408		0,985	1,474	
Rangos	0,052-13,389	0,4999-4,38		0,052-13,388	1,046-1,9	
miR-324			0,241			0,936
Mediana	0,753	1,0126		0,880	1,164	
Rangos	0,159-10,517	0,562-4,646		0,159-10,52	0,362-1,967	
miR-424			0,270			0,046
Mediana	0,319	0,447		0,330	1,276	
Rangos	0,004-1,786	0,063-1,478		0,004-1,786	0,773-1,779	
miR-425			0,506			0,780
Mediana	0,81	0,883		0,811	0,872	
Rangos	0,135-3,701	0,495-3,16		0,135-3,7	0,266-1,478	
miR-500			0,036			0,319
Mediana	0,232	0,449		0,237	0,533	
Rangos	0,047-4,186	0,165-2,2		0,047-4,186	0,278-0,788	
miR-503			0,083			0,577
Mediana	0,234	0,770		0,251	1,014	
Rangos	0,006-5,41	0,032-1,521		0,006-5,41	0,08-1,948	
miR-941			0,025			0,080
Mediana	0,568	0,985		0,661	2,372	
Rangos	0,146-20,190	0,614-2,964		0,146-20,199	1,647-3,098	
miR-1307			0,363			0,605
Mediana	0,400	0,515		0,434	1,168	
Rangos	0,096-6,998	0,192-3,047		0,097-6,99	0,326-2,01	

5.3.1.4 Asociación de la expresión de las isoformas de WT1 con la expresión total de WT1

En los pacientes en los que se analizó la expresión de las cuatro isoformas principales se observó una mediana de expresión total de WT1 de 787,32 copias de WT1/copias de GUS x 10⁴ (P25=156,89; P75=2896,75). Se observó una asociación directa entre la sobreexpresión de las isoformas A, B y C y la sobreexpresión total de WT1, de tal forma que el 80% de los casos que sobreexpresaban WT1 tenían significativamente una mayor proporción de las isoformas A, B y C ($P=0,02$; $P=0,001$ y $P=0,001$, respectivamente)

Por otro lado, 9 pacientes no expresaron ninguna de las isoformas. En éstos, la expresión total de WT1 fue baja o muy baja en 4 de ellos (<P25), moderada-alta en 3 casos (entre la mediana y el P75) y no evaluable por falta de muestra en los 2 restantes.

5.3.1.5 Asociación de la expresión de las isoformas de WT1 con la expresión de los miRNA de WT1

Se observó una mayor expresión del miR-424 en los pacientes que sobreexpresaban la isoforma A de WT1 ($P=0,047$). En los pacientes con sobreexpresión de la isoforma C se observó una menor expresión del miR-503 ($P=0,009$). En los que sobreexpresaban la isoforma D se vio una menor expresión del miR-132 ($P=0,015$). No se observaron diferencias en la expresión de los miRNA atendiendo a la expresión de la isoforma B (Tabla 17).

Tabla 17. Expresión de los miRNA en función de la expresión de cada una de las isoformas principales de WT1

Características	WT1-A		P	WT1-B		P
	Baja	Alta		Baja	Alta	
Total						
miR-132			0,577			0,909
Mediana	1,7479	1,8542		1,5308	1,9116	
Rangos	0,008-9,476	0,007-28,29		0,012-10,473	0,007-28,29	
miR-223			0,808			0,624
Mediana	1,5538	1,9825		2,3131	1,8575	
Rangos	0,43-33,041	0,445-12,535		0,448-33,04	0,43-10,012	
miR-188			0,906			0,462
Mediana	0,9308	0,7967		0,9457	0,7875	
Rangos	0,251-9,854	0,118-7,712		0,118-7,712	0,251-9,854	
miR-193			0,236			0,883
Mediana	0,7657	1,0486		0,9433	0,9455	
Rangos	0,301-2,272	0,052-13,388		0,052-13,388	0,221-2,336	
miR-324			0,169			0,731
Mediana	0,5622	0,7179		0,7185	0,6012	
Rangos	0,159-1,967	0,079-9,794		0,160-9,794	0,079-3,152	
miR-424			0,047			0,545
Mediana	0,1603	0,3295		0,2029	0,2704	
Rangos	0,037-1,779	0,004-1,786		0,004-1,786	0,037-1,779	
miR-425			0,666			0,368
Mediana	0,6555	0,7979		0,804	0,7486	
Rangos	0,135-1,927	0,084-2,097		0,198-2,097	0,084-1,941	
miR-500			0,275			0,377
Mediana	0,2001	0,2467		0,2881	0,2228	
Rangos	0,047-0,866	0,032-4,186		0,074-4,186	0,032-0,894	
miR-503			0,080			0,185
Mediana	0,0926	0,2044		0,0957	0,1745	
Rangos	0,018-1,948	0,014-5,411		0,018-1,803	0,014-5,41	
miR-941			0,485			0,196
Mediana	0,6359	0,6635		0,9135	0,6204	
Rangos	0,146-2,594	0,139-20,199		0,198-20,199	0,139-2,114	
miR-1307			0,931			0,635
Mediana	0,4336	0,3975		0,4158	0,4099	
Rangos	0,139-3,52	0,061-6,998		0,097-6,998	0,061-3,529	
Características	WT1-C		P	WT1-D		P
	Baja	Alta		Baja	Alta	
Total						
miR-132			0,561			0,015
Mediana	1,9691	1,5737		3,0225	1,5099	

Rangos	0,008-28,29	0,007-10,473	0,029-28,29	0,007-9,476	
miR-223			0,515		0,052
Mediana	1,9825	1,6624	2,5127	1,5315	
Rangos	0,43-10,012	0,445-33,04	0,484-12,535	0,43-33,041	
miR-188			0,796		0,344
Mediana	0,8879	0,8467	0,9179	0,8241	
Rangos	0,251-9,854	0,118-7,712	0,251-7,712	0,118-9,854	
miR-193			0,556		0,297
Mediana	1,0449	0,8379	1,0515	0,8294	
Rangos	0,303-2,336	0,052-13,388	0,303-13,388	0,052-2,272	
miR-324			0,367		0,262
Mediana	0,7179	0,6269	0,6793	0,6500	
Rangos	0,159-3,152	0,079-9,794	0,319-9,794	0,079-1,967	
miR-424			0,255		0,180
Mediana	0,2797	0,2271	0,2704	0,2528	
Rangos	0,037-1,779	0,004-1,786	0,071-1,786	0,004-1,779	
miR-425			0,588		0,269
Mediana	0,802	0,6742	0,8068	0,7112	
Rangos	0,135-1,941	0,084-2,097	0,226-2,097	0,084-1,927	
miR-500			0,535		0,165
Mediana	0,2308	0,2467	0,2949	0,2051	
Rangos	0,047-0,894	0,032-4,186	0,047-4,186	0,032-1,467	
miR-503			0,009		0,230
Mediana	0,2524	0,0926	0,1680	0,1258	
Rangos	0,018-5,411	0,014-1,803	0,014-5,411	0,015-1,948	
miR-941			0,736		0,693
Mediana	0,6049	0,7381	0,6317	0,6898	
Rangos	0,146-2,114	0,139-20,199	0,214-20,199	0,139-2,594	
miR-1307			0,655		0,776
Mediana	0,4289	0,3739	0,3776	0,4339	
Rangos	0,139-3,529	0,061-6,998	0,159-6,998	0,061-3,52	

La distribución de las cuatro isoformas principales no varió de forma significativa en función de la expresión baja o alta de los distintos miRNA estudiados.

5.3.1.6 Asociación de la expresión de los distintos miRNA con la expresión global de WT1

Se observó una menor expresión de los *miR-132*, *miR-188* y *miR-1307* en los pacientes que sobreexpresaron *WT1* total ($P=0,040$; $P=0,005$ y $P=0,020$, respectivamente; Tabla 18).

Tabla 18. Expresión de los miRNA en función de la expresión de *WT1* total

	Expresión <i>WT1</i> total		<i>P</i>
	<P75	>P75	
miR-132			0,040
Mediana	2,3664	1,6329	
Rango	0,007-28,29	0,008-6,996	
miR-188			0,005
Mediana	0,9602	0,6636	
Rango	0,251-10,54	0,118-2,033	
miR-193			0,381
Mediana	1,0455	0,7937	
Rango	0,224-13,388	0,052-9,345	
miR-223			0,133
Mediana	2,5799	1,7188	
Rango	0,339-85,42	0,430-13,114	
miR-324			0,340
Mediana	0,7836	0,6943	
Rango	0,160-10,517	0,079-2,789	
miR-424			0,268
Mediana	0,3086	0,2425	
Rango	0,048-2325,98	0,004-1,665	
miR-425			0,074
Mediana	0,8248	0,5924	
Rango	0,084-4,698	0,134-3,701	
miR-500			0,273
Mediana	0,2467	0,2228	
Rango	0,032-4,186	0,055-1,467	
miR-503			0,443
Mediana	0,1848	0,1399	
Rango	0,014-2,466	0,006-5,411	
miR-941			0,117
Mediana	0,6869	0,5057	
Rango	0,139-20,20	0,146-3,116	
miR-1307			0,020
Mediana	0,4425	0,3349	
Rango	0,061-14,672	0,097-1,981	

5.4. Análisis de supervivencia en la serie global

5.4.1. Características clínico biológicas

La mediana de SG de la serie global fue de 10,95 meses (rangos 0,07 - 161,13 meses). La mediana de SLR fue de 23,3 meses (rangos 0,4 - 160) y la de SLE de 15,2 meses (rangos 0,4 - 160). Sesenta y cuatro pacientes permanecían vivos en el momento del análisis estadístico. La mediana de seguimiento de los pacientes vivos fue de 64,64 meses (Rangos 1,94 a 143,18 meses. Para determinar qué factores de riesgo fueron predictivos tanto para muerte como para recaída se realizó un análisis univariante de la serie con cada una de las variables recogidas en el momento del diagnóstico (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis univariante de la serie global

Características	SG (2 años)			SLR (2 años)			SLE (2 años)	
	N (%)	%	P	N (%)	%	P	%	P
Total	220			138				
Sexo	0,926			0,181			0,640	
Hombre	126 (57)	35		77 (56)	52		38	
Mujer	94 (43)	39		61 (44)	44		37	
Edad, años	<0,001			<0,001			<0,001	
≤60	121 (55)	49		90 (65)	60		50	
>60	99 (45)	21		48 (35)	20		13	
Subtipo FAB	0,566			0,601			0,254	
M0	17 (8)	47		13 (10)	51		46	
M1	55 (26)	36		37 (28)	50		40	
M2	45 (22)	35		26 (20)	63		42	
M4	47 (23)	34		30 (23)	37		30	
M5	28 (13)	36		14 (11)	39		29	
M6	10 (5)	20		6 (5)	33		17	
M7	2 (1)	50		2 (1)	33		50	
Bifenotípica	5 (2)	20		3 (2)	0		33	
Riesgo Citogenético	<0,001			0,841			0,064	
Bajo	20 (10)	56		18 (15)	52		43	
Intermedio	138 (72)	45		92 (74)	51		43	
Alto	35 (18)	11		14 (11)	49		21	
Cariotipo Normal	0,021			0,666			0,096	
Si	99 (51)	46		68 (55)	54		46	
No	94 (49)	34		56 (45)	47		34	
Hemoglobina, g/dL	0,991			0,736			0,997	
< 10	153 (70)	38		93 (67)	49		38	
≥ 10	67 (30)	33		45 (33)	47		36	

Características	SG (2 años)			SLR (2 años)			SLE (2 años)	
	N (%)	%	P	N (%)	%	P	%	P
Leucocitos, × 10⁹/L			0,262			0,360		0,674
< 20	114 (52)	42		74 (54)	55		39	
≥ 20	106 (48)	30		64 (46)	42		35	
Plaquetas, × 10⁹/L			0,165			0,441		0,946
< 100	167 (76)	33		104 (75)	52		38	
≥ 100	53 (24)	47		34 (25)	40		35	
FLT3-ITD			<0,001			0,007		0,013
negativo	152 (77)	46		99 (78)	55		44	
positivo	46 (23)	11		28 (22)	32		19	
NPM1			0,008			0,611		0,528
negativo	124 (66)	45		82 (67)	46		37	
positivo	65 (34)	24		40 (33)	50		39	
FLT3/NPM1 estatus			0,062			0,019		0,158
neg/ mut	23 (20)	44		16 (24)	83		63	
pos/neg	11 (10)	36		9 (14)	63		44	
neg/neg	65 (56)	42		33 (50)	47		36	
pos/mut	16 (14)	6		8 (12)	25		13	
CEBPA			0,225			0,029		0,103
negativo	86 (88)	33		43 (86)	51		44	
positivo	12 (12)	42		7 (14)	-		71	
FLT3-D835			0,551			0,236		0,101
Negativo	156 (96)	36		95 (96)	50		38	
Positivo	7 (4)	57		4 (4)	100		100	

5.4.2. Gen WT1

Para determinar el posible impacto pronóstico en la SG, SLE o SLR de: la expresión de *WT1* total, la presencia de mutaciones o el genotipo del SNP *rs16754*, la expresión de sus isoformas o la expresión de los miRNA, se realizó un análisis univariante con cada una de ellas.

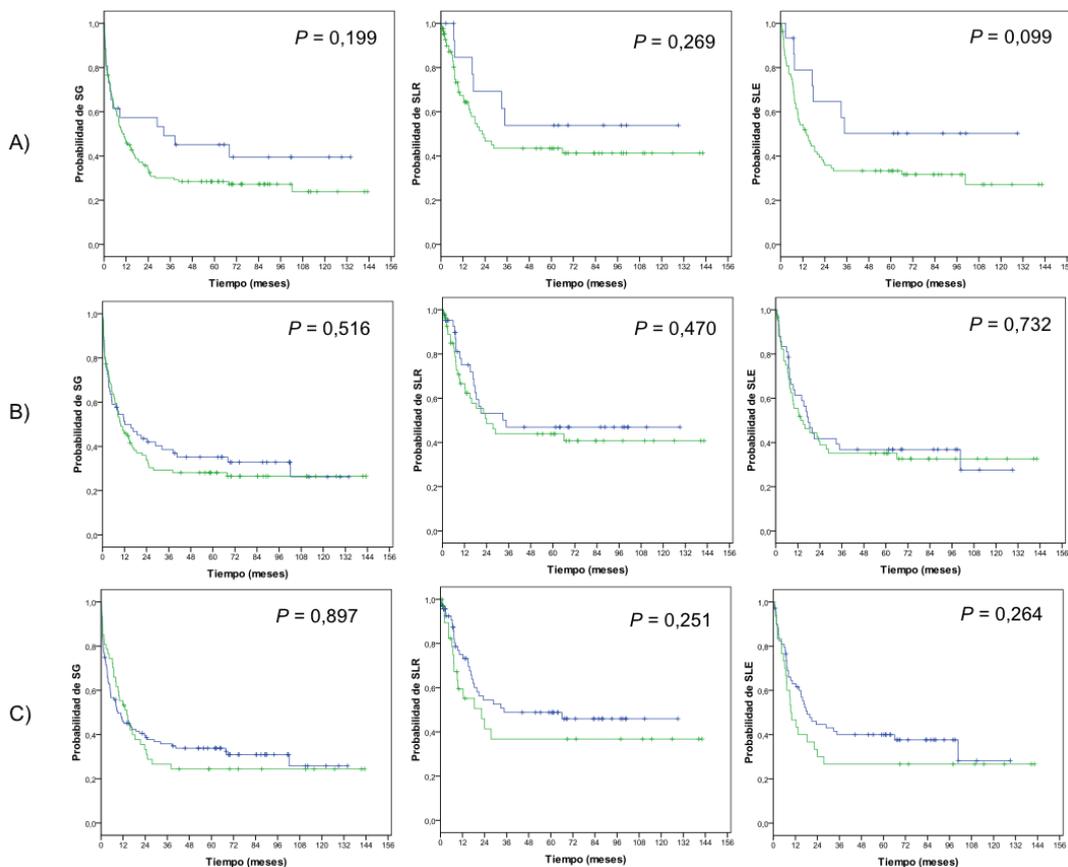
5.4.2.1 Expresión global de WT1

Se realizó el análisis de supervivencia de la expresión total de *WT1* tomando como puntos de corte los cuartiles (P25, P50 y P75) de la serie de pacientes. No se encontraron diferencias ni en SG ni en SLR ni en SLE para ninguno de los puntos de corte de expresión total de *WT1* (Tabla 20 y Figura 13).

Tabla 20. Análisis univariante para la expresión total de WT1 en distintos puntos de corte

Características	SG (2 años)			SLR (2 años)			SLE (2 años)	
	N (%)	%	P	N (%)	%	P	%	P
Expresión WT1_P25			0,199			0,269		0,099
<P25	26 (16)	57		15 (15)	69		65	
≥P25	137 (84)	34		84 (85)	47		36	
Expresión WT1_P50			0,516			0,470		0,732
<P50	66 (40)	44		42 (42)	53		42	
≥P50	97 (60)	34		57 (58)	49		39	
Expresión WT1_P75			0,897			0,251		0,264
<P75	116 (71)	40		69 (70)	54		45	
≥P75	47 (29)	33		30 (30)	41		30	

Figura 13. Curvas de SG, SLR y SLE en función de la expresión total de WT1 según los puntos de corte en A) P25; B) P50; y C) P75

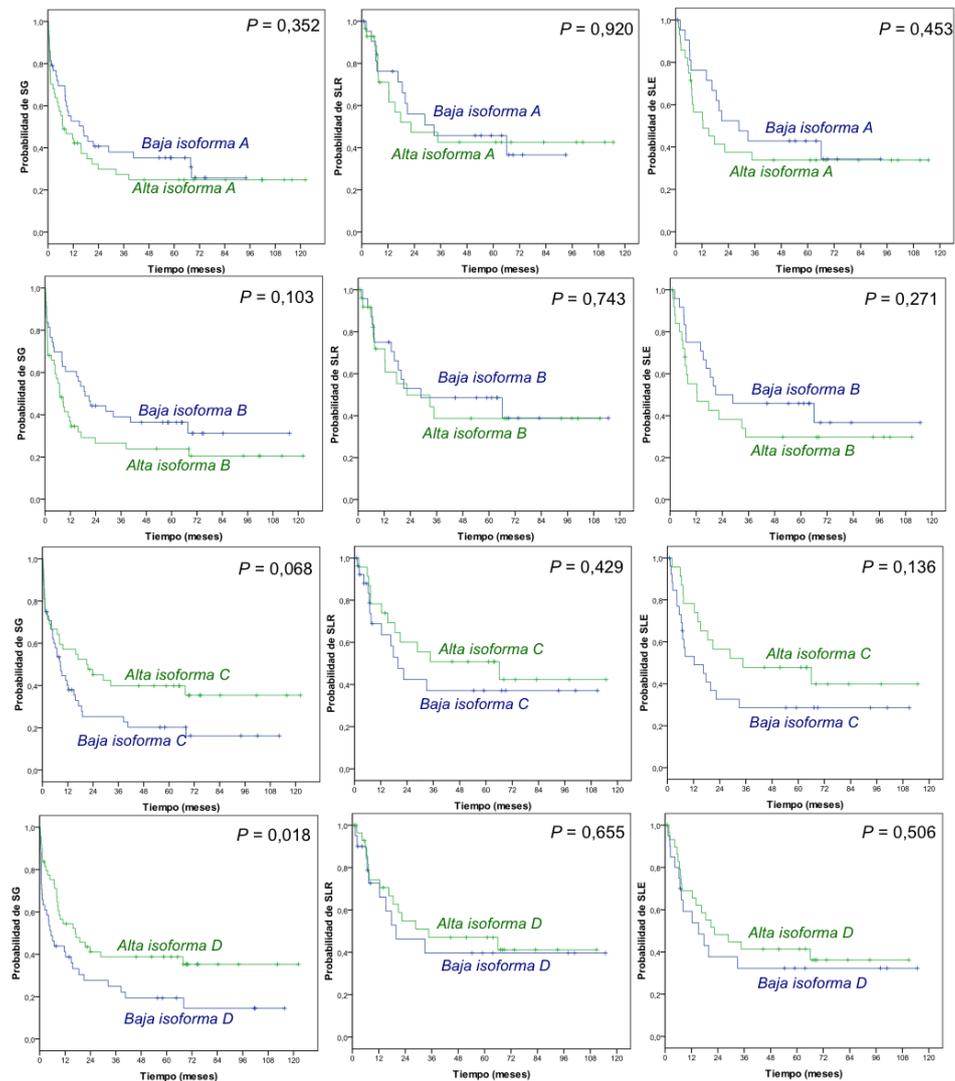


Azul = Infraexpresión de WT1, Verde = sobreexpresión de WT1.

5.4.2.2 Expresión de las isoformas de WT1

En el análisis de supervivencia de la expresión de cada isoforma se observó una mejor SG en los pacientes con sobreexpresión de la isoforma D por encima de la mediana de la serie (Figura 14).

Figura 14. Curvas de SV en la serie global en función de la expresión de la isoforma D



El análisis univariante completo de las isoformas de WT1 se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Análisis de supervivencia en la serie global en función de la expresión de las isoformas de WT1

Características	SG (2 años)			SLR (2 años)			SLE (2 años)	
	N (%)	%	P	N (%)	%	P	%	P
Isoforma A WT1			0,352			0,920		0,453
Baja	43 (48)	41		22 (44)	56		52	
Alta	47 (52)	30		28 (56)	47		38	
Isoforma B WT1			0,103			0,743		0,271
Baja	43 (48)	44		24 (48)	53		50	
Alta	47 (52)	27		26 (52)	50		38	
Isoforma C WT1			0,068			0,429		0,136
Baja	48 (53)	25		27 (54)	42		33	
Alta	42 (47)	45		23 (46)	60		57	
Isoforma D WT1			0,018			0,655		0,506
Baja	41 (46)	28		20 (40)	46		38	
Alta	49 (54)	41		30 (60)	55		48	

5.4.2.3 Mutaciones y SNP rs16754

Se realizó el análisis de supervivencia univariante de la serie global comparando el estatus mutacional y la presencia del SNP rs16754 (Tabla 22).

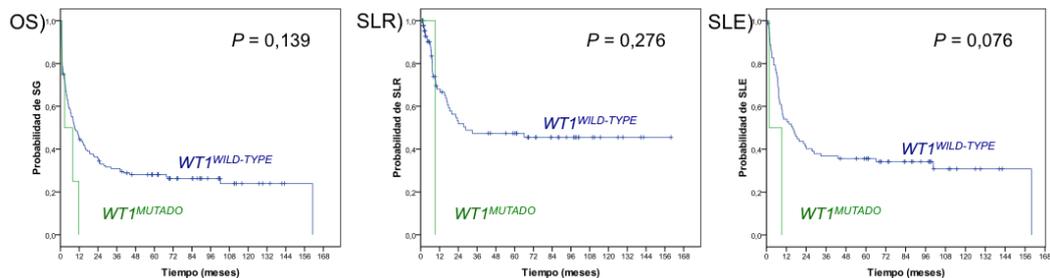
Tabla 22. Análisis de supervivencia en la serie global en función de las variaciones genéticas de WT1

Características	SG (2 años)			SLR (2 años)			SLE (2 años)	
	N (%)	%	P	N (%)	%	P	%	P
SNP rs16754			0,299			0,226		0,150
WT1 ^{AA}	115 (73)	37		64 (70)	58		46	
WT1 ^{AG}	42 (27)	31		27 (30)	37		26	
WT1			0,139			0,276		0,076
Wild-type	152 (97)	36		88 (98)	52		40	
mutado	4 (3)	0		2 (2)	0		0	

5.4.2.3.1 Mutaciones en el gen *WT1*

No se encontraron diferencias en la SG, SLE o SLR entre los pacientes portadores de una mutación en el gen *WT1* y los que no lo eran ($P = 0,139$; $P = 0,276$ y $P = 0,076$; respectivamente) en la serie global (Figura 15).

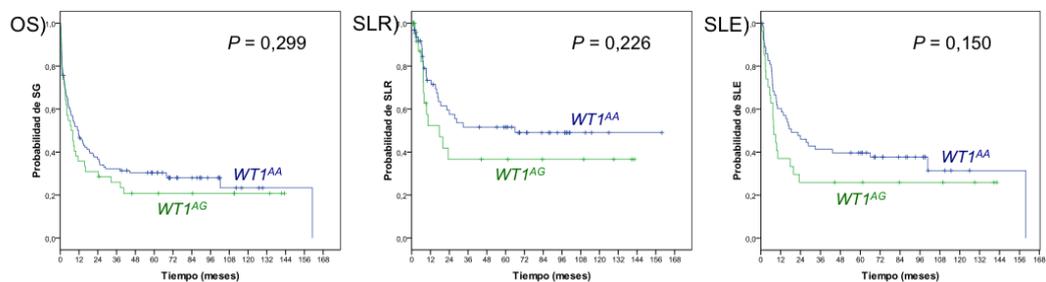
Figura 15. Curvas de SG, SLE y SLR en función de la presencia o no de mutaciones en el gen *WT1*



5.4.2.3.2 Polimorfismo *rs16754* del gen *WT1*

No se encontraron diferencias en la SG, SLE o SLR entre los genotipos *WT1*^{AA} y *WT1*^{AG} ($P=0,299$; $P=0,226$ y $P=0,150$; respectivamente) en la serie global (Figura 16).

Figura 16. Curvas de SG, SLR y SLE en función del genotipo del SNP *rs16754*



5.4.2.4 Expresión de miRNA de *WT1*

Se observó una mejor SLR y SLE en los pacientes que infraexpresaron los miR-223 y miR-425 frente a los que los

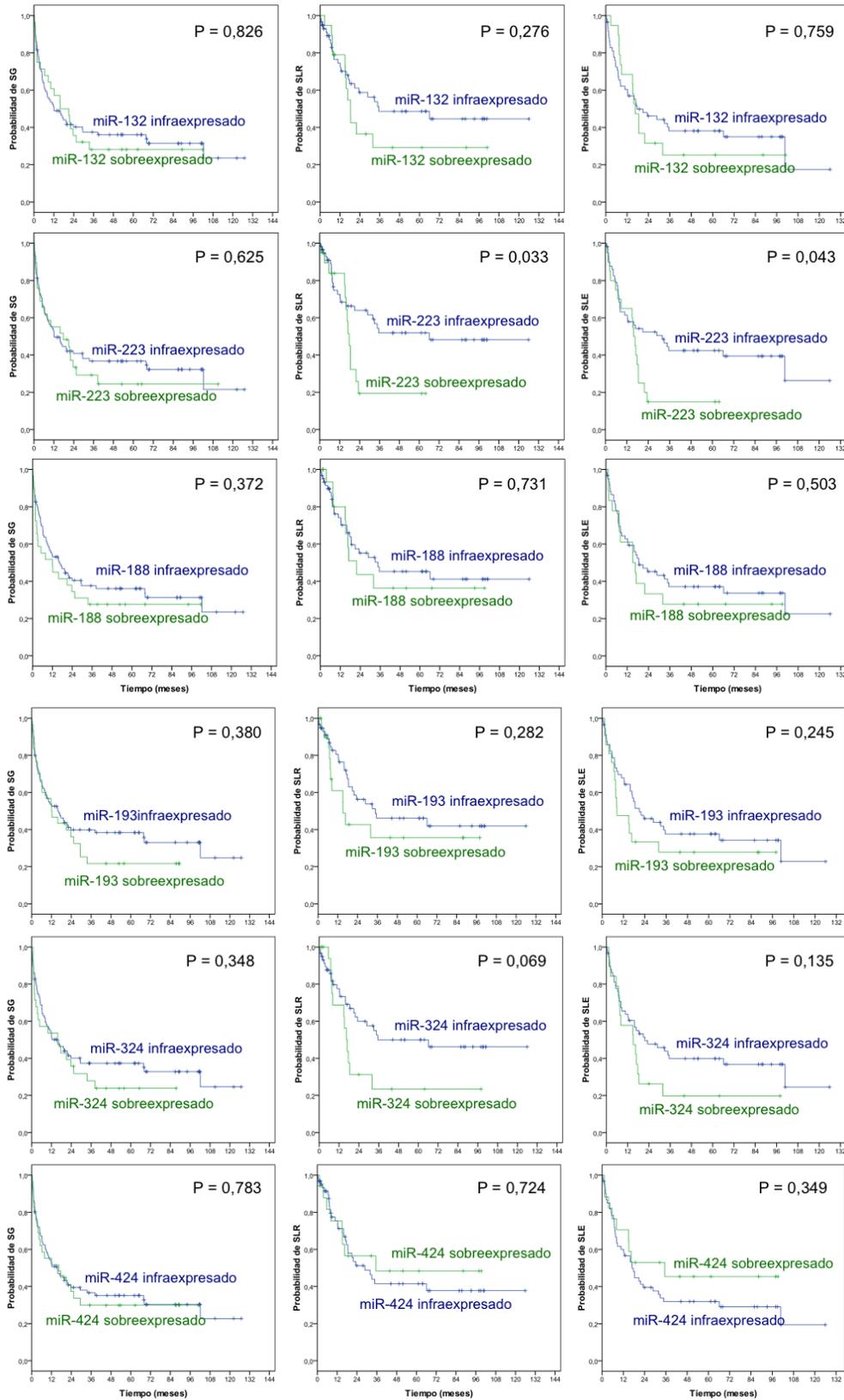
sobreexpresaban. También se observó una mejor SLR para los pacientes con infraexpresión de los miR-500 y miR-1307 (Tabla 23).

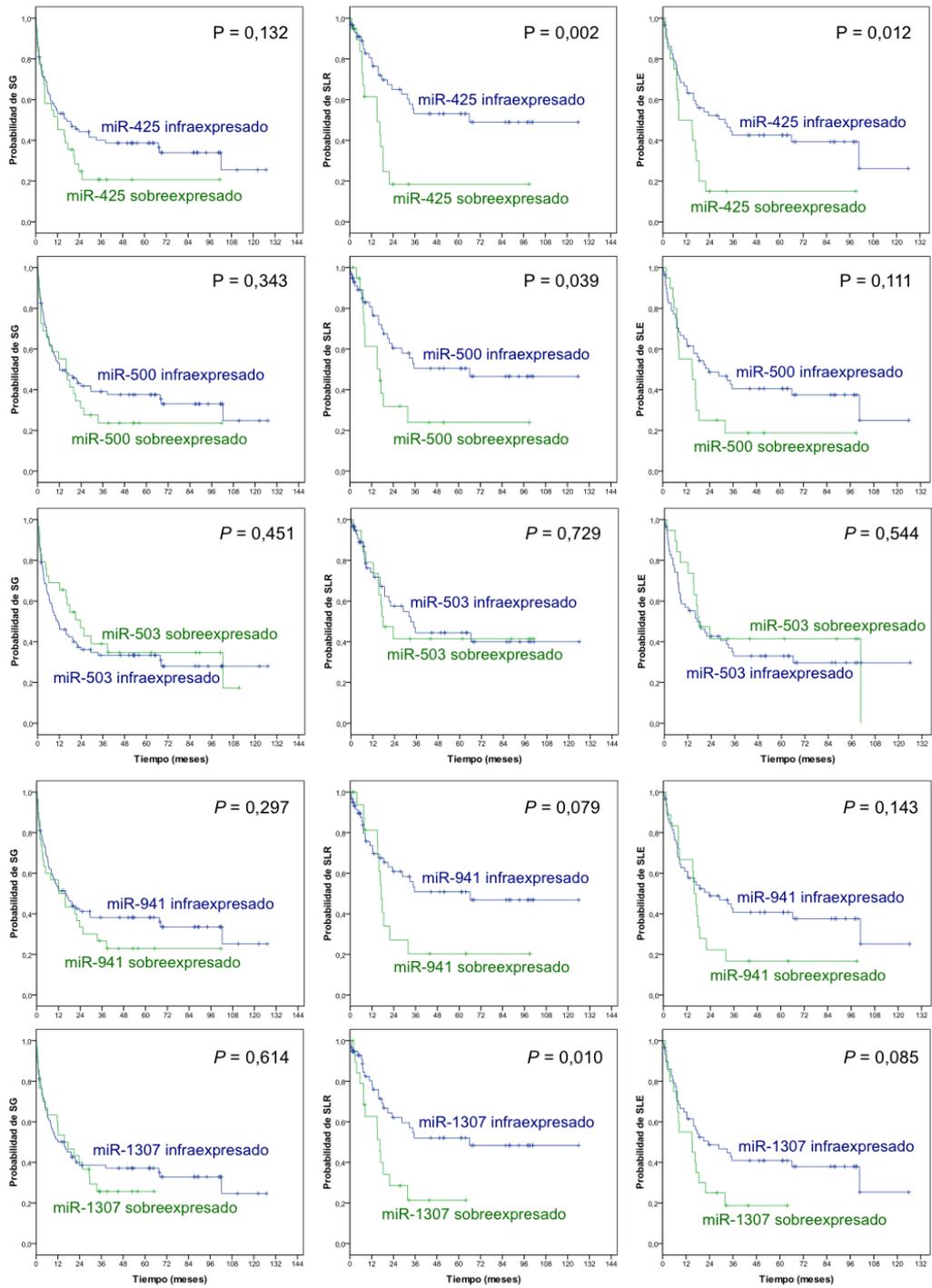
Tabla 23. Análisis univariante completo en función de la baja o alta expresión de los distintos miRNA estudiados

Características	SG (2 años)			SLR (2 años)			SLE (2 años)	
	N (%)	%	P	N (%)	%	P	%	P
miR-132			0,826			0,276		0,759
<P75	87 (76)	40		59 (77)	59		46	
≥P75	28 (24)	36		19 (23)	36		32	
miR-223			0,625			0,033		0,043
<P75	86 (75)	41		58 (74)	64		52	
≥P75	29 (25)	33		20 (26)	19		15	
miR-188			0,372			0,731		0,503
<P75	86 (75)	41		60 (77)	55		45	
≥P75	29 (25)	35		18 (23)	44		33	
miR-193			0,380			0,282		0,245
<P75	85 (74)	40		57 (73)	56		46	
≥P75	30 (26)	36		21 (27)	43		33	
miR-324			0,348			0,069		0,135
<P75	87 (76)	40		59 (76)	60		48	
≥P75	28 (24)	36		19 (24)	31		26	
miR-424			0,783			0,724		0,349
<P75	86 (75)	39		61 (78)	51		40	
≥P75	29 (25)	37		17 (22)	57		53	
miR-425			0,132			0,002		0,012
<P75	84 (73)	44		58 (74)	65		52	
≥P75	31 (27)	25		20 (26)	18		15	
miR-500			0,343			0,039		0,111
<P75	86 (75)	42		58 (74)	60		49	
≥P75	29 (25)	31		20 (26)	32		25	
miR-503			0,451			0,729		0,544
<P75	86 (75)	36		59 (76)	58		43	
≥P75	29 (25)	47		19 (24)	41		41	
miR-941			0,297			0,079		0,143
<P75	85 (74)	41		60 (77)	61		49	
≥P75	30 (26)	33		18 (23)	27		22	
miR-1307			0,614			0,010		0,085
<P75	85 (74)	39		58 (74)	62		49	
≥P75	30 (26)	40		20 (26)	29		25	

Las curvas de supervivencia para cada miRNA se muestran a continuación (Figura 17).

Figura 17. Curvas de SV de la serie global





5.4.3. Análisis mediante riesgos competitivos (Fine-Gray)

En el análisis univariante de incidencia acumulada de riesgo competitivo las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída en la serie global fueron: la edad mayor de 60 años, la presencia de FLT3-ITD, ausencia de mutaciones en el gen CEBPA y la sobreexpresión de los miR-425, miR-500 y miR-1307 (Tabla 24 y Figura 18).

Tabla 24. Análisis de Incidencia Acumulada de la serie global

INCIDENCIA ACUMULADA			
Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Total	138		
Sexo			0,076
Hombre	77 (56)	37	
Mujer	61 (44)	50	
Edad, años			0,030
≤60	90 (65)	35	
>60	48 (35)	58	
Expresión Isoforma A WT1			0,667
Baja	22 (44)	43	
Alta	28 (56)	44	
Expresión Isoforma B WT1			0,776
Baja	24 (48)	46	
Alta	26 (52)	42	
Expresión Isoforma C WT1			0,875
Baja	27 (54)	48	
Alta	23 (46)	39	
Expresión Isoforma D WT1			0,813
Baja	20 (40)	47	
Alta	30 (60)	41	
Subtipo FAB			0,346
M0	13 (10)	46	
M1	37 (28)	43	
M2	26 (20)	27	
M4	31 (23)	55	
M5	14 (11)	50	
M6	6 (5)	33	
M7	2 (2)	0	
Bifenotípica	3 (2)	67	
Grupo de Riesgo Citogenético			0,748
Bajo	18 (15)	40	
Intermedio	92 (74)	42	
Alto	14 (11)	36	
Nivel de hemoglobina, g/dL			0,585
< 10	93 (67)	41	
≥ 10	45 (32)	46	
Recuento leucocitos, × 10⁹/L			0,11
< 20	74 (56)	35	
≥ 20	64 (46)	52	

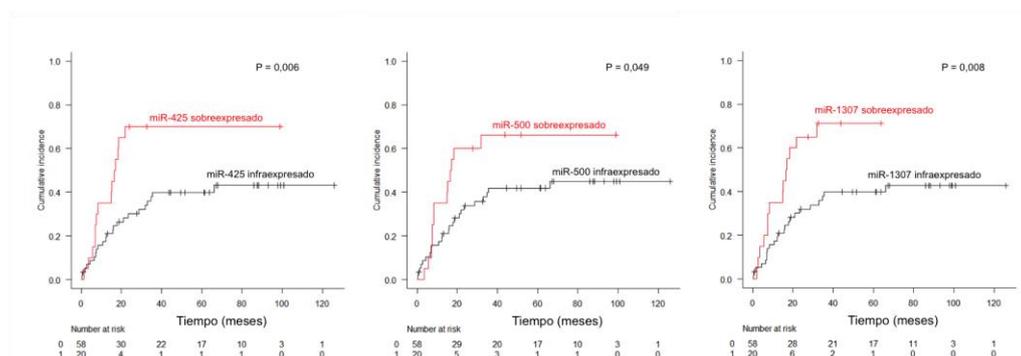
INCIDENCIA ACUMULADA

Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Recuento plaquetar, × 10⁹/L			0,264
< 100	104 (75)	40	
≥ 100	34 (25)	50	
FLT3			0,034
Wild-type	99 (78)	36	
ITD	28 (22)	59	
NPM1			0,861
Wild-type	82 (67)	45	
Mutado	40 (33)	41	
FLT3/NPM1 estatus			0,116
FLT3-ITD neg / NPM1 pos	9 (14)	33	
FLT3-ITD pos / NPM1 neg	16 (24)	13	
FLT3-ITD neg / NPM1 neg	33 (50)	39	
FLT3-ITD pos / NPM1 pos	8 (12)	75	
CEBPA			0,020
Normal	43 (86)	44	
Anormal	7 (14)	0	
Mutaciones WT1			0,584
Wild-type	88 (98)	39	
Mutado	2 (2)	NA	
Expresión total WT1			0,356
< P75	69 (70)	39	
>P75	30 (30)	47	
SNP rs 16754			0,560
WT1 AA	64 (70)	35	
WT1 AG	27 (30)	48	
miR-132 WT1			0,163
Infraexpresado	59 (76)	35	
Sobreexpresado	19 (24)	58	
miR-188 WT1			0,997
Infraexpresado	60 (77)	39	
Sobreexpresado	18 (23)	44	
miR-193 WT1			0,449
Infraexpresado	57 (73)	38	
Sobreexpresado	21 (27)	48	
miR-223 WT1			0,077
Infraexpresado	58 (74)	32	
Sobreexpresado	20 (26)	65	
miR-324 WT1			0,120
Infraexpresado	59 (76)	35	
Sobreexpresado	19 (24)	58	
miR-424 WT1			0,930
Infraexpresado	61 (78)	40	
Sobreexpresado	17 (22)	41	
miR-425 WT1			0,006
Infraexpresado	58 (74)	30	
Sobreexpresado	20 (26)	70	
miR-500 WT1			0,049
Infraexpresado	58 (74)	34	
Sobreexpresado	20 (26)	60	

INCIDENCIA ACUMULADA

Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
miR-503 WT1			0,273
Infraexpresado	59 (76)	35	
Sobreexpresado	19 (24)	59	
miR-941 WT1			0,122
Infraexpresado	60 (77)	34	
Sobreexpresado	18 (23)	61	
miR-1307 WT1			0,008
Infraexpresado	58 (74)	32	
Sobreexpresado	20 (26)	65	

Figura 18. Curvas de incidencia acumulada de los miR-425, miR-500 y miR-1307



5.4.4. Análisis mediante regresión de Cox (Multivariante)

En la Tabla 25 se resume el análisis multivariante de la supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de recaída.

Las variables que mantuvieron significado pronóstico en el análisis multivariante para la SG fueron: la edad, el grupo de riesgo citogenético, la presencia de cariotipo normal, las mutaciones *FLT3-ITD* y la expresión de la isoforma D.

Las variables que mantuvieron significado pronóstico en el análisis multivariante para la SLE fueron: la edad y la presencia de mutaciones en el gen *WT1*.

Las variables que mantuvieron significado pronóstico en el análisis multivariante para la SLR fueron: la edad y la presencia de la mutación *FLT3-ITD*.

Tabla 25. Análisis multivariante mediante regresión de Cox de la serie global

VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
Edad > 60 años	3,00 (1,67-5,39)	<i>P</i> < 0,001
Grupo de riesgo citogenético	1,93 (1,08-3,48)	<i>P</i> = 0,027
Cariotipo normal	0,47 (0,25-0,86)	<i>P</i> = 0,014
Sobreexpresión Isoforma D	0,45 (0,25-0,79)	<i>P</i> = 0,006
<i>FLT3-ITD</i>	2,27 (1,11-4,67)	<i>P</i> = 0,025
SLE		
Edad > 60 años	7,98 (2,4-26,55)	<i>P</i> < 0,001
Mutaciones <i>WT1</i>	12,42 (2,02-76,39)	<i>P</i> = 0,006
SLR		
Edad > 60 años	2,09 (1,25-3,49)	<i>P</i> = 0,005
<i>FLT3-ITD</i>	2,85 (1,65-4,91)	<i>P</i> < 0,001

No se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada.

5.5. Análisis de supervivencia por subgrupos

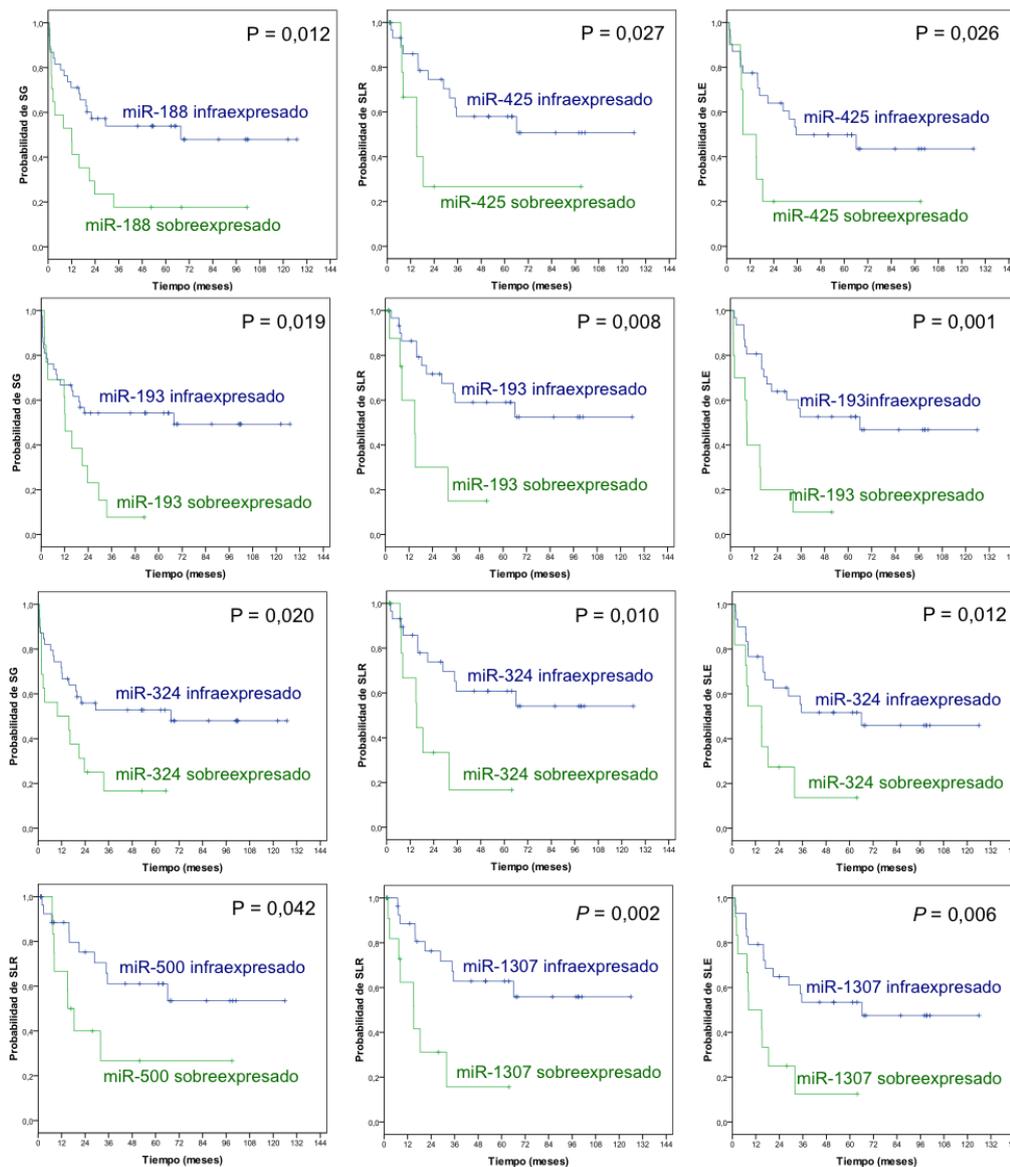
5.5.1. Subgrupo de Cariotipo Normal

En el subgrupo de pacientes con cariotipo normal se observó una mejor SG, SLR y SLE para los pacientes que infraexpresaban los miR-193 y miR-324. Además, se vio una mejor SG para la infraexpresión del miR-188 y una mejor SLR y SLE para la infraexpresión de los miR-425 y miR-1307, así como una mejor SLR para la infraexpresión del miR-500 (Tabla 26 y Figura 19).

Tabla 26. Análisis univariante en el subgrupo de CN

Características	SG (2 años)		SLR (2 años)		SLE (2 años)	
	%	P	%	P	%	P
miR-188		0,012				
<P75	57					
≥P75	24					
miR-193		0,019		0,008		0,001
<P75	54		72		64	
≥P75	23		30		20	
miR-324		0,020		0,010		0,012
<P75	56		74		63	
≥P75	25		33		27	
miR-425		0,079		0,027		0,026
<P75			75		64	
≥P75			27		20	
miR-500				0,042		
<P75			75			
≥P75			40			
miR-1307		0,061		0,002		0,006
<P75			76		65	
≥P75			31		25	

Figura 19. Curvas de SV en el subgrupo de CN

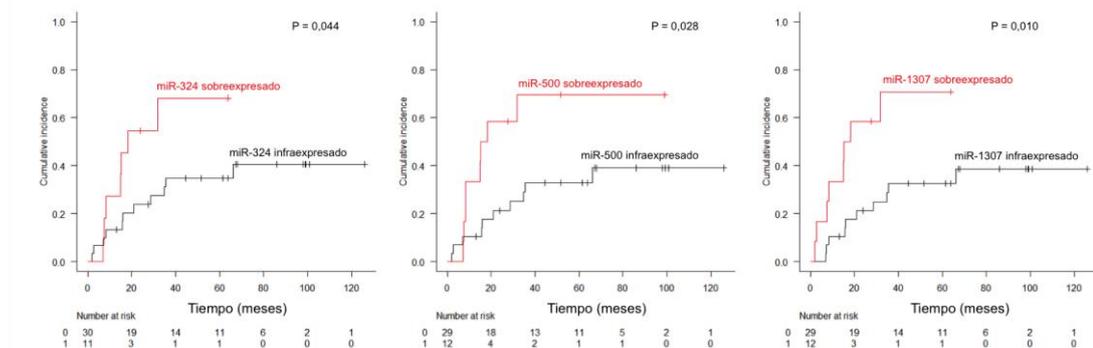


En el análisis de riesgos competitivos, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron la edad, la clasificación FAB, el estatus *NPM1/FLT3* y los miR-324, miR-500 y miR-1307 (Tabla 27 y Figura 20).

Tabla 27. Incidencia acumulada en el subgrupo de cariotipo normal para las variables significativas

INCIDENCIA ACUMULADA			
Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Edad, años			
≤60	45 (66)	27	<0,001
>60	23 (34)	73	
Subtipo FAB			
M0	9 (13)	56	0,002
M1	24 (36)	43	
M2	16 (24)	31	
M4	12 (18)	50	
M5	4 (6)	0	
M6	1 (1,5)	NA	
M7	0	-	
Bifenotípica	1 (1,5)	0	
FLT3/NPM1 estatus			
FLT3-ITD neg / NPM1 mut	6 (18)	17	0,007
FLT3-ITD pos / NPM1 wt	11 (33)	18	
FLT3-ITD neg / NPM1 wt	10 (31)	40	
FLT3-ITD pos / NPM1 mut	6 (18)	83	
miR-324 WT1			
Infraexpresado	30 (73)	24	0,044
Sobreexpresado	11 (27)	55	
miR-500 WT1			
Infraexpresado	29 (71)	21	0,028
Sobreexpresado	12 (29)	58	
miR-1307 WT1			
Infraexpresado	29 (71)	21	0,010
Sobreexpresado	12 (29)	58	

Figura 20. Curvas de CIR en el subgrupo de CN de los miR-324, miR-500 y miR-1307



Las variables que mantuvieron significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox fueron la edad y las mutaciones *FLT3-ITD* para la SG y SLE, y sólo la edad para la SLR (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis multivariante mediante regresión de Cox del subgrupo de cariotipo normal

VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
Edad > 60 años	4,08 (1,69-9,79)	<i>P</i> = 0,002
<i>FLT3-ITD</i>	2,74 (1,09-6,86)	<i>P</i> = 0,031
SLE		
Edad > 60 años	2,49 (1,24-5,01)	<i>P</i> = 0,011
<i>FLT3-ITD</i>	2,96 (1,46-5,97)	<i>P</i> = 0,003
SLR		
Edad > 60 años	3,03 (1,04-8,84)	<i>P</i> = 0,043

No se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada.

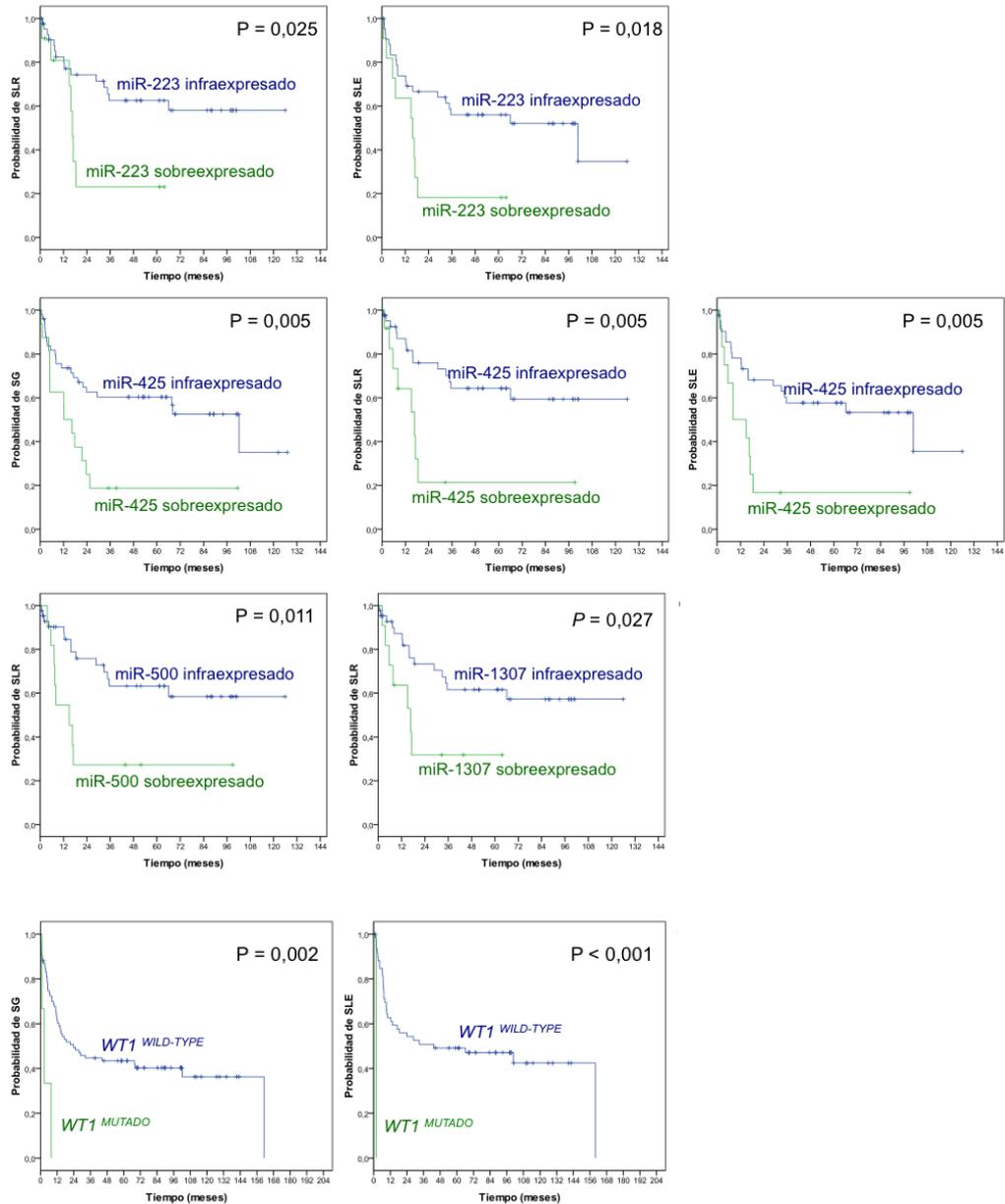
5.5.2. Subgrupo menor de 60 años

En el subgrupo de pacientes de 60 años o menos se observó una mejor SG, SLR y SLE para la infraexpresión del miR-425. También presentaron mejor SG y SLE los pacientes que no eran portadores de una mutación en el gen *WT1*. El miR-223 también demostró una mejor SLR y SLE cuando se encontraba infraexpresado, y hubo una mejor SLR para los pacientes que infraexpresaban los miR-500 y miR-1307 (Tabla 29 y Figura 21).

Tabla 29. Análisis univariante en el subgrupo de pacientes menores de 60 años

Características	SG (2 años)		SLR (2 años)		SLE (2 años)	
	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>
miR-223				0,025		0,018
<P75			74		67	
≥P75			23		18	
miR-425		0,005		0,005		0,005
<P75	63		76		68	
≥P75	25		21		17	
miR-500				0,011		
<P75			76			
≥P75			27			
miR-1307				0,027		
<P75			73			
≥P75			32			
Gen WT1		0,002				<0,001
Wild-type	50				54	
mutado	0				0	

Figura 21. Curvas de SV en el subgrupo de pacientes menores de 60 años

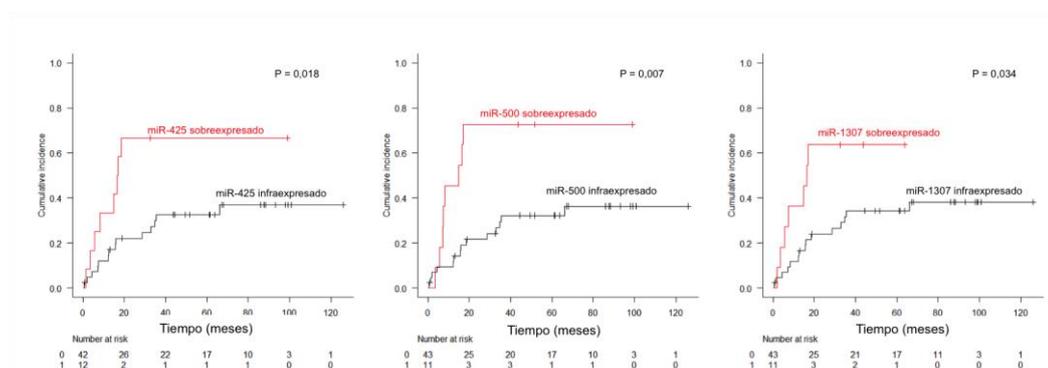


En el análisis de riesgos competitivos, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron la ausencia de mutaciones en el gen *CEBPA* y los miR-425, miR-500 y miR-1307 (Tabla 30 y Figura 22).

Tabla 30. CIR en el subgrupo de pacientes menores de 60 años

INCIDENCIA ACUMULADA			
Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
CEBPA			0,036
Normal	31 (82)	36	
Anormal	7 (18)	0	
miR-425 WT1			0,018
Infraexpresado	42 (78)	22	
Sobreexpresado	12 (22)	67	
miR-500 WT1			0,007
Infraexpresado	43 (80)	22	
Sobreexpresado	11 (20)	73	
miR-1307 WT1			0,034
Infraexpresado	43 (80)	24	
Sobreexpresado	11 (20)	64	

Figura 22. Curvas de CIR en el subgrupo de menores de 60 años de los miR-425, miR-500 y miR-1307



Las variables que mantuvieron significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox fueron el grupo de riesgo citogenético y las mutaciones de *FLT3-ITD* para la SG; la sobreexpresión del miR-425 y *FLT3-ITD* para la SLE y *FLT3-ITD* para la SLR (Tabla 31).

Tabla 31. Análisis multivariante en el subgrupo de pacientes menores de 60 años

VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
Grupo de riesgo citogenético	2,42 (1,31-4,49)	$P = 0,005$
<i>FLT3-ITD</i>	2,46 (1,30-4,65)	$P = 0,005$
SLE		
miR-425	5,75 (1,83-18,11)	$P = 0,003$
<i>FLT3-ITD</i>	24,17 (2,02-289,70)	$P = 0,012$
SLR		
<i>FLT3-ITD</i>	4,38 (1,70-11,26)	$P = 0,002$

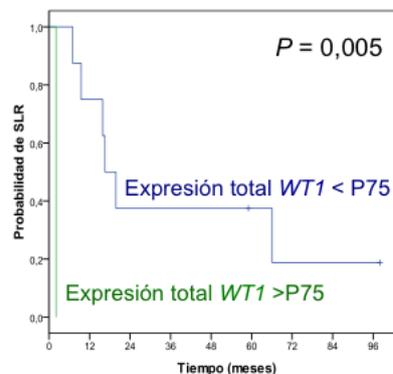
No se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada.

5.5.3. Subgrupos FAB

5.5.3.1 FAB M0

Se encontró una menor SLR y SLE (mediana 17 vs. 2 meses; SG a los 2 años 38 vs. 0%; $P=0,005$; Figura 23) en los pacientes que sobreexpresaban *WT1* total.

Figura 23. Curvas de SV en el subgrupo FAB M0

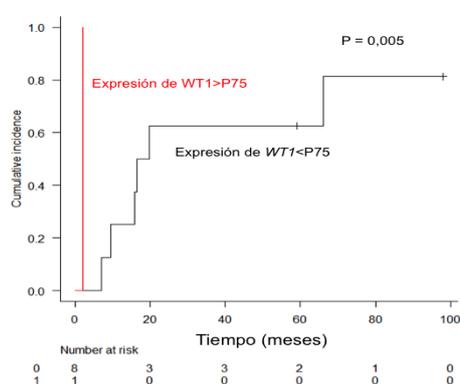


En el análisis de riesgo competitivo, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron la edad y la expresión de *WT1* total por encima del P75 (Tabla 32 y Figura 24).

Tabla 32. CIR en el subgrupo FAB M0

INCIDENCIA ACUMULADA			
Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Edad, años			0,022
≤60	7 (54)	14	
>60	6 (45)	NA	
Expresión total WT1			0,005
< P75	8 (89)	63	
>P75	1 (9)	NA	

Figura 24. Curva de CIR en el subgrupo FAB M0 para la expresión de WT1 total



Las variables que mantuvieron significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox fueron la edad y el grupo de riesgo citogenético para la SG y la edad para la SLR (Tabla 33).

Tabla 33. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M0

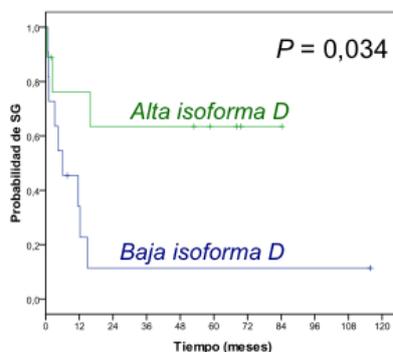
VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
Edad > 60 años	21,06 (2,41-183,7)	P = 0,006
Grupo de riesgo citogenético	24,91 (2,03-306,48)	P = 0,012
SLR		
Edad > 60 años	6,19 (1,15-33,23)	P = 0,034

La sobreexpresión de *WT1* mantuvo significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada: HR de 8,28 con un IC 95% de 1,16 a 58,92 ($P = 0,035$).

5.5.3.2 FAB M1

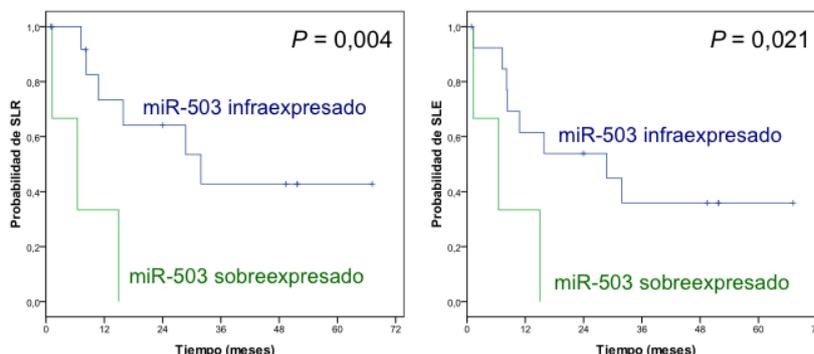
Se observó una mayor SG para los pacientes con expresión de la isoforma D de *WT1* por encima de la mediana de la serie (mediana 6 vs. NA meses; SG a los 2 años 11 vs. 64%; $P=0,034$; Figura 25).

Figura 25. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la expresión de la isoforma D



Además, se observó mejor SLR (mediana 32 vs. 7 meses; SLR a los 2 años 64 vs. 0%; $P=0,004$) y SLE (mediana 29 vs. 7 meses; SLE a los 2 años 54 vs. 0%; $P=0,021$) para los pacientes con infraexpresión del miR-503 (Figura 26).

Figura 26. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la expresión del miR-503

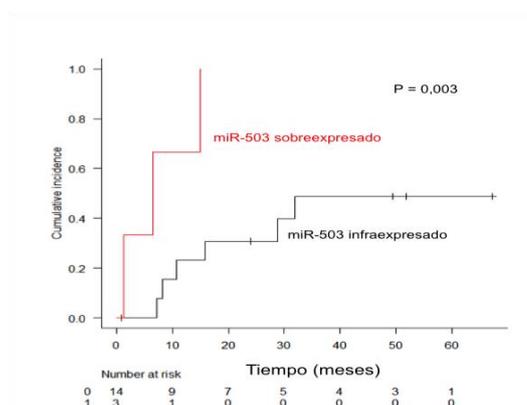


En el análisis de riesgo competitivo, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron el grupo de riesgo citogenético y el miR-503 (Tabla 34 y Figura 27).

Tabla 34. CIR en el subgrupo FAB M1

INCIDENCIA ACUMULADA			
Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Grupo de Riesgo Citogenético			0,020
Bajo	2 (6)	NA	
Intermedio	28 (85)	37	
Alto	3 (9)	NA	
miR-503 WT1			0,003
Infraexpresado	14 (82)	31	
Sobreexpresado	3 (8)	NA	

Figura 27. Curva de CIR en el subgrupo FAB M1 para la expresión del miR-503



Las variables que mantuvieron significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox fueron *FLT3-ITD* para SG y el miR-503 para SLR (Tabla 35).

Tabla 35. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M1

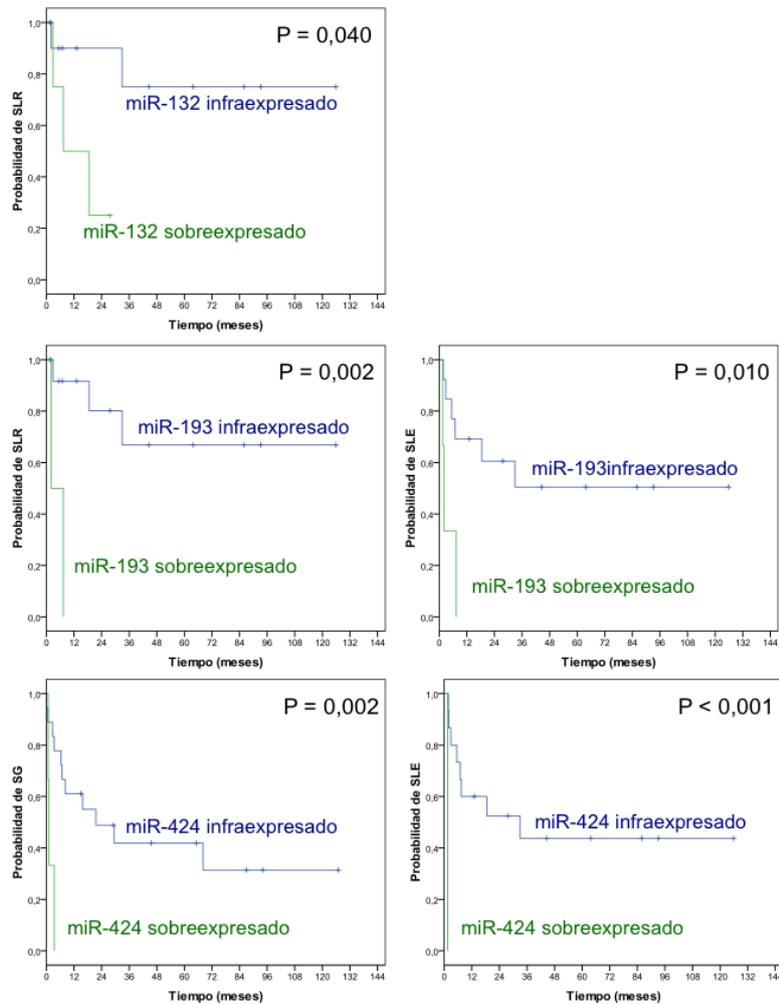
VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
<i>FLT3-ITD</i>	2,35 (1,13-4,87)	<i>P</i> = 0,022
SLR		
<i>miR-503</i>	11,02 (1,80-67,36)	<i>P</i> = 0,009

La sobreexpresión del miR-503 mantuvo significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada: HR de 18,68 con un IC 95% de 3,73 a 93,62 ($P < 0,001$).

5.5.3.3 FAB M2

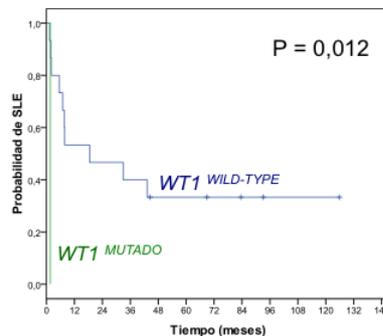
Se observó una mejor SG (mediana 22 vs. 1 mes; SG a los 2 años 49 vs. 0%; $P=0,006$) y SLE (mediana 33 vs. 1 mes; SLE a los 2 años 53 vs. 0%; $P<0,001$) para los pacientes con infraexpresión del miR-424. Además, se observó una mejor SLR (mediana NA vs. 2 meses; SLR a los 2 años 80 vs. 0%; $P=0,002$) y SLE (mediana NA vs. 2 meses; SLE a los 2 años 61 vs. 0%; $P=0,010$) para los pacientes con infraexpresión del miR-193; y una mejor SLR para los pacientes con infraexpresión del miR-132 (mediana NA vs. 7 meses; SLR a los 2 años 90 vs. 25%; $P=0,040$).

Figura 28. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la expresión de los miRNA



También se vio una mejor SLE (mediana 19 vs. 2 meses; SLE a los 2 años 47 vs. 0%; $P=0,012$) para los pacientes sin mutación en el gen *WT1*.

Figura 29. Curvas de SV en el subgrupo FAB M2 según la presencia de mutaciones en *WT1*

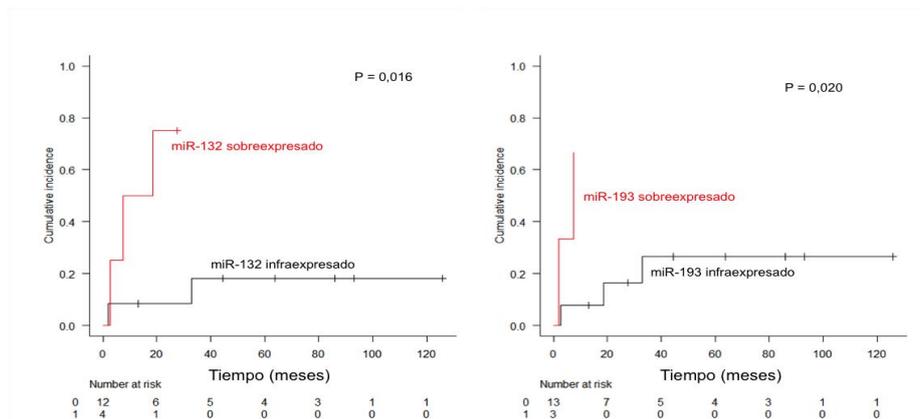


En el análisis de riesgo competitivo, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron la presencia de *FLT3-ITD*, el status mutacional *NPM1/FLT3* y los miR-132 y miR-193 (Tabla 36 y Figura 30).

Tabla 36. CIR en el subgrupo FAB M2

Características	N (%)	INCIDENCIA ACUMULADA	
		CIR a los 2 años (%)	P
<i>FLT3</i>			0,041
Wild-type	19 (76)	16	
ITD	6 (24)	NA	
<i>FLT3/NPM1 estatus</i>			0,025
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> mut	2 (17)	NA	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> wt	3 (25)	0	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> wt	6 (50)	0	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> mut	1 (8)	NA	
<i>miR-132 WT1</i>			0,016
Infraexpresado	12 (75)	8	
Sobreexpresado	4 (25)	75	
<i>miR-193 WT1</i>			0,020
Infraexpresado	13 (81)	16	
Sobreexpresado	3 (19)	NA	

Figura 30. Curva de CIR en el subgrupo FAB M2 para los miR-132 y miR-193



Las variables que mantuvieron significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox para la SG fueron la edad, las mutaciones de *FLT3-ITD* y el cariotipo normal (Tabla 37).

Tabla 37. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M2

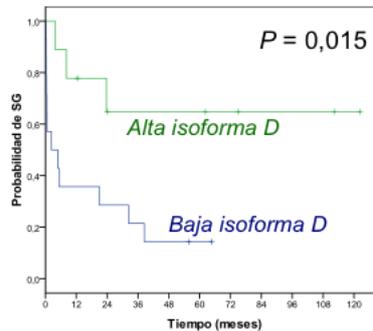
VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
Edad > 60 años	3,12 (1,29-7,58)	<i>P</i> = 0,012
<i>FLT3-ITD</i>	3,55 (1,30-9,71)	<i>P</i> = 0,013
Cariotipo normal	0,29 (0,13-0,69)	<i>P</i> = 0,005

No se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada.

5.5.3.4 FAB M4

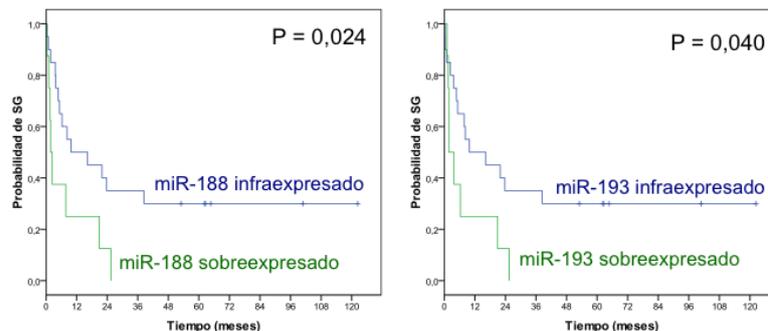
Se observó una mayor SG para los pacientes con expresión de la isoforma D de *WT1* por encima de la mediana de la serie (mediana 2 vs. NA meses; SG a los 2 años 29 vs. 65%; *P*=0,015).

Figura 31. Curvas de SV en el subgrupo FAB M4 según la expresión de la isoforma D



Además se observó una mejor SG para los pacientes con infraexpresión del miR-188 (mediana 10 vs. 2 meses; SG a los 2 años 35 vs. 13%; $P=0,024$) y del miR-193 (mediana 10 vs. 2 meses; SG a los 2 años 35 vs. 13%; $P=0,040$).

Figura 32. Curvas de SV en el subgrupo FAB M4 según la expresión de los miRNA



Las variables que mantuvieron significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox fueron la edad para SG y el riesgo citogenético y la edad para la SLE (Tabla 38).

Tabla 38. Análisis multivariante en el subgrupo FAB M4

VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
Edad > 60 años	5,64 (1,56-20,41)	P = 0,008
SLE		
Edad > 60 años	3,01 (1,48-6,13)	P = 0,002
Grupo de riesgo citogenético	2,05 (1,02-4,09)	P = 0,043

No se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis univariante ni multivariante de incidencia acumulada.

5.5.3.5 FAB M5

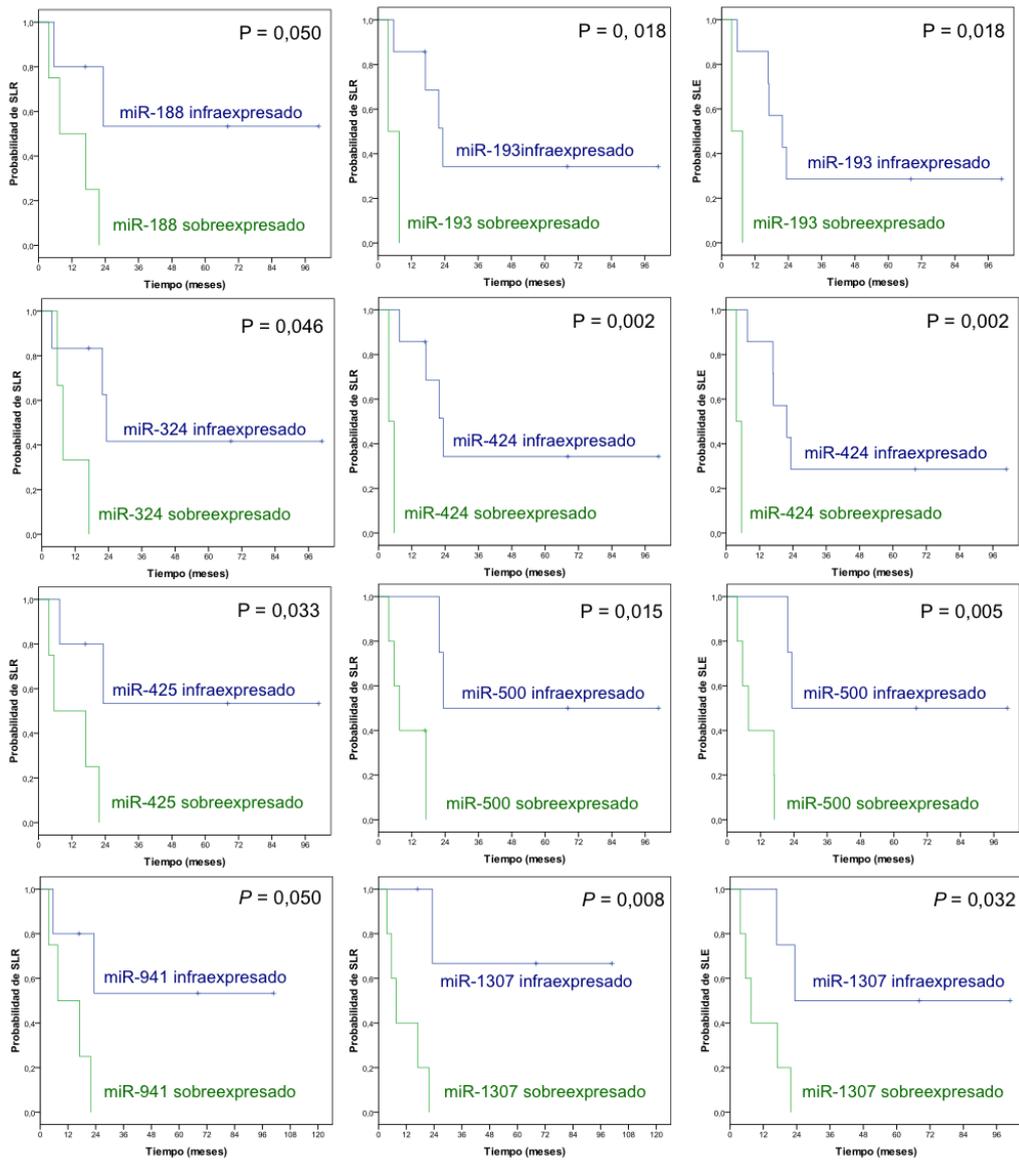
Se encontró una mejor SLR y SLE para la infraexpresión de los miR-193, miR-424, miR-500 y miR-1307; y una mejor SLR en los pacientes que infraexpresaban los miR-188, miR-324, miR-425 y miR-941 (Tabla 39 y Figura 33).

Tabla 39. Análisis univariante en el subgrupo FAB M5

Características	SG (2 años)		SLR (2 años)		SLE (2 años)	
	%	P	%	P	%	P
miR-188				0,050		
<P75			53			
≥P75			0			
miR-193				0,018		0,018
<P75			34		29	
≥P75			0		0	
miR-324				0,046		
<P75			42			
≥P75			0			
miR-424				0,002		0,002
<P75			34		29	
≥P75			0		0	
miR-425				0,033		
<P75			53			
≥P75			0			

miR-500	0,015	0,005
<P75	50	50
≥P75	0	0
miR-941	0,050	
<P75	53	
≥P75	0	
miR-1307	0,008	0,032
<P75	67	50
≥P75	0	0

Figura 33. Curvas de SV en el subgrupo FAB M5

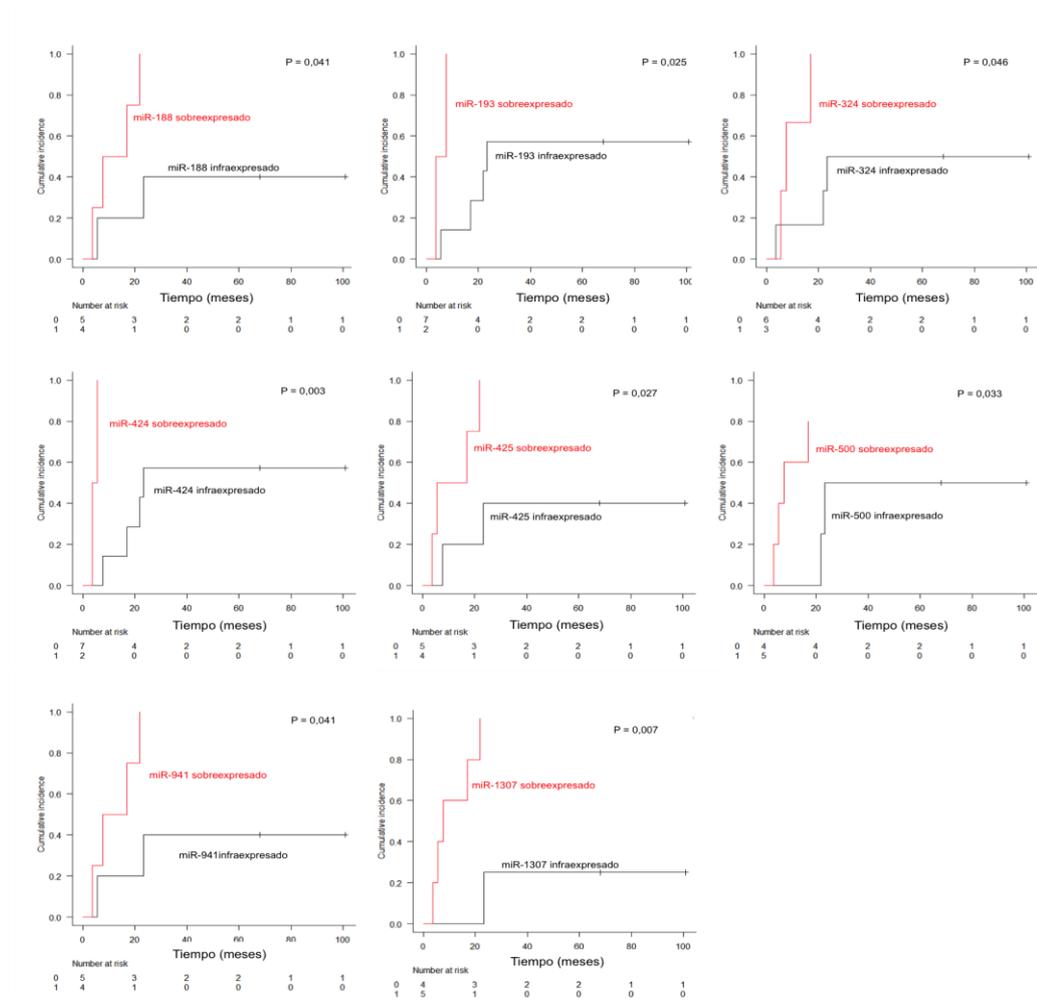


En el análisis de riesgos competitivos, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron los miR-188, miR-193, miR-324, miR-424, miR-425, miR-500, miR-941 y miR-1307 (Tabla 40 y Figura 34).

Tabla 40. CIR en el subgrupo FAB M5

Características	INCIDENCIA ACUMULADA		
	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
<i>miR-188 WT1</i>			0,041
Infraexpresado	5 (56)	40	
Sobreexpresado	4 (45)	NA	
<i>miR-193 WT1</i>			0,025
Infraexpresado	7 (78)	57	
Sobreexpresado	2 (22)	NA	
<i>miR-324 WT1</i>			0,046
Infraexpresado	6 (67)	50	
Sobreexpresado	3 (33)	NA	
<i>miR-424 WT1</i>			0,004
Infraexpresado	7 (78)	57	
Sobreexpresado	2 (22)	NA	
<i>miR-425 WT1</i>			0,027
Infraexpresado	5 (56)	40	
Sobreexpresado	4 (45)	NA	
<i>miR-500 WT1</i>			0,033
Infraexpresado	4 (45)	50	
Sobreexpresado	5 (56)	NA	
<i>miR-941 WT1</i>			0,041
Infraexpresado	5 (56)	40	
Sobreexpresado	4 (45)	NA	
<i>miR-1307 WT1</i>			0,007
Infraexpresado	4 (45)	25	
Sobreexpresado	5 (56)	NA	

Figura 34. Curvas de CIR en el subgrupo FAB M5 para los miR-188, miR-193, miR-324, miR-424, miR-425, miR-500, miR-941 y miR-1307



Ninguna de las variable mantuvo significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox.

Tampoco se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada.

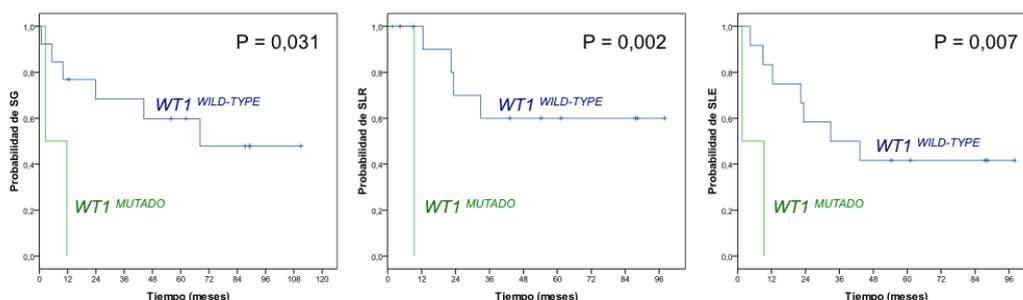
5.5.4. Riesgo citogenético

5.5.4.1 Riesgo citogenético favorable

Se observó una mejor SG (mediana 68 vs. 3 meses; SG a los 2 años 68 vs. 0%; $P=0,031$); SLR (mediana NA vs. 9 meses; SLR a los 2

años 70 vs. 0%; $P=0,002$) y SLE (mediana 33 vs. 2 meses; SLE a los 2 años 58 vs. 0%; $P=0,007$) para los pacientes sin mutación en el gen *WT1* (*wild-type*) frente a los portadores de alguna mutación en *WT1* (Figura 35).

Figura 35. Curvas de SV en el subgrupo de citogenética favorable

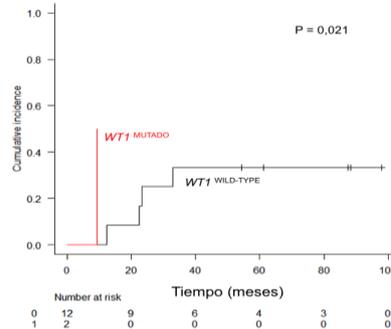


En el análisis de riesgo competitivo, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron la edad y la presencia de mutaciones en el gen *WT1* (Tabla 41 y Figura 36).

Tabla 41. CIR en el subgrupo de citogenética favorable

Características	INCIDENCIA ACUMULADA		
	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Edad, años			0,006
≤60	14 (78)	21	
>60	4 (22)	NA	
Mutaciones <i>WT1</i>			0,021
Wild-type	12 (86)	25	
Mutado	2 (14)	NA	

Figura 36. Curva de CIR en el subgrupo de citogenética favorable para la presencia de mutaciones en el gen *WT1*



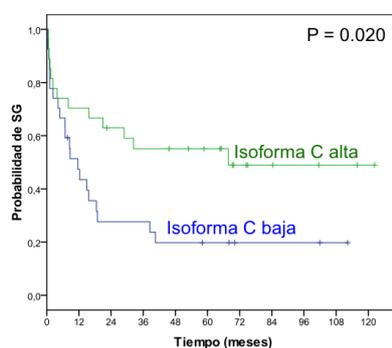
La única variable que mantuvo significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox para la SLR fue la edad (HR de 12,43 con un IC 95% de 1,26 a 123,01; $P = 0,031$).

La edad mayor de 60 años mantuvo significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada: HR de 7,95 con un IC 95% de 1,32 a 47,93 ($P = 0,024$).

5.5.4.2 Riesgo citogenético intermedio

Se observó una mejor SG (mediana 12 vs. 68 meses; SG a los 2 años 28 vs. 63%; $P=0,020$) para los pacientes con expresión de la isoforma C de *WT1* por encima de la mediana de la serie (Figura 37). También se observó una mejor SG en los pacientes con la isoforma D por encima de la mediana de la serie, aunque no alcanzó significación estadística ($P=0,063$).

Figura 37. SG para la isoforma C en el grupo de riesgo citogenético intermedio

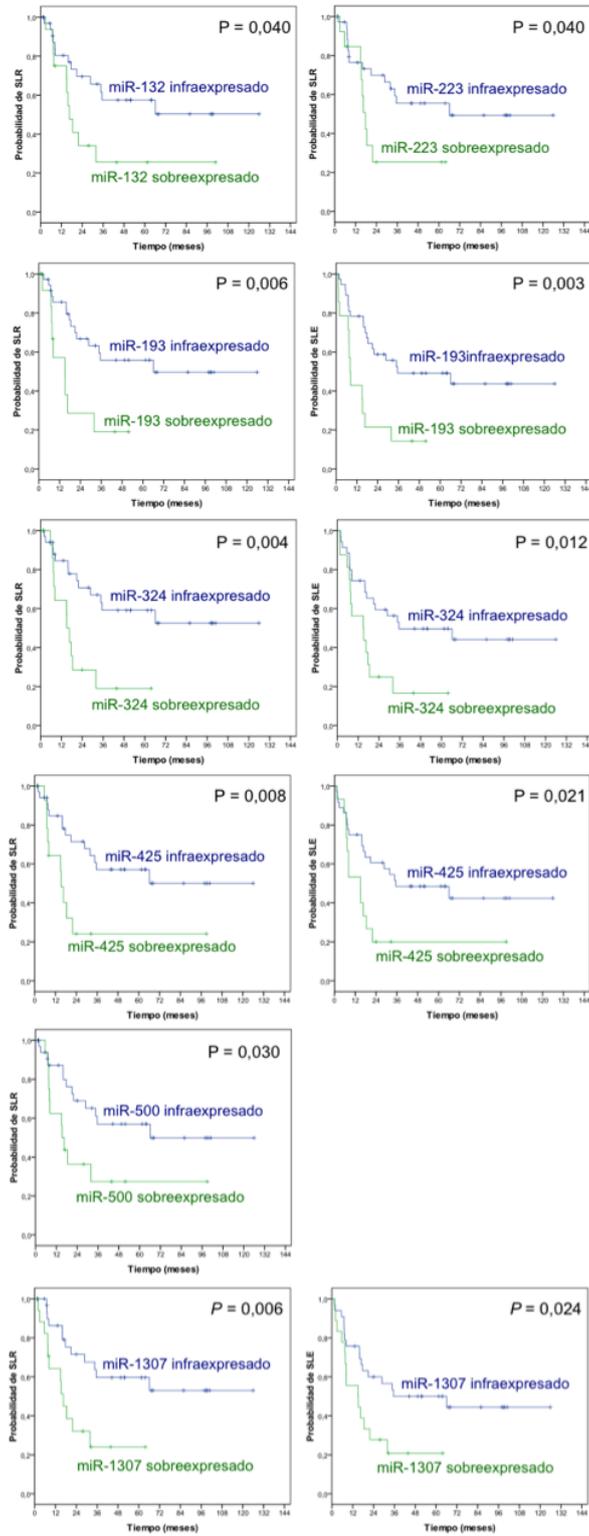


Además, se vio una mejor SLR y SLE para la infraexpresión de los miR-193, miR-324, miR-425 y miR-1307; y una mejor SLR para los miR-132, miR-223 y miR-500 (Tabla 42 y Figura 38).

Tabla 42. Análisis univariante en el grupo de riesgo citogenético intermedio

Características	SG (2 años)		SLR (2 años)		SLE (2 años)	
	%	P	%	P	%	P
miR-132				0,040		
<P75			70			
≥P75			34			
miR-223				0,040		0,063
<P75			70			
≥P75			25			
miR-193		0,052		0,006		0,003
<P75	50		67		59	
≥P75	30		29		21	
miR-324		0,056		0,004		0,012
<P75	50		71		59	
≥P75	33		29		25	
miR-425				0,008		0,021
<P75			71		61	
≥P75			24		20	
miR-500				0,030		
<P75			69			
≥P75			37			
miR-1307				0,006		0,024
<P75			72		60	
≥P75			32		28	

Figura 38. Curvas de supervivencia en el grupo de riesgo citogenético intermedio

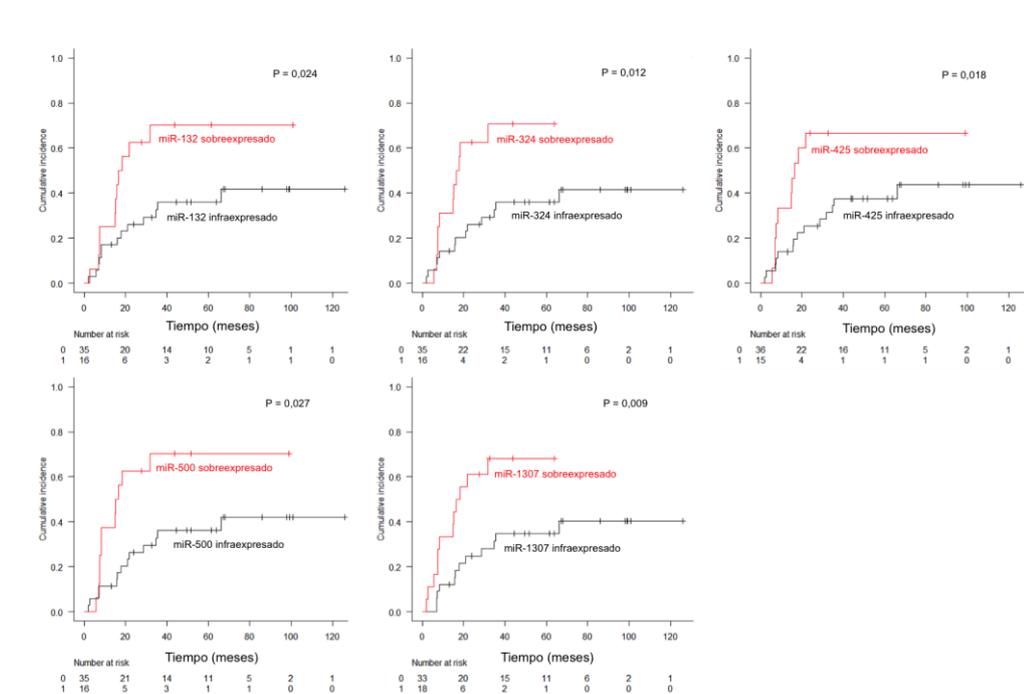


En el análisis de riesgo competitivo, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron la edad, el status *NPM1/FLT3*, la ausencia de mutaciones en el gen *CEBPA* y los miR-132, miR-324, miR-425, miR-500 y miR-1307 (Tabla 43 y Figura 39).

Tabla 43. CIR en el grupo de riesgo citogenético intermedio

INCIDENCIA ACUMULADA			
Características	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Edad, años			0,011
≤60	60 (65)	32	
>60	32 (35)	62	
FLT3/NPM1 estatus			0,023
FLT3-ITD neg / NPM1 pos	9 (22)	33	
FLT3-ITD pos / NPM1 neg	11 (26)	18	
FLT3-ITD neg / NPM1 neg	16 (38)	38	
FLT3-ITD pos / NPM1 pos	6 (14)	83	
CEBPA			0,032
Normal	32 (82)	38	
Anormal	7 (18)	0	
miR-132 WT1			0,024
Infraexpresado	35 (69)	26	
Sobreexpresado	16 (31)	63	
miR-324 WT1			0,012
Infraexpresado	35 (69)	26	
Sobreexpresado	16 (31)	63	
miR-425 WT1			0,018
Infraexpresado	36 (71)	25	
Sobreexpresado	15 (29)	67	
miR-500 WT1			0,016
Infraexpresado	35 (69)	26	
Sobreexpresado	16 (31)	63	
miR-1307 WT1			0,009
Infraexpresado	33 (65)	25	
Sobreexpresado	18 (35)	61	

Figura 39. Curvas de CIR en el subgrupo de riesgo citogenético intermedio para los miR132, miR-324, miR-425, miR-500 y miR-1307



Las variables que mantuvieron significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox fueron la edad y *FLT3-ITD* para la SG y la SLR y la edad para la SLE (Tabla 44).

Tabla 44. Análisis multivariante en el grupo de riesgo citogenético intermedio

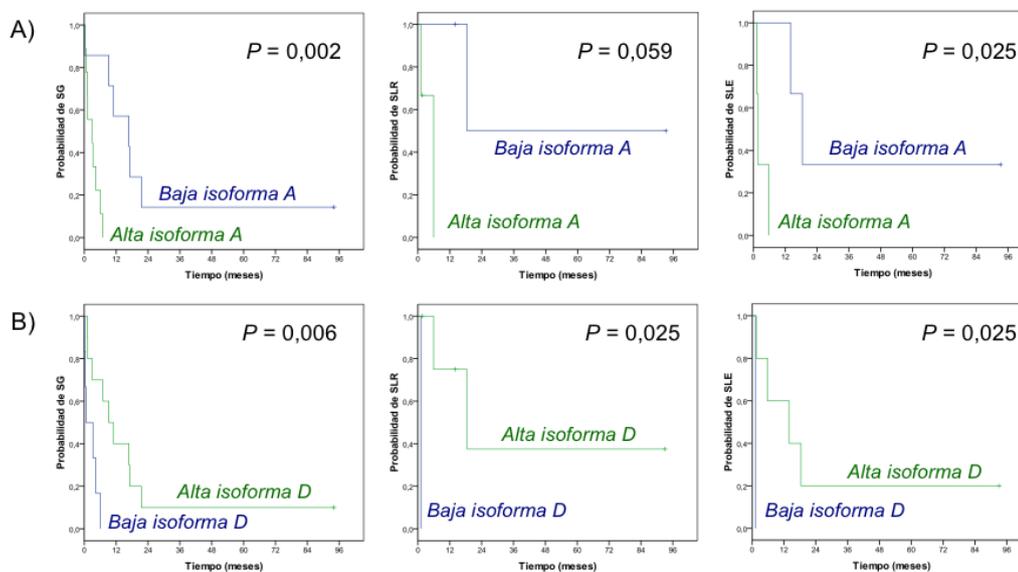
VARIABLE	HR (IC 95%)	P
SG		
Edad > 60 años	3,33 (1,64-6,79)	<i>P</i> < 0,001
<i>FLT3-ITD</i>	2,20 (1,04-4,66)	<i>P</i> = 0,039
SLE		
Edad > 60 años	4,41 (1,70-11,40)	<i>P</i> = 0,002
SLR		
Edad > 60 años	3,42 (1,23-9,51)	<i>P</i> = 0,019
<i>FLT3-ITD</i>	3,36 (1,23-9,18)	<i>P</i> = 0,018

No se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada.

5.5.4.3 Riesgo citogenético adverso

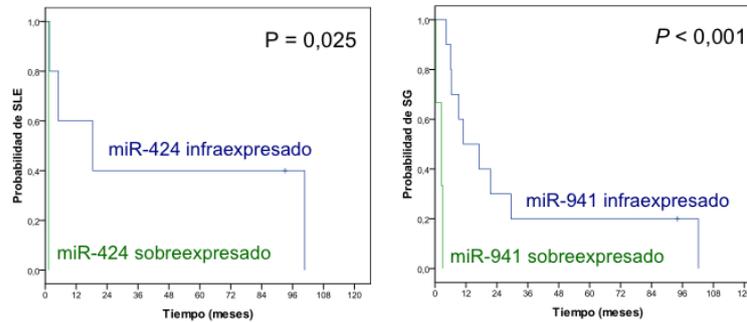
Los pacientes con infraexpresión de la isoforma A tuvieron una mejor SG (mediana 17 vs. 3 meses; SG a los 2 años 14 vs. 0%; $P=0,002$), SLE (mediana 19 vs. 2 meses; SLE a los 2 años 27 vs. 0%; $P=0,025$) y SLR (mediana 19 vs. 6 meses; SLE a los 2 años 50 vs. 0%; $P=0,059$), aunque esta última no alcanzó significación estadística (Figura 40). Los pacientes con sobreexpresión de la isoforma D también tuvieron una mejor SG (mediana 1 vs. 6 meses; SG a los 2 años 0 vs. 10%; $P=0,006$), SLR (mediana 1 vs. 19 meses; SLR a los 2 años 0 vs. 29%; $P=0,025$) y SLE (mediana 0 vs. 20 meses; SLE a los 2 años 1 vs. 14%; $P=0,025$) (Figura 40).

Figura 40. Curvas de supervivencia en el grupo de riesgo citogenético adverso según la expresión de las isoformas A) A y B) D de WT1



También se vio una mejor SG para los pacientes con infraexpresión del miR-941 (mediana 11 vs. 2 meses; SG a los 2 años 30 vs. 0%; $P<0,001$) y mejor SLE para la infraexpresión del miR-424 (mediana 19 vs. 1 mes; SLE a los 2 años 40 vs. 0%; $P=0,025$)($n=5$ vs 1) (Figura 41).

Figura 41. Curvas de supervivencia en el grupo de riesgo citogenético adverso según la expresión de los miRNA

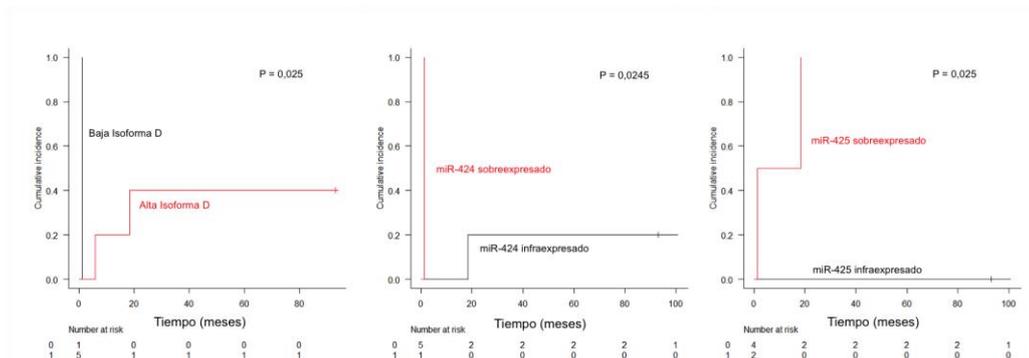


En el análisis de riesgos competitivos, las variables asociadas con un mayor riesgo de recaída fueron la isoforma D y los miR-424 y miR-425 (Tabla 45 y Figura 42).

Tabla 45. CIR en el grupo de riesgo citogenético adverso

Características	INCIDENCIA ACUMULADA		
	N (%)	CIR a los 2 años (%)	P
Expresión isoforma D			0,025
Alta	1 (17)	NA	
Baja	5 (83)	40	
miR-424 WT1			0,025
Infraexpresado	5 (83)	20	
Sobreexpresado	1 (17)	NA	
miR-425 WT1			0,025
Infraexpresado	4 (67)	0	
Sobreexpresado	2 (33)	NA	

Figura 42. Curvas de CIR en el subgrupo de riesgo citogenético desfavorable para la expresión de la isoforma D y los miR-424 y miR-425



La única variable que mantuvo significación estadística en el análisis multivariante de regresión de Cox para la SG fue la edad (HR de 2,26 con un IC 95% de 1,09 a 4,67; $P = 0,028$).

No se hallaron variables que mantuvieran el significado pronóstico en el análisis multivariante de incidencia acumulada.

5.5.5. Análisis de supervivencia según los miRNA

En la Tabla 46 se comparan a modo de resumen los principales hallazgos en el análisis de supervivencia de los miRNA en la serie global y en los distintos subgrupos.

Tabla 46. Resumen de los hallazgos encontrados en el análisis de supervivencia de los miRNA

	GLOBAL								CN								<60											
	UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE				UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE				UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE							
	Kaplan Meier				Fine Log rank IC				Kaplan Meier				Fine Log rank IC				Kaplan Meier				Fine Log rank IC							
	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR
miR-132																												
miR-188																												
miR-193																												
miR-223																												
miR-324																												
miR-424																												
miR-425																												
miR-500																												
miR-503																												
miR-941																												
miR-1307																												
	CTG FAVORABLE								CTG INTERMEDIA								CTG ADVERSA											
	UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE				UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE				UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE							
	Kaplan Meier				Fine Log rank IC				Kaplan Meier				Fine Log rank IC				Kaplan Meier				Fine Log rank IC							
	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR
miR-132																												
miR-188																												
miR-193																												
miR-223																												
miR-324																												
miR-424																												
miR-425																												
miR-500																												
miR-503																												
miR-941																												
miR-1307																												
	FAB M0								FAB M1								FAB M2											
	UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE				UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE				UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE							
	Kaplan Meier				Fine Log rank IC				Kaplan Meier				Fine Log rank IC				Kaplan Meier				Fine Log rank IC							
	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR
miR-132																												
miR-188																												
miR-193																												
miR-223																												
miR-324																												
miR-424																												
miR-425																												
miR-500																												
miR-503																												
miR-941																												
miR-1307																												
	FAB M4								FAB M5																			
	UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE				UNIVARIANTE				MULTIVARIANTE															
	Kaplan Meier				Fine Log rank IC				Kaplan Meier				Fine Log rank IC															
	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR	OS	SLR	SLE	CIR												
miR-132																												
miR-188																												
miR-193																												
miR-223																												
miR-324																												
miR-424																												
miR-425																												
miR-500																												
miR-503																												
miR-941																												
miR-1307																												

6.DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran el análisis de los datos clínico-biológicos y el estudio en profundidad del gen *WT1*, así como de su potencial implicación pronóstica, en una serie amplia de pacientes con LMA diagnosticados en un solo centro durante un periodo de 12 años.

Inicialmente considerado un gen supresor tumoral por su papel en los nefroblastomas infantiles, el gen *WT1* se ha visto implicado en otros muchos cánceres, incluyendo los hematológicos. Es en la LMA donde parece jugar un papel oncogénico más que supresor tumoral, a pesar de que existen estudios discrepantes al respecto. A lo largo de los años se han estudiado muchos aspectos del gen *WT1* en la LMA, incluyendo el impacto pronóstico de las mutaciones, de la expresión global de *WT1* al diagnóstico o de la presencia del SNP *rs16754*. Todas esas facetas de *WT1* han sido objeto de controversia como se ha explicado ampliamente en la introducción, encontrándose en la literatura estudios que confieren un impacto pronóstico a las mismas junto con estudios que no reproducen estos resultados. Además, varios de estos estudios han intentado correlacionar los niveles de expresión de *WT1* con el estatus mutacional del gen o la presencia del SNP. Es por ello que en esta tesis nos planteamos ampliar el conocimiento a nivel biológico del gen *WT1* incluyendo aspectos de sus isoformas y de su regulación a nivel epigenético.

Siendo evidentes algunas debilidades metodológicas inherentes a los estudios de cohortes históricas, por otro lado denominador común en buena parte de los estudios de caracterización de la LMA en la literatura (Visani *et al*, 2001), en nuestra cohorte de pacientes se mantiene el valor de las principales variables pronósticas bien establecidas, como la edad, el cariotipo o las mutaciones de los genes *FLT3* y *NPM1*, lo que contribuye a dar validez a los resultados.

El estudio se planteó en varias vertientes: 1) expresión total de *WT1*; 2) expresión de las 4 isoformas principales de *WT1*; 3) mutaciones en la región codificante del gen *WT1*; 4) SNP *rs16754* de *WT1*; 5) expresión de los miRNA relacionados con *WT1* y 6) asociaciones.

6.1. Expresión total de *WT1*

La mediana de expresión de la serie de pacientes con LMA fue mayor que la mediana de expresión de la serie de controles CD34+ de SCU, lo cual nos está indicando que en la LMA los valores de *WT1* total se encuentran muy por encima de lo que podría ser predecible en su contrapartida sana.

En el presente trabajo, el 29% de los pacientes con LMA sobreexpresaron *WT1* total, ya que se tomó como punto de corte discriminativo el percentil 75 de la serie (ratio $WT1/GUS \geq 0,3$). Este porcentaje coincide con el reportado recientemente por Lyu y cols. en una serie de 103 pacientes con LMA-CN (28%) en el que usa el punto de corte de 250 copias $WT1/10^4$ copias *ABL*, es decir, el establecido por la ELN para la expresión de *WT1* usando *ABL* como gen control (Lyu *et al*, 2014). Sin embargo, difiere de lo publicado con anterioridad donde se encontraba una sobreexpresión de *WT1* entre el 48 y el 73% de las LMA (Barragán *et al*, 2004; Miglino *et al*, 2011). Las diferencias encontradas en los porcentajes pueden justificarse por los diferentes puntos de corte empleados, ya que otros autores han usado la ratio $WT1/GUS$ o $ABL \geq 1$.

En nuestra serie de pacientes la sobreexpresión de *WT1* se asoció con un mayor porcentaje de blastos al diagnóstico y con la presencia de *FLT3-ITD* con mayor frecuencia. En términos de supervivencia, la sobreexpresión de *WT1* no se asoció con un pronóstico desfavorable en las tasas de RC, SG, SLE o CIR. Sin embargo, en el subgrupo de pacientes FAB M0 sí encontramos una menor SLR y SLE en los pacientes que sobreexpresaban *WT1* total, así como un mayor riesgo de recaída en el análisis de riesgo competitivo univariante y multivariante. Varios autores han demostrado que la sobreexpresión de *WT1* es más marcada cuanto más inmadura es la célula clonal, observando un mayor porcentaje de sobreexpresión en los subtipos de LMA más inmaduros (M0, M1 y M2) que en los subtipos más diferenciados (M3, M4 y M5) (Inoue *et al*, 1994; Trka *et al*, 2002; Garg *et al*, 2003). La expresión de *WT1* en nuestros pacientes fue

significativamente mayor en los subgrupos FAB M1 y M2 frente a los subgrupos M4 y M5, pero no se pudo demostrar una mayor expresión en el subgrupo FAB M0, probablemente debido al bajo número de pacientes en este subgrupo ($n = 14$), motivo por el cual las diferencias en la supervivencia deberían ser interpretadas con cautela.

6.2. Expresión de las isoformas principales

Para ampliar el conocimiento del papel que *WT1* pueda estar jugando en la leucemogénesis, recientemente varios trabajos han resaltado la utilidad de una cuantificación precisa de las isoformas de *WT1*. El presente estudio muestra un método fiable de análisis de fragmentos para detectar y cuantificar de forma relativa las cuatro isoformas principales de *WT1*. Este método ha dado lugar a la caracterización del patrón de las isoformas principales en una serie amplia de casos de LMA en relación con una serie control de células CD34+ de SCU.

El método desarrollado ha demostrado ser eficaz para la medición cuantitativa de las 4 isoformas principales de *WT1*, a diferencia de los procedimientos convencionales, que estiman los valores de las isoformas a partir de fórmulas matemáticas derivadas de PCRs elaboradas para cada una de las isoformas (Gu *et al*, 2010; Siehl *et al*, 2004). De los 112 casos analizados sólo en 9 de ellos no se detectó ninguna isoforma, aunque expresaron *WT1* total. Según lo sugerido por Kramarzova y cols. (Kramarzova *et al*, 2012) esta expresión de *WT1* total podría deberse a la presencia de alguna isoforma distinta de las 4 principales, puesto que *WT1* puede traducirse en más de 30 isoformas diferentes (Siehl *et al*, 2004).

Más recientemente, se han publicado técnicas de RT-PCR que permiten cuantificar las isoformas de forma absoluta mediante curvas patrón (Kramarzova *et al*, 2012; Lopotová *et al*, 2012). A diferencia de estas técnicas, nuestro método cuantifica las isoformas de una manera relativa. Sin embargo, se trata de un método reproducible, menos laborioso y más económico que permite la cuantificación de las 4

isoformas mayoritarias de *WT1* con una única PCR sin necesidad de elaborar plásmidos no comerciales.

Otra aportación de este estudio es la evaluación de las 4 isoformas principales en una serie amplia de LMA de adultos tomando como cohorte control células CD34+ de SCU. Hasta ahora, sólo Kramarzova y cols. han evaluado el perfil de expresión de las isoformas en 30 adultos con LMA, 73 niños con LMA y 23 médula ósea sana (Kramarzova *et al*, 2012) y Lopotova y cols. en 34 adultos con LMA (Lopotová *et al*, 2012). Como se ha comentado previamente, en condiciones normales *WT1* sólo se expresa en las células de la médula ósea (Scharnhorst, 2001). Sin embargo, *WT1* no se expresa en otra celularidad del sistema hematopoyético, lo que hace imposible su medición en sangre periférica de sujetos sanos. Se ha intentado usar como control las muestras de médula ósea sana y de donantes de médula ósea previamente movilizados, lo que teóricamente garantizaría un aumento en la celularidad CD34+, pero hasta ahora los resultados no han tenido demasiado éxito. Por ejemplo, Kramarzova y cols. analizaron 23 médulas óseas normales como cohorte control, pero sólo uno de ellos expresó las isoformas (Kramarzova *et al*, 2012). En esta tesis se intentaron analizar las isoformas en varios donantes de sangre periférica movilizadas con G-CSF pero no se obtuvo resultado, por lo que fueron inmediatamente excluidos del estudio. Una posible explicación para este fenómeno podría ser que la cantidad de material que llega para investigación después de la recolección de sangre de donantes es tan baja que no garantiza suficientes células CD34+, además del posible efecto de la movilización en la normalidad de estas células. La misma explicación podría aceptarse en controles sanos de médula sin movilizar, ya que la cantidad de células CD34+ considerados normales en la médula ósea de un sujeto sano es menor al 1% de la celularidad total.

Por lo tanto, mediante el uso de las células de CD34+ de SCU pudimos establecer una referencia para el patrón de expresión de las isoformas. De esta forma observamos que la isoforma predominante en éstas células fue la isoforma D, de forma similar a lo estudiado hasta

ahora en diferentes tejidos y, sorprendentemente, de forma más pronunciada que en la LMA.

A pesar de que constantemente se ha propuesto que la expresión de la isoforma D era la predominante en la LMA (Gu *et al*, 2010; Siehl *et al*, 2004; Kramarzova *et al*, 2012; Lopotová *et al*, 2012), esta expresión es menor en comparación con la observada en la cohorte control ($P=0,05$), sugiriendo así que existe una disminución relativa de la isoforma D en la LMA, no objetivada previamente por falta de un adecuado grupo control de referencia.

De acuerdo con los resultados publicados recientemente (Kramarzova *et al*, 2012; Lopotová *et al*, 2012), no se encontró correlación entre los niveles de expresión de la isoforma D y los niveles de *WT1* total. Por el contrario, pudimos encontrar una asociación de las isoformas A, B y C con *WT1* total.

En las líneas celulares leucémicas humanas analizadas no se observó ningún patrón específico, aunque parece que las líneas celulares de linaje mieloide tenían una discreta prevalencia de la isoforma D, mientras que la línea celular eosinofílica mostró un claro predominio de la isoforma C. Sin embargo, en comparación con la cohorte control, encontramos una sobreexpresión de las isoformas A, B y C junto con una baja expresión de la isoforma D en todas ellas, imitando así el patrón observado en los pacientes.

Otra novedad que cabe destacar fue la mejor SG observada en pacientes con sobreexpresión de la isoforma D, manteniendo su significado pronóstico en el análisis multivariante. El impacto pronóstico favorable de la isoforma D de *WT1* sobre la SG se observó también en el subgrupo de pacientes FAB M1 y M4 y en los pacientes que pertenecían al riesgo citogenético adverso. En este último grupo de riesgo se observó además una mejor SLR, SLE e IC para la sobreexpresión de la isoforma D, así como una peor SG y SLE para los pacientes que sobreexpresaban la isoforma A. En el subgrupo de pacientes pertenecientes al riesgo citogenético intermedio se vio una mejor SG para los pacientes que sobreexpresaban en este caso la

isoforma C. Estos resultados parecen sugerir un papel protector de la isoforma D en la LMA. Sin embargo, no se han realizado estudios funcionales para averiguar si la isoforma D realmente podría tener un efecto protector. Aunque se han hecho varios estudios para mostrar las diferentes funciones de *WT1*, principalmente han evaluado el papel de cada “splicing” alternativo, lo que hace difícil o incluso imposible extraer conclusiones válidas acerca de una determinada isoforma, puesto que cada “splicing” constituye al menos 2 isoformas (Bor *et al*, 2006; Ito *et al*, 2006). Los resultados que se han podido extraer de estos estudios son que las funciones de cada isoforma dependen no sólo de la expresión de la isoforma predominante en sí, si no también del medioambiente celular y, presumiblemente, de los diferentes tejidos involucrados.

6.3. Mutaciones en el gen *WT1*

El presente trabajo muestra la técnica de cribado HRM como una herramienta sencilla, práctica y precisa para diferenciar los pacientes con alguna alteración en la secuencia del gen *WT1*. Actualmente, el método de referencia para analizar las mutaciones y el SNP es la secuenciación directa de Sanger. Sin embargo, este método resulta laborioso, costoso y consume mucho tiempo de personal técnico, lo que puede evitarse en parte mediante un método de cribado eficiente y fiable que permita la identificación de muestras sospechosas, reduciendo así la cantidad de secuenciación directa necesaria. El análisis de las curvas de fusión utilizando agentes intercalantes de nueva generación (HRM) es capaz de identificar las muestras portadoras de alguna alteración, discriminando entre los pacientes según sean portadores de una mutación o del SNP *rs16754*, e incluso de un SNP en la región no codificante. La técnica de HRM demostró una sensibilidad del 100% y una especificidad de 96,6% para la detección de variaciones en el exón 7 del gen *WT1*.

Las mutaciones en el gen *WT1* son poco recurrentes en nuestra serie de pacientes con LMA (4%) en comparación a otros estudios

donde su frecuencia es del 10-15%. Estos resultados pueden deberse a las características de nuestra serie de pacientes, ya que la mayoría de estudios se han realizado sobre cohortes seleccionadas de pacientes, generalmente menores de 60 años y con LMA-CN. Como era esperable, la mayoría de las mutaciones del gen *WT1* encontradas en LMA afectaron al exón 7 y alteraron la pauta de lectura del RNA mensajero dando lugar a proteínas truncadas.

Muy recientemente, Krauth y cols. han publicado un estudio en 3157 pacientes con LMA no seleccionados encontrando mutaciones en *WT1* en 175 pacientes (5,5%), porcentaje que aumenta en determinados subgrupos como son los portadores de mutaciones bialélicas de *CEBPA* (13,6%), las LPA (11%) y los pacientes con *FLT3-ITD* (8,5%). Además observan que estas mutaciones son más frecuentes en mujeres y en menores de 60 años. No encuentran impacto pronóstico para las mutaciones en la cohorte total ni en los subgrupos con alta incidencia de las mutaciones. Sin embargo, en el subgrupo de pacientes con cariotipo normal sí demuestran una peor SLE tanto en el análisis univariante como en el multivariante (Krauth *et al*, 2015).

El análisis descriptivo de nuestra serie demostró que las mutaciones se encuentran con mayor frecuencia en el sexo femenino y que no se observan en los pacientes que pertenecen al grupo de riesgo citogenético adverso.

El significado pronóstico de las mutaciones de *WT1* es controvertido. Se ha sugerido que las diferentes dosis de citarabina utilizadas por los diferentes grupos en la consolidación podrían explicar estas discrepancias, dado que dichas mutaciones podrían estar relacionadas con una resistencia a la quimioterapia. Además, la mayoría de estudios han investigado fundamentalmente cohortes seleccionadas de pacientes con LMA-CN. En nuestra serie de pacientes de LMA no seleccionados no encontramos diferencias de supervivencia entre los pacientes portadores o no de mutaciones en *WT1* en el análisis univariante. Sin embargo, sí parecen jugar un papel desfavorable en el

análisis multivariante de la serie global, así como en los subgrupos de pacientes menores de 60 años, en los de grupo de riesgo favorable y en la FAB M2. Es probable que alguno de estos factores, ya sea la edad, el subtipo morfológico de leucemia o la concurrencia con otras alteraciones genéticas, pueda estar enmascarando el impacto pronóstico de las mutaciones de *WT1* en algunas series reportadas, dando lugar a resultados discrepantes.

6.4. SNP rs 16754 de *WT1*

El SNP *rs16754* fue encontrado en heterocigosis en 54 pacientes (31%), consistente con la frecuencia esperada en la población europea. No encontramos el fenotipo en homocigosis para el alelo menor (*WT1^{GG}*) en nuestra serie, ni por HRM ni por secuenciación de Sanger.

Con respecto a las características de los pacientes, encontramos que los pacientes heterocigotos para el alelo mayor (*WT1^{AG}*) fueron significativamente mayores que los homocigotos (*WT1^{AA}*). Curiosamente, este hallazgo, ya reportado por Reneville y cols. se explica por estos autores como debido a un sesgo de muestreo (Renneville *et al*, 2011). Asumiendo una distribución uniforme de este polimorfismo a través de todos los grupos de edad, la pregunta que se presenta es si este hallazgo se puede relacionar con una hipotética mayor susceptibilidad a leucemia de los pacientes mayores que presentan este polimorfismo.

En relación al impacto pronóstico del SNP *rs16754*, Damm y cols. encontraron que la presencia de uno o dos de los alelos menores independientemente predijo mejor SG y SLR en 249 LMA de adultos menores de 60 años. Este impacto pronóstico favorable de los genotipos *WT1^{AG/GG}* se mantuvo significativo en el análisis multivariante, especialmente en pacientes con cariotipo normal y dentro del subgrupo molecular de alto riesgo (*FLT3-ITD* y/o *NPM1* wt) (Damm *et al*, 2010). Asimismo, Ho y cols. asociaron la presencia del SNP con una mayor expresión de RNAm y predijeron una mejor supervivencia independientemente en un análisis multivariante de 790 LMA pediátrica,

principalmente en el subgrupo con enfermedad de bajo riesgo (Ho *et al*, 2011). Más recientemente, Becker y cols. observaron que, si bien no hubo diferencias en el pronóstico entre pacientes con $WT1^{AA}$, $WT1^{AG}$ o $WT1^{GG}$ en una cohorte grande de 433 adultos con LMA-CN, los pacientes con $WT1^{GG}$ tenían un resultado más favorable que el grupo de pacientes $WT1^{AA}$ y $WT1^{AG}$ en el subgrupo de pacientes con CN y $FLT3-ITD$. Sin embargo, este resultado no pudo ser confirmado en el análisis multivariante debido a la baja incidencia del fenotipo $WT1^{GG}$ (Becker *et al*, 2011). Por el contrario, otros estudios han reportado la ausencia de impacto pronóstico del SNP $rs16754$ tanto en niños (Hollink *et al*, 2010) como en adultos (Renneville *et al*, 2011; Choi *et al*, 2012) con LMA.

Las discrepancias en los resultados entre los estudios de $WT1$ en la LMA son difíciles de reconciliar. El variable impacto pronóstico del SNP $rs16754$ no se explica por el origen étnico, por la edad ni por el cariotipo. El impacto funcional del SNP $rs16754$ no se entiende, ni tampoco el mecanismo por el cual se produce. Una hipótesis es que se altere la sensibilidad a ciertas drogas, ya sea directamente a través de cambios en las propiedades del RNA, o indirectamente a través de asociación con otros SNPs en genes que afectan el metabolismo de la droga. Por lo tanto, las diferentes estrategias terapéuticas pueden influir potencialmente en el impacto pronóstico atribuido al SNP.

En nuestra serie, no encontramos diferencias significativas en el impacto pronóstico entre los genotipos de $WT1^{AA}$ o $WT1^{AG}$. Al restringir el análisis de supervivencia a diferentes subgrupos para confirmar los resultados favorables reportados tampoco observamos ningún impacto pronóstico en el subgrupo de LMA-CN o cuando los pacientes fueron estratificados según la edad, el grupo de riesgo citogenético o la clasificación FAB. Aunque esto podría estar relacionado con el pequeño tamaño muestral, otros factores pronósticos bien establecidos, tales como la edad, el cariotipo o el estado mutacional $FLT3/NPM1$, se asociaron independientemente con el pronóstico de esta serie, sugiriendo una influencia marginal como máximo del SNP $rs16754$ en la supervivencia de los pacientes con LMA.

6.5. Expresión de los miRNA relacionados con *WT1*

Los miRNA participan en el control de la expresión de genes generalmente a nivel postranscripcional uniéndose a la región 3'UTR de los RNA mensajeros y regulando su estabilidad y su transcripción. Los miRNA están emergiendo como parte de la regulación de la hematopoyesis normal y en varios estudios se ha visto que sus perfiles de expresión se encuentran alterados en leucemia, y por tanto que podrían tener un papel importante en la leucemogénesis. Sin embargo, del gran número de miRNA descritos hasta el momento en LMA sólo algunos se han visto alterados de forma persistente y en muchos casos estas diferencias se atribuyen al análisis en pacientes seleccionados según las alteraciones citogenéticas y/o moleculares que presenten (Dixon-Mclver *et al*, 2008).

En el presente estudio al comparar los perfiles de expresión de miRNA de un grupo de pacientes con LMA se encontraron 9 miRNA (miR-132, miR-188, miR-193, miR-223, miR-324, miR-424, miR-425, miR-941 y miR-1307) con expresión diferencial que podrían estar potencialmente implicados en la regulación del gen *WT1* a nivel postranscripcional. Se sabe relativamente poco sobre las funciones de regulación génica de estos miRNA y fundamentalmente los estudios se han llevado a cabo en tumores sólidos. Los miR-132, miR-324, miR-424, miR-425 y miR-941 se han visto implicados fundamentalmente en mecanismos de invasión y metástasis en distintos tipos de cancer (Zhang *et al*, 2014c; Zheng *et al*, 2014; Cao *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2015b; Zhang *et al*, 2014a; Xu *et al*, 2013; Yu *et al*, 2014; Faraoni *et al*, 2012). Por otro lado, los miR-188, miR-223 y miR-941 parecen estar involucrados en la inhibición de la proliferación celular (Wu *et al*, 2014; Johnnidis *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2014a) mientras que los miR-425 y miR-1307 se han visto asociados con una ventaja proliferativa (Di Leva *et al*, 2013; Zhou *et al*, 2015). Además, este último también se ha relacionado con quimioresistencia en cáncer de ovario (Zhou *et al*, 2015). Por último, y concretamente en tumores hematológicos, el miR-193 está relacionado con la diferenciación granulocítica, con la

apoptosis y se ha demostrado que reprime la expresión de c-kit en la LMA, funcionando como un gen supresor tumoral (Gao *et al*, 2011).

En nuestra serie de pacientes los miR-424 y miR-1307 resultaron estar infraexpresados, mientras el miR-132 se encontró sobreexpresado, comparando con los controles de células CD34+ de SCU, sugiriendo que estos miRNA con *WT1* como gen diana presentan patrones de expresión diferentes y podrían desempeñar un papel regulador en la hematopoyesis y la diferenciación celular.

En relación al impacto pronóstico en líneas generales de estos miRNA en la LMA se vio que era la infraexpresión de los mismos la que confería un mejor pronóstico. En concreto, la infraexpresión de los miR-223, miR-425, miR-500 y miR-1307 impactó positivamente en la supervivencia de la serie global. Esto puede ser debido en parte a que la infraexpresión de los miR-223 y miR-500 se encuentran con mayor frecuencia en el subgrupo de pacientes jóvenes y la infraexpresión del miR-425 en pacientes sin leucocitosis al diagnóstico. Además éstos miRNA y algún otro se asociaron también con un aumento en la supervivencia, fundamentalmente en los subgrupos de CN, menores de 60 años, del grupo de riesgo citogenético intermedio y del subgrupo de la FAB M5. Teniendo en cuenta que el principal cajón desastre a la hora de estratificar a los pacientes con LMA según el riesgo lo constituyen los pacientes de CN y, por extensión, los del grupo de riesgo citogenético intermedio, el uso de miRNA podría permitir una mejor caracterización de estos pacientes, con las consecuencias que de ello se derivan.

6.6. Asociaciones

Los resultados de este estudio muestran una correlación directa entre la expresión de *WT1* total y la expresión de las isoformas A, B y C. Además, se observó una correlación inversa entre la expresión de *WT1* total y la expresión de los miR-132, miR-188 y miR-1307. Por lo tanto se

podría sugerir que la sobreexpresión de *WT1* total observada en la LMA pudiera ser debida a un aumento de la expresión de las isoformas A, B y C y, posiblemente, influenciado por la infraexpresión de los miR-132, miR-188 y miR1307. Sin embargo, no parece existir relación entre la expresión de *WT1* y la presencia de mutaciones y/o SNP en el gen, al contrario de lo sugerido recientemente por Luo y cols. que encontraron un aumento en los niveles de expresión de *WT1* en la población *WT1*^{GG} (Luo *et al*, 2014). Una explicación de estos resultados discrepantes en lo concerniente a *WT1* serían las posibles diferencias en cuanto a las características de los pacientes entre cohortes o la variabilidad interensayo que puede existir entre las diferentes técnicas. Además, las complejas interacciones entre el estado de SNP *WT1*, el estado mutacional, los niveles de expresión total o de cada una de sus isoformas y la multitud de otros factores pronósticos moleculares y epigenéticos pueden complicar los resultados.

Por otra parte, en este estudio se demuestra que la expresión de algunos miRNA puede afectarse por determinadas variaciones del gen como las mutaciones de *WT1*, donde se observa una mayor expresión del miR-424 o los pacientes heterocigotos para el alelo menor del SNP *rs16754*, que presentan mayor expresión de los miR-223, miR-500 y miR-941. Otro estado que parece influir en la expresión de determinados miRNA es la expresión de las isoformas, encontrándose mayor expresión del miR-424 en los que sobreexpresan la isoforma A y, curiosamente, una menor expresión de los miR-503 y miR-132 en los que sobreexpresan las isoformas C y D, respectivamente.

7.CONCLUSIONES

1. En relación con la expresión total de *WT1*:

- a. La expresión de *WT1* total se encuentra aumentada en la LMA en comparación con las células CD34+ de SCU de controles sanos.
- b. La sobreexpresión de *WT1* confiere una peor SLR y SLE al subgrupo de pacientes con LMA indiferenciada (M0 de la clasificación FAB).

2. En relación con la expresión de las isoformas principales de *WT1*:

- a. Se ha diseñado un método eficiente y económico basado en el análisis de fragmentos para cuantificar la expresión relativa de cada isoforma en una única PCR.
- b. La expresión de la isoforma D de *WT1* es la predominante, tanto en LMA como en controles de células CD34+ de SCU. Sin embargo, dicha expresión es significativamente menor en la LMA comparado con su contrapartida normal.
- c. Hay una correlación positiva entre los niveles de expresión de *WT1* total y los niveles de expresión de las isoformas A, B y C en la LMA, pero no con la isoforma D.
- d. La sobreexpresión de la isoforma D tiene un impacto favorable en la supervivencia de los pacientes con LMA. Además, la sobreexpresión de la isoforma C confiere una mejor SG a los pacientes del subgrupo de riesgo citogenético intermedio, mientras que la sobreexpresión de la isoforma A confiere una peor SG y SLE a los pacientes del grupo de riesgo desfavorable.

3. En relación con las variaciones genéticas de *WT1*:

- a. El método de High Resolution Melting se ha mostrado muy útil en el rastreo de variaciones de la secuencia del

gen *WT1*, mostrando una alta sensibilidad y especificidad.

- b. La frecuencia de mutaciones de *WT1* en nuestra serie de pacientes con LMA fue baja (4%) y similar a lo reportado en la literatura.
- c. En la serie global no se encontró un impacto pronóstico adverso de las mutaciones de *WT1*, pero sí en los subgrupos de pacientes jóvenes, de riesgo citogenético desfavorable o la LMA con maduración (M2 de la clasificación FAB).
- d. La frecuencia del SNP *rs16754* en nuestra serie (31%) coincide con la descrita en la población caucásica.
- e. El SNP *rs16754* no mostró impacto sobre el pronóstico en la LMA *de novo*.

4. En relación con la regulación epigenética de *WT1*:

- a. De los 11 miRNA involucrados en la regulación epigenética de *WT1*, los miR-424 y miR-1307 resultaron estar infraexpresados, mientras que el miR-132 está sobreexpresado en la LMA en comparación con las células CD34+ de SCU.
- b. Se observó una relación inversa entre la expresión de *WT1* total y la expresión de los miR-132, miR-188 y miR-1307, sugiriendo un posible papel regulador de estos miRNA sobre la expresión de *WT1*.
- c. La infraexpresión de los miR-223, miR-425, miR-500 y miR-1307 mostró un impacto pronóstico favorable en la LMA.

8.BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinge, S., Yao, J., Kilpivaara, O., Bhat, R., Huberman, K., Thomas, S., Dolgalev, I., Heguy, A., Paietta, E., Le Beau, M.M., Beran, M., Tallman, M.S., Ebert, B.L., Kantarjian, H.M., et al (2009) Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*, **114**, 144–147.
- Algar, E.M., Khromykh, T., Smith, S.I., Blackburn, D.M., Bryson, G.J. & Smith, P.J. (1996) A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene*, **12**, 1005–1014.
- Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F.W., Bateman, C.M., Guo, Y., Colman, S.M., Kempinski, H., Moorman, A.V., Titley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T. & Greaves, M. (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *nature*, **469**, 356–361.
- Arber, D., Porwit, A. & Brunning, R.D. (2008) Acute Myeloid Leukemia and Related Precursor Neoplasms. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of ... Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinge, S., Yao, J., Kilpivaara, O., Bhat, R., Huberman, K., Thomas, S., Dolgalev, I., Heguy, A., Paietta, E., Le Beau, M.M., Beran, M., Tallman, M.S., Ebert, B.L., Kantarjian, H.M., et al (2009) Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*, **114**, 144–147.
- Algar, E.M., Khromykh, T., Smith, S.I., Blackburn, D.M., Bryson, G.J. & Smith, P.J. (1996) A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene*, **12**, 1005–1014.
- Anderson, K., Lutz, C., van Delft, F.W., Bateman, C.M., Guo, Y., Colman, S.M., Kempinski, H., Moorman, A.V., Titley, I., Swansbury, J., Kearney, L., Enver, T. & Greaves, M. (2011) Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *nature*, **469**, 356–361.
- Arber, D., Porwit, A. & Brunning, R.D. (2008) Acute Myeloid Leukemia and Related Precursor Neoplasms. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues." (2008): 124-126.
- Bacher, U., Haferlach, C., Schnittger, S., Kohlmann, A., Kern, W. & Haferlach, T. (2010) Mutations of the TET2 and CBL genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Annals of Hematology*, **89**, 643–652.
- Baird, P.N. & Simmons, P.J. (1997) Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Experimental Hematology*, **25**, 312–

320.

- Baldus, C.D., Tanner, S.M., Kusewitt, D.F., Liyanarachchi, S., Choi, C., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D. & la Chapelle, de, A. (2003a) BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology*, **31**, 1051–1056.
- Baldus, C.D., Tanner, S.M., Ruppert, A.S., Whitman, S.P., Archer, K.J., Marcucci, G., Caligiuri, M.A., Carroll, A.J., Vardiman, J.W., Powell, B.L., Allen, S.L., Moore, J.O., Larson, R.A., Kolitz, J.E., la Chapelle, de, A. & Bloomfield, C.D. (2003b) BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*, **102**, 1613–1618.
- Baldus, C.D., Thiede, C., Soucek, S., Bloomfield, C.D., Thiel, E. & Ehninger, G. (2006) BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **24**, 790–797.
- Barboux, S., Niaudet, P., Gubler, M.C., Grünfeld, J.P., Jaubert, F., Kuttann, F., Fékété, C.N., Souleyreau-Therville, N., Thibaud, E., Fellous, M. & McElreavey, K. (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nature Genetics*, **17**, 467–470.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Erpelinck, C., Meijer, J., van Oosterhoud, S., Van Putten, W.L.J., Valk, P.J.M., Berna Beverloo, H., Tenen, D.G., Lowenberg, B. & Delwel, R. (2003a) Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA*, **4**, 31–40.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., Erpelinck, C., Van Putten, W.L.J., Valk, P.J.M., van der Poel-van de Luytgaarde, S., Hack, R., Slater, R., Smit, E.M.E., Beverloo, H.B., Verhoef, G., Verdonck, L.F., Ossenkoppele, G.J., Sonneveld, P., De Greef, G.E., Lowenberg, B. & Delwel, R. (2003b) High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood*, **101**, 837–845.
- Barragán, E., Cervera, J., Bolufer, P., Ballester, S., Martín, G., Fernández, P., Collado, R., Sayas, M.J. & Sanz, M.A. (2004) Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **89**, 926–933.
- Baylin, S.B., Belinsky, S.A. & Herman, J.G. (2000) Aberrant methylation

- of gene promoters in cancer---concepts, misconcepts, and promise. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**, 1460–1461.
- Becker, H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrozek, K., Metzeler, K.H., Whitman, S.P., Schwind, S., Kohlschmidt, J., Wu, Y.Z., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Moore, J.O., Caligiuri, M.A., Larson, R.A., Marcucci, G. & Bloomfield, C.D. (2011) Clinical outcome and gene- and microRNA-expression profiling according to the Wilms tumor 1 (WT1) single nucleotide polymorphism rs16754 in adult de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Haematologica*, **96**, 1488–1495.
- Becker, H., Marcucci, G., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrozek, K., Margeson, D., Whitman, S.P., Paschka, P., Holland, K.B., Schwind, S., Wu, Y.Z., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Moore, J.O., Caligiuri, M.A., Larson, R.A., et al (2010) Mutations of the Wilms tumor 1 gene (WT1) in older patients with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*, **116**, 788–792.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, **33**, 451–458.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine*, **103**, 620–625.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A.G., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML- MO). *British Journal of Haematology*, **78**, 325–329.
- Bergmann, L., Miething, C., Maurer, U., Brieger, J., Karakas, T., Weidmann, E. & Hoelzer, D. (1997) High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*, **90**, 1217–1225.
- Bienz, M., Ludwig, M., Leibundgut, E.O., Mueller, B.U., Ratschiller, D., Solenthaler, M., Fey, M.F. & Pabst, T. (2005) Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **11**, 1416–1424.
- Bolufer, P., Collado, M., Barragán, E., Cervera, J., Calasanz, M.-J., Colomer, D., Roman-Gómez, J. & Sanz, M.A. (2007) The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms

- of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica*, **92**, 308–314.
- Bor, Y.-C., Swartz, J., Morrison, A., Rekosh, D., Ladomery, M. & Hammarskjöld, M.-L. (2006) The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes & Development*, **20**, 1597–1608.
- Bornhäuser, M., Illmer, T., Schaich, M., Soucek, S., Ehninger, G., Thiede, C. AML SHG 96 study group (2007) Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML. *Blood*, **109**, 2264–5– author reply 2265.
- Breems, D.A., Van Putten, W.L.J., De Greef, G.E., Van Zelder-Bhola, S.L., Gerssen-Schoorl, K.B.J., Mellink, C.H.M., Nieuwint, A., Jotterand, M., Hagemeyer, A., Beverloo, H.B. & Lowenberg, B. (2008) Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **26**, 4791–4797.
- Byrd, J.C., Mrozek, K., Dodge, R.K., Carroll, A.J. & Edwards, C.G. (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461) *Blood*, **100**, 4325-4336.
- Calin, G.A. & Croce, C.M. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 857–866.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. & Croce, C.M. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 2999–3004.
- Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H. & Lewis, W.H. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, **60**, 509–520.
- Cao, L., Xie, B., Yang, X., Liang, H., Jiang, X., Zhang, D., Xue, P., De Chen & Shao, Z. (2015) MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1. *PLOS ONE*, **10**, e0133074.
- Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S.H., Hastie, N.D., Little, M., Holmes, G., Todorov, I. & Ward, A. (1996) RNA binding by the

- Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 7562–7566.
- Casale, F., D'Angelo, V., Addeo, R., Caraglia, M., Crisci, S., Rondelli, R., Di Tullio, M.T. & Indolfi, P. (2004) P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncology reports*, **12**, 1201–1207.
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H.F. & Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, **303**, 83–86.
- Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L. & Wang, D.-Z. (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, **38**, 228–233.
- Chen, X., Yang, Y., Huang, Y., Tan, J., Chen, Y., Yang, J., Dou, H., Zou, L., Yu, J. & Bao, L. (2012) WT1 mutations and single nucleotide polymorphism rs16754 analysis of patients with pediatric acute myeloid leukemia in a Chinese population. *Leukemia & lymphoma*, **53**, 2195–2204.
- Choi, Y., Lee, J.-H., Hur, E.-H., Kang, M.J., Kim, S.-D., Lee, J.-H., Kim, D.-Y., Lim, S.-N., Bae, K.-S., Lim, H.-S., Seol, M., Kang, Y.-A. & Lee, K.-H. (2012) Single nucleotide polymorphism of Wilms' tumor 1 gene rs16754 in Korean patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, **91**, 671–677.
- Cilloni, D., Renneville, A., Hermitte, F., Hills, R.K., Daly, S., Jovanovic, J.V., Gottardi, E., Fava, M., Schnittger, S., Weiss, T., Izzo, B., Nomdedeu, J., van der Heijden, A., van der Reijden, B.A., Jansen, J.H., van der Velden, V.H.J., Ommen, H., Preudhomme, C., Saglio, G. & Grimwade, D. (2009) 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. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 5195–5201.
- Cox, D.R. (1972) Regression models and life-tables.
- Damm, F., Heuser, M., Morgan, M., Wagner, K., Gorlich, K., Grosshennig, A., Hamwi, I., Thol, F., Surdziel, E., Fiedler, W., Lubbert, M., Kanz, L., Reuter, C., Heil, G., Delwel, R., Lowenberg, B., Valk, P.J.M., Krauter, J. & Ganser, A. (2011) Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*, **117**, 4561–4568.
- Damm, F., Heuser, M., Morgan, M., Yun, H., Grosshennig, A., Gohring, G., Schlegelberger, B., Dohner, K., Ottmann, O., Lubbert, M., Heit,

- W., Kanz, L., Schlimok, G., Raghavachar, A., Fiedler, W., Kirchner, H., Döhner, H., Heil, G., Ganser, A. & Krauter, J. (2010) Single Nucleotide Polymorphism in the Mutational Hotspot of WT1 Predicts a Favorable Outcome in Patients With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 578–585.
- Di Leva, G., Piovan, C., Gasparini, P., Ngrankeu, A., Taccioli, C., Briskin, D., Cheung, D.G., Bolon, B., Anderlucchi, L., Alder, H., Nuovo, G., Li, M., Iorio, M.V., Galasso, M., Ramasamy, S., Marcucci, G., Perrotti, D., Powell, K.A., Bratasz, A., Garofalo, M., et al (2013) Estrogen Mediated-Activation of miR-191/425 Cluster Modulates Tumorigenicity of Breast Cancer Cells Depending on Estrogen Receptor Status. *PLoS Genet*, **9**, e1003311.
- Ding, L., Ley, T.J., Larson, D.E., Miller, C.A., Koboldt, D.C., Welch, J.S., Ritchey, J.K., Young, M.A., Lamprecht, T., McLellan, M.D., McMichael, J.F., Wallis, J.W., Lu, C., Shen, D., Harris, C.C., Dooling, D.J., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Chen, K., Schmidt, H., et al (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *nature*, **481**, 506–510.
- Dixon-Mclver, A., East, P., Mein, C.A., Cazier, J.-B., Molloy, G., Chaplin, T., Andrew Lister, T., Young, B.D. & Debernardi, S. (2008) Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLOS ONE*, **3**, e2141.
- Dombret, H. (2011) Gene mutation and AML pathogenesis. *Blood*, **118**, 5366–5367.
- Dufour, A., Schneider, F., Metzeler, K.H., Hoster, E., Schneider, S., Zellmeier, E., Benthaus, T., Sauerland, M.-C., Berdel, W.E., Büchner, T., Wörmann, B., Braess, J., Hiddemann, W., Bohlander, S.K. & Spiekermann, K. (2010) Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 570–577.
- Ellisen, L.W., Carlesso, N., Cheng, T., Scadden, D.T. & Haber, D.A. (2001) The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *The EMBO Journal*, **20**, 1897–1909.
- Estey, E. & Döhner, H. (2006) Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, **368**, 1894–1907.
- Falini, 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., Pettirossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., et al (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal

- karyotype. *New England Journal of Medicine*, **352**, 254–266.
- Faraoni, I., Laterza, S., Ardiri, D., Ciardi, C., Fazi, F. & Lo-Coco, F. (2012) MiR-424 and miR-155 deregulated expression in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia: correlation with NPM1 and FLT3 mutation status. *J. Hematol*, **5**, 1–1.
- Fazi, F., Racanicchi, S., Zardo, G., Starnes, L.M., Mancini, M., Travaglini, L., Diverio, D., Ammatuna, E., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani, F. & Nervi, C. (2007) Epigenetic Silencing of the Myelopoiesis Regulator microRNA-223 by the AML1/ETO Oncoprotein. *Cancer Cell*, **12**, 457–466.
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C. & Bozzoni, I. (2005) A Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP α Regulates Human Granulopoiesis. *Cell*, **123**, 819–831.
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., Valtieri, M., Calin, G.A., Liu, C.-G., Sorrentino, A., Croce, C.M. & Peschle, C. (2005) MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 18081–18086.
- Frohling, S. (2005) Genetics of Myeloid Malignancies: Pathogenetic and Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 6285–6295.
- Fuster, O., Barragán, E., Bolufer, P., Such, E., Valencia, A., Ibañez, M., Dolz, S., de Juan, I., Jiménez, A., Gómez, M.T., Buño, I., Martínez, J., Cervera, J., Montesinos, P., Moscardó, F. & Sanz, M.A. (2012) Fragment length analysis screening for detection of CEBPA mutations in intermediate-risk karyotype acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, **91**, 1–7.
- Gaidzik, V.I., Schlenk, R.F., Moschny, S., Becker, A., Bullinger, L., Corbacioglu, A., Krauter, J., Schlegelberger, B., Ganser, A., Döhner, H., Döhner, K. German-Austrian AML Study Group (2009) Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*, **113**, 4505–4511.
- Gaiger, A. (1998) Detection of the *WT1* transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in *de novo* acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **12**, 1–9.
- Gale, R.E., Hills, R., Kottaridis, P.D., Srirangan, S., Wheatley, K., Burnett, A.K. & Linch, D.C. (2005) 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*, **106**, 3658–3665.
- Galm, O., Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2006) The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Reviews*, **20**, 1–13.
- Gao, X.-N., Lin, J., Li, Y.-H., Gao, L., Wang, X.-R., Wang, W., Kang, H.-Y., Yan, G.-T., Wang, L.-L. & Yu, L. (2011) MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*, **30**, 3416–3428.
- Garg, M., Moore, H., Tobal, K. & Liu Yin, J.A. (2003) Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *British Journal of Haematology*, **123**, 49–59.
- Garzon, R., Volinia, S., Liu, C.-G., Fernandez-Cymering, C., Palumbo, T., Pichiorri, F., Fabbri, M., Coombes, K., Alder, H., Nakamura, T., Flomenberg, N., Marcucci, G., Calin, G.A., Kornblau, S.M., Kantarjian, H., Bloomfield, C.D., Andreeff, M. & Croce, C.M. (2008) MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 3183–3189.
- Georgantas, R.W., Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C.-G., Heimfeld, S., Calin, G.A., Croce, C.M. & Civin, C.I. (2007) CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 2750–2755.
- Gilliland, D.G. (2002) Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Seminars in hematology*, **39**, 6–11.
- Gordanpour, A., Nam, R.K., Sugar, L., Bacopulos, S. & Seth, A. (2012) MicroRNA detection in prostate tumors by quantitative real-time PCR (qPCR). *Journal of visualized experiments*, **63**, e3874–e3874.
- Greiner, J., Schmitt, M., Li, L., Giannopoulos, K., Bosch, K., Schmitt, A., Döhner, K., Schlenk, R.F., Pollack, J.R., Döhner, H. & Bullinger, L. (2006) Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood*, **108**, 4109–4117.
- Grimwade, D. (1998) The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood*, 1–12.
- Grimwade, D. (2001) The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML):

- analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 1–9.
- Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J., Burnett, A.K. on behalf of the National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, **116**, 354–365.
- Groschel, S., Lugthart, S., Schlenk, R.F., Valk, P.J.M., Eiwien, K., Goudswaard, C., van Putten, W.J.L., Kayser, S., Verdonck, L.F., Lubbert, M., Ossenkoppele, G.J., Germing, U., Schmidt-Wolf, I., Schlegelberger, B., Krauter, J., Ganser, A., Dohner, H., Lowenberg, B., Dohner, K. & Delwel, R. (2010) High EVI1 Expression Predicts Outcome in Younger Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia and Is Associated With Distinct Cytogenetic Abnormalities. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 2101–2107.
- Grossmann, V., Tiacci, E., Holmes, A.B., Kohlmann, A., Martelli, M.P., Kern, W., Spanhol-Rosseto, A., Klein, H.-U., Dugas, M., Schindela, S., Trifonov, V., Schnittger, S., Haferlach, C., Bassan, R., Wells, V.A., Spinelli, O., Chan, J., Rossi, R., Baldoni, S., De Carolis, L., et al (2011) Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*, **118**, 6153–6163.
- Gu, W., Hu, S., Chen, Z., Qiu, G., Cen, J., He, B., He, J. & Wu, W. (2010) High expression of WT1 gene in acute myeloid leukemias with more predominant WT1+17AA isoforms at relapse. *Leukemia Research*, **34**, 46–49.
- Guillem, V.M., Collado, M., Terol, M.J., Calasanz, M.J., Esteve, J., Gonzalez, M., Sanzo, C., Nomdedeu, J., Bolufer, P., Lluch, A. & Tormo, M. (2007) Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia*, **21**, 1413–1422.
- Haber, D.A., Sohn, R.L., Buckler, A.J., Pelletier, J., Call, K.M. & Housman, D.E. (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 9618–9622.
- Han, Y., San-Marina, S., Liu, J. & Minden, M.D. (2004) Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene*, **23**, 6933–6941.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A. & Bloomfield, C.D. (1999) World Health

- Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*, **17**, 3835–3849.
- Hasle, H., Clemmensen, I.H. & Mikkelsen, M. (2000) Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet (London, England)*, **355**, 165–169.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J. & Hammond, S.M. (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *nature*, **435**, 828–833.
- Heidel, F., Solem, F.K., Breitenbuecher, F., Lipka, D.B., Kasper, S., Thiede, M.H., Brandts, C., Serve, H., Roesel, J., Giles, F., Feldman, E., Ehninger, G., Schiller, G.J., Nimer, S., Stone, R.M., Wang, Y., Kindler, T., Cohen, P.S., Huber, C. & Fischer, T. (2006) Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood*, **107**, 293–300.
- Heuser, M., Beutel, G., Krauter, J., Döhner, K., Neuhoff, von, N., Schlegelberger, B. & Ganser, A. (2006) High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood*, **108**, 3898–3905.
- Hewitt, S.M., Hamada, S., McDonnell, T.J., Rauscher, F.J. & Saunders, G.F. (1995) Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer research*, **55**, 5386–5389.
- Higgins, C.D., dos-Santos-Silva, I., Stiller, C.A. & Swerdlow, A.J. (2001) Season of birth and diagnosis of children with leukaemia: an analysis of over 15 000 UK cases occurring from 1953-95. *British Journal of Cancer*, **84**, 406–412.
- Ho, P.A., Kuhn, J., Gerbing, R.B., Pollard, J.A., Zeng, R., Miller, K.L., Heerema, N.A., Raimondi, S.C., Hirsch, B.A., Franklin, J.L., Lange, B., Gamis, A.S., Alonzo, T.A. & Meshinchi, S. (2011) WT1 synonymous single nucleotide polymorphism rs16754 correlates with higher mRNA expression and predicts significantly improved outcome in favorable-risk pediatric acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 704–711.
- Hollink, I.H.I.M., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Zimmermann, M., Balgobind, B.V., Arentsen-Peters, S.T.C.J.M., Alders, M., Willasch, A., Kaspers, G.-J.J.L., Trka, J., Baruchel, A., Creutzig, U., Pieters, R., Reinhardt, D. & Zwaan, C.M. (2010) No prognostic impact of the

- WT1 gene single nucleotide polymorphism rs16754 in pediatric acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, e523–6– author reply e527–e528.
- Hosen, N., Sonoda, Y., Oji, Y., Kimura, T., Minamiguchi, H., Tamaki, H., Kawakami, M., Asada, M., Kanato, K., Motomura, M., Murakami, M., Fujioka, T., Masuda, T., Kim, E.H., Tsuboi, A., Oka, Y., Soma, T., Ogawa, H. & Sugiyama, H. (2002) Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, **116**, 409–420.
- Hossain, A., Nixon, M., Kuo, M.T. & Saunders, G.F. (2006) N-terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 28122–28130.
- Hou, H.A., Huang, T.C., Lin, L.I., Liu, C.Y., Chen, C.Y., Chou, W.C., Tang, J.L., Tseng, M.H., Huang, C.F., Chiang, Y.C., Lee, F.Y., Liu, M.C., Yao, M., Huang, S.Y., Ko, B.S., Hsu, S.C., Wu, S.J., Tsay, W., Chen, Y.C. & Tien, H.F. (2010) WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood*, **115**, 5222–5231.
- Ikeda, H., Lethé, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J.F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T. & Coulie, P.G. (1997) Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*, **6**, 199–208.
- Illmer, T., Schuler, U.S., Thiede, C., Schwarz, U.I., Kim, R.B., Gotthard, S., Freund, D., Schäkel, U., Ehninger, G. & Schaich, M. (2002) MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer research*, **62**, 4955–4962.
- Inoue, K., Ogawa, H., Yamagami, T., Soma, T., Tani, Y., Tatekawa, T., Oji, Y., Tamaki, H., Kyo, T., Dohy, H., Hiraoka, A., Masaoka, T., Kishimoto, T. & Sugiyama, H. (1996) Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood*, **88**, 2267–2278.
- Inoue, K., Sugiyama, H., Ogawa, H., Nakagawa, M., Yamagami, T., Miwa, H., Kita, K., Hiraoka, A., Masaoka, T. & Nasu, K. (1994) WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*, **84**, 3071–3079.
- Inoue, K., Tamaki, H., Ogawa, H., Oka, Y., Soma, T., Tatekawa, T., Oji, Y., Tsuboi, A., Kim, E.H., Kawakami, M., Akiyama, T., Kishimoto, T. & Sugiyama, H. (1998) Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells.

Blood, **91**, 2969–2976.

Issa, J.P., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (1997) DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia*, **11 Suppl 1**, S7–11.

Ito, K., Oji, Y., Tatsumi, N., Shimizu, S., Kanai, Y., Nakazawa, T., Asada, M., Jomgeow, T., Aoyagi, S., Nakano, Y., Tamaki, H., Sakaguchi, N., Shirakata, T., Nishida, S., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Tsujimoto, Y. & Sugiyama, H. (2006) Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene*, **25**, 4217–4229.

Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D. & Camargo, F.D. (2008) Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *nature*, **451**, 1125–1129.

Jones, P.A. & Laird, P.W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*, **21**, 163–167.

Kaplan, E.L. & Meier, P. (2012) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American statistical association*, **53**, 457–481.

Kayser, S., Zucknick, M., Döhner, K., Krauter, J., Köhne, C.-H., Horst, H.-A., Held, G., Lilienfeld-Toal, von, M., Wilhelm, S., Rummel, M., Germing, U., Götze, K., Nachbaur, D., Schlegelberger, B., Göhring, G., Späth, D., Morlok, C., Teleanu, V., Ganser, A., Döhner, H., et al (2012) Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood*, **119**, 551–558.

Keilholz, U., Menssen, H.D., Gaiger, A., Menke, A., Oji, Y., Oka, Y., Scheibenbogen, C., Stauss, H., Thiel, E. & Sugiyama, H. (2005) Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. In pp 1318–1323. Nature Publishing Group.

King-Underwood, L. & Pritchard-Jones, K. (1998) Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood*, **91**, 2961–2968.

Koschmieder, S., Halmos, B., Levantini, E. & Tenen, D.G. (2009) Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 619–628.

Kottaridis, P.D., Gale, R.E., Frew, M.E., Harrison, G., Langabeer, S.E., Belton, A.A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D.T., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. & Linch, D.C. (2001) 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*, **98**, 1752–1759.
- Kramarzova, K., Stuchly, J., Willasch, A., Gruhn, B., Schwarz, J., Cermak, J., Machova-Polakova, K., Fuchs, O., Stary, J., Trka, J. & Boublikova, L. (2012) Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia*, **26(9)**, 2086-2095.
- Krauth, M.-T., Alpermann, T., Bacher, U., Eder, C., Dicker, F., Ulke, M., Kuznia, S., Nadarajah, N., Kern, W., Haferlach, C., Haferlach, T. & Schnittger, S. (2015) WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia*, **29**, 660–667.
- Laity, J.H., Chung, J., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2000) Alternative Splicing of Wilms' Tumor Suppressor Protein Modulates DNA Binding Activity through Isoform-Specific DNA-Induced Conformational Changes †. *Biochemistry*, **39**, 5341–5348.
- Langer, C., Marcucci, G., Holland, K.B., Radmacher, M.D., Maharry, K., Paschka, P., Whitman, S.P., Mrózek, K., Baldus, C.D., Vij, R., Powell, B.L., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2009) Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 3198–3204.
- Langer, C., Radmacher, M.D., Ruppert, A.S., Whitman, S.P., Paschka, P., Mrozek, K., Baldus, C.D., Vukosavljevic, T., Liu, C.G., Ross, M.E., Powell, B.L., la Chapelle, de, A., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Marcucci, G. & Bloomfield, C.D. (2008) High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*, **111**, 5371–5379.
- Lapillonne, H., Renneville, A., Auvrignon, A., Flamant, C., Blaise, A., Perot, C., Lai, J.-L., Ballerini, P., Mazingue, F., Fasola, S., Dehée, A., Bellman, F., Adam, M., Labopin, M., Douay, L., Leverger, G., Preudhomme, C. & Landman-Parker, J. (2006) High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **24**, 1507–1515.

- Larson, R.A. (2010) Micro-RNAs and copy number changes: New levels of gene regulation in acute myeloid leukemia. *Chemico-Biological Interactions*, **184**, 21–25.
- Larsson, S.H., Charlier, J.P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V. & Hastie, N.D. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*, **81**, 391–401.
- Lasa, A., Carricondo, M., Estivill, C., Bussaglia, E., Gich, I., Brunet, S., Aventin, A., Sierra, J. & Nomdedéu, J.F. (2009) WT1 monitoring in core binding factor AML: comparison with specific chimeric products. *Leukemia Research*, **33**, 1643–1649.
- Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., Harris, C.C., Licht, C.F., Townsend, R.R., Fulton, R.S., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J.R., Lin, L., et al (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **363**, 2424–2433.
- Li, Z., Lu, J., Sun, M., Mi, S., Zhang, H., Luo, R.T., Chen, P., Wang, Y., Yan, M., Qian, Z., Neilly, M.B., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, S.K., Zhang, D.-E., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Thirman, M.J., Golub, T.R., Rowley, J.D., et al (2008) Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15535–15540.
- Licht, J. (2005) The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 137–142.
- Lin, L.-I., Chen, C.-Y., Lin, D.-T., Tsay, W., Tang, J.-L., Yeh, Y.-C., Shen, H.-L., Su, F.-H., Yao, M., Huang, S.-Y. & Tien, H.-F. (2005) Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **11**, 1372–1379.
- Loeb, D.M., Summers, J.L., Burwell, E.A., Korz, D., Friedman, A.D. & Sukumar, S. (2003) An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia*, **17**, 965–971.
- Lopotová, T., Polák, J., Schwarz, J., Klamová, H. & Moravcová, J. (2012) Expression of four major WT1 splicing variants in acute and chronic myeloid leukemia patients analyzed by newly developed four real-time RT PCRs. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **49**, 41–47.

- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. & Golub, T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*, **435**, 834–838.
- Lugthart, S., van Drunen, E., van Norden, Y., van Hoven, A., Erpelinck, C.A.J., Valk, P.J.M., Beverloo, H.B., Lowenberg, B. & Delwel, R. (2008) High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*, **111**, 4329–4337.
- Luo, S., Yu, K., Yan, Q.-X., Shen, Z.-J., Wu, J.-B., Chen, H.-M. & Gao, S.-M. (2014) Analysis of WT1 mutations, expression levels and single nucleotide polymorphism rs16754 in de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, **55**, 349–357.
- Lyu, X., Xin, Y., Mi, R., Ding, J., Wang, X., Hu, J., Fan, R., Wei, X., Song, Y. & Zhao, R.Y. (2014) Overexpression of Wilms Tumor 1 Gene as a Negative Prognostic Indicator in Acute Myeloid Leukemia. *PLOS ONE*, **9**, e92470–9.
- Mantel, N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer chemotherapy reports. Part 1*, **50**, 163–170.
- Marcucci, G., Haferlach, T. & Döhner, H. (2011) Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 475–486.
- Marcucci, G., Maharry, K., Whitman, S.P., Vukosavljevic, T., Paschka, P., Langer, C., Mrózek, K., Baldus, C.D., Carroll, A.J., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D. Cancer and Leukemia Group B Study (2007) High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **25**, 3337–3343.
- Marcucci, G., Maharry, K., Wu, Y.-Z., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Holland, K.B., Whitman, S.P., Becker, H., Schwind, S., Metzeler, K.H., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2010) IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 2348–2355.
- Marcucci, G., Radmacher, M.D., Maharry, K., Mrózek, K., Ruppert, A.S.,

- Paschka, P., Vukosavljevic, T., Whitman, S.P., Baldus, C.D., Langer, C., Liu, C.-G., Carroll, A.J., Powell, B.L., Garzon, R., Croce, C.M., Kolitz, J.E., Caligiuri, M.A., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2008) MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **358**, 1919–1928.
- Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Locke, D.P., Magrini, V.J., Abbott, R.M., Vickery, T.L., Reed, J.S., Robinson, J.S., Wylie, T., Smith, S.M., Carmichael, L., et al (2009) Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine*, **361**, 1058–1066.
- Martens, J.H.A. & Stunnenberg, H.G. (2010) The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS letters*, **584**, 2662–2669.
- Medeiros, B.C., Othus, M., Fang, M., Roulston, D. & Appelbaum, F.R. (2010) Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood*, **116**, 2224–2228.
- Menke, A.L., van der Eb, A.J. & Jochemsen, A.G. (1998) The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *International review of cytology*, **181**, 151–212.
- Menssen, H.D., Renkl, H.J., Rodeck, U., Maurer, J., Notter, M., Schwartz, S., Reinhardt, R. & Thiel, E. (1995) Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia*, **9**, 1060–1067.
- Metzeler, K.H., Dufour, A., Benthaus, T., Hummel, M., Sauerland, M.-C., Heinecke, A., Berdel, W.E., Büchner, T., Wörmann, B., Mansmann, U., Braess, J., Spiekermann, K., Hiddemann, W., Buske, C. & Bohlander, S.K. (2009) ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **27**, 5031–5038.
- Migliano, M., Colombo, N., Pica, G., Grasso, R., Clavio, M., Bergamaschi, M., Ballerini, F., Ghiso, A., Ghiggi, C., Mitscheunig, L., Beltrami, G., Cagnetta, A., Vignolo, L., Lucchetti, M.V., Aquino, S., Pierri, I., Sessarego, M., Carella, A.M. & Gobbi, M. (2011) WT1 overexpression at diagnosis may predict favorable outcome in patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, **52**, 1961–1969.

- Minelli, A., Maserati, E., Rossi, G., Bernardo, M.E., De Stefano, P., Cecchini, M.P., Valli, R., Albano, V., Pierani, P., Leszl, A., Sainati, L., Curto, Lo, F., Danesino, C., Locatelli, F. & Pasquali, F. (2004) Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes, chromosomes & cancer*, **40**, 165–171.
- Miwa, H., Beran, M. & Saunders, G.F. (1992) Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias. *Leukemia*, **6**, 405–409.
- Miyawaki, S., Hatsumi, N., Tamaki, T., Naoe, T., Ozawa, K., Kitamura, K., Karasuno, T., Mitani, K., Kodera, Y., Yamagami, T. & Koga, D. (2010) Prognostic potential of detection of WT1 mRNA level in peripheral blood in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*, **51**, 1855–1861.
- Mrozek, K., Marcucci, G., Paschka, P., Whitman, S.P. & Bloomfield, C.D. (2007) Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, **109**, 431–448.
- Mrózek, K., Heerema, N.A. & Bloomfield, C.D. (2004) Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews*, **18**, 115–136.
- Mrózek, K., Radmacher, M.D., Bloomfield, C.D. & Marcucci, G. (2009) Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*, **16**, 64–69.
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T. & Misawa, S. (1996) Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **10**, 1911–1918.
- Nervi, C., Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A. & Bozzoni, I. (2007) Emerging role for microRNAs in acute promyelocytic leukemia. *Current topics in microbiology and immunology*, **313**, 73–84.
- Nibourel, O., Kosmider, O., Cheok, M., Boissel, N., Renneville, A., Philippe, N., Dombret, H., Dreyfus, F., Quesnel, B., Geffroy, S., Quentin, S., Roche-Lestienne, C., Cayuela, J.-M., Roumier, C., Fenaux, P., Vainchenker, W., Bernard, O.A., Soulier, J., Fontenay, M. & Preudhomme, C. (2010) Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood*, **116**, 1132–1135.
- Nomenclature, I.S.C.O.H.C., Shaffer, L.G., Slovak, M.L. & Campbell, L.J. (2009) ISCN 2009 S Karger Ag.
- Nooter, K., Sonneveld, P., Oostrum, R., Herweijer, H., Hagenbeek, T. &

- Valerio, D. (1990) Overexpression of the *mdr1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by cyclosporin-A. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **45**, 263–268.
- Nowakowska-Kopera, A., Sacha, T., Florek, I., Zawada, M., Czekalska, S. & Skotnicki, A.B. (2009) Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia & lymphoma*, **50**, 1326–1332.
- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. & Mendell, J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *nature*, **435**, 839–843.
- Ogawa, H. (2002) The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood*, **101**, 1698–1704.
- Oran, B., Dolan, M., Cao, Q., Brunstein, C., Warlick, E. & Weisdorf, D. (2011) Monosomal karyotype provides better prognostic prediction after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myelogenous leukemia. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **17**, 356–364.
- Owen, C., Fitzgibbon, J. & Paschka, P. (2010) The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia. *Hematological Oncology*, **28**, 13-19.
- Parkin, D.M., Ferlay, J., Whelan, S.L. & Storm, H.H. (2005) *Cancer Incidence in Five Continents Diamond Pocket Books (P) Ltd.*
- Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S., Whitman, S.P., Mrozek, K., Maharry, K., Langer, C., Baldus, C.D., Zhao, W., Powell, B.L., Baer, M.R., Carroll, A.J., Caligiuri, M.A., Kollitz, J.E., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2008) Wilms' Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 4595–4602.
- Paschka, P., Schlenk, R.F., Gaidzik, V.I., Habdank, M., Krönke, J., Bullinger, L., Späth, D., Kayser, S., Zucknick, M., Götze, K., Horst, H.-A., Germing, U., Döhner, H. & Döhner, K. (2010) IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 3636–3643.

- Paydas, S., Tanriverdi, K., Yavuz, S., Disel, U., Baslamisli, F. & Burgut, R. (2005) PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects. *American journal of hematology*, **79**, 257–261.
- Pelletier, J., Bruening, W., Li, F.P., Haber, D.A., Glaser, T. & Housman, D.E. (1991) WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *nature*, **353**, 431–434.
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J. & Housman, D. (1990) The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *nature*, **346**, 194–197.
- Reindl, C., Bagrintseva, K., Vempati, S., Schnittger, S., Ellwart, J.W., Wenig, K., Hopfner, K.-P., Hiddemann, W. & Spiekermann, K. (2006) Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*, **107**, 3700–3707.
- Renneville, A., Boissel, N., Helevaut, N., Nibourel, O., Terré, C., Pautas, C., Gardin, C., Thomas, X., Turlure, P., Reman, O., Berthon, C., Dombret, H., Castaigne, S. & Preudhomme, C. (2011) Wilms' tumor 1 single-nucleotide polymorphism rs16754 does not predict clinical outcome in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **25**, 1918–1921.
- Renneville, A., Boissel, N., Zurawski, V., Llopis, L., Biggio, V., Nibourel, O., Philippe, N., Thomas, X., Dombret, H. & Preudhomme, C. (2009) Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia. *Cancer*, **115**, 3719–3727.
- Renshaw, J., Orr, R.M., Walton, M.I., Poele, Te, R., Williams, R.D., Wancewicz, E.V., Monia, B.P., Workman, P. & Pritchard-Jones, K. (2004) Disruption of WT1 gene expression and exon 5 splicing following cytotoxic drug treatment: antisense down-regulation of exon 5 alters target gene expression and inhibits cell survival. *Molecular cancer therapeutics*, **3**, 1467–1484.
- Rivera, M.N. & Haber, D.A. (2005) Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nature Reviews Cancer*, **5**, 699–712.
- Sakamoto, Y., Yoshida, M., Semba, K. & Hunter, T. (1997) Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene*, **15**, 2001–2012.
- Santamaría, C.M., Chillón, M.C., García-Sanz, R., Pérez, C., Caballero, M.D., Ramos, F., de Coca, A.G., Alonso, J.M., Giraldo, P., Bernal,

- T., Queizán, J.A., Rodríguez, J.N., Fernández-Abellán, P., Báñez, A., Peñarrubia, M.J., Balanzategui, A., Vidriales, M.B., Sarasquete, M.E., Alcoceba, M., Díaz-Mediavilla, J., et al (2009) Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, **114**, 148–152.
- Scharnhorst, V. (2001) WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*, **271**, 141–161.
- Schittenhelm, M.M., Yee, K.W.H., Tyner, J.W., McGreevey, L., Haley, A.D., Town, A., Griffith, D.J., Bainbridge, T., Braziel, R.M., O'Farrell, A.-M., Cherrington, J.M. & Heinrich, M.C. (2006) FLT3 K663Q is a novel AML-associated oncogenic kinase: Determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248). *Leukemia*, **20**, 2008–2014.
- Schmid, D. (1997) Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **11** (5), 639-643.
- Schnittger, S., Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Staib, P., Wuchter, C., Löffler, H., Sauerland, C.M., Serve, H., Büchner, T., Haferlach, T. & Hiddemann, W. (2002) 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*, **100**, 59–66.
- Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M.F., Haferlach, T., Hiddemann, W. & Falini, B. (2005) Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, **106**, 3733–3739.
- Schwind, S., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrozek, K., Holland, K.B., Margeson, D., Whitman, S.P., Hickey, C., Becker, H., Metzeler, K.H., Paschka, P., Baldus, C.D., Liu, S., Garzon, R., Powell, B.L., Kolitz, J.E., Carroll, A.J., Caligiuri, M.A., Larson, R.A., Marcucci, G., et al (2010) Prognostic Significance of Expression of a Single MicroRNA, miR-181a, in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 5257–5264.
- Siehl, J.M., Reinwald, M., Heufelder, K., Menssen, H.D., Keilholz, U. & Thiel, E. (2004) Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants. *Annals of Hematology*, **83**, 745–750.
- Skaggs, B.J., Gorre, M.E., Ryvkin, A., Burgess, M.R., Xie, Y., Han, Y., Komisopoulou, E., Brown, L.M., Loo, J.A., Landaw, E.M., Sawyers, C.L. & Graeber, T.G. (2006) Phosphorylation of the ATP-binding

- loop directs oncogenicity of drug-resistant BCR-ABL mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 19466–19471.
- Slovak, M.L., Kopecky, K.J., Cassileth, P.A. & Harrington, D.H. (2000) Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood*, **96**, 4075-4083.
- Spassov, B.V., Stoimenov, A.S., Balatzenko, G.N., Genova, M.L., Peichev, D.B. & Konstantinov, S.M. (2011) Wilms' tumor protein and FLT3-internal tandem duplication expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *hematology*, **16**, 37–42.
- Steffen, B., Müller-Tidow, C., Schwäble, J., Berdel, W.E. & Serve, H. (2005) The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, **56**, 195–221.
- Steinbach, D. (2002) Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **133(2)**, 118-123.
- Steinbach, D., Hermann, J., Viehmann, S., Zintl, F. & Gruhn, B. (2002) Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **133**, 118–123.
- Stirewalt, D.L., Meshinchi, S., Kussick, S.J., Sheets, K.M., Pogossova-Agadjanyan, E., Willman, C.L. & Radich, J.P. (2004) Novel FLT3 point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, **124**, 481–484.
- Summers, K., Stevens, J., Kakkas, I., Smith, M., Smith, L.L., MacDougall, F., Cavenagh, J., Bonnet, D., Young, B.D., Lister, T.A. & Fitzgibbon, J. (2007) Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia*, **21**, 550–551.
- Tallman, M.S. (2006) New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best practice & research. Clinical haematology*, **19**, 311–320.
- Tallman, M.S., Gilliland, D.G. & Rowe, J.M. (2005) Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, **106**, 1154–1163.
- Taneri, B., Asilmaz, E. & Gaasterland, T. (2012) Biomedical impact of splicing mutations revealed through exome sequencing. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, **18**, 314–319.
- Tanner, S.M., Austin, J.L., Leone, G., Rush, L.J., Plass, C., Heinonen, K., Mrozek, K., Sill, H., Knuutila, S., Kolitz, J.E., Archer, K.J.,

- Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D. & la Chapelle, de, A. (2001) BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 13901–13906.
- Taylor, A.M. (2001) Chromosome instability syndromes. *Best practice & research. Clinical haematology*, **14**, 631–644.
- Tazi, J., Bakkour, N. & Stamm, S. (2009) Alternative splicing and disease. *Biochimica et biophysica acta*, **1792**, 14–26.
- Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M. & Ehninger, G. (2006) Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, **107**, 4011–4020.
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhäuser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. & Illmer, T. (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, **99**, 4326–4335.
- Thol, F., Damm, F., Wagner, K., Göhring, G., Schlegelberger, B., Hoelzer, D., Lübbert, M., Heit, W., Kanz, L., Schlimok, G., Raghavachar, A., Fiedler, W., Kirchner, H., Heil, G., Heuser, M., Krauter, J. & Ganser, A. (2010) Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, **116**, 614–616.
- Trka, J., Kalinová, M., Hrusák, O., Zuna, J., Krejčí, O., Madzo, J., Sedláček, P., Vávra, V., Michalová, K., Jarosová, M., Stary, J. For Czech Paediatric Haematology Working Group (2002) Real-time quantitative PCR detection of WT1 gene expression in children with AML: prognostic significance, correlation with disease status and residual disease detection by flow cytometry. *Leukemia*, **16**, 1381–1389.
- Tsuboi, A., Oka, Y., Kyo, T., Katayama, Y., Elisseeva, O.A., Kawakami, M., Nishida, S., Morimoto, S., Murao, A., Nakajima, H., Hosen, N., Oji, Y. & Sugiyama, H. (2012) Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia*, **26**, 1410–1413.
- Valk, P.J.M., Bowen, D.T., Frew, M.E., Goodeve, A.C., Lowenberg, B. & Reilly, J.T. (2004) Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16). *Haematologica*, **89**, 106.
- van Baren, N., Chambost, H., Ferrant, A., Michaux, L., Ikeda, H., Millard,

- I., Olive, D., Boon, T. & Coulie, P.G. (1998) PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, **102**, 1376–1379.
- van den Heuvel-Eibrink, M.M., Wiemer, E.A., de Boevere, M.J., Slater, R.M., Smit, E.M., van Noesel, M.M., van der Holt, B., Schoester, M., Pieters, R. & Sonneveld, P. (2001) MDR1 expression in poor-risk acute myeloid leukemia with partial or complete monosomy 7. *Leukemia*, **15**, 398–405.
- Vardiman, J.W., Harris, N.L. & Brunning, R.D. (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, **100**, 2292–2302.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A. & Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, **114**(5), 937–951.
- Virappane, P., Gale, R., Hills, R., Kakkas, I., Summers, K., Stevens, J., Allen, C., Green, C., Quentmeier, H., Drexler, H., Burnett, A., Linch, D., Bonnet, D., Lister, T.A. & Fitzgibbon, J. (2008) Mutation of the Wilms' Tumor 1 Gene Is a Poor Prognostic Factor Associated With Chemotherapy Resistance in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *Journal of Clinical Oncology*, **26**, 5429–5435.
- Visani, G., Bernasconi, P., Boni, M., Castoldi, G.L., Ciolli, S., Clavio, M., Cox, M.C., Cuneo, A., Del Poeta, G., Dini, D., Falzetti, D., Fanin, R., Gobbi, M., Isidori, A., Leoni, F., Liso, V., Malagola, M., Martinelli, G., Mecucci, C., Piccaluga, P.P., et al (2001) The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia--analysis of 848 patients. *Leukemia*, **15**, 903–909.
- Volm, M., Zintl, F., Edler, L. & Sauerbrey, A. (1997) Prognostic value of protein kinase C, proto-oncogene products and resistance-related proteins in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Medical and pediatric oncology*, **28**, 117–126.
- Walker, A. & Marcucci, G. (2011) Impact of molecular prognostic factors in cytogenetically normal acute myeloid leukemia at diagnosis and relapse. *Haematologica*, **96**, 640–643.
- Wang, G.-S. & Cooper, T.A. (2007a) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics*, **8**, 749–761.

- Wang, G.-S. & Cooper, T.A. (2007b) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics*, **8**, 749–761.
- Wells, R.J., Odom, L.F., Gold, S.H., Feusner, J., Krill, C.E., Waldron, P., Moulton, T.A., Knoppell, E., White, M.L. & Cairo, M.S. (1994) Cytosine arabinoside and mitoxantrone treatment of relapsed or refractory childhood leukemia: initial response and relationship to multidrug resistance gene 1. *Medical and pediatric oncology*, **22**, 244–249.
- Whitman, S.P., Archer, K.J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B.D., Carroll, A.J., Mrozek, K., Vardiman, J.W., George, S.L., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D. & Caligiuri, M.A. (2001) 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 research*, **61**, 7233–7239.
- Williams, S.C., Angerer, N.D. & Johnson, P.F. (1997) C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene expression*, **6**, 371–385.
- Williamson, E.A., Xu, H.N., Gombart, A.F., Verbeek, W., Chumakov, A.M., Friedman, A.D. & Koeffler, H.P. (1998) Identification of transcriptional activation and repression domains in human CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 14796–14804.
- Wouters, B.J., Lowenberg, B., Erpelinck-Verschueren, C.A.J., Van Putten, W.L.J., Valk, P.J.M. & Delwel, R. (2009) 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*, **113**, 3088–3091.
- Wu, J., Lv, Q., He, J., Zhang, H., Mei, X. & Cui, K. (2014) MicroRNA-188 suppresses G 1/S transition by targeting multiple cyclin/CDK complexes. *Cell Communication and Signaling*, **12**:66.
- Xu, J., Li, Y., Wang, F., Wang, X., Cheng, B., Ye, F., Xie, X., Zhou, C. & Lu, W. (2013) Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene*, **32**, 976–987.
- Yamagami, T., Sugiyama, H., Inoue, K., Ogawa, H., Tatekawa, T., Hirata, M., Kudoh, T., Akiyama, T., Murakami, A. & Maekawa, T. (1996) Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood*, **87**, 2878–2884.

- Yamamoto, 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. & Naoe, T. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, **97**, 2434–2439.
- Yan, X.-J., Xu, J., Gu, Z.-H., Pan, C.-M., Lu, G., Shen, Y., Shi, J.-Y., Zhu, Y.-M., Tang, L., Zhang, X.-W., Liang, W.-X., Mi, J.-Q., Song, H.-D., Li, K.-Q., Chen, Z. & Chen, S.-J. (2011) Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nature Genetics*, **43**, 309–315.
- Ye (2011) Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *The EMBO Journal*, **15**, 5606-5615.
- Yu, L., Ding, G.-F., He, C., Sun, L., Jiang, Y. & Zhu, L. (2014) MicroRNA-424 is down-regulated in hepatocellular carcinoma and suppresses cell migration and invasion through c-Myb. *PLOS ONE*, **9**, e91661.
- Zhang, L., Ding, Y., Yuan, Z., Liu, J., Sun, J., Lei, F., Wu, S., Li, S. & Zhang, D. (2015a) MicroRNA-500 sustains nuclear factor- κ B activation and induces gastric cancer cell proliferation and resistance to apoptosis. *Oncotarget*, **6**, 2483–2495.
- Zhang, P.-P., Wang, X.-L., Zhao, W., Qi, B., Yang, Q., Wan, H.-Y., Shuang, Z.-Y., Liu, M., Li, X., Li, S. & Tang, H. (2014a) DNA methylation-mediated repression of miR-941 enhances lysine (K)-specific demethylase 6B expression in hepatoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **289**, 24724–24735.
- Zhang, Y., Chen, X., Lian, H., Liu, J., Zhou, B., Han, S., Peng, B., Yin, J., Liu, W. & He, X. (2014b) MicroRNA-503 acts as a tumor suppressor in glioblastoma for multiple antitumor effects by targeting IGF-1R. *Oncology reports*, **31**, 1445–1452.
- Zhang, Z., Li, Y., Fan, L., Zhao, Q., Tan, B., Li, Z. & Zang, A. (2015b) microRNA-425-5p is upregulated in human gastric cancer and contributes to invasion and metastasis in vitro and in vivo. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **9**, 1617–1622.
- Zhang, Z.-G., Chen, W.-X., Wu, Y.-H., Liang, H.-F. & Zhang, B.-X. (2014c) MiR-132 prohibits proliferation, invasion, migration, and metastasis in breast cancer by targeting HN1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **454**, 109–114.
- Zheng, Y.-B., Luo, H.-P., Shi, Q., Hao, Z.-N., Ding, Y., Wang, Q.-S., Li, S.-B., Xiao, G.-C. & Tong, S.-L. (2014) miR-132 inhibits colorectal

cancer invasion and metastasis via directly targeting ZEB2. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, **20**, 6515–6522.

Zhou, Y., Wang, M., Wu, J., Jie, Z., Chang, S. & Shuang, T. (2015) The clinicopathological significance of miR-1307 in chemotherapy resistant epithelial ovarian cancer. *Journal of ovarian research*, **8**, 23.

Zuber, J., Radtke, I., Pardee, T.S., Zhao, Z., Rappaport, A.R., Luo, W., McCurrach, M.E., Yang, M.-M., Dolan, M.E., Kogan, S.C., Downing, J.R. & Lowe, S.W. (2009) Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes & Development*, **23**, 877–889.

Østergaard, M., Olesen, L.H., Hasle, H., Kjeldsen, E. & Hokland, P. (2004) WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *British Journal of Haematology*, **125**, 590–600.

9.ANEXO

Tabla 47. Comparación de características en los pacientes de acuerdo a la expresión de las isoformas de WT1

Isoforma A	Baja N (%)	Alta N (%)	P
N	26	86	
Edad, años (rango)	62(17-79)	61(17-91)	0,589
≤60	10 (40)	42 (49)	0,436
>60	15 (60)	45 (51)	
Sexo			0,323
Hombre	17 (68)	49 (57)	
Mujer	8 (32)	37 (43)	
Grupo de riesgo citogenético			0,862
Favorable	2 (10)	9 (12)	
Intermedio	16 (76)	54 (70)	
Adverso	3 (14)	14 (18)	
Cariotipo normal	11 (52)	39 (51)	0,888
FAB			0,261
M0	6 (25)	6 (7)	
M1	0	26 (30)	
M2	8 (33)	18 (21)	
M4	5 (21)	22 (25)	
M5	3 (13)	9 (10)	
M6	1 (4)	4 (5)	
M7	0	0	
Bifenotípica	1 (4)	0	
No clasificada	0	2 (2)	
Recuento leucocitos (×10⁹/L)			
Mediana	9,3	16,8	
Rango	1,3-342	0,6-396	
Recuento plaquetar (×10⁹/L)			0,764
Mediana	53	54	
Rango	21-336	4-572	
Hemoglobina (g/dL)			0,676
Mediana	9,2	8,85	
Rango	6,6-16,6	4-14,2	
PMN			0,336
Mediana	14,2	13,35	
Rango	0-80,3	0-88	
% blastos SP			0,008
Mediana	22	57	
Rango	0-98	0-100	
FLT3-ITD			0,401
Positivo	3 (14)	18 (22)	

Negativo	19 (86)	65 (78)	
<i>NPM1</i>			0,054
Mutado	5 (23)	36 (46)	
Wild-type	17 (77)	43 (54)	
<i>FLT3-ITD/NPM1</i> estatus			0,257
<i>FLT3-ITD</i> neg/ <i>NPM1</i> pos	4 (18)	23 (29)	
<i>FLT3-ITD</i> pos / <i>NPM1</i> neg	2 (9)	5 (6)	
<i>FLT3-ITD</i> neg / <i>NPM1</i> neg	15 (68)	38 (48)	
<i>FLT3-ITD</i> pos / <i>NPM1</i> pos	1 (5)	13 (17)	
<i>CEBPA</i>			0,187
Mutado	2 (18)	2 (5)	
Wild-type	9 (82)	40 (95)	
<i>FLT3-D835</i>			0,807
Positivo	1 (5)	5 (6)	
Negativo	20 (95)	76 (94)	
Isoforma B	Baja	Alta	P
N	26	86	
Edad, años (rango)	62(17-79)	61(17-91)	0,877
≤60	11 (44)	41 (48)	
>60	15 (56)	45 (52)	0,746
Sexo			0,689
Hombre	15 (56)	52 (60)	
Mujer	11 (44)	34 (40)	
Grupo de riesgo citogenético			0,936
Favorable	2 (9)	9 (12)	
Intermedio	16 (73)	54 (71)	
Adverso	4 (18)	13 (17)	
Cariotipo normal	12 (55)	38 (50)	0,707
FAB			0,917
M0	4 (15)	8 (10)	
M1	2 (8)	24 (28)	
M2	7 (27)	19 (22)	
M4	8 (31)	19 (22)	
M5	3 (11)	9 (11)	
M6	1 (4)	4 (5)	
M7	0	0	
Bifenotípica	0	1 (1)	
No clasificada	1 (4)	1 (1)	
Recuento leucocitos (×10⁹/L)			0,171
Mediana	6,65	18,9	
Rango	0,6-342	0,9-396	
Recuento plaquetar (×10⁹/L)			0,816
Mediana	51	53,5	

Rango	21-336	4-572	
Hemoglobina (g/dL)			0,594
Mediana	9,15	8,8	
Rango	6,6-13,6	4-16,6	
PMN			0,376
Mediana	14,1	14	
Rango	0-80,3	0-88	
% blastos SP			0,001
Mediana	11,5	59	
Rango	0-86	0-100	
<i>FLT3</i> -ITD			0,230
Positivo	3 (13)	18 (22)	
Negativo	21 (87)	63 (78)	
<i>NPM1</i>			0,407
Mutado	8 (33)	33 (43)	
Wild-type	16 (67)	44 (57)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,475
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	7 (29)	20 (26)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	2 (8)	5 (6)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> neg	14 (59)	39 (51)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> pos	1 (4)	13 (17)	
<i>CEBPA</i>			0,579
Mutado	1 (10)	3 (7)	
Wild-type	9 (90)	40 (93)	
<i>FLT3</i> -D835			0,567
Positivo	1 (4)	5 (6)	
Negativo	23 (96)	73 (94)	
Isoforma C	Baja	Alta	P
N	19	93	
Edad, años (rango)	63(31-79)	61(17-91)	0,287
≤60	7 (37)	45 (49)	
>60	12 (63)	47 (51)	0,337
Sexo			0,879
Hombre	11 (58)	55 (60)	
Mujer	8 (42)	37 (40)	
Grupo de riesgo citogenético			0,799
Favorable	2 (12)	9 (11)	
Intermedio	13 (76)	57 (70)	
Adverso	2 (12)	15 (19)	
Cariotipo normal	8 (47)	42 (52)	0,719
FAB			0,088

M0	4 (21)	8 (9)	
M1	0	26 (28)	
M2	6 (32)	20 (22)	
M4	5 (26)	22 (24)	
M5	2 (11)	10 (11)	
M6	1 (5)	4 (4)	
M7	0	0	
Bifenotípica	1 (5)	0	
No clasificada	0	2 (2)	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,395
Mediana	9,3	14,7	
Rango	1,5-118	0,6-396	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,431
Mediana	45	54	
Rango	21-151	4-572	
Hemoglobina (g/dL)			0,672
Mediana	9	8,9	
Rango	7,4-13,6	4-16,6	
PMN			0,378
Mediana	14,2	13,85	
Rango	0-80,3	0-88	
% blastos SP			0,109
Mediana	28	48	
Rango	0-98	0-100	
<i>FLT3</i> -ITD			0,598
Positivo	3 (19)	18 (20)	
Negativo	13 (81)	71 (80)	
<i>NPM1</i>			0,133
Mutado	4 (25)	37 (44)	
Wild-type	12 (75)	48 (56)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,088
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	4 (25)	23 (27)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	3 (19)	4 (5)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> neg	9 (56)	44 (52)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> pos	0	14 (16)	
<i>CEBPA</i>			0,664
Mutado	0	4 (8)	
Wild-type	5 (100)	44 (92)	
<i>FLT3</i> -D835			0,651
Positivo	1 (6)	5 (6)	
Negativo	15 (94)	81 (94)	
Isoforma D	Baja	Alta	P
N	92	20	
Edad, años (rango)	62(17-91)	56(28-88)	0,490

≤60	40 (44)	12 (60)	0,193	
>60	52 (56)	8 (40)		
Sexo			0,654	
Hombre	56 (60)	11 (55)		
Mujer	36 (40)	9 (45)		
Grupo de riesgo citogenético			0,385	
Favorable	9 (11)	2 (12)		
Intermedio	56 (69)	14 (82)		
Adverso	16 (20)	1 (6)		
Cariotipo normal	39 (48)	11 (65)	0,214	
FAB			0,409	
M0	11 (12)	1 (5)		
M1	23 (25)	3 (16)		
M2	18 (20)	8 (42)		
M4	23 (25)	4 (21)		
M5	10 (11)	2 (11)		
M6	5 (5)	0		
M7	0	0		
Bifenotípica	1 (1)	0		
No clasificada	1 (1)	1 (5)		
Recuento leucocitos (×10 ⁹ /L)				0,954
Mediana	14,3	18,55		
Rango	0,6-396	1,3-342		
Recuento plaquetar (×10 ⁹ /L)				0,895
Mediana	53	53,5		
Rango	4-572	24-336		
Hemoglobina (g/dL)			0,963	
Mediana	9	9		
Rango	5-16,6	4-13,6		
PMN			0,446	
Mediana	14	12		
Rango	0-88	0-42		
% blastos SP			0,995	
Mediana	45	26,5		
Rango	0-100	0-98		
<i>FLT3</i> -ITD			0,447	
Positivo	16 (19)	5 (26)		
Negativo	70 (81)	14 (74)		
<i>NPM1</i>			0,370	
Mutado	32 (39)	9 (50)		
Wild-type	51 (61)	9 (50)		
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,189	

<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	23 (28)	4 (22)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	7 (8)	0	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> neg	44 (53)	9 (50)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> pos	9 (11)	5 (28)	
CEBPA			0,066
Mutado	1 (2)	3 (23)	
Wild-type	39 (98)	10 (77)	
<i>FLT3</i>-D835			0,325
Positivo	6 (7)	0	
Negativo	79 (93)	17 (100)	

Tabla 48. Comparación de características basales de los pacientes según la expresión de los miRNA

Características	miRNA-132		P
	Baja	Alta	
Total	101	34	
Edad, años (rango)	57(17-91)	63 (28-77)	0,121
≤60	60 (59)	13 (38)	0,032
>60	41 (40)	21 (62)	
Sexo			0,397
Hombre	57 (56)	22 (65)	
Mujer	44 (44)	12 (35)	
Grupo de riesgo citogenético			0,290
Favorable	11 (14)	2 (6)	
Intermedio	54 (69)	26 (84)	
Adverso	13 (17)	3 (10)	
Cariotipo normal	44 (56)	15 (48)	0,448
FAB			0,696
M0	5 (6)	3 (9)	
M1	23 (26)	5 (16)	
M2	18 (20)	7 (22)	
M4	18 (20)	11 (34)	
M5	15 (17)	5 (16)	
M6	6 (7)	1 (3)	
M7	0	0	
Bifenotípica	2 (2)	0	
No clasificada	2 (2)	0	
Recuento leucocitos (×10 ⁹ /L)			0,301
Mediana	11,6	22,93	
Rango	0-396	1-209	

Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,308
Mediana	61	51	
Rango	6-572	7-213	
Hemoglobina (g/dL)			0,089
Mediana	9,2	9,95	
Rango	4-13,5	5,8-16,6	
PMN			0,875
Mediana	18	15	
Rango	0-88	1-88	
% blastos SP			0,338
Mediana	52,5	45	
Rango	0-100	0-91	
<i>FLT3</i> -ITD			0,838
Positivo	19 (20)	6 (19)	
Negativo	74 (80)	26 (81)	
<i>NPM1</i>			0,279
Mutado	39 (43)	10 (32)	
Wild-type	51 (57)	21 (68)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,803
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	14 (38)	3 (23)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	2 (5)	1 (8)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	17 (46)	7 (54)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	4 (11)	2 (15)	
<i>CEBPA</i>			0,612
Mutado	5 (15)	1 (9)	
Wild-type	28 (85)	10 (91)	
<i>FLT3</i> -D835			0,267
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	64 (94)	20 (100)	
miRNA-223			<0,001
Mediana	1,7996	5,632	
Rangos	0,2827-85,4227	0,292-46,273	
miRNA-188			<0,001
Mediana	0,8467	1,5017	
Rangos	0,118-9,854	0,3306-68,77	
miRNA-193			<0,001
Mediana	0,9979	2,1534	
Rangos	0,052-17,975	0,4476-68,06	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,629	1,345	
Rangos	0,079-10,517	0,3046-14,88	
miRNA-424			0,002
Mediana	0,258	0,5037	
Rangos	0,0044-2325,99	0,0388-3,418	

miRNA-425			<0,001
Mediana	0,696	1,1614	
Rangos	0,0844-3,7012	0,1997-4,698	
miRNA-500			<0,001
Mediana	0,2242	0,5144	
Rangos	0,0316-2,795	0,0736-8,085	
miRNA-503			0,013
Mediana	0,1757	0,4418	
Rangos	0,0062-5,4107	0,0165-2,659	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,5635	1,8038	
Rangos	0,1231-5,733	0,3058-20,2	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4289	1,7377	
Rangos	0,0606-3,753	0,2265-19,77	
	miRNA-188		
Características	Baja	Alta	P
Total	101	34	
Edad, años (rango)	58 (17-91)	61 (28-83)	0,393
≤60	55 (55)	18 (53)	0,878
>60	46 (45)	16 (47)	
Sexo			0,657
Hombre	58 (57)	21 (62)	
Mujer	43 (43)	13 (38)	
Grupo de riesgo citogenético			0,124
Favorable	12 (15)	1 (3)	
Intermedio	54 (68)	26 (87)	
Adverso	13 (17)	3 (10)	
Cariotipo normal	40 (68)	19 (32)	0,235
FAB			0,794
M0	7 (8)	1 (3)	
M1	19 (21)	9 (28)	
M2	18 (20)	7 (22)	
M4	21 (24)	8 (25)	
M5	15 (17)	5 (16)	
M6	6 (7)	1 (3)	
M7	0	0	
Bifenotípica	2 (2)	1 (3)	
No clasificada	1 (1)	0	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,280
Mediana	13,85	22,9	
Rango	0-396	1-337	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,715

Mediana	54	58	
Rango	7-572	6-150	
Hemoglobina (g/dL)			0,372
Mediana	9,2	9,4	
Rango	4-16,6	5,5-14,2	
PMN			0,523
Mediana	18	15	
Rango	0-88	0-62	
% blastos SP			0,479
Mediana	48	63,5	
Rango	0-100	0-98	
<i>FLT3</i> -ITD			0,223
Positivo	16 (17)	9 (27)	
Negativo	76 (83)	24 (73)	
<i>NPM1</i>			0,880
Mutado	36 (41)	13 (39)	
Wild-type	52 (59)	20 (61)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,210
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	14 (36)	3 (27)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	1 (3)	2 (18)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	20 (51)	4 (36)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	4 (10)	2 (18)	
<i>CEBPA</i>			0,400
Mutado	4 (11)	2 (22)	
Wild-type	31 (89)	7 (78)	
<i>FLT3</i> -D835			0,283
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	65 (94)	19 (100)	
miRNA-132			<0,001
Mediana	2,0118	4,39	
Rangos	0,0031-13,73	1,003-28,29	
miRNA-223			0,063
Mediana	1,9825	3,054	
Rangos	0,3438-37,505	0,2827-85,423	
miRNA-188			<0,001
Mediana	0,7782	2,37	
Rangos	0,118-1,582	1,586-68,768	
miRNA-193			<0,001
Mediana	0,9365	2,598	
Rangos	0,0519-17,9755	0,8615-68,059	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,6269	1,4086	
Rangos	0,079-10,5174	0,3617-14,884	

miRNA-424			<0,001
Mediana	0,2407	0,7106	
Rangos	0,0044-1,6654	0,179-2325,99	
miRNA-425			0,002
Mediana	0,7788	1,386	
Rangos	0,0844-4,698	0,1885-4,209	
miRNA-500			<0,001
Mediana	0,2043	0,5645	
Rangos	0,0316-1,4668	0,1965-8,085	
miRNA-503			0,001
Mediana	0,1681	0,5135	
Rangos	0,0062-5,4107	0,0556-2,659	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,5666	2,1522	
Rangos	0,1231-3,3704	0,454-20,199	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4289	1,8539	
Rangos	0,0606-3,5199	0,2652-19,773	
Características	miRNA-193		P
	Baja	Alta	
Total	101	34	
Edad, años (rango)	57 (17-83)	63 (20-91)	0,186
≤60	58 (57)	15 (44)	0,178
>60	43 (43)	19 (56)	
Sexo			0,967
Hombre	59 (58)	20 (59)	
Mujer	42 (42)	14 (41)	
Grupo de riesgo citogenético			0,093
Favorable	6 (8)	7 (22)	
Intermedio	58 (75)	22 (69)	
Adverso	13 (17)	3 (9)	
Cariotipo normal	45 (58)	14 (44)	0,161
FAB			0,021
M0	6 (6)	2 (7)	
M1	19 (20)	9 (33)	
M2	20 (21)	5 (19)	
M4	21 (23)	8 (30)	
M5	17 (18)	3 (11)	
M6	7 (8)	0	
M7	0	0	
Bifenotípica	2 (2)	0	
No clasificada	2 (2)	0	

Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,260
Mediana	22,86	13,05	
Rango	1-396	0-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,995
Mediana	54	54,5	
Rango	6-572	7-242	
Hemoglobina (g/dL)			0,125
Mediana	9,21	9,75	
Rango	4-13,5	6,5-16,6	
PMN			0,153
Mediana	19	12	
Rango	0-88	1-20	
% blastos SP			0,603
Mediana	47,5	64	
Rango	0-100	0-93	
<i>FLT3</i> -ITD			0,351
Positivo	17 (18)	8 (26)	
Negativo	77 (82)	23 (74)	
<i>NPM1</i>			0,304
Mutado	40 (43)	9 (32)	
Wild-type	53 (57)	19 (68)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,474
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	16 (36)	1 (20)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	2 (4)	1 (20)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	22 (49)	2 (40)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	5 (11)	1 (20)	
<i>CEBPA</i>			0,538
Mutado	5 (13)	1 (20)	
Wild-type	34 (87)	4 (80)	
<i>FLT3</i> -D835			
Positivo	4 (5)	0	
Negativo	69 (95)	15 (100)	
miRNA-132			<0,001
Mediana	1,969	5,256	
Rangos	0,0031-28,29	0,889-25,52	
miRNA-223			0,814
Mediana	2,301	2,681	
Rangos	0,3389-85,423	0,2827-46,273	
miRNA-188			<0,001
Mediana	0,8467	1,681	
Rangos	0,118-9,854	0,5326-68,768	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,673	1,354	
Rangos	0,079-10,52	0,3045-	

		14,884	
miRNA-424			<0,001
Mediana	0,2407	0,7627	
Rangos	0,0044-1,7788	0,1626-2325,9	
miRNA-425			0,004
Mediana	0,748	1,0197	
Rangos	0,0844-4,698	0,1997-4,209	
miRNA-500			<0,001
Mediana	0,2308	0,4577	
Rangos	0,0316-2,795	0,0895-8,0846	
miRNA-503			<0,001
Mediana	0,1599	0,6894	
Rangos	0,0062-5,4107	0,01648-2,659	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,5882	2,1415	
Rangos	0,1366-5,7327	0,1231-20,199	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4255	1,589	
Rangos	0,0606-3,332	0,1287-19,773	
	miRNA-223		
Características	Baja	Alta	P
Total	101	34	
Edad, años (rango)	57 (17-91)	64 (35-83)	0,032
≤60	60 (59)	13 (38)	
>60	41 (40)	21 (62)	0,032
Sexo			0,445
Hombre	61 (60)	18 (53)	
Mujer	40 (40)	16 (47)	
Grupo de riesgo citogenético			0,220
Favorable	12 (15)	1 (4)	
Intermedio	57 (69)	23 (85)	
Adverso	13 (16)	3 (11)	
Cariotipo normal	43 (52)	16 (59)	0,537
FAB			0,163
M0	7 (8)	1 (3)	
M1	24 (27)	4 (12)	
M2	18 (20)	7 (22)	
M4	16 (18)	13 (41)	
M5	14 (16)	6 (19)	
M6	6 (7)	1 (3)	

M7	0	0	
Bifenotípica	2 (2)	0	
No clasificada	2(2)	0	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,189
Mediana	12,35	22,9	
Rango	0-396	1-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,982
Mediana	54	54,95	
Rango	13-572	6-336	
Hemoglobina (g/dL)			0,246
Mediana	9,15	9,75	
Rango	4-16,6	5,8-14,2	
PMN			0,547
Mediana	18	20	
Rango	0-88	1-88	
% blastos SP			0,385
Mediana	59,5	28	
Rango	0-100	0-91	
<i>FLT3</i> -ITD			0,142
Positivo	21 (23)	4 (12)	
Negativo	71 (77)	29 (88)	
<i>NPM1</i>			0,037
Mutado	41 (46)	8 (25)	
Wild-type	48 (54)	24 (75)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,120
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	15 (40)	2 (17)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	2 (5)	1 (8)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	15 (40)	9 (75)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	6 (15)	0	
<i>CEBPA</i>			0,505
Mutado	4 (12)	2 (20)	
Wild-type	30 (88)	8 (80)	
<i>FLT3</i> -D835			0,223
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	61 (94)	23 (100)	
miRNA-132			<0,001
Mediana	1,8349	4,9	
Rangos	0,0031-25,52	1,765-28,29	
miRNA-188			0,018
Mediana	0,8467	1,375	
Rangos	0,118-68,768	0,3306-10,539	
miRNA-193			0,041
Mediana	1,0486	1,764	
Rangos	0,0519-68,06	0,4164-13,388	

miRNA-324			<0,001
Mediana	0,6411	1,358	
Rangos	0,079-14,884	0,43-9,79	
miRNA-424			0,005
Mediana	0,2649	0,5037	
Rangos	0,0044-4,302	0,0248-2325,9	
miRNA-425			<0,001
Mediana	0,748	1,3946	
Rangos	0,0844-2,877	0,2259-4,698	
miRNA-500			0,004
Mediana	0,2333	0,4518	
Rangos	0,0316-8,0846	0,0736-4,186	
miRNA-503			<0,001
Mediana	0,1599	0,6806	
Rangos	0,0062-5,4107	0,0217-4,175	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,5676	1,3296	
Rangos	0,1231-13,945	0,3058-20,199	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,434	1,1829	
Rangos	0,606-19,773	0,2727-14,672	
Características	miRNA-324		P
	Baja	Alta	
Total	102	33	
Edad, años (rango)	57 (17-91)	63 (34-76)	0,090
≤60	60 (59)	13 (39)	0,052
>60	42 (41)	20 (61)	
Sexo			0,779
Hombre	59 (58)	20 (59)	
Mujer	43 (42)	13 (41)	
Grupo de riesgo citogenético			0,152
Favorable	11 (14)	2 (7)	
Intermedio	54 (68)	26 (87)	
Adverso	14 (18)	2 (7)	
Cariotipo normal	42 (53)	17 (57)	0,743
FAB			0,785
M0	7 (8)	1 (3)	
M1	22 (24)	6 (20)	
M2	19 (21)	6 (20)	
M4	18 (20)	11 (35)	
M5	15 (17)	5 (16)	

M6	5 (6)	2 (6)	
M7	-	-	
Bifenotípica	2 (2)	-	
No clasificada	2 (2)	-	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,515
Mediana	16,8	7,76	
Rango	0-396	1-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,224
Mediana	53,5	65	
Rango	6-242	17-572	
Hemoglobina (g/dL)			0,210
Mediana	9,2	9,7	
Rango	4-16,6	7,8-14,2	
PMN			0,282
Mediana	13	22	
Rango	0-88	1-88	
% blastos SP			0,420
Mediana	48	64	
Rango	0-97	0-100	
<i>FLT3</i> -ITD			0,839
Positivo	18 (20)	0	
Negativo	74 (80)	26 (100)	
<i>NPM1</i>			0,096
Mutado	40 (45)	9 (28)	
Wild-type	49 (55)	23 (72)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,396
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	16 (39)	1 (11)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	2 (5)	1 (11)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	18 (12)	6 (67)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	5 (44)	1 (11)	
<i>CEBPA</i>			0,703
Mutado	5 (14)	1 (13)	
Wild-type	31 (86)	7 (87)	
<i>FLT3</i> -D835			0,252
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	63 (94)	21 (100)	
miRNA-132			<0,001
Mediana	1,9659	4,2928	
Rangos	0,0031-28,29	0,029-25,62	
miRNA-223			<0,001
Mediana	1,8872	5,0597	
Rangos	0,3389-19,18	0,2828-85,423	
miRNA-188			<0,001
Mediana	0,7969	1,5896	
Rangos	0,118-9,854	0,4845-68,768	

miRNA-193			<0,001
Mediana	0,9852	2,2719	
Rangos	0,0519-17,976	0,7336-68,06	
miRNA-424			<0,001
Mediana	0,2556	0,5988	
Rangos	0,0044-2,6259	0,0248-2325,9	
miRNA-425			<0,001
Mediana	0,6994	1,5557	
Rangos	0,0844-2,171	0,1997-4,698	
miRNA-500			<0,001
Mediana	0,21185	0,606	
Rangos	0,0316-1,4668	0,1471-8,085	
miRNA-503			<0,001
Mediana	0,1426	0,7018	
Rangos	0,0062-5,411	0,0217-4,1754	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,5779	2,0928	
Rangos	0,1231-3,660	0,2137-20,199	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4187	1,6265	
Rangos	0,0606-3,529	0,3346-19,773	
Características	miRNA-424		P
	Baja	Alta	
Total	101	34	
Edad, años (rango)	61 (17-91)	58,5 (20-83)	0,482
≤60	52 (52)	21 (62)	
>60	49 (48)	13 (38)	0,298
Sexo			0,718
Hombre	60 (59)	19 (56)	
Mujer	41 (41)	15 (44)	
Grupo de riesgo citogenético			0,936
Favorable	9 (12)	4 (13)	
Intermedio	58 (74)	22 (71)	
Adverso	11 (14)	5 (16)	
Cariotipo normal	45 (58)	14 (45)	0,236
FAB			0,265
M0	5 (5)	3 (11)	
M1	22 (24)	6 (22)	
M2	21 (23)	4 (14)	
M4	18 (19)	11 (39)	

M5	16 (17)	4 (14)	
M6	7 (8)	0	
M7	-	-	
Bifenotípica	2 (2)	0	
No clasificada	2 (2)	0	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,766
Mediana	15,75	21,4	
Rango	0-396	2-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,673
Mediana	55	54	
Rango	7-572	6-198	
Hemoglobina (g/dL)			0,294
Mediana	9,2	9,4	
Rango	4-16,6	5,8-14,20	
PMN			0,628
Mediana	19	12	
Rango	0-88	2-82	
% blastos SP			0,065
Mediana	45	67	
Rango	0-100	0-95	
<i>FLT3</i> -ITD			0,295
Positivo	17 (18)	8 (27)	
Negativo	78 (82)	22 (73)	
<i>NPM1</i>			0,234
Mutado	40 (43)	9 (31)	
Wild-type	52 (57)	20 (69)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,630
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	15 (38)	2 (20)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	2 (5)	1 (10)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	19 (48)	5 (50)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	4 (10)	2 (20)	
<i>CEBPA</i>			0,295
Mutado	6 (16)	0	
Wild-type	32 (84)	6 (100)	
<i>FLT3</i> -D835			0,299
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	66 (94)	18 (100)	
miRNA-132			0,018
Mediana	2,1498	3,2309	
Rangos	0,0031-28,29	0,029-25,52	
miRNA-223			0,107
Mediana	2,0179	2,9862	
Rangos	0,3782-85,4227	0,2828-46,273	
miRNA-188			<0,001
Mediana	0,8204	1,5912	
Rangos	0,118-9,992	0,5211-	

		68,768	
miRNA-193			<0,001
Mediana	0,9527	2,4324	
Rangos	0,0519-8,973	0,5222-68,06	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,6885	1,3146	
Rangos	0,0791-10,5174	0,3617-14,884	
miRNA-425			0,001
Mediana	0,7025	1,1757	
Rangos	0,0844-4,6981	0,1997-4,209	
miRNA-500			<0,001
Mediana	0,2137	0,4191	
Rangos	0,0316-2,7949	0,1039-8,0846	
miRNA-503			<0,001
Mediana	0,1232	1,1391	
Rangos	0,0062-1,8339	0,0689-5,4107	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,6144	1,4079	
Rangos	0,1366-6,6569	0,1231-20,199	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4300	1,4487	
Rangos	0,0606-6,6204	0,322-19,773	
	miRNA-425		
Características	Baja	Alta	P
Total			
Edad, años (rango)	57,5 (17-91)	61 (30-83)	0,584
≤60	56 (55)	17 (50)	
>60	45 (45)	17 (50)	0,582
Sexo			0,397
Hombre	57 (56)	22 (65)	
Mujer	44 (44)	12 (35)	
Grupo de riesgo citogenético			0,015
Favorable	13 (16)	0	
Intermedio	53 (66)	27 (93)	
Adverso	14 (18)	2 (7)	
Cariotipo normal	41 (51)	18 (62)	0,316
FAB			0,267
M0	6 (7)	2 (6)	
M1	22 (24)	6 (19)	
M2	21 (23)	4 (13)	

M4	18 (20)	11 (36)	
M5	13 (14)	7 (23)	
M6	7 (9)	0	
M7	-	-	
Bifenotípica	1 (1)	1 (3)	
No clasificada	2 (2)	0	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,001
Mediana	9,9	42,8	
Rango	0-396	3-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,863
Mediana	55	53,5	
Rango	7-336	6-572	
Hemoglobina (g/dL)			0,253
Mediana	9,2	9,6	
Rango	4-13,5	5,8-16,6	
PMN			0,866
Mediana	18	12	
Rango	0-62	0-88	
% blastos SP			0,108
Mediana	48	65	
Rango	0-98	0-100	
<i>FLT3</i> -ITD			0,108
Positivo	15 (17)	10 (29)	
Negativo	76 (83)	24 (71)	
<i>NPM1</i>			0,120
Mutado	39 (45)	10 (29)	
Wild-type	48 (55)	24 (71)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,054
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	15 (35)	2 (29)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	1 (2)	2 (29)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	22 (51)	2 (29)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	5 (12)	1 (14)	
<i>CEBPA</i>			0,527
Mutado	5 (15)	1 (9)	
Wild-type	28 (85)	10 (91)	
<i>FLT3</i> -D835			0,237
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	62 (94)	22 (100)	
miRNA-132			<0,001
Mediana	1,9947	4,2914	
Rangos	0,0031-25,52	0,1162-28,29	
miRNA-223			<0,001
Mediana	1,7333	5,758	
Rangos	0,2828-33,041	1,2749-85,423	
miRNA-188			<0,001
Mediana	0,8015	1,5879	

Rangos	0,118-68,768	0,5218-10,539	
miRNA-193			<0,001
Mediana	0,9527	1,8088	
Rangos	0,0519-68,0599	0,4794-13,388	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,6269	1,4428	
Rangos	0,0791-14,884	0,4472-9,7936	
miRNA-424			<0,001
Mediana	0,2609	0,5386	
Rangos	0,0044-4,3017	0,0248-2325,9	
miRNA-500			<0,001
Mediana	0,210	0,4946	
Rangos	0,0316-8,0846	0,0736-4,186	
miRNA-503			<0,001
Mediana	0,1599	0,6930	
Rangos	0,0062-2,528	0,0217-5,411	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,5882	1,7147	
Rangos	0,1234-13,945	0,2137-20,199	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4255	1,5978	
Rangos	0,0606-19,773	0,3479-14,672	
Características	miRNA-500		P
	Baja	Alta	
Total			
Edad, años (rango)	57 (17-91)	63 (32-76)	0,049
≤60	57 (56)	16 (47)	
>60	44 (44)	18 (53)	0,343
Sexo			0,657
Hombre	58 (57)	21 (62)	
Mujer	43 (43)	13 (38)	
Grupo de riesgo citogenético			0,045
Favorable	13 (16)	0	
Intermedio	55 (68)	25 (89)	
Adverso	13 (16)	3 (11)	
Cariotipo normal	40 (49)	19 (68)	0,091
FAB			0,097
M0	7 (9)	1 (3)	
M1	21 (24)	7 (21)	

M2	23 (26)	2 (6)	
M4	18 (20)	11 (33)	
M5	11 (12)	9 (28)	
M6	5 (6)	2 (6)	
M7	-	-	
Bifenotípica	1 (1)	1 (3)	
No clasificada	2 (2)	0	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,113
Mediana	11,6	27,3	
Rango	0-396	1-337	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,901
Mediana	54	55,5	
Rango	6-572	13-213	
Hemoglobina (g/dL)			0,181
Mediana	9,2	9,9	
Rango	4-16,6	5,5-14,2	
PMN			0,511
Mediana	18	13,7	
Rango	0-88	2-38	
% blastos SP			0,530
Mediana	48	65	
Rango	0-100	0-98	
<i>FLT3</i> -ITD			0,065
Positivo	15 (16)	10 (31)	
Negativo	78 (84)	22 (69)	
<i>NPM1</i>			0,986
Mutado	()	()	
Wild-type	()	()	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,074
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	13 (33)	4 (40)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	1 (2)	2 (20)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	22 (55)	2 (20)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	4 (10)	2 (20)	
<i>CEBPA</i>			0,230
Mutado	6 (17)	0	
Wild-type	29 (83)	9 (100)	
<i>FLT3</i> -D835			0,865
Positivo	3 (4)	1 (5)	
Negativo	66 (96)	18 (95)	
miRNA-132			<0,001
Mediana	2,0118	4,5386	
Rangos	0,0031-13,734	0,0161-28,29	
miRNA-223			0,087
Mediana	1,9825	3,0293	
Rangos	0,2828-33,041	0,2921-85,423	

miRNA-188			<0,001
Mediana	0,7971	1,7547	
Rangos	0,251-9,8537	0,118-88,768	
miRNA-193			<0,001
Mediana	0,9979	1,7581	
Rangos	0,221-17,976	0,0519-68,059	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,6407	1,4287	
Rangos	0,0791-10,517	0,2188-14,884	
miRNA-424			0,025
Mediana	0,2797	0,4498	
Rangos	0,0248-2325,9	0,0044-3,4117	
miRNA-425			<0,001
Mediana	0,7025	1,1730	
Rangos	0,0844-2,171	0,1997-4,698	
miRNA-503			0,006
Mediana	0,1707	0,5057	
Rangos	0,0062-5,411	0,0247-4,1754	
miRNA-941			<0,001
Mediana	0,6049	1,9378	
Rangos	0,1231-3,6325	0,3617-20,199	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4300	1,5609	
Rangos	0,0606-6,8109	0,0965-19,773	
	miRNA-503		
Características	Baja	Alta	P
Total			
Edad, años (rango)	60 (17-91)	59,5 (20-77)	0,835
≤60	54 (54)	19 (56)	
>60	47 (46)	15 (44)	0,807
Sexo			0,718
Hombre	60 (59)	19 (56)	
Mujer	41 (41)	15 (44)	
Grupo de riesgo citogenético			0,173
Favorable	7 (9)	6 (19)	
Intermedio	61 (78)	19 (61)	
Adverso	10 (13)	6 (19)	
Cariotipo normal	50 (85)	9 (15)	0,001
FAB			0,430

M0	6 (7)	2 (7)	
M1	23 (25)	5 (17)	
M2	22 (24)	10 (35)	
M4	19 (21)	7 (24)	
M5	13 (14)	2 (7)	
M6	5 (6)	2 (7)	
M7	-	-	
Bifenotípica	2 (2)	0	
No clasificada	1 (1)	1 (3)	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,407
Mediana	16,8	21,7	
Rango	0-396	2-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,373
Mediana	54	62	
Rango	6-572	12-242	
Hemoglobina (g/dL)			0,896
Mediana	9,35	9,26	
Rango	4-16,6	6,8-14,2	
PMN			0,439
Mediana	15	22	
Rango	0-88	0-82	
% blastos SP			0,791
Mediana	50	55,5	
Rango	0-100	0-97	
<i>FLT3</i> -ITD			0,191
Positivo	21 (22)	4 (13)	
Negativo	73 (78)	27 (87)	
<i>NPM1</i>			<0,001
Mutado	47 (52)	2 (7)	
Wild-type	44 (48)	28 (93)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,027
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	16 (42)	1 (8)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> pos	2 (5)	1 (8)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> neg	14 (37)	10 (83)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	6 (16)	0	
<i>CEBPA</i>			0,295
Mutado	6 (16)	0	
Wild-type	32 (84)	6 (100)	
<i>FLT3</i> -D835			0,237
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	62 (94)	22 (100)	
miRNA-132			0,018
Mediana	2,1498	3,2865	
Rangos	0,0031-28,29	0,029-25,521	
miRNA-223			0,006
Mediana	1,8066	3,2069	
Rangos	0,3389-46,2729	0,2828-	

		85,423	
miRNA-188			0,088
Mediana	0,9275	1,0785	
Rangos	0,1180-10,539	0,3573-68,768	
miRNA-193			0,004
Mediana	1,0486	1,7791	
Rangos	0,0519-12,60	0,4697-88,059	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,6407	1,2228	
Rangos	0,0791-9,3631	0,4473-14,883	
miRNA-424			<0,001
Mediana	0,2318	0,7983	
Rangos	0,0044-2323,9	0,2759-4,3017	
miRNA-425			0,005
Mediana	0,7091	0,9309	
Rangos	0,0844-4,6981	0,1997-4,2093	
miRNA-500			0,027
Mediana	0,2382	0,3043	
Rangos	0,0316-1,8832	0,1039-8,0846	
miRNA-941			0,002
Mediana	0,6359	1,1455	
Rangos	0,1366-9,8855	0,1231-20,199	
miRNA-1307			0,002
Mediana	0,4342	0,7381	
Rangos	0,0606-14,6722	0,210-19,773	
Características	miRNA-941		P
	Baja	Alta	
Total			
Edad, años (rango)	57 (17-91)	63 (30-76)	0,180
≤60	58 (57)	15 (44)	0,178
>60	43 (43)	19 (56)	
Sexo			0,445
Hombre	61 (60)	18 (53)	
Mujer	40 (40)	16 (47)	
Grupo de riesgo citogenético			0,175

Favorable	12 (15)	1 (3)	
Intermedio	54 (69)	26 (84)	
Adverso	12 (15)	4 (13)	
Cariotipo normal	44 (56)	15 (48)	0,448
FAB			0,236
M0	7 ()	1 ()	
M1	23 ()	5 ()	
M2	19 ()	6 ()	
M4	16 ()	13 ()	
M5	15 ()	5 ()	
M6	6 ()	1 ()	
M7	-	-	
Bifenotípica	1 ()	1 ()	
No clasificada	2 ()	0 ()	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,509
Mediana	15,75	21,4	
Rango	0-396	1-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,234
Mediana	54	60,5	
Rango	6-572	12-336	
Hemoglobina (g/dL)			0,801
Mediana	9,2	9,4	
Rango	4-16,6	5,5-14,2	
PMN			0,762
Mediana	18	15	
Rango	0-88	1-56	
% blastos SP			0,900
Mediana	48	61,5	
Rango	0-100	0-91	
<i>FLT3</i> -ITD			0,412
Positivo	17 (18)	8 (25)	
Negativo	76 (82)	24 (75)	
<i>NPM1</i>			0,214
Mutado	39 (44)	10 (31)	
Wild-type	50 (56)	22 (69)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,082
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	16 (42)	1 (8)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	1 (3)	2 (17)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	17 (45)	7 (58)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	4 (11)	2 (17)	
<i>CEBPA</i>			0,300
Mutado	4 (11)	2 (25)	
Wild-type	32 (89)	6 (75)	
<i>FLT3</i> -D835			0,267
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	64 (94)	20 (100)	

miRNA-132			<0,001
Mediana	2,0036	6,0036	
Rangos	0,0031-28,29	1,0029-25,521	
miRNA-223			<0,001
Mediana	1,9083	4,8041	
Rangos	0,3438-19,181	0,2828-85,423	
miRNA-188			<0,001
Mediana	0,7967	1,9879	
Rangos	0,118-9,8537	0,3306-68,768	
miRNA-193			<0,001
Mediana	0,9365	2,6405	
Rangos	0,0519-17,9755	0,4476-68,059	
miRNA-324			<0,001
Mediana	0,6269	1,4947	
Rangos	0,0791-10,517	0,3046-14,884	
miRNA-424			<0,001
Mediana	0,2407	0,6250	
Rangos	0,0044-1,6654	0,0388-2325,9	
miRNA-425			<0,001
Mediana	0,7788	1,4828	
Rangos	0,0844-2,1397	0,1997-4,6981	
miRNA-500			<0,001
Mediana	0,2067	0,6971	
Rangos	0,0316-1,4668	0,1102-8,0846	
miRNA-503			<0,001
Mediana	0,1251	0,6930	
Rangos	0,0062-5,4107	0,0165-2,659	
miRNA-1307			<0,001
Mediana	0,4289	1,9953	
Rangos	0,0606-2,8898	0,3259-19,773	
Características	miRNA-1307		P
	Baja	Alta	
Total			
Edad, años (rango)	57 (17-91)	63 (30-83)	0,094
≤60	59 (58)	14 (41)	0,081
>60	42 (42)	20 (59)	

Sexo			0,244
Hombre	62 (61)	17 (50)	
Mujer	39 (39)	17 (50)	
Grupo de riesgo citogenético			0,011
Favorable	12 (15)	1 (3)	
Intermedio	51 (66)	29 (94)	
Adverso	15 (19)	1 (3)	
Cariotipo normal	41 (53)	18 (58)	0,603
FAB			0,485
M0	6 ()	2 ()	
M1	22 ()	6 ()	
M2	16 ()	9 ()	
M4	20 ()	9 ()	
M5	14 ()	6 ()	
M6	7 ()	0	
M7	-	-	
Bifenotípica	2 ()	0	
No clasificada	2 ()	0	
Recuento leucocitos ($\times 10^9/L$)			0,331
Mediana	13,85	22,9	
Rango	0-396	1-209	
Recuento plaquetar ($\times 10^9/L$)			0,883
Mediana	55	54	
Rango	7-572	6-336	
Hemoglobina (g/dL)			0,579
Mediana	9,2	9,4	
Rango	4-16,6	5,8-14,2	
PMN			0,534
Mediana	18,5	13,5	
Rango	0-88	1-56	
% blastos SP			0,510
Mediana	55	43	
Rango	0-100	0-91	
<i>FLT3</i> -ITD			0,412
Positivo	17 (18)	8 (25)	
Negativo	76 (82)	24 (75)	
<i>NPM1</i>			0,214
Mutado	39 (44)	10 (31)	
Wild-type	50 (56)	22 (69)	
<i>FLT3</i> -ITD/ <i>NPM1</i> estatus			0,781
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	15 (35)	2 (29)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	2 (5)	1 (14)	
<i>FLT3</i> -ITD neg / <i>NPM1</i> pos	21 (49)	3 (43)	
<i>FLT3</i> -ITD pos / <i>NPM1</i> neg	5 (12)	1 (14)	
<i>CEBPA</i>			0,238
Mutado	4 (11)	2 (29)	
Wild-type	33 (89)	5 (71)	

<i>FLT3-D835</i>			0,353
Positivo	4 (6)	0	
Negativo	69 (94)	15 (100)	
<i>miRNA-132</i>			<0,001
Mediana	1,8445	7,0543	
Rangos	0,0031-13,734	1,2234-28,29	
<i>miRNA-223</i>			<0,001
Mediana	1,9083	4,9324	
Rangos	0,3389-19,181	0,2828-85,423	
<i>miRNA-188</i>			<0,001
Mediana	0,7967	1,7986	
Rangos	0,118-9,8537	0,5586-68,768	
<i>miRNA-193</i>			<0,001
Mediana	0,8615	3,1314	
Rangos	0,0519-17,976	1,2729-68,259	
<i>miRNA-324</i>			<0,001
Mediana	0,6269	1,5643	
Rangos	0,0791-10,517	0,6036-14,884	
<i>miRNA-424</i>			<0,001
Mediana	0,2407	0,7228	
Rangos	0,0044-1,665	0,0879-2325,9	
<i>miRNA-425</i>			<0,001
Mediana	0,6964	1,8012	
Rangos	0,0844-2,1397	0,1997-4,6981	
<i>miRNA-500</i>			<0,001
Mediana	0,2043	0,6521	
Rangos	0,0316-1,4668	0,1858-8,0846	
<i>miRNA-503</i>			<0,001
Mediana	0,1251	0,7278	
Rangos	0,0062-5,4107	0,0248-4,1754	
<i>miRNA-941</i>			<0,001
Mediana	0,5421	2,6773	
Rangos	0,1231-3,0978	0,5525-20,199	