

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA (Q*)

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Medicina

Programa de doctorado 3139 en Medicina



TESIS DOCTORAL

SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) Y DE GENES IMPLICADOS EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL VEGF EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

Presentada por:

María Luisa Calabuig Muñoz

Dirigida por:

Dra. Mar Tormo Díaz

Dr. Carlos Solano Vercet

Valencia, enero 2022

INFORME DE LOS DIRECTORES PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS

Directores:

1.- **Tormo Díaz, Mar.** N.I.F: 74186082L. Departamento: Medicina. Centro: Universidad de Valencia.

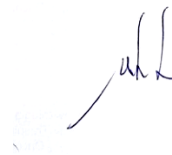
2.- **Solano Vercet, Carlos.** N.I.F: 22628375D. Departamento: Medicina. Centro: Universidad de Valencia.

Como directores de la tesis doctoral “Significado pronóstico de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de genes implicados en las vías de señalización del VEGF en pacientes con leucemia aguda mieloblástica” de D^a Maria Luisa Calabuig Muñoz, estudiante del programa de doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011), de la Universidad de Valencia, emiten informe *favorable* para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 14/01/2022



Firmado: Dra. Mar Tormo Díaz
Directora



Firmado: Dr. Carlos Solano Vercet
Director

ESCUELA DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Esta tesis ha sido realizada dentro del grupo de investigación en neoplasias de la línea mieloide del Instituto de Investigaciones Sanitarias (INCLIVA), en colaboración con el hospital Clínico Universitario de Valencia y el grupo cooperativo de estudio y tratamiento de las leucemias agudas y mielodisplasias (CETLAM), bajo la supervisión del Dr. Vicent Guillem Primo, la Dra. Mar Tormo Díaz y el Dr. Carlos Solano Vercet.

El estudio ha sido financiado gracias a la ayuda concedida al proyecto de investigación en salud PI11/00712 del fondo de investigaciones sanitarias de la acción estratégica en salud del ministerio de ciencia e innovación español.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este proyecto.

A mis directores de tesis, a la Dra. Mar Tormo, por su apoyo y su ayuda durante la realización de este trabajo, por haberme guiado en mi aprendizaje, tanto a asistencial como de investigación, y por tener la suerte de compartir mi labor asistencial diaria con ella. Y al Dr. Carlos Solano, por su ejemplo de dedicación a la hematología y por confiar en mí durante todos estos años.

Al Dr. Vicent Guillem, motor de este proyecto, porque sin él no habría sido posible, y a todas las personas del laboratorio de hematología del hospital Clínico Universitario de Valencia que han colaborado en este trabajo.

A mis compañeros del grupo CETLAM, por su dedicación a nuestra especialidad y por su esfuerzo para que se avance en el estudio de esta enfermedad. Todo un ejemplo de que la unión hace la fuerza. A todos mis compañeros del servicio de Hematología del hospital Clínico Universitario de Valencia, por su apoyo y por su comprensión. Para mí es un orgullo y un honor formar parte de esta gran familia.

También mi agradecimiento para los compañeros del servicio de Oncología del hospital Clínico Universitario de Valencia, con los que he tenido la suerte de compartir muchos años de sesiones, guardias y ordenadores, y de los que he aprendido mucho.

A los pacientes, principio y fin de nuestros proyectos porque, sin su generosidad, no sería posible la investigación. Gracias por enseñarme lo que es importante en la vida y recordarme cada día por qué decidí dedicarme a esta profesión.

A mis familiares y a mis amigos, a los que están y a los que ya no están, por su afecto y por animarme siempre a seguir luchando.

A mis padres, José Ramón y Marisa, por darme la vida, por ser un ejemplo de dedicación a la familia y a la medicina, por intentar mostrarme el mejor camino y alentarme siempre a seguir.

A mis hermanos, Eva y Manu, María y Manel, Ramón, Marta y Alfonso, por el cariño y todos los buenos momentos que vivimos.

A mi marido Salva, mi compañero de viaje y mi sol, por estar siempre a mi lado, por tu comprensión y por animarme cuando llegaba el desaliento.

A mis hijos, Juan y Martina, por ser mi alegría, mi esperanza, mi vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
1. INTRODUCCIÓN.....	25
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	25
1.1.1. Clasificación de las leucemias mieloides agudas	26
1.1.2. Diagnóstico de las leucemias mieloides agudas	29
1.1.2.1. Citomorfología	30
1.1.2.2. Citoquímica	31
1.1.2.3. Citometría de Flujo	31
1.1.2.4. Citogenética.....	32
1.1.2.5. Estudios moleculares.....	33
1.1.2.6. Conservación de muestras biológicas	37
1.1.3. Factores y grupos pronósticos en las leucemias mieloides agudas	38
1.1.3.1. Factores Pronósticos	38
1.1.3.1.1. Relacionados con el paciente.....	38
1.1.3.1.2. Relacionados con la presentación clínica de la LMA	39
1.1.3.1.3. Relacionados con las características genéticas de la LMA	39
1.1.3.1.4. Relacionados con la respuesta y la enfermedad residual medible.....	40
1.1.3.2. Grupos pronósticos	40
1.1.3.2.1. Medical Research Council	41
1.1.3.2.2. European LeukemiaNET	42
1.1.4. Tratamiento de las leucemias mieloides agudas	43
1.1.4.1. Tratamiento de inducción a la remisión	44
1.1.4.2. Tratamiento post-remisión	45
1.1.4.3. Tratamiento de mantenimiento	46
1.2. ANGIOGÉNESIS TUMORAL	46
1.2.1. Angiogénesis y leucemia mieloide aguda	48
1.2.2. Factor de crecimiento vascular endotelial.....	50

1.2.2.1. Ligandos del VEGF.....	50
1.2.2.2. Receptores del VEGF	51
1.2.2.3. Neuropilinas.....	53
1.2.3. Factor de crecimiento vascular endotelial y leucemia mieloide aguda	53
1.2.4. Factor de crecimiento vascular endotelial C.....	56
1.2.5. Terapia antiangiogénica	58
1.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES.....	59
2. HIPÓTESIS.....	65
3. OBJETIVOS	69
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	69
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	69
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
4.1. DISEÑO.....	73
4.2. ÁMBITO	73
4.3. POBLACIÓN.....	73
4.4. MATERIAL.....	73
4.5. MUESTRA	73
4.6. ASPECTOS ÉTICOS	73
4.7. VARIABLES.....	73
4.7.1. Método de recogida.....	73
4.7.2. Variables demográficas	74
4.7.3. Variables clínicas.....	74
4.7.4. Variables de laboratorio.....	74
4.7.5. Variables pronósticas	74
4.8. PROTOCOLO LMA-03	74
4.8.1. Grupos pronósticos.....	74
4.8.2. Tratamiento	75
4.8.3. Evaluación de la respuesta al tratamiento.....	76

4.9. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES.....	76
4.9.1. Extracción de ARN.....	76
4.9.2. Síntesis de ADN complementario.....	77
4.9.3. Cuantificación de la expresión del gen <i>VEGF-C</i>	78
4.9.4. Análisis de genes de las vías de señalización del gen <i>VEGF</i>	79
4.10. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	80
4.10.1. Análisis estadístico.....	80
4.10.1.1. Análisis descriptivo.....	81
4.10.1.2. Análisis de las variables categóricas.....	81
4.10.1.3. Análisis de las variables cuantitativas.....	82
4.10.1.4. Regresión logística.....	83
4.10.1.5. Curvas de Supervivencia.....	83
4.10.2. Representación gráfica.....	83
5. RESULTADOS.....	87
5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	87
5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA LMA.....	87
5.2.1. Datos de laboratorio.....	87
5.2.2. Clasificación FAB/OMS.....	88
5.2.3. Presencia de mielodisplasia.....	91
5.2.4. Estudios citogenéticos.....	91
5.2.5. Estudios moleculares.....	92
5.2.5.1. Estado mutacional de NPM1/FLT3-ITD.....	92
5.2.5.2. Estado mutacional de NPM1/FLT3-ITD en pacientes con cariotipo normal.....	93
5.2.6. Grupos pronósticos.....	93
5.2.7. Tratamiento de la LMA.....	94
5.2.7.1. Quimioterapia.....	94
5.2.7.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	95
5.2.8. Evolución de la LMA.....	96

5.3. EXPRESIÓN DEL <i>VEGF-C</i> EN PACIENTES CON LMA.....	96
5.3.1. Asociación entre los niveles de expresión del <i>VEGF-C</i> y las variables clínicas.....	97
5.3.2. Asociación entre los niveles de expresión del <i>VEGF-C</i> y las variables del laboratorio..	98
5.3.2.1. Asociación entre los niveles de expresión del <i>VEGF-C</i> y la mielodisplasia.....	99
5.3.3. Relación entre los niveles de expresión del <i>VEGF-C</i> y marcadores pronósticos.....	99
5.3.3.1. Marcadores citogenéticos.....	99
5.3.3.2. Marcadores moleculares.....	100
5.3.3.2.1. Estado mutacional de NPM1/FLT3-ITD	102
5.3.3.2.2. Estado mutacional de NPM1/FLT3-ITD en pacientes con cariotipo normal	102
5.3.3.3. Grupos pronósticos.....	103
5.3.4. Relación entre los niveles de expresión del <i>VEGF-C</i> y la respuesta al tratamiento	105
5.4. EXPRESIÓN DEL <i>VEGF-C</i> Y SU CORRELACIÓN CON VARIABLES SIGNIFICATIVAS.....	105
5.4.1. Mielodisplasia	105
5.4.2. Grupos pronósticos.....	105
5.4.3. Marcadores moleculares	106
5.4.4. Análisis multivariable	107
5.5. EXPRESIÓN DEL <i>VEGF-C</i> Y SUPERVIVENCIA.....	107
5.6. EXPRESIÓN DE GENES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL <i>VEGF-C</i>	109
5.6.1. Expresión relativa de los genes de las vías de señalización del <i>VEGF</i>	109
5.6.2. Expresión de los genes de los ligandos del <i>VEGF</i>	109
5.6.3. Correlación de la expresión entre genes de los ligandos del <i>VEGF</i>	110
5.6.4. Correlación de la expresión entre genes de los receptores del <i>VEGF</i>	110
5.6.5. Correlación de la expresión de los genes de la familia <i>VEGF/VEGFR</i>	112
6. DISCUSIÓN	117
7. CONCLUSIONES.....	129
8. ANEXOS.....	133
8.1. Dictamen del CEIm.....	133
8.2. Hoja de información al paciente	134

8.3. Escala <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> (escala ECOG)	141
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Clasificación FAB de las leucemias mieloides agudas</i>	26
Tabla 2: <i>Clasificación OMS 2001 de las LMA</i>	26
Tabla 3: <i>Clasificación OMS 2008 de las LMA y neoplasias relacionadas</i>	27
Tabla 4: <i>Clasificación OMS 2016 de las LMA y neoplasias relacionadas</i>	28
Tabla 5: <i>Pruebas diagnósticas de LMA según ELN 2017</i>	29
Tabla 6: <i>Expresión de marcadores de superficie y citoplasmáticos de la LMA y la LAFM según ELN</i>	31
Tabla 7: <i>Alteraciones citogenéticas en la LMA CRMD (OMS 2016)</i>	32
Tabla 8: <i>Categorías funcionales de los genes recurrentemente mutados en la LMA</i>	35
Tabla 9: <i>Factores pronósticos en la LMA</i>	38
Tabla 10: <i>Grupos de riesgo según la citogenética del MRC (1998)</i>	41
Tabla 11: <i>Grupos de riesgo según la citogenética del MRC (2010)</i>	41
Tabla 12: <i>Estratificación del riesgo según la genética de la ELN (2010)</i>	42
Tabla 13: <i>Estratificación del riesgo según la genética de la ELN (2017)</i>	42
Tabla 14: <i>Potenciales terapias frente a VEGF en pacientes con LMA</i>	59
Tabla 15: <i>Genes de las vías de señalización del VEGF analizados</i>	79
Tabla 16: <i>Variables categóricas analizadas</i>	81
Tabla 17: <i>Variables cuantitativas analizadas</i>	82
Tabla 18: <i>Valores de laboratorio al diagnóstico</i>	87
Tabla 19: <i>Pacientes en cada subgrupo según la clasificación OMS 2001</i>	88
Tabla 20: <i>Pacientes en cada subgrupo según la clasificación OMS 2008</i>	89
Tabla 21: <i>Pacientes en cada subgrupo según la clasificación OMS 2016</i>	89
Tabla 22: <i>Grupos de riesgo según las clasificaciones CELTAM, MRC y ELN2010</i>	94
Tabla 23: <i>Quimioterapia recibida y respuesta alcanzada</i>	95
Tabla 24: <i>Características de los TPH</i>	95
Tabla 25: <i>Relación entre niveles de expresión del VEGF-C y variables categóricas</i>	97
Tabla 26: <i>Relación entre la expresión del VEGF-C y las variables continuas</i>	98
Tabla 27: <i>Expresión del VEGF-C según los marcadores moleculares</i>	100
Tabla 28: <i>Expresión del gen VEGF-C según el estado mutacional en pacientes con cariotipo normal</i>	103
Tabla 29: <i>Expresión del VEGF-C según los grupos pronósticos y las clasificaciones</i>	104
Tabla 30: <i>Regresión logística de los grupos pronósticos en la expresión de VEGF-C</i>	105
Tabla 31: <i>Regresión logística de los marcadores moleculares en la expresión de VEGF-C</i>	106
Tabla 32: <i>Análisis multivariable</i>	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Inestabilidad genómica en la LMA</i>	25
Figura 2: <i>Subclases de LMA según la citogenética y la biología molecular</i>	37
Figura 3: <i>Mecanismos de angiogénesis de las células leucémicas</i>	49
Figura 4: <i>Estructura de los receptores del VEGF</i>	52
Figura 5: <i>Funciones fisiopatológicas del VEGF en el microambiente medular</i>	54
Figura 6: <i>Papel del VEGF en la LMA</i>	55
Figura 7: <i>Separación de las células mononucleadas utilizando Lymphoprep™</i>	77
Figura 8: <i>Síntesis de ADN complementario</i>	78
Figura 9: <i>Pacientes en cada subgrupo según la clasificación FAB</i>	88
Figura 10: <i>Subtipos de LMA más frecuentes de las clasificaciones OMS 2001, 2008 y 2016</i>	90
Figura 11: <i>LMA CRMD según la OMS 2001, 2008 y 2016</i>	91
Figura 12: <i>Representación de los reordenamientos AML1/ETO, CBFβ/MYH11 y MLL</i>	92
Figura 13: <i>Representación de los genes FLT3, NPM1 y CEBPA</i>	92
Figura 14: <i>Estado mutacional de NPM1 y FLT3-ITD con la ratio</i>	93
Figura 15: <i>Grupos de riesgo según las clasificaciones MRC y ELN2010</i>	94
Figura 16: <i>Logaritmo de la expresión del VEGF-C en pacientes con LMA</i>	97
Figura 17: <i>Relación entre la expresión del VEGF-C y la cifra de plaquetas y de LDH</i>	98
Figura 18: <i>Asociación entre la expresión del VEGF-C y la mielodisplasia</i>	99
Figura 19: <i>Asociación entre la expresión del VEGF-C y el cariotipo</i>	100
Figura 20: <i>Expresión del VEGF-C según el gen NPM1</i>	101
Figura 21: <i>Expresión del VEGF-C según el gen CEBPA</i>	101
Figura 22: <i>Expresión del VEGF-C según el estado mutacional de NPM1 y FLT3-ITD</i>	102
Figura 23: <i>Expresión del VEGF-C según los grupos pronósticos de CETLAM</i>	103
Figura 24: <i>Expresión del VEGF-C según los grupos pronósticos del MRC</i>	104
Figura 25: <i>Supervivencia global y libre de evento según la expresión del VEGF-C en toda la serie</i>	108
Figura 26: <i>SG y SLE según la expresión del VEGF-C en los grupos CETLAM y MRC</i>	108
Figura 27: <i>Expresión relativa de 84 genes de señalización del VEGF</i>	109
Figura 28: <i>Correlación y descriptivo de la expresión entre genes de los ligandos del VEGF</i>	110
Figura 29: <i>Correlación y descriptivo de la expresión entre genes de los receptores</i>	111
Figura 30: <i>Correlación y descriptivo de la expresión entre genes de la familia VEGF/VEGFR</i>	112
Figura 31: <i>Correlación de los genes estudiados de la vía de señalización del VEGF</i>	113

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxinucleico complementario o copia.

AEMPS: agencia española de medicamentos y productos sanitarios.

Ara-C: arabinósido de citarabina.

ARN: ácido ribonucleico.

ASLX1: *additional sex combs-like 1*.

bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básicos.

CBF: *core binding factor*.

CEBPA: *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*.

CETLAM: *grup cooperatiu d'estudi i tractament de les leucèmies agudes i mielodisplàssies*.

CFM: citometría de flujo multiparamétrica.

COX-2: ciclooxigenasa-2.

CRMD: cambios relacionados con la mielodisplasia.

CT: *cycle threshold* o ciclo umbral.

ECG: electrocardiograma.

ECOG: *eastern cooperative oncology group*.

ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción.

ELN: *european leukemiaNet*.

EMA: *european medicines agency*.

ERM: enfermedad residual medible.

FAB: clasificación franco-americana-británica.

FDA: *food and drug administration*.

FISH: hibridación *in situ* fluorescente.

FLT3: *FMS-like tyrosine kinase*.

Flt-1: *FMS-related tyrosin kinase 1*.

Flt-4: *FMS-related tyrosine kinase 4*.

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos.

GO: gemtuzumab ozogamicina.

HIF-1: factor inducido por la hipoxia 1.

HLA: *human leukocyte antigen*.

IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina 1.

IL-6: interleucina 6.

ITDs: duplicaciones internas en tándem.

KDR/Flk1: *kinase insert domain receptor/fetal liver kinase 1*.

LAFM: leucemia aguda de fenotipo mixto.

LMA: leucemia mieloide aguda.

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica.

MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógeno.

MO: médula ósea.

MPO: mieloperoxidasa.

MRC: *medical research council*.

MRT: mortalidad relacionada con el tratamiento.

NGS: *next generation sequencing*.

NMP: neoplasia mieloproliferativa.

NPM1: nucleofosmina 1.

NRP: neuropilinas.

OMS: organización mundial de la salud.

PBS: solución salina tamponada con fosfatos.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PIGF: factor de crecimiento de placenta.

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa.

PMNs: polimorfonucleares.

Q: cuartil.

QT: quimioterapia.

RC: remisión completa.

RT: transcripción reversa.

RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

RUNX1: *Runt-related transcription factor 1*.

SCF: factor de células madre.

SEER: programa estadounidense de vigilancia, epidemiología y resultados finales.

SG: supervivencia global.

SLE: supervivencia libre de enfermedad.

SMD: síndrome mielodisplásico.

Taq: *Thermus aquaticus*.

TNF: factor de necrosis tisular.

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

TP53: proteína tumoral p53.

VAFs: alelos variantes frecuentes.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular C.

VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

INTRODUCCIÓN

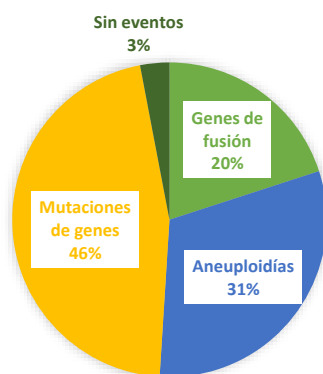
1. INTRODUCCIÓN

1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad maligna que se produce como consecuencia de la expansión clonal de precursores mieloides indiferenciados llamados blastos, que producen una alteración de la hematopoyesis y un fallo medular. Es una enfermedad muy heterogénea en cuanto a la morfología, inmunofenotipo, citogenética y alteraciones moleculares, así como en la respuesta al tratamiento. A pesar de que la mayoría de los pacientes responden al tratamiento de inducción, algunos son refractarios y la recaída es la causa más frecuente de fallo del tratamiento [1].

El desarrollo de una leucemia mieloide aguda se relaciona con la acumulación de alteraciones genéticas adquiridas y cambios epigenéticos en las células progenitoras hematopoyéticas, que alteran los mecanismos normales de crecimiento, proliferación y diferenciación celular. En el estudio inicial de un paciente con sospecha de LMA, es obligatorio realizar un análisis genético puesto que, aproximadamente, un 55% de los pacientes diagnosticados de LMA presentan alteraciones cromosómicas al diagnóstico (2)[3]. Se han detectado numerosas alteraciones estructurales y numéricas que juegan un papel fundamental en la biología de la enfermedad, se asocian a determinados subtipos de LMA y tienen un valor pronóstico independiente en términos de remisión completa, riesgo de recaída y supervivencia global [4][5][6]. El desarrollo de la LMA a partir de mutaciones conductoras adquiridas somáticamente explica la complejidad biológica y clínica de la enfermedad. Además, en el caso de la LMA, ha habido un cambio progresivo desde un esquema de clasificación morfológica a uno genómico cada vez más completo. El estudio de Papaemmanuil *et al.* (2016) en 1540 pacientes con LMA, mostró varios patrones de inestabilidad genómica, un 20% de pacientes con genes de fusión, un 31% con aneuploidías cromosómicas y un 46% sólo con mutaciones en genes (en ausencia de genes de fusión y de aneuploidías cromosómicas) (Figura 1) [7].

Figura 1: *Inestabilidad genómica en la LMA*



La edad mediana de los pacientes diagnosticados de una leucemia aguda es de 60-65 años por lo que, muchos de los pacientes reciben terapias menos intensivas o sólo tratamiento de soporte debido a la alta mortalidad relacionada con la quimioterapia intensiva [8]. La supervivencia global a los 5 años depende, sobre todo, de la edad del paciente y de las alteraciones genéticas detectadas al diagnóstico [3]. La supervivencia libre de enfermedad es del 40-50% en los pacientes menores de 60 años y de tan sólo un 10% en adultos mayores de 60 años [5].

1.1.1. Clasificación de las leucemias mieloides agudas

Existen dos sistemas para clasificar las leucemias mieloides agudas (LMA). El primero de ellos es la clasificación franco-americana-británica (FAB) que fue desarrollada en los años 70 por un grupo de expertos [9]. La clasificación se basaba en la línea celular implicada en la proliferación, el grado de maduración de las células malignas y en las características morfológicas con tinciones panópticas (*May-Grunwald Giemsa* o *Wright*) y citoquímicas (mieloperoxidasa, negro Sudán, esterasas,... etc.) en sangre y médula ósea (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación FAB de las leucemias mieloides agudas

LAM0 (mínimamente diferenciada)
LAM1 (mieloide sin maduración)
LAM2 (mieloide con maduración)
LAM3 (promielocítica)
LAM4 (mielomonocítica)
LAM5 (monocítica)
LAM6 (eritroide)
LAM7 (megacarioblástica)

Ante el aumento de la importancia de las alteraciones citogenéticas, surge la necesidad de desarrollar otro sistema de clasificación, que es el de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Este sistema clasifica las LMA según las características clínicas, biológicas, inmunofenotípicas y genéticas. En 2001 se publicó la tercera edición de la clasificación de tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides de la OMS (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación OMS 2001 de las LMA

LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes: - LMA con t(8;21)(q22;q22), (<i>AML1/ETO</i>) - LMA con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22), (<i>CBFβ/MYH11</i>) - Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); <i>PML/RARα</i> - LMA con 11q23 (<i>MLL</i>)
LMA con displasia multilinea:

<ul style="list-style-type: none"> - Secundaria a un SMD o SMD/NMP - Sin antecedentes de SMD o SMD/NMP pero con displasia, al menos, en el 50% de las células de 2 o más líneas mieloides
<p>LMA relacionadas con la terapia:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Relacionadas con agentes alquilantes o radiación - Relacionadas con inhibidores de topoisomerasa II
<p>LMA no clasificadas en otras categorías:</p> <ul style="list-style-type: none"> - LMA con mínima diferenciación - LMA sin maduración - LMA con maduración - Leucemia mielomonocítica aguda - Leucemia monoblástica/monocítica aguda - Leucemia eritroide aguda: <ul style="list-style-type: none"> • Eritroide/mieloide • Eritroleucemia pura - Leucemia megacarioblástica aguda - Leucemia basofílica aguda - Panmielosis aguda con mielofibrosis
<p>Sarcoma mieloide</p>

SMD: síndrome mielodisplásico. NMP: neoplasia mieloproliferativa.

En la clasificación OMS de 2008 se incluyen subtipos de LMA basados exclusivamente en las alteraciones citogenéticas presentes al diagnóstico y se añaden 2 entidades provisionales con alteraciones moleculares (Tabla 3) [10].

Tabla 3: Clasificación OMS 2008 de las LMA y neoplasias relacionadas

<p>LMA con alteraciones genéticas recurrentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ-MYH11</i> - Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i> - LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> - LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> - LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> - LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> - Entidad provisional: LMA con <i>NPM1</i> mutado - Entidad provisional: LMA con <i>CEBPA</i> mutado
<p>LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia</p>
<p>Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia</p>
<p>LMA no clasificadas en otras categorías:</p> <ul style="list-style-type: none"> - LMA con mínima diferenciación - LMA sin maduración - LMA con maduración - Leucemia mielomonocítica aguda - Leucemia monoblástica/monocítica aguda - Leucemia eritroide aguda: <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia eritroide pura • Eritroleucemia, eritroide/mieloide

- Leucemia megacarioblástica aguda - Leucemia basofílica aguda - Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mielóide
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down: - Mielopoyesis anormal transitoria - Leucemia mielóide asociada con el síndrome de Down
Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas

NPM1: nucleofosmina 1. *CEBPA*: *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*.

El descubrimiento de nuevas mutaciones junto a una mejor comprensión de las alteraciones morfológicas de algunas entidades llevó, en 2016, a la publicación de una actualización de la clasificación de las neoplasias mieloides de la OMS con cambios en algunos de los criterios diagnósticos [11]. En la clasificación de 2016 (Tabla 4) se confirman nuevas categorías que incluyen alteraciones moleculares, como la LMA con *NPM1* mutado y la LMA con mutaciones bialélicas *CEBPA*, y se añaden dos nuevas categorías provisionales, la LMA con reordenamiento *BCR-ABL1* y la LMA con *RUNX1* mutado. Además, se realizan actualizaciones en la nomenclatura de los genes, como la sustitución de *MLL* por *KMT2A*, y se reconoce que la *inv(3)(q21.3q26.2)* o la *t(3;3)(q21.3;q26.2)* no representan un gen de fusión, sino que repositionan un potenciador distal de *GATA2* para activar la expresión de *MECOM* y conferir haploinsuficiencia a *GATA2*.

Tabla 4: Clasificación OMS 2016 de las LMA y neoplasias relacionadas

LMA con alteraciones genéticas recurrentes: - LMA con <i>t(8;21)(q22;q22.1)</i> ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> - LMA con <i>inv(16)(p13.1q22)</i> o <i>t(16;16)(p13.1;q22)</i> ; <i>CBFβ-MYH11</i> - Leucemia promielocítica aguda con <i>PML-RARα</i> - LMA con <i>t(9;11)(p21.3;q23.3)</i> ; <i>MLLT3-KMT2A</i> - LMA con <i>t(6;9)(p23;q34.1)</i> ; <i>DEK-NUP214</i> - LMA con <i>inv(3)(q21.3q26.2)</i> o <i>t(3;3)(q21.3;q26.2)</i> ; <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EVT1)</i> - LMA (megacarioblástica) con <i>t(1;22)(p13.3;q13.3)</i> ; <i>RBM15-MKL1</i> - Entidad provisional: LMA con <i>BCR-ABL1</i> - LMA con <i>NPM1</i> mutado - LMA con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i> - Entidad provisional: LMA con <i>RUNX1</i> mutado
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia

LMA no clasificadas en otras categorías: - LMA con mínima diferenciación - LMA sin maduración - LMA con maduración - Leucemia mielomonocítica aguda - Leucemia monoblástica/monocítica aguda - Leucemia eritroide pura - Leucemia megacarioblástica aguda - Leucemia basofílica aguda - Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down: - Mielopoyesis anormal transitoria - Leucemia mieloide asociada con el síndrome de Down
Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas

En esta nueva clasificación también se incluye una sección de neoplasias mieloides de origen germinal que engloba mutaciones constitucionales que le otorgan al individuo una susceptibilidad al desarrollo de neoplasias hematológicas mieloides. Las neoplasias mieloides de origen germinal son trastornos autosómicos dominantes cuya forma de aparición es muy heterogénea. Son numerosos los genes asociados con la predisposición al desarrollo de neoplasias mieloides pero, cuando se sospecha que un individuo diagnosticado de alguna neoplasia mieloide en la edad adulta tiene una susceptibilidad heredada al desarrollo de neoplasias mieloides, es necesario estudiar, al menos, los genes *CEBPA*, *TP53*, *ANKRD26*, *ETV6*, *RUNX1*, *DDX41* y *GATA2*. Hay pacientes que tienen una clara agregación familiar mientras que otros no presentan antecedentes familiares, bien por la expresividad variable de la enfermedad o porque son eventos *de novo*. En pacientes candidatos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es muy importante la selección cuidadosa de los donantes para evitar la reintroducción de una mutación deletérea en el paciente [12].

1.1.2. Diagnóstico de las leucemias mieloides agudas

Las recomendaciones actuales del consenso internacional de expertos de la *European LeukemiaNet* (ELN) de 2017 destacan la importancia de la integración de los hallazgos obtenidos por diferentes técnicas, que incluyen la citomorfología, la citometría de flujo, la citogenética y los estudios moleculares, para optimizar el manejo clínico de los pacientes. Para establecer el diagnóstico de una leucemia mieloide aguda se requieren las pruebas que se muestran en la Tabla 5 [13].

Tabla 5: *Pruebas diagnósticas de LMA según ELN 2017*

Pruebas para establecer el diagnóstico:
Hemograma
Aspirado de médula ósea (biopsia en caso de aspirado seco)

Pruebas para establecer el diagnóstico:
Inmunofenotipo
Citogenética
Mutaciones genéticas: <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i>
Reordenamientos genéticos: <i>PML-RARα</i> , <i>CBFβ-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , otros.
Pruebas adicionales:
Bioquímica, coagulación y análisis de orina
Test de embarazo (si procede)
Preservación de la fertilidad (si procede)
Estudio HLA y estudio CMV (en pacientes candidatos a trasplante)
Serología vírica: VHA, VHB, VHC e VIH
Rx tórax, ECG y ecocardiograma
Punción lumbar (si procede)
Biobanco

HLA: *human leukocyte antigen*. CMV: citomegalovirus. VHA: virus hepatitis A. VHB: virus hepatitis B. VHC: virus hepatitis C. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. ECG: electrocardiograma.

1.1.2.1. Citomorfología

El diagnóstico de una LMA se establece tras el estudio de sangre periférica y medular donde debe realizarse el conteo de, al menos, 200 células en el frotis de sangre periférica y de 500 células en el aspirado de médula ósea con tinción May-Grünwald-Giemsa. Los mieloblastos, monoblastos y megacarioblastos se incluyen en el conteo de blastos. En el caso de que el aspirado sea seco, se debe realizar una biopsia de médula ósea. El diagnóstico de una LMA se establece cuando hay un porcentaje igual o superior a un 20% de blastos en la médula ósea o, independientemente del número de blastos, si existe una alteración citogenética recurrente como la t(15;17), la t(8;21), la inv(16) o la t(16;16). En la LMA mielomonocítica y en la LMA monocítica, los monoblastos y los promonocitos se cuentan como blastos. En la última clasificación de la OMS 2016, los mieloblastos se contabilizan dentro del porcentaje total de células de la médula ósea. La categoría “leucemia eritroide pura” requiere la presencia de más de un 80% de precursores eritroides inmaduros con $\geq 30\%$ de proeritroblastos [14]. La valoración de la presencia de alteraciones morfológicas celulares o rasgos de mielodisplasia (diseritropoyesis, disgranulopoyesis y distrombopoyesis) es fundamental para la determinar el subtipo de “LMA con cambios relacionados con mielodisplasia” (CRMD), donde se observan rasgos displásicos en dos o más líneas hematopoyéticas.

1.1.2.2. Citoquímica

Para identificar la estirpe de las células malignas se pueden utilizar tinciones citoquímicas como la mieloperoxidasa, el Negro Sudán o las esterasas no específicas. La detección de mieloperoxidasa (MPO) en más de 3% de los blastos indica diferenciación mielóide pero su ausencia no excluye una línea mielóide puesto que los mieloblastos y los monoblastos pueden perderla. El Negro Sudán tiñe igual que la MPO, pero es menos específico. Las esterasas no específicas tiñen de forma difusa el citoplasma de los monoblastos (normalmente, un 80% positivas) y monocitos (normalmente, un 20% positivas). En la leucemia eritroide aguda, la tinción con ácido peryódico de Schiff muestra gránulos gruesos.

1.1.2.3. Citometría de Flujo

El inmunofenotipo se determina mediante citometría de flujo multiparamétrica (normalmente con ≥ 8 colores) y cuantifica los patrones de expresión de diversos antígenos citoplasmáticos y de superficie. El estudio inmunofenotípico al diagnóstico de la LMA permite establecer el linaje de los blastos y detectar fenotipos aberrantes. La población blástica está mejor definida gracias al desarrollo de la citometría de flujo multidimensional y los métodos de análisis por lo que, el clásico punto de corte del 10-20% de células positivas, hoy es menos relevante [15][16]. Actualmente es más importante evaluar el cambio y el patrón de la fluorescencia de toda la población leucémica clonal comparado con la intensidad de la fluorescencia del marcador en células negativas de la misma muestra [17]. Se ha relacionado el tamaño del compartimento leucémico valorado por citometría de flujo con el pronóstico en algunos subtipos de LMA [18]. En la Tabla 6 se muestran los marcadores de superficie y citoplasmáticos recomendados por la ELN para el diagnóstico de las LMA y para la leucemia aguda de fenotipo mixto (LAFM) [13].

Tabla 6: *Expresión de marcadores de superficie y citoplasmáticos de la LMA y la LAFM según ELN*

Diagnóstico de LMA
<u>Precursos</u> *: CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
<u>Marcadores granulocíticos</u> : CD65, MPO citoplasmática
<u>Marcadores monocíticos</u> : CD14, CD36, CD64
<u>Marcadores megacariocíticos</u> : CD41 (glicoproteína IIb/IIIa), CD61 (glicoproteína IIIa)
<u>Marcadores eritroides</u> : CD235a (glicoforina A), CD36
*CD38 y otros marcadores como CD123 o CD133 pueden añadirse para identificar las células blásticas pero no contribuyen al diagnóstico
Diagnóstico LAFM
<u>Linaje mielóide</u> : mieloperoxidasa (por citometría de flujo, inmunohistoquímica, o citoquímica) o diferenciación monocítica (al menos 2 de los siguientes: esterasas no específicas, CD11c, CD14, CD64, lisozima)

Linaje T: CD3 citoplasmático fuerte⁺ (con anticuerpos contra la cadena ϵ de CD3) o CD3 de superficie

Linaje B: CD19 fuerte⁺ con, al menos, 1 de los siguientes con expresión fuerte: CD79a citoplasmático, cCD22, o CD10 o CD19 débil con, al menos, 2 de los siguientes con expresión fuerte: CD79a, cCD22 o CD10

⁺Fuerte: igual o mayor fluorescencia que las células B o T normales de la muestra

La categoría de leucemia aguda de fenotipo mixto, incluye las leucemias con expresión de antígenos de más de un linaje y puede comprender tanto varias poblaciones de blastos de diferentes linajes como una población de blastos con expresión de antígenos de diferentes linajes en una misma célula o una combinación. La detección al diagnóstico de los patrones aberrantes permitirá el seguimiento de la enfermedad residual medible, que es el método utilizado para la detección de la presencia de blastos hasta niveles de 1:10⁴ a 1:10⁶ en pacientes en remisión completa morfológica (<5% de blastos en médula ósea). La enfermedad residual medible es un indicador pronóstico independiente, junto con otros marcadores como la citogenética y la biología molecular, para establecer el riesgo de recaída y es fundamental para la decisión terapéutica [19][20][21].

1.1.2.4. Citogenética

Las alteraciones citogenéticas se detectan en un 55-60% de los pacientes con LMA al diagnóstico [22]. Es necesaria una muestra de aspirado medular con heparina y, siempre que sea posible, se analizarán 20 metafases. El estudio citogenético convencional de los blastos en médula ósea es obligatorio en la evaluación inicial de un paciente con sospecha de leucemia aguda ya que permite detectar alteraciones específicas y establecer el grupo pronóstico. El estudio citogenético y molecular es imprescindible para un correcto diagnóstico de las LMAs de la categoría “LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes” de la clasificación de la OMS. De tal forma que, si existe una alteración citogenética recurrente como la t(15;17), la t(8;21), la inv(16) o la t(16;16), se establece el diagnóstico de LMA independientemente del número de blastos en médula ósea. En el caso de la categoría “LMA con cambios relacionados con mielodisplasia”, la presencia de una serie de alteraciones citogenéticas (Tabla 7) junto a una cifra de blastos $\geq 20\%$, establecen el diagnóstico [11].

Tabla 7: *Alteraciones citogenéticas en la LMA CRMD (OMS 2016)*

Cariotipo complejo	Alteraciones balanceadas	Alteraciones múltiples no balanceadas
≥ 3 alteraciones citogenéticas no incluidas en la categoría “alteraciones citogenéticas recurrentes”	t(11;16)(q23.3;p13.3)	-7 o del(7q)
	t(3;21)(q26.2;q22.1)	-5 o del(5q)
	t(1;3)(p36.3;q21.2)	i(17q) o t(17p)
	t(2;11)(p21;q23.3)	-13 o del(13q)
	t(5;12)(q32;p13.2)	del(11q)

Cariotipo complejo	Alteraciones balanceadas	Alteraciones múltiples no balanceadas
	t(5;7)(q32;q11.2)	del(12p) o t(12p)
	t(5;17)(q32;p13.2)	idic(X)(q13)
	t(5;10)(q32;q21.2)	
	t(3;5) (q25.3;q35.1)	

Existen otros reordenamientos que, aunque se consideran eventos iniciadores de la enfermedad, todavía no están definidos en categorías independientes. Se trata de genes que codifican reguladores epigenéticos (como *KMT2A* [*MLL*], *CREBBP* o *NSD1*) o componentes del complejo de poros nucleares (*NUP98*, *NUP214*). Algunos reordenamientos son citogenéticamente críticos, como la t(5;11)(q35.2;p15.4); *NUP98-NSD1*, que ocurre en el 1% de LAM en adultos jóvenes y predice un mal pronóstico [23]. La citogenética tiene ciertas limitaciones, como las dificultades para conseguir metafases de calidad en algunos pacientes y que no puede identificar genes críticos de fusión. Además, puede estar limitada también en su resolución y no aporta información en los casos con alteraciones genéticas numéricas o estructurales, ni en el 40% de los pacientes con LMA y cariotipo normal [24]. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica citogenética que utiliza fragmentos de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN), sonda marcada con fluorescencia, con el fin de localizar una secuencia complementaria en el ADN de la muestra. Existen varios tipos de sondas, cada una con una función específica según lo que se desee detectar. Se distinguen las sondas centroméricas (que marcan toda la región del centrómero), las sondas de pintado cromosómico (constituidas por una librería de sondas que abarcan todo el cromosoma) y las sondas de secuencia única (locus específico) que marcan regiones cromosómicas muy concretas. Estas sondas emiten una fluorescencia y permiten la visualización, distinción y estudio de los cromosomas, así como de las anomalías que puedan presentar. Esta técnica permite el análisis de células tanto en metafase como en interfase, por lo que supera una limitación importante de la citogenética convencional, la necesidad de obtener las células en metafase. Algunos de los reordenamientos detectados son: *core binding factor* (CBF) mediante sondas para la t(8;21) e inv(16) (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*), genes de fusión *KMT2A* (*MLL*) y *MECOM* (*EVI1*), o pérdida de cromosomas 5q, 7q, o 17p [25].

1.1.2.5. Estudios moleculares

El origen de la LMA es un proceso complejo y dinámico caracterizado por múltiples mutaciones conductoras adquiridas somáticamente, clones competitivos coexistentes y un patrón evolutivo heterogéneo [26]. Algunas alteraciones moleculares no detectables mediante cariotipado (análisis cromosómico) también presentan un fuerte impacto en el pronóstico de la LMA, especialmente en los pacientes de riesgo citogenético intermedio y, sobre todo, en los que presentan un cariotipo normal. Por tanto, los estudios moleculares son una herramienta fundamental para un correcto

diagnóstico, refinar la clasificación pronóstica propuesta por el MRC, basada únicamente en el cariotipo, personalizar el tratamiento y realizar el seguimiento de la LMA [27]. Los primeros marcadores moleculares con reconocido valor pronóstico fueron las mutaciones en el gen *FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)*, en el gen de la nucleofosmina (*NPM1*) y bialélicas en el gen *CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA)*. El diagnóstico molecular requiere la aplicación de diversas técnicas para identificar diferentes biomarcadores moleculares. Los estudios clásicos de biología molecular se fundamentan principalmente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo todas sus variantes, y en la secuenciación Sanger. Sin embargo, el creciente número de determinaciones moleculares identificadas en la LMA plantea nuevos retos en el laboratorio y está suponiendo un cambio metodológico hacia técnicas de alto rendimiento, como la secuenciación masiva (NGS, *next-generation sequencing*), que permiten el análisis simultáneo de numerosos genes y muestras en un único experimento. De la muestra de médula ósea es recomendable criopreservar células tumorales y se debe obtener ADN y ácido ribonucleico (ARN) [14].

Los estudios moleculares al diagnóstico de la LAM deben incluir:

1. Mutaciones en el gen *FLT3*, tanto las duplicaciones internas en tándem [ITDs] y el *ratio* alelo mutado/salvaje como las mutaciones en los codones del dominio de tirosina quinasa D835: la detección de estas mutaciones tiene importancia pronóstica y terapéutica, puesto que los pacientes pueden beneficiarse del tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa.
2. Mutaciones en los genes *NPM1*, *CEBPA* y *RUNX1*, porque definen categorías moleculares en la última revisión de la clasificación de las leucemias agudas de la OMS de 2016 (provisionalmente para *RUNX1*) [11].
3. Mutaciones en los genes *TP53* y *ASXL1*, debido a que se asocian con un mal pronóstico.

El estudio de las mutaciones en los genes de la isocitrato deshidrogenasa 1 (*IDH1*) y 2 (*IDH2*) debería incluirse, aunque no estén incluidas en los grupos pronósticos de la ELN 2017, debido a que se dispone de terapias diana inhibitoras de estas enzimas [28].

Las LMA con *FLT3*-ITD no han sido incluidas como una entidad diferenciada en la última clasificación de la OMS de 2016 pero su condición de factor pronóstico desfavorable ha sido claramente establecido en diversos estudios [29][30][31]. Las LMA con mutación en el gen *NPM1* representan el 30% de las LMA y se asocian con altas tasas de remisión completa con quimioterapia intensiva [32]. Las LMA con mutación bialélica en el gen *CEBPA* se han descrito en el 7-14 % de los casos de LMA *de novo* [33] y, en pacientes con cariotipo normal, la mutación se asocia a un pronóstico favorable [34]. Las LMA con mutaciones en los genes *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53* se han incorporado en la categoría adversa en la última clasificación de riesgo genético de la ELN 2017 [13]. Las mutaciones del gen *Runt-related transcription factor 1 (RUNX1)* ocurren en, aproximadamente, el 5–15% de los pacientes con LMA, sobre todo en los de riesgo intermedio. Es mutuamente excluyente de las mutaciones en *NPM1* y bialélicas en *CEBPA*. Están asociadas a menor tasa de remisiones completas

y a menor supervivencia global [35]. Las mutaciones del gen *Additional sex combs-like 1 (ASXL1)* se detectan en un 10-20% de los pacientes con LMA, especialmente con mielodisplasia y confieren un pronóstico adverso [36]. Las mutaciones del gen de la proteína tumoral p53 (*TP53*) se asocian a cariotipos complejos, cariotipos monosómicos y aneuploidías (Ej., 25/5q2, 27/7q2), y tienen un pronóstico muy desfavorable. Se ha avanzado mucho en el estudio de la función supresora tumoral de la proteína p53 para poder entender el papel de las mutaciones *TP53* y se están estudiando nuevas terapias y combinaciones que podrían mejorar los resultados de los pacientes con esta mutación [37]. El impacto pronóstico de algunos de estos marcadores moleculares puede modificarse dependiendo de la presencia o ausencia de otro marcador [38] como, por ejemplo, la mutación *NPM1* es un marcador de buen pronóstico en ausencia de la mutación *FLT3-ITD* o cuando *FLT3-ITD* tiene un *ratio* inferior a 0,5 [39]. Las mutaciones *IDH1* e *IDH2* se detectan en 6–10% y 9–13% de pacientes con LMA, respectivamente. El valor pronóstico de estas mutaciones en la LMA todavía no está claro [40].

Se han realizado numerosos estudios de mutaciones en otros genes, como *WT1* [41], *KIT* [42], *DNMT3A* [43], *TET2* [44] o *NRAS* [45] pero no existe de momento suficiente evidencia para incorporarlos como marcadores pronósticos.

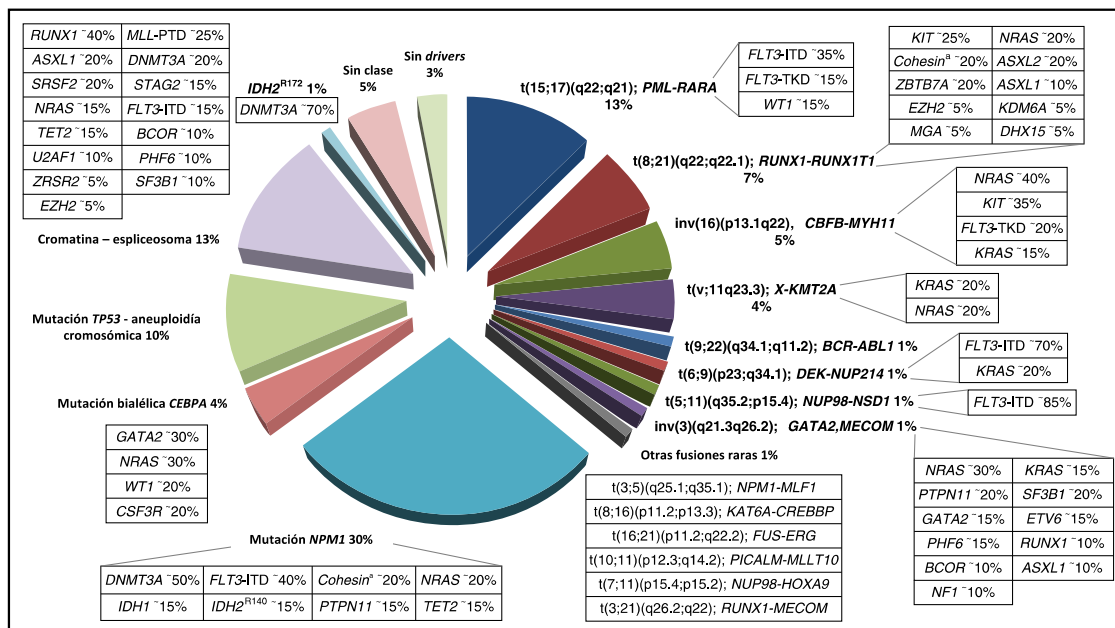
Los genes recurrentemente mutados en la LMA pueden ser organizados en categorías funcionales atendiendo a las funciones celulares que se ven afectadas por dichas alteraciones (Tabla 8) [46].

Tabla 8: *Categorías funcionales de los genes recurrentemente mutados en la LMA*

Categoría funcional	Genes implicados	Frecuencia (%)
Genes activadores de señales	<i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , otras tirosinas quinazas, serina-treonina-quinazas, <i>KRAS/NRAS</i> , <i>PTP</i>	59
Genes relacionados con la metilación del ADN	<i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>TET1</i> , <i>TET2</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i>	44
Mutaciones de factores de transcripción	<i>RUNX1</i> , <i>CEBPA</i> , otros	30
Nucleofosmina	<i>NPM1</i>	27
Genes modificadores de cromatina	Fusiones <i>MLL-X</i> , <i>MLL-PTD</i> , <i>NUP98-NSD1</i> , <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , <i>KDM6A</i> , otros	22
Fusiones de factores de transcripción	<i>PML-RARα</i> , <i>CBFβ-MYH1</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	18
Genes supresores de tumores	<i>TP53</i> , <i>WT1</i> , <i>PHF6</i>	16
Genes del empalmosoma	<i>U2AF1</i> , <i>U2AF2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>SRSF6</i> , <i>SF3B1</i> , <i>HNRNPK</i> , otros	14
Genes del complejo cohesina	<i>SMC1A</i> , <i>SMC3</i> , <i>SMC5</i> , <i>STAG2</i> , <i>RAD21</i>	13

Metzeler *et al.* (2016) encontraron que, con frecuencia, las mutaciones en los modificadores epigenéticos *DNMT3A*, *TET2* y *IDH2* tienen alelos variantes frecuentes (*VAFs*) cerca del 50% que están presentes en la gran mayoría de las células. Sin embargo, la activación de las mutaciones en los genes de las vías de señalización del factor de crecimiento, tales como *FLT3*, *KIT*, *NRAS* y *KRAS*, tenían *VAFs* más bajos [47]. Estos hallazgos sugieren que algunas mutaciones son eventos tempranos o iniciadores en las células preleucémicas y fases tempranas de la leucemogénesis, como *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, mientras que otras se desarrollan posteriormente en subconjuntos de la leucemia de acuerdo con la evolución clonal. En individuos sanos se sabe que, con la edad, las células madre hematopoyéticas adquieren mutaciones somáticas recurrentes frecuentes en genes reguladores epigenéticos (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*) y, menos frecuentemente, en los relacionados con el empalme (*splicing*), como *SF3B1* o *SRSF2*. El concepto de hematopoyesis clonal de potencial indeterminado se ha utilizado para describir a los individuos con una mutación somática en médula ósea o sangre periférica, pero sin otros criterios diagnósticos de una enfermedad hematológica maligna [48]. Adamia *et al.* (2014) encontraron que, en los pacientes con LMA, aproximadamente el 29% de los genes expresados en todo el genoma presentaban alteraciones del *splicing* de forma recurrente, a diferencia de las células CD34 positivas de médula ósea de donantes sanos [49]. En su serie, los genes encargados de regular el *splicing* que más frecuentemente se encontraban alterados (en más del 70% de los pacientes con LMA) fueron *NOTCH2* y *FLT3*, que codifican las proteínas de superficie de las células mieloides [50]. En la Figura 2 se muestra la frecuencia de las distintas alteraciones citogenéticas y moleculares que presentan los pacientes adultos con LMA de hasta 65 años, según las bases de datos de los grupos cooperativos *British Medical Research Council* (MRC) [51][52], *German-Austrian AML Study Group* (AMLSG) [7], y de otros estudios [53][54].

Figura 2: Subclases de LMA según la citogenética y la biología molecular



Nota. Adaptado de “Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel” (p. 428), por H. Döhner, 2017, *Blood*, 129(4) [14]

Jongen-Lavrencic *et al.* (2018), realizaron estudios de secuenciación de nueva generación en 482 pacientes con LAM y observaron que el 89,2% presentaban, al menos, una mutación al diagnóstico y que, en el 51,4%, las mutaciones persistían a pesar de la remisión completa tras la quimioterapia de inducción. El análisis multivariante confirmó que la persistencia de mutaciones que no fueran *DNMT3A*, *TET2* o *ASXL1* (que se encuentran a menudo en personas con hematopoyesis clonal relacionada con la edad) tras la remisión completa, tenía un valor pronóstico independiente en cuanto a la tasa de recaída, supervivencia libre de recaída y supervivencia global [55].

1.1.2.6. Conservación de muestras biológicas

Al diagnóstico de la LMA es recomendable criopreservar células tumorales de médula ósea y/o sangre periférica en el biobanco, previa obtención del consentimiento informado del paciente. Las muestras a conservar deben incluir ácidos nucleicos (ADN y ARN almacenados a una temperatura de -80°C), células viables (conservadas a -196°), muestras de plasma y *pellets* de células fijadas en metanol/ácido acético de los estudios citogenéticos así como de células congeladas. Se puede analizar el ADN de línea germinal en muestras de raspado bucal y de esputo, pero se recomienda su obtención tras la remisión para evitar la contaminación por células leucémicas. Los fibroblastos cutáneos son la fuente de tejido preferida [14].

1.1.3. Factores y grupos pronósticos en las leucemias mieloides agudas

1.1.3.1. Factores Pronósticos

La identificación de diferentes factores pronósticos en la LMA ha permitido individualizar y ajustar la intensidad de los tratamientos, aumentando la supervivencia de los pacientes. Existen variables demográficas, clínicas y del tratamiento, junto con variables genéticas y moleculares, que pueden predecir la supervivencia libre de evento y la supervivencia global [7][26][56]. En la Tabla 9 se muestran los factores pronósticos más importantes de mortalidad precoz, de resistencia al tratamiento y de recaída.

Tabla 9: Factores pronósticos en la LMA

Mortalidad precoz	Resistencia al tratamiento	Recaída
Edad >55-60 años	Cariotipo adverso	Edad > 60 años
Mal estado general (ECOG \geq 2)	Mutación <i>FLT3</i> -ITD	Leucocitosis al diagnóstico
Comorbilidades	LMA secundaria (SMD, NMP)	Riesgo adverso (ELN 2017)
Leucocitosis al diagnóstico		Ausencia RC tras 1ª Inducción
Fiebre al diagnóstico		Enfermedad residual medible*
Creatinina >1,2 mg/dl		
Albúmina <3,5 mg/dl		

SMD: síndrome mielodisplásico. NMP: neoplasia mieloproliferativa. RC: remisión completa.

*por citometría o PCR tras inducción y/o consolidación

Las principales variables clínicas y biológicas consideradas como factores pronósticos a tener en cuenta para un adecuado abordaje del paciente con LMA son:

1. Factores relacionados con el paciente.
2. Factores relacionados con la presentación clínica de la leucemia.
3. Factores relacionados con las características citogenéticas y moleculares de la LMA.
4. Factores relacionados con la respuesta al tratamiento de inducción y monitorización de la enfermedad residual medible.

A pesar de todos estos factores pronósticos conocidos, sólo en el 75-80% de los casos se puede predecir la duración de la remisión o la supervivencia, por lo que, es necesario identificar nuevos factores pronósticos tanto al diagnóstico como tras el tratamiento.

1.1.3.1.1. Relacionados con el paciente

La edad, el estado general y las comorbilidades del paciente al diagnóstico de la LMA son de gran importancia y están relacionados entre sí [57]. Los pacientes jóvenes tienen más probabilidades de alcanzar una remisión completa porque la mortalidad en inducción y durante el tratamiento post-remisión es menor. La edad avanzada es un factor independiente de pronóstico desfavorable [58] y se asocia más frecuentemente a cariotipos complejos y a leucemias secundarias al tratamiento con

quimioterapia o radioterapia, o a síndromes mielodisplásicos o neoplasias mieloproliferativas [59]. Los pacientes mayores presentan más resistencia a la quimioterapia y la aplasia post-tratamiento suele ser más prolongada, lo que favorece las complicaciones infecciosas graves. Además, determinados biomarcadores pueden tener un impacto pronóstico diferente dependiendo de la edad, como el estado mutacional de *NPM1* y de *FLT3* [60]. A pesar de todo esto, el efecto deletéreo del incremento de la edad puede venir modulado por el estado general y las comorbilidades del paciente, modificando la tolerancia a la quimioterapia intensiva por lo que, la edad no debe ser el único determinante en la decisión terapéutica [61].

1.1.3.1.2. Relacionados con la presentación clínica de la LMA

Las LMA secundarias a hemopatías previas, como los síndromes mielodisplásicos o las neoplasias mieloproliferativas, así como las LMA con alteraciones genéticas asociadas a displasia redefinidas por la clasificación OMS 2016 y las relacionadas con terapia previa (quimioterapia o radioterapia), conllevan una tasa mayor de resistencia al tratamiento [62][63]. El mal pronóstico de las LMA secundarias viene dado, en muchos casos, por su asociación a alteraciones citogenéticas de mal pronóstico, como las anomalías de los cromosomas 5 y 7 en pacientes previamente tratados con alquilantes, o las deleciones del brazo largo del cromosoma 11, en pacientes tratados con inhibidores de la topoisomerasa II [64]. Otros factores relacionados con la presentación clínica de la leucemia son la leucocitosis y la infiltración extramedular, asociadas a una mayor mortalidad precoz y a un aumento del riesgo de recaída [65][66].

1.1.3.1.3. Relacionados con las características genéticas de la LMA

Las características genéticas (citogenéticas y moleculares) de la LMA han sido incorporadas a la práctica clínica habitual puesto que constituyen el factor con mayor impacto pronóstico, especialmente en los pacientes jóvenes candidatos a terapia intensiva [7]. Las últimas recomendaciones del grupo de expertos de la ELN 2017 establecen tres grupos pronósticos, favorable, intermedio y adverso en función de las alteraciones genéticas al diagnóstico [13]. Hasta hace unos años, la citogenética era considerada el factor pronóstico más importante en los pacientes con LMA, sin embargo, entre un 40 - 50% de los pacientes con LMA carecen de alteraciones citogenéticas detectables [2][8]. Los pacientes con citogenética normal se agrupan en el grupo de riesgo citogenético intermedio constituyendo un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista pronóstico, con peor pronóstico que los de riesgo favorable pero mejor que los de riesgo desfavorable. Los resultados de este subgrupo de riesgo intermedio varían en los estudios con tasas de respuestas a los 5 años entre 24-42% [2][67], probablemente porque presentan alteraciones a nivel molecular que les conferían un pronóstico diferente. Posteriormente se han descubierto diferentes marcadores moleculares (mutaciones, alteraciones en miRNA o alteraciones en perfiles de expresión génica) que permiten distinguir diferentes grupos de riesgo entre los pacientes con citogenética normal, y que determinan el pronóstico y la elección del tratamiento de este subgrupo de pacientes

[7][26][56]. En el año 2008 se publicó el primer caso de secuenciación genómica completa de un caso de LMA con cariotipo normal, evidenciando mutaciones en *NPM1* y *FLT3* así como otras ocho nuevas mutaciones [68]. Algunas de estas mutaciones recurrentes con significado pronóstico establecido en las LMA son: las duplicaciones en tándem en el gen *FLT3* (*FLT3-ITD*) [69], las mutaciones en el gen *NPM1* (35), en el gen *CEBPA* [70], en el gen *RUNX1*, en el gen *TP53* y en el gen *ASXL1* [7](37). La identificación de estas alteraciones moleculares ha permitido, además, comprender algunos mecanismos de leucemogénesis y descubrir nuevas dianas terapéuticas pero, a pesar de estos marcadores pronósticos, sigue habiendo un subgrupo de pacientes con citogenética normal que no presenta ninguna de estas alteraciones molecular y cuyo pronóstico es incierto [71].

1.1.3.1.4. Relacionados con la respuesta y la enfermedad residual medible

Tras la quimioterapia de inducción se realiza una evaluación de la respuesta y, la ausencia de remisión completa se considera un factor de riesgo adverso con independencia de otros factores [72]. La monitorización de la enfermedad residual medible (ERM) permite valorar la respuesta tras la quimioterapia de inducción y de consolidación o la presencia de una recaída de la enfermedad. El estudio debe realizarse post-inducción, durante y tras la consolidación (incluyendo pre-TPH) y el seguimiento para determinar la cinética de respuesta, la calidad de la remisión y para tratar de detectar una recaída inminente [73]. El estudio de ERM puede ser medido mediante citometría de flujo multiparamétrica (CFM) o por técnicas moleculares incluyendo PCR cuantitativa (RT-qPCR) y la PCR digital, para detección de transcritos de fusión específicos y de *NPM1*. Cada uno de estos métodos difiere en la sensibilidad y en la proporción de pacientes a los que se les puede realizar. La valoración de la remisión por CFM se puede utilizar hasta en el 90% de los pacientes y es más sensible que la citomorfología convencional, aunque menos que otras técnicas. Es un factor pronóstico independiente que proporciona información sobre la profundidad de la respuesta y sobre la estratificación de riesgo [74][75]. Las técnicas moleculares permiten monitorizar hasta a un 60% de los pacientes adultos jóvenes con LMA con marcadores moleculares como la mutación *NPM1* y los genes de fusión *PML-RAR α* , *CBF β -MYH1* y *RUNX1-RUNX1T1* [76], siendo diferente la cinética de respuesta al tratamiento de cada marcador [77]. Sin embargo, estos estudios sólo se pueden realizar en aquellos pacientes que tengan alteraciones genéticas específicas. Con la introducción de la NGS se pueden detectar marcadores moleculares en la mayoría de los pacientes y realizar el seguimiento de la ERM, aunque esta técnica aún se encuentran en investigación [78].

1.1.3.2. Grupos pronósticos

Los resultados de los estudios citogenéticos y moleculares han permitido establecer unos grupos de riesgo de recaída.

1.1.3.2.1. Medical Research Council

El *Medical Research Council* (MRC) del Reino Unido establece en 1998 tres categorías de riesgo citogenético, favorable, intermedia y desfavorable (Tabla 10) tras el estudio de 1966 pacientes con LMA de hasta 55 años de edad [79].

Tabla 10: Grupos de riesgo según la citogenética del MRC (1998)

Grupo de riesgo	Alteración citogenética
Favorable	t(15;17)* t(8;21)* inv(16) / t(16;16) / del(16q)* *con o sin alteraciones secundarias
Intermedio	Normal Alteraciones 11q23, +8, del(9q), del(7q), +21, +22 Todas las demás
Desfavorable	del(5q)/-5 -7 Alteraciones 3q t(9;22) t(6;9) Cariotipos complejos (≥ 5 alteraciones)

Posteriormente, en 2010, la MRC analiza los datos citogenéticos de 5876 pacientes con LMA mayores de 44 años y distingue tres grupos de riesgo, favorable, intermedio y adverso (Tabla 11) [80].

Tabla 11: Grupos de riesgo según la citogenética del MRC (2010)

Grupo de riesgo	Alteración citogenética
Favorable	t(15;17)(q22;q21)* t(8;21)(q22;q22)* inv(16)(p13q22) / t(16;16)(p13;q22)* *Independientemente de las anomalías citogenéticas adicionales
Intermedio	Entidades no clasificadas como favorables o adversas
Adverso	Abn(3q) [excluyendo t(3;5)(q21~25;q31~35)] inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) add(5q), del(5q), -5 -7, add(7q)/del(7q) 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) Cariotipo complejo (≥ 4 alteraciones)

1.1.3.2.2. *European LeukemiaNET*

Una de las clasificaciones más utilizadas es la del grupo de expertos de la *European LeukemiaNET* (ELN) que, en 2010, establece cuatro categorías de riesgo o grupos pronósticos, favorable, intermedio-I, intermedio-II y adverso, según los marcadores genéticos al diagnóstico de la LMA (Tabla 12) [81].

Tabla 12: Estratificación del riesgo según la genética de la ELN (2010)

Categoría de riesgo	Alteración genética
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22) <i>CBFβ-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal) <i>CEBPA</i> mutado (cariotipo normal)
Intermedio-I	<i>NPM1</i> mutado con <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal) <i>NPM1</i> no mutado con <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal) <i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> (cariotipo normal)
Intermedio-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o desfavorables
Desfavorable	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); reordenamiento de <i>MLL</i> -5 o del(5q) -7; abnl(17p) cariotipo complejo (≥3 alteraciones*)

*En ausencia de una de las traslocaciones o inversiones recurrentes designadas por la OMS [t(15;17), t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) o t(3;3)].

En el año 2017 se publica una nueva estratificación de riesgo genético de la *European LeukemiaNET* [13] con tres grupos pronósticos genéticos: favorable, intermedio y adverso (Tabla 13).

Tabla 13: Estratificación del riesgo según la genética de la ELN (2017)

Categoría de riesgo	Alteración genética
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> ^{bajo} * <i>CEBPA</i> mutado bialélico
Intermedio	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> ^{alto} * <i>NPM1</i> no mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> ^{bajo} * (sin lesiones genéticas de pronóstico adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ⁺ Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas

Categoría de riesgo	Alteración genética
Adverso	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); reordenamiento <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i> -5 o del(5q); -7; -17/abn(17p) Cariotipo complejo [^] , cariotipo monosómico [#] <i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> ^{alto*} <i>RUNX1</i> mutado [@] <i>ASXL1</i> mutado [@] <i>TP53</i> mutado

*Ratio alélico bajo <0,5. Ratio alélico alto ≥0,5.

+La presencia de la t(9;11)(p21.3;q23.3) tiene mayor valor en el caso (infrecuente) de que concorra con mutaciones genéticas de riesgo adverso.

[^]Tres o más alteraciones cromosómica en ausencia de una de las siguientes: t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) o t(3;3); LMA con BCR-ABL1.

[#]Presencia de una monosomía (excepto -X y -Y) asociada a otra monosomía adicional o a una alteración cromosómica estructural (excepto LMA CBF).

[@]Estos marcadores no se consideran de pronóstico adverso si se asocian a subtipos LMA de pronóstico favorable.

En esta nueva clasificación se establecen sólo tres grupos tras el estudio de Mrózek *et al.* (2012), donde los resultados en los pacientes mayores de 60 años, que son la mayoría de casos de LMA, eran similares en los grupos de riesgo genético intermedio-I e intermedio-II de la clasificación de 2010 [82]. En los pacientes con menos de 60 años, el grupo intermedio-II tuvo una mayor supervivencia global respecto al grupo intermedio-I pero sin diferencias en cuanto a la tasa de remisiones completas y de supervivencia libre de enfermedad. Esta es la clasificación que se utiliza actualmente.

Tras el análisis de la bibliografía científica y el estado actual de los conocimientos sobre la leucemia mieloide aguda se puede concluir que el pronóstico de esta enfermedad viene determinado por las características genéticas al diagnóstico y la respuesta al tratamiento recibido. Pero, a pesar de los estudios realizados, queda un subgrupo de pacientes que no muestran o no se detectan alteraciones citogenéticas o moleculares al diagnóstico y cuya evolución es muy heterogénea. Por ello, es necesario identificar nuevos factores clínicos o biológicos en estos pacientes que nos permitan realizar una clasificación pronóstica más precisa según el riesgo de recaída, personalizar el tratamiento con nuevas dianas terapéuticas, reducir su toxicidad, y realizar un seguimiento estrecho de la enfermedad residual medible.

1.1.4. Tratamiento de las leucemias mieloides agudas

Durante cuarenta años el tratamiento de la LMA no experimentó cambios y el debate terapéutico se centraba únicamente en la intensidad de las dosis de los fármacos. Sin embargo, en los últimos años estamos asistiendo a un cambio sin precedentes en el manejo y en el tratamiento de los pacientes con LMA debido a la importancia de la identificación de las alteraciones genéticas al diagnóstico, a la disponibilidad de nuevos fármacos, algunos de ellos dirigidos frente a determinadas alteraciones

genéticas, y a la posibilidad de realizar un tratamiento post-remisión adaptado al riesgo y guiado por la monitorización de ERM [83]. La primera consideración tras el diagnóstico de la LMA en el paciente joven es evaluar si es candidato o no a recibir quimioterapia. El tratamiento estándar de los pacientes candidatos a recibir terapia intensiva consiste en una quimioterapia de inducción a la remisión seguida y, en caso de remisión completa, de un tratamiento post-remisión. El tratamiento post-remisión consiste en uno o varios ciclos de quimioterapia seguidos, en algunos casos, de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). El TPH alogénico es la mejor opción para prevenir la recaída de la leucemia, pero se asocia con una alta morbilidad y mortalidad relacionada con el procedimiento, sobre todo en pacientes mayores. Por lo tanto, en los pacientes candidatos a trasplante, hay que valorar el riesgo/beneficio del procedimiento.

1.1.4.1. Tratamiento de inducción a la remisión

El tratamiento estándar de inducción a la remisión consiste en una infusión continua de citarabina con una antraciclina. La expresión “3 + 7” hace referencia a esta combinación de una antraciclina (idarubicina 12 mg/m² o daunorubicina 45 mg/m²) durante 3 días con citarabina o arabinósido de citarabina (Ara-C 100-200 mg/m² en infusión continua) durante 7 días. Esta combinación fue establecida por el *Cancer and Leukemia Group B* en 1981 tras demostrar que era mejor que administrar 2 días de daunorubicina y 5 días de citarabina [84] y que, administrar la citarabina durante 10 días, no mejoraba los resultados con respecto a 7 días [85]. Respecto a la utilización de idarubicina o daunorubicina, una revisión sistemática de los principales estudios mostró una mayor eficacia con el esquema con idarubicina, incluso a pesar de aumentar la dosis de daunorubicina. La supervivencia global y la tasa de remisión completa fue mayor en los pacientes que recibieron idarubicina [86]. Se han realizados diversos estudios con la intención de mejorar los resultados de esta combinación, como la utilización de otras antraciclinas, como mitoxantrone o doxorubicina [87], pero no han mejorado los resultados en cuanto a tasa de respuestas completas o de supervivencia. Otra estrategia ha sido aumentar la dosis de los fármacos. En un estudio del ECOG, se comparó la dosis estándar de daunorubicina de 45 mg frente a 90 mg con un aumento de la tasa de remisiones completas en el subgrupo de pacientes con edad inferior a 50 años y una mayor supervivencia global en el grupo de pacientes de riesgo citogenético favorable e intermedio, presentando una tasa de efectos adversos similar [88]. En el grupo de pacientes de 60 - 65 años también se ha estudiado este aumento de dosis, alcanzando una tasa de remisiones completas mayor con daunorubicina 90 mg sin aumento de la toxicidad hematológica [89]. La dosis de daunorubicina de 60 mg parece que produce el mismo beneficio que la de 90 mg/m² según el ensayo AML17 del Instituto Nacional de Investigación en Cáncer del Reino Unido con 1206 adultos donde no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la tasa de remisión completa y de supervivencia global [90]. El aumento de la dosis de Ara-C se ha asociado a mayor toxicidad sin mayores tasas de remisión completa ni supervivencia [91][92]. Se han realizado varios estudios añadiendo un tercer fármaco al esquema

clásico de “3 + 7”. El gemtuzumab ozogamicina (GO) es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD33 unido covalentemente al agente citotóxico N-acetil-gamma-calicheamicina. En el subgrupo de riesgo citogenético favorable e intermedio se recomienda añadir GO a la terapia estándar de primera línea tras los resultados de cinco ensayos clínicos randomizados que mostraron una mejoría de la supervivencia global a los 5 años en un 20% así como un menor número de recaídas [93]. El estudio RATIFY mostró que el empleo de midostaurina, un fármaco inhibidor de *FLT3* de primera generación, asociado a la quimioterapia de inducción en pacientes hasta 60 años con LMA con la mutación *FLT3*, presentaba una ventaja en términos de supervivencia global frente a placebo [94]. Dicho estudio llevó a la aprobación por las agencias reguladoras de la indicación del fármaco en primera línea en el subgrupo de pacientes con esta mutación. Actualmente están en estudio otros fármacos inhibidores de *FLT3* de segunda generación (quizartinib, gilteritinib, crenolanib) en combinación con quimioterapia de primera línea dentro de ensayos clínicos. Las LMA secundarias a SMD/NMP y las LMA no CBF relacionadas con la terapia o con alteraciones genéticas relacionadas con mielodisplasia pueden beneficiarse del uso de CPX-351, una formulación liposómica de una combinación fija de daunorubicina y citarabina con relación molar 1:5. Este fármaco consigue tasas de remisión y supervivencia global superiores a la terapia estándar en pacientes mayores de 60 años candidatos a quimioterapia [95]. Por tanto, aunque el esquema clásico “3 + 7” sigue siendo el tratamiento estándar de inducción a la remisión, según las características genético-moleculares de la LMA, se pueden incorporar nuevos agentes terapéuticos [96]. Es fundamental disponer de los resultados iniciales de estos estudios en el mínimo tiempo posible para individualizar el tratamiento y optimizar los algoritmos adaptados al riesgo. Los avances en el tratamiento de soporte, la profilaxis y el tratamiento antiinfeccioso, así como una mejor selección y cuidados del paciente en el TPH han mejorado también los resultados del tratamiento de la LMA. Con el esquema estándar, el 60-80% de los pacientes jóvenes y el 40-60% de los pacientes mayores de 60 años alcanzan una remisión completa con una supervivencia global a largo plazo del 40% y del 20%, respectivamente [97].

1.1.4.2. Tratamiento post-remisión

Una vez obtenida la remisión completa se administra un tratamiento post-remisión adaptado al riesgo de recaída de la leucemia. El tratamiento post-remisión consiste en la administración de uno o varios ciclos de Ara-C a dosis intermedias o altas seguidos o no de un TPH. En este momento del tratamiento es fundamental valorar la mortalidad relacionada con el tratamiento (MRT) que conlleva el tratamiento terapéutico [98] y monitorizar la ERM [73]. En los pacientes con LMA CBF se recomienda dar una dosis única de GO a 3 mg/m² el primer día de cada ciclo de consolidación, siempre teniendo en cuenta la toxicidad previa del fármaco. Los pacientes con LMA y la mutación *FLT3* que recibieron tratamiento con midostaurina durante la inducción, lo recibirán durante 14 días en cada ciclo de consolidación y tras finalizar la quimioterapia.

Los pacientes con LMA de riesgo genético favorable según clasificación ELN 2017 recibirán quimioterapia, 1-3 ciclos de consolidación con Ara-C a altas dosis o a dosis intermedias, ajustando según la toxicidad en ciclos previos. Los pacientes que presenten una ERM negativa tras el segundo ciclo de consolidación pueden completar un total de 3 ciclos o sustituir el último ciclo por un TPH autólogo. En el caso de que persista una ERM positiva tras la segunda consolidación o que reaparezca una ERM positiva (recaída molecular) medida mediante RT-qPCR de los reordenamientos CBF o de *NPM1*, pasarán a ser considerados pacientes de alto riesgo.

Los pacientes con LMA de riesgo genético intermedio según clasificación ELN 2017 con ERM negativa recibirán, tras 1-2 ciclos de consolidación con Ara-C a altas dosis, una intensificación del tratamiento con un TPH autólogo o alogénico (según disponibilidad de un donante idéntico y la estimación de bajo riesgo de MRT). En los pacientes con ERM positiva por CFM o RT-qPCR, recibirán un TPH alogénico precedido o no de un tratamiento de reinducción.

Los pacientes con LMA de riesgo genético desfavorable según clasificación ELN 2017, aquellos con LMA de riesgo genético favorable o intermedio que hayan requerido dos o más ciclos de quimioterapia para alcanzar la remisión y los pacientes con LMA secundarias, deben ser considerados candidatos a la realización de un TPH alogénico en primera remisión completa, independientemente del tipo de donante que dispongan. La incidencia de recaída sin el TPH en este grupo de alto riesgo se sitúa alrededor del 45-55% [99]. La monitorización de la ERM tras el TPH es muy importante porque se pueden emplear terapias preventivas o anticipadas, como la infusión de linfocitos de donante y/o la suspensión precoz del tratamiento inmunosupresor [100].

1.1.4.3. Tratamiento de mantenimiento

Se ha estudiado el efecto de la terapia de mantenimiento para evitar las recaídas pero, de momento, no forma parte del tratamiento estándar de la LMA fuera de los ensayos clínicos. El sorafenib es el único fármaco que ha mostrado eficacia post-TPH en un estudio fase 2 randomizado frente a placebo en pacientes con LMA y mutación *FLT3-ITD* donde se observó una reducción del riesgo de recaída y de muerte [101]. También en un estudio fase 3 se demostró una menor incidencia acumulada de recaída al año del TPH en el grupo de tratamiento con sorafenib [102]. Otros fármacos en estudio para el tratamiento de mantenimiento son la midostaurina [103][104] y la azacitidina [105][106].

1.2. ANGIOGÉNESIS TUMORAL

La angiogénesis o formación de vasos sanguíneos nuevos, a partir de las preexistentes, ocurre durante el desarrollo y reproducción humana. La regulación de la angiogénesis se lleva cabo mediante la producción y liberación de diversos factores estimulantes e inhibidores, que varían según la condición fisiológica o patológica, y el tipo de tejido. La alteración de la regulación de este proceso da lugar a diversas condiciones patológicas, tanto por disminución como por aumento del proceso. Se produce

una angiogénesis insuficiente cuando un tejido no puede producir cantidades adecuadas de factores de crecimiento angiogénico, como en las enfermedades coronarias, los accidentes cerebrovasculares o las úlceras [107]. Por el contrario, cuando se produce un exceso de angiogénesis, las células o tejidos alterados producen cantidades anormales de factores de crecimiento angiogénico, sobrepasando la capacidad de regulación de los inhibidores naturales de la angiogénesis. Las patologías que cursan con un exceso de angiogénesis son diversas y muy variadas, como el cáncer, la ceguera diabética [108], la degeneración macular asociada a envejecimiento [109] o la artritis reumatoide [110].

El doctor Judah Folkman postuló en el año 1971 que los tumores dependían de la angiogénesis. La angiogénesis tumoral es la capacidad del tumor para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos que facilita el desarrollo y la supervivencia tumoral. Las células tumorales necesitan oxígeno y nutrientes de la sangre para crecer, proliferar y sobrevivir así que la angiogénesis tumoral provee al tumor de oxígeno y nutrientes, y produce factores de crecimiento que benefician a las células tumorales y favorecen la permeabilidad vascular. Todos los tumores comienzan su existencia como pequeños agregados de células neoplásicas que crecen por encima de la membrana basal, sin ningún aporte específico de sangre. Estas células proliferan formando la masa tumoral pero el crecimiento de ese tumor es limitado, debido al aporte insuficiente de factores de crecimiento y de oxígeno, y a la incapacidad para eliminar los subproductos tóxicos del metabolismo. La inducción de la angiogénesis por parte de estas células tumorales salva este obstáculo y permite que el tumor no sólo aumente de tamaño, sino también que metastatice a otros lugares del organismo. El tamaño tumoral también está limitado por la relación existente entre la proliferación celular y la apoptosis o muerte celular programada. Los vasos sanguíneos neoformados no son exactamente iguales a los normales puesto que presentan un diámetro interior desproporcionadamente grande en relación al grosor de la pared vascular con menor cantidad de células musculares lisas y de pericitos. Esto implica una notable delgadez y fragilidad de la pared vascular, que favorece el desarrollo de dilataciones aneurismáticas, un flujo sanguíneo irregular con zonas de estasis sanguínea y una elevada permeabilidad vascular, permitiendo la diseminación de células tumorales por todo el organismo. Tanto los tumores sólidos como las neoplasias hematológicas parecen depender de la angiogénesis para su crecimiento y metástasis. Hay evidencias de la existencia de un incremento de la densidad microvascular en la médula ósea así como de una alteración de la expresión de diversos factores angiogénicos en pacientes con hemopatías malignas, como la leucemia aguda y crónica [111] [112], los linfomas de Hodgkin [113] y no Hodgkin [114], el síndrome mielodisplásico [115][116] y el mieloma múltiple [117]. Las células tumorales adquieren la capacidad para expresar determinados genes que codifican factores naturales de crecimiento angiogénico que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos. La presencia de células proinflamatorias (linfocitos y macrófagos, principalmente) inducida por el propio tumor, también contribuye a liberar factores de crecimiento angiogénico. Los dos factores angiogénicos más importantes son el factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF) [118] y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) [119]. Estos factores se unen a sus receptores y producen la división de las células endoteliales vasculares, induciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos de pared más delgada y estructura caótica alrededor del tumor, lo que origina un flujo sanguíneo variable, y reduce la llegada y la distribución homogénea de fármacos antitumorales. Se ha relacionado la expresión de estos marcadores en neoplasias malignas con características clínicas adversas y con un pronóstico adverso [120]. A nivel molecular, los factores de crecimiento angiogénicos actúan como ligando de sus receptores específicos, que se dimerizan para su posterior activación dando lugar a la fosforilación de los residuos intracitoplásmicos de las tirosinas quinasas (actividad catalítica) e iniciándose el proceso de señalización intracelular. En las neoplasias hematológicas, se produce tanto la sobreexpresión como la transactivación de estos receptores. Finalmente, las metaloproteasas degradan la matriz extracelular formada por colagenasas, fibronectina, laminina y glucoproteínas de la membrana, y se liberan y/o activan factores de crecimiento proangiogénicos [121].

Por tanto, la angiogénesis tumoral se encuentra regulada por moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas producidas por las células neoplásicas, las células estromales, las células endoteliales, la matriz extracelular y la sangre. La contribución relativa de estas moléculas depende del tipo tumoral y del lugar de generación del mismo, y su expresión cambia con la progresión tumoral, la remisión y la recaída [122].

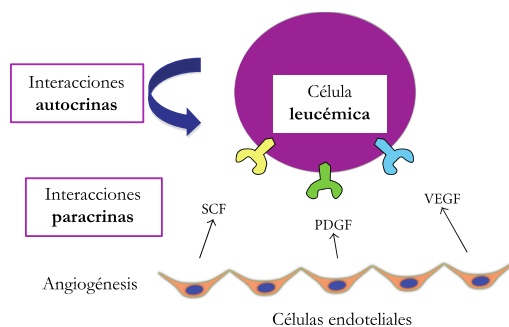
1.2.1. Angiogénesis y leucemia mieloide aguda

En los tumores sólidos, el aumento de la angiogénesis permite el aporte de nutrientes y de oxígeno, así como la retirada de metabolitos de las células tumorales. El microambiente tumoral es fundamental puesto que las células cancerosas interactúan de forma compleja con el microambiente estromal para promover su propia proliferación y supervivencia [123]. En el caso de las neoplasias hematológicas, las células leucémicas que invaden la médula ósea no forman una “masa sólida”, por tanto, la cuestión es por qué en los pacientes con LMA tendría que haber un aumento de la angiogénesis en la médula ósea. Aunque no se conoce totalmente cómo actúa el microambiente medular, de forma simplista, se ha subdividido en tres compartimentos: el nicho endosteal, donde permanecen quiescentes las células madre hematopoyéticas, el nicho vascular, que regula la entrada y salida de células en la médula ósea, y el nicho reticular, el espacio medular central donde se encuentran varios progenitores hematopoyéticos en proceso de diferenciación [124][125]. El microambiente medular es muy dinámico en las LMA. El nicho leucémico típico está en el microambiente de la médula ósea pero las células de la LMA pueden migrar a otros órganos donde se produce hematopoyesis, como el bazo y el hígado.

Las células leucémicas inducen la angiogénesis mediante diversos mecanismos: directamente, expresando receptores específicos para los factores de crecimiento angiogénicos (regulación paracrina), e indirectamente, secretando sus propios factores angiogénicos para sus propios

receptores (estimulación autocrina) [126]. Entre otros factores angiogénicos, el factor de células madre (SCF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) regulan la supervivencia y proliferación de las células leucémicas. Mediante una retroalimentación positiva, las células leucémicas estimulan la proliferación de las células endoteliales y, a su vez, éstas estimulan la de las células leucémicas (Figura 3).

Figura 3: Mecanismos de angiogénesis de las células leucémicas



SCF: factor de células madre. PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

Nota. Adaptado de “Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies” (p. 4), por A. Trujillo, 2012, *J Oncol*, 2012 [126]

Se han realizado diversos estudios para demostrar que existe un aumento de la angiogénesis en la médula ósea de pacientes con leucemia mieloide aguda. Hussong *et al.* (2000) tiñeron con un marcador endotelial, el factor von Willebrand, las biopsias de médula ósea de 20 pacientes con diagnóstico de LMA y las compararon con las de 20 controles. En las muestras de los pacientes con LMA observaron un aumento de la densidad microvascular, es decir, del número de vasos/mm ($p < 0,001$) y una relación positiva entre el número de vasos y el porcentaje de blastos, sugiriendo el papel de la angiogénesis en la LMA [127]. Por ello, el aumento de la angiogénesis en estos pacientes dependería del aumento de la secreción de factores angiogénicos por parte de las células leucémicas.

También se ha estudiado el efecto de la quimioterapia sobre la densidad microvascular en la médula ósea de pacientes con LMA. Padro *et al.* (2000) observaron un mayor grado de neovascularización en el día 16 de la quimioterapia de inducción en los pacientes con enfermedad residual comparada con los pacientes en remisión completa, reflejando una continua estimulación angiogénica por parte de los blastos residuales junto con una menor susceptibilidad individual al efecto antiangiogénico de la

quimioterapia [128]. De tal forma, la persistencia de la densidad microvascular durante la quimioterapia de inducción se asociaría a un peor pronóstico.

1.2.2. Factor de crecimiento vascular endotelial

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es uno de los principales factores proangiogénicos, y es un regulador de múltiples funciones de proliferación, supervivencia, angiogénesis y migración celular, tanto en las células endoteliales como en las células neoplásicas [129]. En 1983, Senger y sus colaboradores identificaron el llamado “factor de permeabilidad vascular” [130] y, en 1989, fue purificado *in vitro* por primera vez a partir de medios de cultivo de células foliculares de pituitaria bovina por el grupo de Ferrara [131]. En 1996, el Dr. Jeffrey Isner publicó uno de los primeros ensayos clínicos sobre la angiogénesis en regiones isquémicas [132]. El VEGF puede regular el desarrollo de las células madre hematopoyéticas, remodelando la matriz extracelular, y la regeneración de las citoquinas inflamatorias. También juega un papel importante en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la cicatrización de heridas y la retinopatía diabética [133]. El VEGF es el único factor de crecimiento específico para la angiogénesis, a diferencia de otros factores de crecimiento, como el bFGF y el PDGF, que pueden actuar sobre varios tipos de células y tienen baja especificidad por las células endoteliales vasculares.

1.2.2.1. Ligandos del VEGF

La familia del VEGF y sus receptores son el principal regulador de los procesos angiogénicos y linfangiogénicos. Esta familia incluye cinco ligandos descritos en humanos, el VEGF-A, el VEGF-B, el VEGF-C, el VEGF-D y el PlGF (factor de crecimiento de placenta); el VEGF-E, descrito solamente en parapoxivirus (Orf virus), y el VEGF-F, aislado en el veneno de ciertas víboras. Cada una de estas proteínas contiene una secuencia señal que se escinde durante la biosíntesis. Además, el procesamiento alternativo (*splicing*) de sus correspondientes pre-ARNs genera múltiples isoformas de VEGF-A, VEGF-B y PlGF [134]. El proceso de señalización se encuentra mediado por uniones de alta afinidad de los ligandos con receptores específicos que tienen actividad tirosina quinasa intrínseca [135]. El VEGF activo está compuesto por dos subunidades idénticas y la unión a su receptor es mediada por el homodímero a través de la unión del núcleo de la proteína. Los receptores son dímeros anclados a la superficie de las células endoteliales.

- **VEGF-A:** el gen del VEGF-A se encuentra ubicado en el gen humano en el cromosoma 6p21.3, y está formado por ocho hexones y separados por siete intrones, lo cual lo lleva a ser una glicoproteína homodimérica de 45 kilodaltons. Está implicado en la migración y división de las células endoteliales, en el aumento de la actividad de la metano monooxigenasa y la integrina $\alpha\gamma:\beta_3$, en promover la creación de la luz de los vasos sanguíneos, y es un agente quimiotáctico para macrófagos y granulocitos. Además, es un potente vasodilatador activado indirectamente por la liberación de óxido nítrico. Existen varias formas del VEGF-A y el más importante es el VEGF-A₁₆₅.

- **VEGF-B:** el gen humano de VEGF-B contiene ocho exones y seis intrones y se encuentra localizado en el cromosoma 11. Se sabe que existen dos isoformas, el VEGF-B₁₆₇ y el VEGF-B₁₈₆, cada uno con 167 y 186 residuos de aminoácidos, respectivamente. Está implicado en los procesos angiogénicos que tienen lugar en el desarrollo embrionario. VEGF-B es ligando del VEGFR-1, pero no de VEGFR-2 o VEGFR-3. La activación de su receptor induce una señal mitogénica pobre en las células endoteliales. Por otro lado, VEGF-B puede formar heterodímeros con VEGF-A, lo que podría representar un mecanismo para modular la liberación y disponibilidad de VEGF-A.

- **VEGF-C:** el gen del VEGF-C se encuentra en el cromosoma 4 y consta de 7 exones. Es un potente factor de permeabilidad, estimula la migración y proliferación de las células endoteliales. Se produce como un precursor proteico y requiere procesamiento post-traducciona. Se activa proteolíticamente en el espacio extracelular para generar una proteína homodimérica sin uniones disulfuro con alta afinidad por VEGFR-2 y VEGFR-3 [136]. Tanto las formas maduras de VEGF-C como las parcialmente procesadas se unen al VEGFR-3 con gran afinidad, participando de forma importante en la regulación de la linfangiogénesis. Su unión al VEGFR-3 regula la señalización del VEGFR-2 actuando de manera sinérgica con el VEGF-A. Sólo las formas completamente procesadas se unen al VEGFR-2.

- **VEGF-D:** es una glicoproteína secretada que estructuralmente tiene un 48% de homología con VEGF-C. El gen de VEGF-D humano se encuentra en el cromosoma X y contiene siete exones. Induce la proliferación de las células endoteliales y muestra propiedades angiogénicas. Del mismo modo que VEGF-C, VEGF-D se sintetiza primeramente como una proteína precursora que se activa mediante procesamiento proteolítico de los extremos N-terminal y C-terminal. Aunque la forma precursora se une a VEGFR-3, la forma madura se une y activa tanto a VEGFR-2 como a VEGFR-3.

- **PlGF:** es importante en procesos como la vasculogénesis, isquemia, inflamación y cicatrización. El gen humano de PlGF se localiza en el cromosoma 14 y está codificado por siete exones. Se han descrito cuatro isoformas generadas por procesamiento alternativo, que son PlGF-1 (PlGF₁₃₁), PlGF-2 (PlGF₁₅₂), PlGF-3 (PlGF₂₀₃) y PlGF-4 (PlGF₂₂₄).

- **VEGF-E:** es capaz de estimular la proliferación de las células endoteliales y la permeabilidad vascular mediante la unión específica al VEGFR-2.

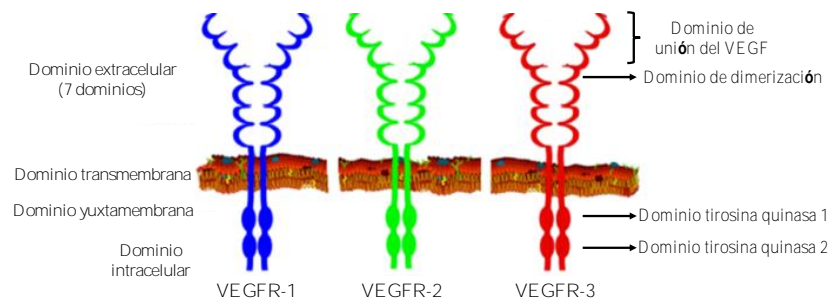
- **VEGF-F:** tiene una estructura 50% homóloga a VEGF-A₁₆₅ y se une selectivamente al VEGFR-2.

1.2.2.2. Receptores del VEGF

Estos ligandos del VEGF realizan su función en las células diana a través de tres receptores pertenecientes a la familia de receptores de las tirosinas quinasas: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, originalmente denominados *FMS-related tyrosin kinase 1* (FLT-1), *kinase inser domain receptor/fetal liver kinase 1* (KDR/FLK-1) y *FMS-related tyrosine kinase 4* (FLT-4), respectivamente [137]. En adultos, los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se expresan principalmente en el endotelio vascular, mientras que

el VEGFR-3 se limita en gran medida al endotelio linfático. La estructura de los receptores del VEGF está formada por un dominio extracelular, que consta de 7 dominios similares a inmunoglobulinas, un único dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana y un dominio intracelular, que contiene dos dominios tirosina quinasa (Figura 4) [138].

Figura 4: Estructura de los receptores del VEGF



VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. VEGFR-1: receptor del VEGF 1. VEGFR-2: receptor del VEGF 2. VEGFR-3: receptor del VEGF 3.

Estos receptores son dímeros anclados a la superficie de las células endoteliales y de otros tipos celulares. La dimerización del receptor tiene lugar en condiciones normales en respuesta a la unión de ligando y se produce auto/transfosforilación, desencadenando una cascada de señalización en la que se fosforilan distintas proteínas que activan varias rutas intracelulares como la vía Ras/Raf/MEK/ERK, FAK y PI3K, involucradas en la angio y linfangiogénesis [139].

El **receptor del VEGF 1** (VEGFR-1) se expresa en células endoteliales, monocitos, células madre hematopoyéticas, células musculares lisa vasculares y en células leucémicas. Se une con alta afinidad a los ligandos VEGF-A, VEGF-B y PlGF. Su función se conoce poco, pero se piensa que modula la función del VEGFR-2 y la motilidad celular. Se cree que podría secuestrar al VEGF para evitar su unión con el VEGFR-2 y esto parece ser especialmente importante durante la vasculogénesis en el embrión. La transcripción del VEGFR-1 es aumentada por la hipoxia y, aunque probablemente no induce proliferación celular debido a que las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPKs) no son activadas por este receptor, sí promueve la generación de proteasas como la metaloproteasa de matriz extracelular 9 (MMP9), las cuales son requeridas para la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos en las etapas iniciales de la angiogénesis [134].

El **receptor del VEGF 2** (VEGFR-2) se expresa en células progenitoras endoteliales y megacariocitos. Su función consiste en actividades proliferativas y mitogénicas, así como de permeabilidad vascular. Se une con alta afinidad a VEGF-A y a formas maduras del VEGF-C y VEGF-D. El VEGFR-2 parece mediar casi todas las respuestas celulares conocidas del VEGF por

lo que juega un papel fundamental en la angiogénesis inducida por el VEGF. La unión entre el VEGF y su receptor VEGFR-2 activa el sistema de las MAPKs vía la proteína kinasa C o la proteína Ras e induce la proliferación de las células endoteliales vasculares [140].

El **receptor del VEGF 3** (VEGFR-3) es homólogo del receptor 1 de la neurofilina. Junto a sus ligandos, VEGF-C y VEGF-D, está involucrado principalmente en la linfangiogénesis y también en la angiogénesis [141].

1.2.2.3. Neuropilinas

Un segundo grupo de receptores afines a VEGF son las neuropilinas (NRP), la NRP-1 y NRP-2. Estos receptores están implicados en el sistema inmune y el desarrollo neural, aunque también en la angiogénesis formando parte de los complejos VEGF/VEGFR. Son receptores glicoproteicos sin actividad quinasa ubicados en la superficie celular que se unen a semaforinas y a la familia del VEGF. NRP-1 se une a VEGF-A, VEGF-B y PlGF, y NRP-2 se une a VEGF-A, VEGF-C y PlGF. Actúan como coreceptores aumentando la afinidad de VEGFR-2 por VEGF-A [142].

1.2.3. Factor de crecimiento vascular endotelial y leucemia mieloide aguda

La implicación de la vía VEGF/VEGFR en la LMA no está claramente establecida, aunque en los blastos de sangre periférica y de médula ósea de pacientes con LMA se ha detectado la expresión del gen *VEGF*, sobre todo del *VEGF-A* y del *VEGF-C*, y de sus receptores, *VEGFR-1*, *VEGFR-2* y *VEGFR-3* [143]. El VEGF se produce en células que no están recibiendo suficiente oxígeno debido al crecimiento tumoral que deja zonas sin vascularizar. Cuando una célula es deficitaria en oxígeno, produce el factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1), que es un factor de transcripción que estimula la liberación del VEGF, entre otras funciones, así como la modulación de la eritropoyesis. Las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β se producen continuamente, pero HIF-1 α es altamente lábil en presencia de oxígeno, por lo que se degrada en condiciones aeróbicas. Cuando la célula está en condiciones de hipoxia, HIF-1 α persiste y el complejo HIF-1 α/β estimula la liberación del VEGF y también la del PDGF y del bFGF [144]. Deeb *et al.* (2011) estudiaron el impacto pronóstico de la expresión de la proteína HIF-1 α en 84 pacientes con LMA con cariotipo normal y, en el análisis multivariante, la expresión de HIF-1 α se asoció de forma independiente a una menor supervivencia global y supervivencia libre de evento [145].

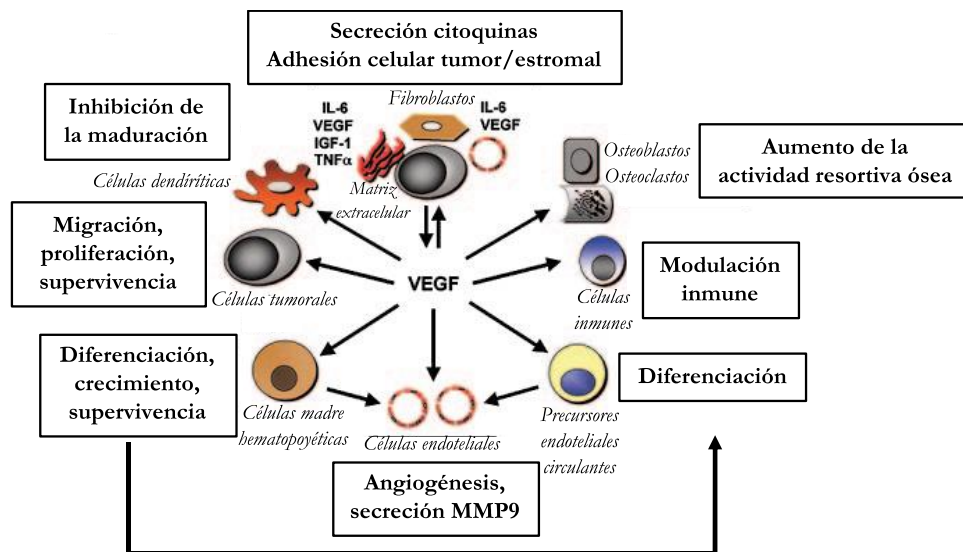
Además de la hipoxia, diversos factores de crecimiento y citoquinas aumentan la expresión del VEGF. El microambiente de la médula ósea comprende una población celular heterogénea que incluye células madre hematopoyéticas, células endoteliales, células estromales (fibroblastos, macrófagos, linfocitos T) y células implicadas en la homeostasis ósea (condrocitos, osteoclastos y osteoblastos). La diferenciación, mantenimiento y expansión de las células tumorales en este microambiente medular está coordinada por múltiples sustancias como factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, como el VEGF, la interleucina 6 (IL-6), el factor de crecimiento similar a

la insulina 1 (IGF-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), secretados por las células tumorales, las células estromales y por órganos no hematopoyéticos como el hígado y el riñón.

El VEGF, además de su papel fisiológico de regulador fundamental del crecimiento, permeabilidad y migración vascular, posee las siguientes funciones en el microambiente medular de las neoplasias hematológicas (Figura 5) [146]:

- Aumento de la actividad resortiva y de quimiotaxis de los osteoclastos.
- Inductor de la migración, acumulación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) dependiente de hormona paratiroidea y fofatasa alcalina en osteoblastos.
- Modulador de las respuestas inmunes (Ej., mejora la adhesión de las células *natural killer* al endotelio tumoral).
- Movilizador de precursores endoteliales circulantes derivados de la médula ósea a la circulación periférica y mejorar su reclutamiento en la vasculatura tumoral.
- Mediador en el reclutamiento de monocitos y de precursores endoteliales circulantes derivados de la médula ósea en los vasos sanguíneos.
- Agente mitógeno sobre las células endoteliales de la micro y macrovasculatura de venas, arterias y vasos linfáticos.
- Inductor de la diferenciación de múltiples linajes hematopoyéticos.
- Aumento la producción de células B.
- Regulador de la supervivencia de células madre hematopoyéticas de forma autocrina.
- Inhibidor de la maduración de las células dendríticas mediante la inhibición de la activación del factor nuclear β .

Figura 5: Funciones fisiopatológicas del VEGF en el microambiente medular

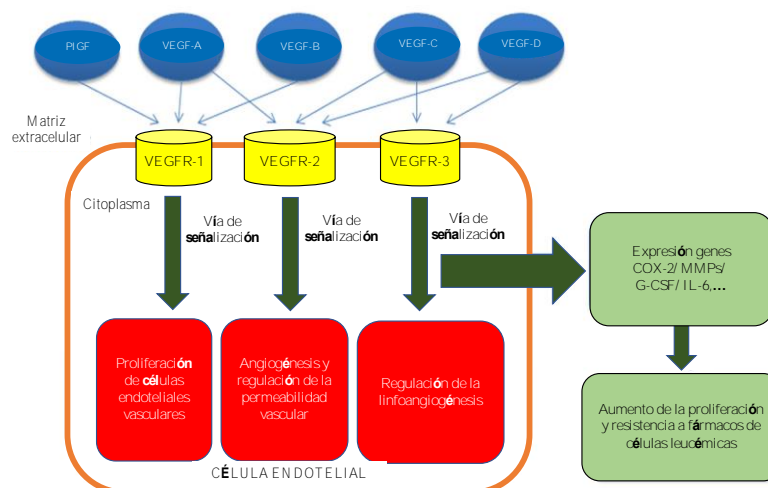


IL-6: interleucina 6. IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina 1. FNT α : factor de necrosis tumoral α . MMP9: metaloproteasa de matriz extracelular 9.

Nota. Adaptado de “The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications” (p. 1385), por K. Podar, 2005, *J Oncol*, 105(4) [146]

Las células leucémicas sintetizan y excretan el VEGF que interactúa con los receptores de la superficie de las células endoteliales, produciendo la liberación de factores de crecimiento, como el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF). Estos factores actúan, a su vez, sobre las células leucémicas, aumentando su actividad proliferativa y resistencia al tratamiento, o actúan directamente sobre receptores de la superficie de las células leucémicas, aumentando la proliferación y resistencia a fármacos (Figura 6) [147].

Figura 6: Papel del VEGF en la LMA



COX-2: ciclooxigenasa-2. MMP: metaloproteasa de matriz extracelular. G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos. IL-6: interleucina 6.

Nota. Adaptado de “The progress of angiogenic factors in the development of leukemias” (p. 7), por Y. Han, 2016, *Intractable & Rare Diseases Research*, 5(1) [148]

El VEGF puede modular el comportamiento de las células leucémicas mediante dos mecanismos, paracrino y autocrino. Fiedler *et al.* (1997) fueron de los primeros en sugerir que las células leucémicas producían señales angiogénicas para la estimulación autocrina y que estimulaban a las células endoteliales para que liberaran factores pro-leucémicos para su proliferación y supervivencia. Estudiaron la expresión del VEGF y de sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 por PCR en pacientes

con leucemia mieloide aguda. Detectaron la expresión del VEGF en los blastos de 20 de los 28 pacientes y observaron un aumento, dosis y tiempo dependiente, de la secreción de factores de crecimiento hematopoyético, como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*GM-CSF*) por las células endoteliales de venas umbilicales humanas tras la estimulación con el VEGF [149]. Esto apoyaría la hipótesis de la producción paracrina de factores de crecimiento por las células leucémicas. Bellamy *et al.* (1999) observaron un aumento de la expresión del VEGF y de sus receptores en 12 líneas celulares hematopoyéticas de varias hemopatías malignas, incluyendo leucemia, linfoma y mieloma múltiple. La expresión de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se creía exclusiva de las células endoteliales vasculares, pero en el estudio se encontró un aumento de la expresión de estos receptores en varias de las líneas celulares tumorales. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que las propias células tumorales estimulen su crecimiento de forma autocrina, tras la exposición al VEGF. Además, vieron que la exposición de células endoteliales humanas al VEGF estimulaba la expresión de citoquinas hematopoyéticas (G-CSF, IL-6), importantes para el control paracrino del crecimiento del tumor [150]. Dias *et al.* (2001) inhibieron la vía de señalización paracrina y autocrina de VEGF/ VEGFR-2 retrasando el crecimiento de células leucémicas en cultivos humanos [151]. Por ello, cuando se origina la LMA, las citoquinas proangiogénicas funcionan como factores angiogénicos o linfangiogénicos que afectan a las células hematopoyéticas, incluidas las células inmunitarias derivadas de la médula ósea. Después de la exposición a las citoquinas proangiogénicas, los fenotipos y las funciones de las células inmunes se ven afectados. A su vez, el VEGF y sus receptores son expresados en los blastos leucémicos tanto a nivel de la circulación periférica como en la médula ósea, en los nichos vasculares y de osteoblastos. Estos comportamientos dinámicos en la médula ósea reflejarían las características clínicas de la LMA. El estudio y caracterización funcional de los factores angiogénicos en el nicho medular leucémico puede ser útil para interrumpir el injerto de células madre leucémicas y para mejorar la función de las células inmunitarias mediante la modulación del microambiente tumoral [152]. Hussong *et al.* (2000) estudiaron en dos líneas celulares humanas (HL-60 and U937) y en células de pacientes con LMA el posible papel de la angiogénesis en la fisiopatología de la LMA. Para estudiar estas células leucémicas como fuente de factores angiogénicos que estimularían la angiogénesis *in vivo*, midieron la expresión del VEGF, tanto por inmunohistoquímica, mediante anticuerpos anti-VEGF humano, como por PCR a tiempo real y todas mostraron un aumento de la expresión del VEGF [127]. Aunque todavía no está clara la regulación molecular de VEGF los esfuerzos deben dirigirse al desarrollo de múltiples vías terapéuticas dirigidas directa o indirectamente a VEGF.

1.2.4. Factor de crecimiento vascular endotelial C

El VEGF-C, una de las isoformas del VEGF, es un factor de crecimiento angiogénico y linfangiogénico que actúa sobre los receptores VEGFR-2 y VEGFR-3. Sin embargo, varios estudios han mostrado otras funciones del VEGF-C que son importantes para la progresión de tumores

sólidos, como su actividad autocrina para la invasión y metástasis del cáncer [153]. En las células leucémicas de pacientes con LMA se han realizado estudios que muestran la expresión del VEGF-C aunque todavía queda por explorar su relevancia clínica. Fiedler *et al.* (1997) investigaron la expresión del VEGFR-3 y su ligando *VEGF-C* en muestras frescas de pacientes con LMA y descubrieron la expresión del VEGFR-3 en 15 de los 41 pacientes. La expresión del VEGF-C se detectó en el 36% de los pacientes con expresión del VEGFR-3. No se detectó expresión del VEGFR-3 en ninguna de las muestras de médula ósea de 15 voluntarios sanos [154]. Liersch *et al.* (2008) observaron un aumento de la expresión del *VEGF-C* por técnicas inmunohistoquímicas en la médula ósea de pacientes con LMA con respecto a controles sanos pero esta expresión no estaba aumentada en el plasma detectado mediante una técnica de ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). No se observó una relación entre los niveles de expresión del VEGF-C y la respuesta a la quimioterapia, la tasa de remisión completa o la supervivencia global [155]. También hay estudios donde se ha observado una menor expresión del VEGF-C en los pacientes con LMA comparada con donantes sanos, tanto en médula ósea [156] como en sangre periférica [157].

Otros estudios han demostrado que el aumento de la expresión del VEGF-C en los blastos leucémicos está relacionado con un aumento de la resistencia *in vitro* e *in vivo* a fármacos. Dias *et al.* (2002) mostraron que la adición *in vitro* del VEGF-C a dos líneas celulares de LMA promovía la proliferación y supervivencia celular, así como la resistencia a la quimioterapia mediante la activación del receptor VEGFR-3. La hipótesis es que los blastos liberarían citoquinas proangiogénicas que producirían la estimulación paracrina del VEGF-C/VEGFR-3, contribuyendo a la progresión de un subgrupo de células leucémicas y protegiéndolas de los efectos proapoptóticos de la quimioterapia [158]. En un estudio en adultos con LMA *de novo*, en el análisis multivariante, los niveles altos de expresión del VEGF-C fueron un factor de riesgo independiente de resistencia a la quimioterapia de inducción [159]. En pacientes pediátricos con niveles elevados del VEGF-C se observó un mayor porcentaje de blastos en el aspirado medular del día 15 de la quimioterapia de inducción y que tardaban más días en alcanzar la remisión completa. Además, los niveles de expresión del VEGF-C de las células leucémicas se relacionaron con un aumento de la resistencia *in vitro* a distintas terapias para la LMA [160]. Chien *et al.* (2009) observaron que el VEGF-C activa la angiogénesis tumoral a través de la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en líneas celulares de LMA, THP-1, y que los niveles del VEGF-C y COX-2 se correlacionaban [161]. El aumento de la expresión de VEGF-C también induce una resistencia a la quimioterapia mediada por COX-2 a través de la expresión de endotelina 1, que regula el eje VEGF-C/COX-2. Este eje podría ser una diana terapéutica para mejorar la resistencia a la quimioterapia de los pacientes con LMA [162]. En 2010, Jonge *et al.* divulgaron los resultados del estudio de la expresión del VEGF-C en 525 pacientes con LMA. Los autores detectaron una relación entre el aumento de la expresión del VEGF-C en los blastos en sangre

periférica y médula ósea, y un peor pronóstico a largo plazo en la serie global, con menor tasa de remisión completa, de supervivencia libre de evento y de supervivencia global [163].

1.2.5. Terapia antiangiogénica

En 1971, J. Folkman propuso inhibir la angiogénesis para tratar los tumores y, desde entonces, se ha investigado el uso de tratamientos anti-angiogénicos dirigidos a inhibir elementos celulares y moleculares de la cascada angiogénica. En 1992 comenzaron los primeros ensayos clínicos con fármacos antiangiogénicos para el tratamiento del cáncer, aunque con resultados iniciales poco interesantes. En 1993 Kim *et al.* observaron que los anticuerpos neutralizantes anti-VEGF reducían de forma notable la angiogénesis y el crecimiento de las células tumorales implantadas en ratones con inmunodeficiencias [164]. O'Reilly *et al.* (1997) estudian el efecto del tratamiento con endostatina, un antiangiogénico, en ratones con distintos tumores sólidos y observaron la desaparición completa del tumor [165]. El A.4.6.1 fue el primer anticuerpo monoclonal murino frente al VEGF. Posteriormente fue humanizado [166] y hoy es conocido como bevacizumab, fármaco aprobado por la *European Medicines Agency* (EMA) desde 2005 para el tratamiento de varias neoplasias sólidas.

Para el tratamiento de la LMA se ha estudiado la inhibición de la función del VEGF mediante fármacos inmunomoduladores anti-angiogénicos, como anticuerpos monoclonales anti-VEGF, fármacos inhibidores de receptores de VEGF e inhibidores de histonas deacetilasas. Loges *et al.* (2006) realizaron un ensayo clínico multicéntrico con SU5416, una pequeña molécula inhibidora de la actividad tirosina quinasa que bloquea la fosforilación de c-kit, *FLT3*, VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, en 18 pacientes con LMA refractaria. Se investigaron los niveles de expresión del VEGF en los blastos de sangre periférica antes y después del tratamiento, y se observó una disminución de la expresión en el 72% de los pacientes [167]. Ilorasertib (ABT-348), un inhibidor de aurora quinasa capaz de inhibir receptores del VEGF, se ha estudiado en un ensayo clínico fase 1 en pacientes con LMA y otras neoplasias hematológicas [168]. Zhang *et al.* (2015) comprobaron que el HS3ST3B1 (*heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase 3B1*) promueve la angiogénesis y la proliferación *in vitro* e *in vivo* de células leucémicas a través de la expresión del VEGF. Utilizaron axitinib, un inhibidor del VEGFR, para bloquear la función del VEGF y observaron un descenso de la proliferación celular en los cultivos, sobre todo, en aquellas células con mayor expresión de HS3ST3B1 [169]. El apatinib, un inhibidor selectivo de VEGFR-2, tiene un efecto antileucémico en líneas celulares a través de la inhibición de las vías Src/STAT3 y AKT/mTOR así como de la inducción de la apoptosis mediada por la mitocondria [170]. El ginsenosido Rg3, un producto natural del género de las plantas, se ha utilizado como terapia antiangiogénica en tumores sólidos y también se ha estudiado en pacientes con LMA. Se trataron 20 pacientes con LMA con quimioterapia más placebo o Rg3 y se detectó la expresión del VEGF y del HIF-1 α por RT-PCR y por la técnica de *western blot*. El tratamiento con Rg3 produjo una inhibición de la expresión del VEGF y del HIF-1 α en las células del estroma de la médula ósea, así como una reducción de los niveles séricos de ambos. El efecto antileucémico de este

fármaco se debe, en parte, a su actividad antiangiogénica inhibiendo las vías PI3K/Akt y ERK1/2 que regulan al VEGF y al HIF-1 α [171]. También se ha estudiado el efecto del tratamiento con AZD2171 (cediranib), un inhibidor de los receptores VEGF-1 y VEGF-2, en pacientes con LMA sin que se observara ninguna respuesta [172]. Los inhibidores de histonas deacetilasas (HDAC) inhiben la angiogénesis tumoral a través del descenso de la regulación de factores angiogénicos (31). El ácido valproico es un inhibidor de HDAC que produce una inhibición del VEGF y de sus receptores *in vitro* [173].

Estos resultados sugieren que la inhibición del VEGF y/o sus receptores y la interrupción de las vías de señalización podrían ser una potencial diana terapéutica para pacientes con LMA y abren la posibilidad de usar combinaciones de agentes con actividad citotóxica junto con antiangiogénicos como estrategia terapéutica. En la Tabla 14 se muestran algunas de las potenciales terapias dianas frente al VEGF y otros factores angiogénicos [174].

Tabla 14: Potenciales terapias frente a VEGF en pacientes con LMA

Agente	Diana
Aflibercept	VEGF-A, VEGF-B, PlGF
Axitinib	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- β , c-KIT
Apatinib	VEGFR-2
Bevacizumab	VEGF-A
Cediranib	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- β , c-KIT
Midostaurina	FLT3, VEGFR-2, PDGFR, c-KIT
Semaxanib	VEGFR-1, -2, c-KIT, FLT3
Sorafenib	FLT3, VEGFR-2, -3, PDGFR, Raf, c-KIT
Sunitinib	VEGFR-1, -2, -3, PDGFRs, c-KIT, FLT3, CSF-1
Vatalanib	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- β , c-KIT, FMS

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. PlGF: factor de crecimiento de placenta.

VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular. PDGFR: factor de crecimiento derivado de plaquetas. FLT3: *FMS-like tyrosine kinase-3*.

1.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) se desarrolló por primera vez por Mullis y colaboradores en 1986 [175] y, desde entonces, ha sido una de las técnicas

básicas en laboratorios de todo el mundo. El objetivo de la misma es la amplificación específica de nucleótidos a partir de un molde de DNA. La técnica se basa en dos conceptos: la desnaturalización y renaturalización del DNA dependiendo de la temperatura, y la resistencia a altas temperaturas de la polimerasa del organismo *Thermus aquaticus* (Taq). La Taq polimerasa y otras polimerasas se encargan de sintetizar una secuencia de nucleótidos a partir de una hebra molde. La PCR consiste en aumentar y disminuir la temperatura alternadamente en ciclos en los siguientes pasos:

1º: Desnaturalización: la temperatura sube por encima del nivel de desnaturalización del DNA por lo que ambas hebras del DNA se separan.

2º: Hibridación: la temperatura disminuye a un nivel que permite la unión de la Taq polimerasa y de los cebadores a las hebras del DNA desnaturalizadas, que sirven de molde.

3º: Elongación: la temperatura disminuye permitiendo la síntesis de DNA de doble cadena por parte de la Taq polimerasa. Y, una vez sintetizado, la Taq polimerasa se suelta de la hebra.

Tras cerrarse un ciclo de temperatura se inicia otro con los mismos pasos pero, esta vez, además de la hebra completa de DNA como molde, cuenta con los fragmentos cortos de la secuencia específica de nucleótidos como sustrato, cuya cantidad aumentará de manera exponencial.

La especificidad de secuencia se consigue empleando unos cebadores complementarios a la secuencia nucleotídica problema, que se unen en el 2º paso del ciclo de temperatura y permiten el inicio de la polimerización del DNA por parte de la Taq. Obtenemos como producto final el fragmento de DNA de secuencia específica amplificado varios órdenes de magnitud, permitiéndonos detectar la presencia de pequeñas cantidades de dicha secuencia.

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR, *real time quantitative polymerase chain reaction*) es una variación de la PCR convencional. Los primeros desarrollos de la PCR en tiempo real los realizaron Higuchi y colaboradores entre 1992 y 1993, basándose en el principio de la fluorescencia del bromuro de etidio cuando se intercala con las moléculas de ADN [176]. En la RT-qPCR se mide en tiempo real la cantidad de producto amplificado por cada ciclo de la PCR, obteniendo así una curva de amplificación que permite cuantificar la cantidad inicial de producto. Se amplifica en paralelo el gen problema (gen de fusión) y uno o más genes control, también llamados *housekeeping*. El gen *housekeeping* se define como un gen que codifica una proteína necesaria para una función celular básica en todas las células nucleadas y que no se afecta por ningún tratamiento experimental. El uso de genes de control permite una cuantificación reproducible del transcrito de un gen de fusión. Para corregir las diferencias en la cantidad de ADN/ARN añadida en cada muestra y para reducir la variación producida por la preparación de PCR y el proceso del ciclo, se utilizan genes control internos o de referencia. En la RT-qPCR se incorpora un agente intercalante fluorescente, que permite detectar la cantidad de producto sintetizado a tiempo t mediante la acumulación de fluorescencia. La cinética de la acumulación de la fluorescencia con cada ciclo depende directamente de la cantidad inicial de DNA,

pudiendo extrapolar así dicha cantidad. Las técnicas de PCR cuantitativa se pueden clasificar según el empleo de fluorocromos no específicos o bien de sondas moleculares dependientes de la secuencia. En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos se detecta la generación exponencial de ADN de doble cadena empleando un fluorocromo que se une inespecíficamente a aquél, el SYBR Green®. Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan, al menos, un oligonucleótido marcado fluorescentemente. Estas sondas fluorescentes unidas a los cebadores sólo emiten fluorescencia al tener lugar la elongación en cada ciclo de la PCR, aumentando así intensidad de fluorescencia al aumentar la cantidad de producto amplificado que es sintetizado. Existen dos formas de analizar los datos de la PCR, mediante cuantificación absoluta y relativa. La cuantificación absoluta identifica la cantidad de gen generado basada en las características de la fase exponencial de la curva sigmoidea de emisión de fluorescencia. En cambio, la cuantificación relativa establece una relación entre la cantidad de ADN inicial de una muestra respecto de la de un control, que se asume se expresa de forma invariable e independiente del tratamiento. Es decir, determina cambios en la expresión del gen respecto a una muestra de referencia. Es más sencilla de realizar, requiere menos reactivos dado que no necesita generar una curva estándar y no se producen errores en relación a las diluciones estándar para la realización de la curva. En la cuantificación relativa es irrelevante en qué unidades se expresa la cuantificación, y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos de RT-qPCR. El método $2^{-\Delta\Delta CT}$ es el método de cuantificación relativa más utilizado y emplea pendientes e intercepciones de curvas estándar de plásmidos generados previamente [177]. El método $\Delta\Delta CT$ se basa en el supuesto de que las intercepciones y pendientes son idénticas entre el gen de fusión y el gen control. Este método utiliza la información generada por el CT (*cycle threshold* o ciclo umbral) de un sistema de PCR cuantitativa para calcular la expresión relativa del gen a estudio y las muestras de referencia. El punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal (umbral o *threshold*) se considera el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo. Este punto es conocido como CT y su valor es definido de forma arbitraria por el usuario, aunque es posible definirlo de forma matemática. El $\Delta\Delta CT$ es la diferencia de las diferentes ΔCT de la muestra a estudio y de la de referencia. El CT del gen de fusión (CT-GF) obtenido durante el seguimiento se normaliza primero restando el CT del gen control (CT-GC) y, posteriormente, se normaliza por el ΔCT_{DX} , es decir, la resta de CT-GF y CT-GC del paciente al diagnóstico.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ (muestra a estudio)} - \Delta CT \text{ (muestra control)}$$

Se identifican los fragmentos amplificados de ADN concretos a partir de la temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés *melting temperature*), que es específica para el fragmento amplificado que se está buscando y cuyos resultados son obtenidos a partir de la observación de la curva de disociación de las muestras de ADN analizadas.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C) está implicado en mecanismos de proliferación, supervivencia, angiogénesis y migración celular, y su expresión está aumentada en algunos tumores sólidos. Sin embargo, la relevancia de la expresión del gen *VEGF-C* en las células leucémicas de los pacientes con LMA todavía no se conoce bien.

Por todo ello, la hipótesis principal de este trabajo es que el aumento de la expresión del gen *VEGF-C* en los blastos de médula ósea de los pacientes diagnosticados de LMA *de novo* influye en la evolución de la enfermedad. La determinación de la expresión del *VEGF-C* identificaría a un subgrupo de pacientes con peor pronóstico que podrían beneficiarse de un tratamiento más agresivo o de nuevas terapias diana.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal es estudiar la expresión del gen *VEGF-C* en pacientes adultos diagnosticados de leucemia mieloide aguda y su relación con otros marcadores de significado pronóstico conocido.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Los objetivos secundarios del estudio son:

1. Investigar si existe una asociación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y determinadas variables clínicas y del laboratorio.
2. Analizar el efecto de la expresión del *VEGF-C* en el subgrupo de pacientes con citogenética normal.
3. Establecer la relación entre la expresión del *VEGF-C* y la respuesta al tratamiento de la LMA.
4. Comparar la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de los pacientes según la expresión del *VEGF-C*.
5. Estudiar la expresión de los genes implicados en las vías de señalización del *VEGF*.
6. Identificar qué genes de las vías de señalización del *VEGF* están relacionados con la expresión del *VEGF-C*.
7. Evaluar el grado de dependencia de la expresión entre los genes de la familia *VEGF/VEGFR*.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO

Se ha realizado un estudio retrospectivo, observacional, descriptivo y analítico de una cohorte de pacientes adultos menores de 70 años diagnosticados de leucemia mieloide aguda (LMA).

4.2. ÁMBITO

Pacientes incluidos en el protocolo LMA-03 dentro del grupo cooperativo para el estudio y tratamiento de las leucemias agudas y mielodisplasias (CETLAM).

4.3. POBLACIÓN

Los pacientes incluidos en el estudio fueron adultos menores de 70 años diagnosticados de LMA e incluidos en el protocolo LMA-03 del grupo CETLAM entre diciembre de 2003 y diciembre de 2011. Los centros participantes a nivel nacional fueron 14 y se obtuvieron 436 muestras de médula ósea al diagnóstico.

4.4. MATERIAL

El material utilizado para realizar los estudios fue la médula ósea que se había obtenido por punción aspiración mediante aguja a nivel esternal o de la cresta ilíaca posterosuperior.

4.5. MUESTRA

La expresión del gen *VEGF-C* se pudo estudiar en el ácido desoxinucleico (ADN) complementario o copia de 353 muestras de médula ósea mediante una PCR en tiempo real. Todos los pacientes habían sido diagnosticados de una LMA *de novo* (excluidas las leucemias promielocíticas agudas) clasificada según los criterios de la OMS 2001, y con una edad entre 16 y 70 años. La expresión del gen también se estudió en 6 muestras de médula ósea de sujetos sin patología hematológica que se utilizaron como controles. Para el estudio de la expresión de 84 genes implicados en las vías de señalización del *VEGF* se realizó una PCR en tiempo real en un subgrupo de 24 pacientes seleccionados al azar.

4.6. ASPECTOS ÉTICOS

El estudio fue aprobado previamente por el Comité Ético de Investigación con medicamentos del hospital Clínico Universitario de Valencia (Anexo 1) y se realizó según la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes para participar en el estudio y para la utilización de las muestras biológicas (Anexo 2).

4.7. VARIABLES

4.7.1. Método de recogida

Los datos clínicos y biológicos de cada paciente necesarios para el estudio se obtuvieron de la base de datos del grupo CETLAM y, en caso necesario, de la historia clínica del paciente. Se realizó una

base de datos de Excel con estos datos a los que se les añadió la información del estudio del gen *VEGF-C* y de los genes implicados en las vías de señalización del *VEGF*. Esta base se revisó para la detección de incongruencias, de valores incorrectos o de la ausencia de información.

4.7.2. Variables demográficas

Las variables demográficas recogidas de los pacientes fueron la fecha de nacimiento del paciente, edad al diagnóstico y sexo.

4.7.3. Variables clínicas

Las variables clínicas registradas fueron la fecha del diagnóstico, estado funcional (ECOG) (Anexo 3), tratamiento recibido, respuesta al tratamiento, características del TPH, recaída y mortalidad.

4.7.4. Variables de laboratorio

Las variables de laboratorio recogidas al diagnóstico fueron la cifra de hemoglobina, de leucocitos, de plaquetas, de creatinina y de lactato deshidrogenasa (LDH), el subtipo FAB y OMS (2001, 2008 y 2016) de la LMA, la cifra de blastos en sangre periférica y en médula ósea, la presencia de mielodisplasia al diagnóstico, estudios citogenéticos (fórmula cromosómica, número de metafases), estudios moleculares (*FLT3*, ratio *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11*, *MLL*), la expresión del *VEGF-C* y de 84 genes implicados en las vías de señalización del *VEGF*.

4.7.5. Variables pronósticas

Se recogieron las variables necesarias para clasificar a los pacientes en los grupos de riesgo establecidos por las clasificaciones del grupo CETLAM, MRC y ELN 2010.

4.8. PROTOCOLO LMA-03

4.8.1. Grupos pronósticos

Según el protocolo CETLAM LMA-03, los pacientes fueron clasificados en grupos pronósticos dependiendo de las alteraciones citogenéticas y moleculares detectadas al diagnóstico, así como de la respuesta al tratamiento.

1. **Pronóstico favorable**: pacientes con alteraciones citogenéticas de buen pronóstico como t(8;21), inv(16) o t(16;16).
2. **Pronóstico intermedio**: pacientes con cariotipo normal (examen mínimo de 20 metafases) sin reordenamiento del gen *MLL* ni detección de la duplicación interna en tándem del gen *FLT3* (*FLT3-ITD*) y aquellos que, por citometría de flujo, la enfermedad mínima residual tras la intensificación fuera inferior al 0,1%.
3. **Pronóstico desfavorable**: pacientes con una cifra inicial de leucocitos al diagnóstico superior a $50 \times 10^9/L$, con alteraciones citogenéticas distintas a las incluidas en los grupos de pronóstico favorable o intermedio, con insuficientes metafases (<20) o sin estudio citogenético al diagnóstico, con reordenamiento del gen *MLL*, con mutación del gen *FLT3-ITD*, con cariotipo normal que requirieran 2 ciclos para alcanzar la remisión completa o aquellos que, por citometría de flujo, la enfermedad mínima residual tras la intensificación fuera superior al 0,1%.

4.8.2. Tratamiento

Los pacientes recibieron tratamiento según el protocolo LMA-03 del grupo CETLAM registrado en <https://clinicaltrials.gov> como NCT01723657.

El tratamiento constaba de las siguientes fases:

1º) Quimioterapia de inducción a la remisión:

- Idarrubicina 12 mg/m²/intravenoso, los días 1, 3, 5 (3 dosis).
- Ara-C o citarabina 500 mg/m²/12 horas/intravenoso, los días 1, 3, 5 y 7 (8 dosis).
- Etopósido 100 mg/m²/intravenoso, los días 1 a 3 (3 dosis).
- G-CSF (filgrastim): 150 microgramos/m²/subcutáneo desde el día 0 hasta finalizar la inducción (día 7) si cifra leucocitos es inferior a 30 x 10⁹/L al diagnóstico. Se interrumpía si la cifra de leucocitos durante el tratamiento era superior a 30 x 10⁹/l.

Los pacientes que no alcanzaban una remisión completa tras un primer ciclo, recibían un segundo ciclo de inducción.

2º) Quimioterapia de consolidación:

- Ara-C o citarabina 500 mg/m²/12 horas/intravenoso, los días 1 a 6.
- Mitoxantrone 12 mg m²/intravenoso, días 4 a 6.
- G-CSF (filgrastim): 150 microgramos/m²/subcutáneo desde el día 0 hasta finalizar la consolidación (día 6). Se interrumpía si la cifra de leucocitos durante el tratamiento era superior a 30 x 10⁹/l.

3º) El tratamiento posterior dependía del grupo pronóstico al que pertenecían:

- Pacientes de pronóstico **favorable** recibían una intensificación con:
 - Ara-C o citarabina 500 mg/m²/12 horas/intravenoso, los días 1 a 6.
 - Mitoxantrone 12 mg/m²/intravenoso, días 4 a 6.
 - G-CSF (filgrastim): 150 microgramos/m²/subcutáneo desde el día 0 hasta finalizar la consolidación (día 6). Se interrumpía si la cifra de leucocitos durante el tratamiento era superior a 30 x 10⁹/l.

Posteriormente:

- Los pacientes con un índice leucocitario [Leucocitos x (blastos en médula ósea/100)] menor de 20 al diagnóstico recibían un ciclo de Ara-C a dosis altas (3 g/m²/12 horas/intravenoso, días 1, 3 y 5).

- Los pacientes con índice leucocitario mayor >20 al diagnóstico recibían un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogo de sangre periférica.

- Pacientes de pronóstico **intermedio** recibían un TPH autólogo de sangre periférica.
- Pacientes de pronóstico **desfavorable** recibían un TPH alogénico de sangre periférica.
- Los pacientes con menos de 50 años, recibían un TPH alogénico familiar con selección

positiva de células CD34+ con ajuste de linfocitos a $3 \times 10^5/\text{kg}$ o de un donante no emparentado 9 ó 10/10.

- Los pacientes con más de 50 años, recibían un TPH alogénico familiar con acondicionamiento de intensidad reducida.

Los pacientes sin donante disponible, recibían Gemtuzumab Ozogamicina como *purging in vivo* y, posteriormente, un TPH autólogo de sangre periférica.

4.8.3. Evaluación de la respuesta al tratamiento

Para evaluar la respuesta al tratamiento se emplearon las siguientes definiciones:

1. Remisión completa: medula ósea normocelular o ligeramente hipocelular con proporción de blastos menor del 5% (incluidos promonocitos en caso de la LMA-M5), ausencia de bastones de Auer, ausencia de leucemia extramedular, cifra de neutrófilos y de plaquetas en ascenso.
2. Remisión parcial: persistencia de un 5 - 25% de blastos en medula ósea o una remisión completa que dure menos de 1 mes.
3. Refractariedad: cuando, tras un ciclo de quimioterapia, hay una proporción de blastos superior al 50% respecto a la del diagnóstico.
4. Resistencia relativa: cuando la proporción de blastos es inferior al 50%, comparada con la inicial, pero sin alcanzar criterios de remisión parcial. También se considera que existe una resistencia relativa cuando existe una remisión medular pero con presencia de leucemia extramedular.
5. Mortalidad en inducción: incluye el fallecimiento durante el tratamiento de inducción sin conocer la situación de la enfermedad, en remisión medular o con persistencia de la leucemia.
6. Mortalidad relacionada con el trasplante: todos los fallecimientos que ocurran en los 6 primeros meses después del trasplante y que no se deban a una recidiva leucémica.
7. Recaída medular: proporción de blastos igual o superior al 5% en medula ósea, en dos ocasiones consecutivas separadas al menos por 7 días.

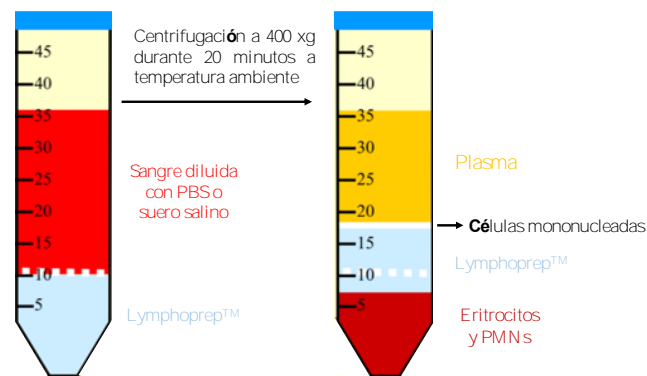
4.9. ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES

4.9.1. Extracción de ARN

El ARN se obtuvo de células mononucleadas de las muestras de médula ósea. Las células mononucleadas fueron separadas por centrifugación por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Las células mononucleadas (monocitos y linfocitos) tienen menor densidad flotante (menor de 1.077 g/ml) que los eritrocitos y los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) o granulocitos. El Lymphoprep™ está compuesto por ficoll que aglutina los eritrocitos y aumenta su velocidad de sedimentación, y metrizoato sódico, que es un compuesto que da la densidad adecuada. La técnica consiste en diluir la muestra con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) o suero salino y depositarla sobre el líquido de densidad 1.077 g/ml (Lymphoprep™). Se centrifuga a 400 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente para acelerar la separación y se retira la capa superior (plasma). Los eritrocitos y PMNs tienen una mayor densidad

que las células mononucleadas, por lo que sedimentan a través de la capa de Lymphoprep™ durante la centrifugación. El anillo blanquecino de células mononucleares de la interfaz del medio se aspira, se lava con PBS o suero salino y se centrifuga a 100 xg durante 5 minutos. Se aspira el sobrenadante (rico en plaquetas) y se vuelve a centrifugar. El sedimento o *pellet* celular se suspende en medio de cultivo o en PBS y queda listo para la extracción del ARN. Con esta técnica se obtienen más del 90% de los linfocitos (Figura 7).

Figura 7: Separación de las células mononucleadas utilizando Lymphoprep™



PBS: solución salina tamponada con fosfatos. PMNs: polimoronucleares.

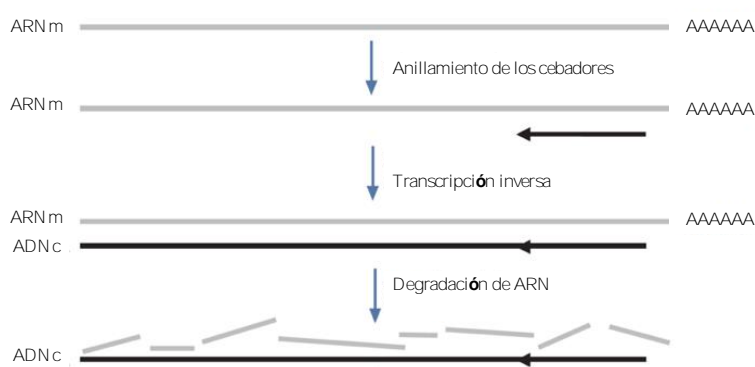
El ARN total fue extraído utilizando el reactivo TRIzol™ según las instrucciones del fabricante (Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se agrega 1 mL de TRIzol™ para cada placa de 2,5 cm al *pellet* y se incuba durante 5 min de 15 a 30°C. Se añade 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol™ usado. Se agita, se incuba durante 6 min de 15 a 30°C y se centrifuga a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. Se obtienen tres capas en el interior del tubo, la capa inferior u orgánica, que contiene ADA, la fase intermedia, que está constituida por proteínas y la capa inorgánica o superior, que contiene el ARN. Se extrae la fase inorgánica y se agrega a un tubo eppendorf nuevo con 0,5 mL de alcohol isopropílico. Se incuba 3 min de 15 a 30°C y se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se retira el sobrenadante, se agrega 1 mL de etanol al 75% y se centrifuga a 5500 rpm durante 5 min a 4°C. Se retira el sobrenadante y se re-suspende el *pellet* de ARN total en 50 µL de agua tratada con Dietil-piro carbonato, que inactiva las ribonucleasas.

4.9.2. Síntesis de ADN complementario

El ADN complementario o copia (ADNc) es una hebra de ADN de doble cadena, una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado. En el estudio, el ADNc se obtuvo por transcripción inversa (RT, *reverse transcription*) con el kit de transcripción QuantiTect® Reverse según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Izasa,

Madrid, Spain). Para cada reacción RT se utilizaron 2 µg de ARN como molde en un volumen final de 40 µL. La muestra de ARN se incubó con tampón de purificación a 42°C durante 2 minutos para retirar el ADN genómico contaminante. Posteriormente, la muestra de ARN está preparada para la transcripción reversa utilizando el Quantiscript Reverse Transcriptase, tampón Quantiscript RT, y RT Primer Mix. La reacción tiene lugar a 42°C y posteriormente la enzima es inactivada a 95°C. La Quantiscript Reverse Transcriptase tienen gran afinidad por el ARN y, junto con el tampón Quantiscript RT, permiten un alto rendimiento de ADNc. El RT Primer Mix asegura la síntesis de ADNc de todas las regiones de los transcritos de ARN, incluso de las regiones 5' (Figura 8). Esto permite gran rendimiento de muestras de ADNc para el análisis por PCR en tiempo real independientemente de dónde esté localizada la región diana en el transcrito.

Figura 8: Síntesis de ADN complementario



ARNm: ARN mensajero. ADNc: ADN complementario.

Nota. Adaptado de “Quantitect® Reverse Transcription Handbook” (p. 9), marzo 2009.

4.9.3. Cuantificación de la expresión del gen *VEGF-C*

La cuantificación relativa de la expresión del gen *VEGF-C* se realizó con la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real con la sonda fluorescente SYBR® Green mediante el sistema de PCR a tiempo real 7900HT de Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La expresión del gen *housekeeping* Abelson (*ABL*) se usó como referencia interna [178]. Los cebadores o *primers* para la amplificación del gen *VEGF-C* fueron los de RT² qPCR Primer Assay for Human VEGF-C de Qiagen (PPH00673B-200). Los cebadores para la amplificación del gen *ABL* (*Forward*: 5' TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3, *Reverse*: 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3') fueron sintetizados por IDT (Coralville, IA, USA). Las

muestras se analizaron por triplicado en placas de 384 pocillos con 5 μL de volumen final en cada reacción. Cada reacción estaba compuesta por 2,5 μL de Power SYBR® Green PCR 2X Master mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0,25 μL de cada cebador (directo o *forward* e inverso o *reverse*) a 10 μM , y 2 μL de ADNc molde.

Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron:

- 1º) Un primer paso de activación de 10 minutos a 95°C.
- 2º) Un segundo paso de amplificación de 40 ciclos durante 15 segundos a 95°C, y de 45 segundos a 60°C.
- 3º) Un paso final de disociación (análisis de la curva de disociación o *melting curve*) para confirmar la especificidad del producto amplificado.

La expresión relativa del gen *VEGF-C* se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ [177]. Los datos fueron normalizados según la media geométrica de los niveles de expresión del *VEGF-C* en donantes sanos. Las muestras fueron excluidas del análisis si el valor CT del gen *ABL* estaba fuera del rango normal (22–29,3), si tenían menos de dos réplicas válidas o si la media de réplicas tenía una desviación estándar mayor de 0,4 ciclos.

4.9.4. Análisis de genes de las vías de señalización del gen *VEGF*

La expresión de los genes implicados en las vías de señalización del *VEGF* se analizó mediante el RT² Profiler™ PCR Array Human VEGF Signaling (PAHS-091ZA) de Qiagen. Los genes estudiados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Genes de las vías de señalización del *VEGF* analizados

<i>AKT1</i>	<i>MAPK11</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>PPP3CB</i>
<i>AKT2</i>	<i>MAPK12</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>PPP3CC</i>
<i>AKT3</i>	<i>MAPK13</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>PPP3R1</i>
<i>ARNT</i>	<i>MAPK14</i>	<i>PIK3R3</i>	<i>PPP3R2</i>
<i>BAD</i>	<i>MAPK3</i>	<i>PIK3R5</i>	<i>PRKCA</i>
<i>CASP9</i>	<i>MAPKAPK2</i>	<i>PLA2G10</i>	<i>PRKCB</i>
<i>CAV1</i>	<i>MAPKAPK3</i>	<i>PLA2G12A</i>	<i>PRKCG</i>
<i>CDC42</i>	<i>NFAT5</i>	<i>PLA2G12B</i>	<i>PTGS2</i>
<i>FIGF</i>	<i>NFATC1</i>	<i>PLA2G1B</i>	<i>PTK2</i>
<i>FLT1</i>	<i>NFATC2</i>	<i>PLA2G2A</i>	<i>PXN</i>
<i>FLT4</i>	<i>NFATC3</i>	<i>PLA2G2D</i>	<i>RAC1</i>
<i>GRB2</i>	<i>NFATC4</i>	<i>PLA2G2E</i>	<i>RAC2</i>
<i>HIF1A</i>	<i>NOS3</i>	<i>PLA2G2F</i>	<i>RAF1</i>
<i>HRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>PLA2G3</i>	<i>SH2D2A</i>
<i>HSP90AA1</i>	<i>NRP1</i>	<i>PLA2G4A</i>	<i>SHC2</i>
<i>HSPB1</i>	<i>NRP2</i>	<i>PLA2G4B</i>	<i>SPHK1</i>
<i>KDR</i>	<i>PDGFC</i>	<i>PLA2G5</i>	<i>SPHK2</i>
<i>KRAS</i>	<i>PGF</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>SRC</i>

<i>MAP2K1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PLCG1</i>	<i>VEGFA</i>
<i>MAP2K2</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>PLCG2</i>	<i>VEGFB</i>
<i>MAPK1</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>PPP3CA</i>	<i>VEGFC</i>

El ADNc se obtuvo por transcripción inversa con el kit RT2 First strand según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Izasa, Madrid, Spain). Para cada reacción RT se utilizaron 2,5 µg de ARN como molde en un volumen final de 50 µL. Para la realización de la PCR, las muestras de ADNc fueron diluidas 1:2 y preparadas para la amplificación PCR. Cada 100 µL de muestra de ADNc se mezcló con 500 µL de agua libre de ARNasas y con 600 µL de Power SYBR® Green PCR 2X Master mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las muestras se colocaron en RT² Profiler 384 plate array, a razón de 10 µL en cada pocillo. Cada placa contenía 4 réplicas de 96 genes de expresión (84 genes de señalización del VEGF, 5 genes *housekeeping* y 7 pocillos con controles internos), que se utilizaron para el análisis de 4 muestras de ADNc. Se realizaron los ciclos térmicos en tiempo real y la detección con el Fast-Real time PCR system 7900HT de Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), según las instrucciones del fabricante.

Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron:

- 1º) Un primer paso de activación de 10 minutos a 95°C.
- 2º) Un segundo paso de amplificación de 40 ciclos durante 15 segundos a 95°C, y de 60 segundos a 60°C.
- 3º) Un paso final de disociación (análisis de la curva de disociación o *melting curve*) para confirmar la especificidad del producto amplificado.

El análisis de la expresión de los genes de las vías de señalización del VEGF se realizó con el programa RT² Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.2. La expresión relativa de cada gen se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El cálculo de ΔCT se realiza con el valor medio del CT de los cinco genes de referencia (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPLP0), tal y como se ha descrito previamente [179]. Los valores fueron normalizados utilizando el valor medio de la expresión de *VEGF-C* en las muestras analizadas como calibrador.

4.10. ANÁLISIS DE LOS DATOS

4.10.1. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete Rcmdr del programa estadístico R (*R Project for Statistical Computing*) versión 4.0.5. En todos los análisis se estableció como estadísticamente significativo todo aquel test con un valor de p menor de 0,05.

4.10.1.1. Análisis descriptivo

Para el análisis descriptivo del conjunto de pacientes se han descrito las frecuencias en las variables cualitativas, y los estimadores de tendencia central y de dispersión habituales (mediana, rango intercuartílico) en las cuantitativas.

4.10.1.2. Análisis de las variables categóricas

Para estudiar las diferencias en la expresión del *VEGF-C* entre variables categóricas que no seguían una distribución normal se utilizó el test de Wilcoxon (para 2 grupos) y el test de Kruskal–Wallis (para más de 2 grupos). Para calcular las tablas con dos filas y dos columnas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates. Las variables categóricas estudiadas se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: *Variables categóricas analizadas*

VARIABLE	VALORES
Sexo	Hombre Mujer
Estado funcional (ECOG)	ECOG 0–1: bueno ECOG 2–4: malo
Clasificación FAB	Ver Tabla 1
Clasificación OMS 2001	Ver Tabla 2
Clasificación OMS 2008	Ver Tabla 3
Clasificación OMS 2016	Ver Tabla 4
Cambios relacionados con la mielodisplasia	No Sí
Cariotipo	Alterado Normal No mitosis No realizado
Marcadores moleculares (<i>FLT3</i> , <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i>)	Normal Mutado
Marcadores moleculares (<i>AML1-ETO</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>MLL</i>)	Germinal Reordenado
Grupos pronósticos (CETLAM, MRC)	Favorable Intermedio Desfavorable
Grupos pronósticos (ELN2010)	Favorable Intermedio-I Intermedio-II Desfavorable
Remisión completa tras la inducción	Sí No
Muerte durante tratamiento de inducción	Sí No
Respuesta al tratamiento de inducción	Respuesta completa

VARIABLE	VALORES
	Respuesta parcial Refractariedad <i>Exitus</i> en inducción
Trasplante	Sí No
Recaída	Sí No
Estado en la última visita	Vivo Fallecido

Los subgrupos pronósticos (favorable, intermedio y desfavorable) se establecieron de acuerdo a las distintas clasificaciones del grupo CETLAM, MRC y ELN 2010. El estado de las mutaciones FLT3 y NPM1 se categorizó como: no mutados (FLT3-/NPM1-), FLT3 no mutado/NPM1 mutado (FLT3-/NPM1+), FLT3 mutado/NPM1 no mutado (FLT3+/NPM1-) y ambos mutados (FLT3+/NPM1+).

4.10.1.3. Análisis de las variables cuantitativas

Para medir la asociación lineal entre las variables se ha utilizado el coeficiente de correlación de Spearman para las tablas en las que tanto las columnas como las filas contenían valores ordenados y el coeficiente de correlación de Pearson cuando ambas variables de la tabla eran cuantitativas. Los valores oscilan entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente; el cero, significa “no correlación” pero no independencia.

El análisis de la dependencia de la expresión de los genes de la vía de señalización del *VEGF-C* se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Las variables cuantitativas analizadas se encuentran en la Tabla 17.

Tabla 17: Variables cuantitativas analizadas

VARIABLES (unidades)
Edad al diagnóstico (años)
Hemoglobina (g/dl)
Leucocitos (x 10 ⁹ /l)
Plaquetas (x 10 ⁹ /l)
Creatinina (mg/dl)
LDH (U/l)
Blastos en sangre periférica (%)
Blastos en médula ósea (%)
Expresión relativa del <i>VEGF-C</i>
Expresión relativa de genes de las vías de señalización

4.10.1.4. Regresión logística

La regresión logística es un tipo de análisis de regresión utilizado para estudiar el resultado de una variable categórica con dos niveles en función de otras variables independientes o predictoras. Se estudió la variable expresión del *VEGF-C* categorizándola en cuartiles (Q), Q1 *vs.* Q2-4, Q1-2 *vs.* Q3-4 y Q1-3 *vs.* Q4. Las variables independientes incluidas fueron mielodisplasia, grupos pronósticos y marcadores moleculares.

4.10.1.5. Curvas de Supervivencia

Para estudiar la relación entre la expresión del *VEGF-C* y la supervivencia global y la libre de evento se empleó el método de Kaplan-Meier. La prueba de rangos logarítmicos (*log-rank test*) se utilizó para comparar las curvas de supervivencia entre sí. La supervivencia libre de evento (leucemia) se calculó desde la fecha diagnóstico hasta la fecha de recaída, de la ausencia de respuesta al tratamiento, muerte por cualquier causa. Se consideró la supervivencia global desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha del fallecimiento del paciente.

4.10.2. Representación gráfica

En la representación gráfica de las variables se han utilizado los siguientes tipos de gráficos: histogramas, diagramas de sectores, de caja y de dispersión.

1. Un histograma es una representación gráfica de una variable en forma de barras, donde la superficie de cada barra es proporcional a la frecuencia de los valores representados. Ofrece una visión en grupo, permitiendo observar una tendencia de la población por ubicarse hacia una determinada región de valores posibles. En el eje vertical se representan las frecuencias, es decir el porcentaje de población que se ubica en un determinado valor o sub-rango de valores.
2. El gráfico o diagrama de sectores está formado por un círculo dividido en sectores circulares, de forma que los ángulos de cada sector sean proporcionales a la frecuencia del resultado representado, siendo más ancho cuanto más grande sea el porcentaje de esa categoría.
3. El diagrama de caja (también llamado, diagrama de caja y bigotes o *box plot*) es un método estandarizado para representar gráficamente una serie de datos numéricos a través de sus cuartiles. De esta manera, se muestran a simple vista la mediana y los cuartiles de los datos y también pueden representarse sus valores atípicos. Proporcionan una visión general de la simetría de la distribución de los datos.
4. El diagrama de dispersión es un tipo de diagrama matemático que utiliza las coordenadas cartesianas para mostrar los valores de dos variables para un conjunto de datos. El diagrama de dispersión puede sugerir varios tipos de correlaciones entre las variables con un intervalo de confianza determinado. La correlación puede ser positiva (aumento), negativa (descenso), o nula (las variables no están correlacionadas). Se ha dibujado una línea de ajuste (llamada también "línea de tendencia") con el fin de estudiar la correlación entre las variables.
5. Las curvas de supervivencia muestran las probabilidades de sobrevivir en un tiempo determinado.

La representación gráfica es una función en escalera descendiente, donde los escalones se producen en los tiempos de muerte y las cruces representan censuras.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Desde diciembre de 2003 hasta diciembre de 2011, se obtuvo muestra de médula ósea de 436 pacientes menores de 70 años diagnosticados de LMA *de novo* e incluidos en el protocolo LMA-03 del grupo cooperativo CETLAM. La determinación de la expresión del gen *VEGF-C* se pudo realizar en 353 de los pacientes y en todos ellos se analizaron las características clínicas y biológicas, los factores pronósticos y la evolución de la enfermedad. También se realizó el estudio de la expresión del gen en 6 muestras de médula ósea de sujetos sin patología hematológica que se utilizaron como controles. En 24 pacientes seleccionados al azar se estudió, además, la expresión de 84 genes implicados en las vías de señalización del *VEGF*.

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

La edad media al diagnóstico de los pacientes fue de 52 años con extremos de 17 y 70 años. En la serie había 191 hombres (54%) y 162 mujeres (46%). El estado general de los pacientes al diagnóstico fue bueno (ECOG 0-1) en 191 pacientes (72,4%), de 0 en el 26,2% y de 1 en el 46,2%, y malo (ECOG 2-4) en 73 pacientes (27,6%), de 2 en el 20,8%, de 3 en el 6,4% y de 4 en el 0,4%.

5.2. CARACTERÍSTICAS DE LA LMA

5.2.1. Datos de laboratorio

La mediana y el rango de los principales parámetros de laboratorio al diagnóstico se muestran en la Tabla 18.

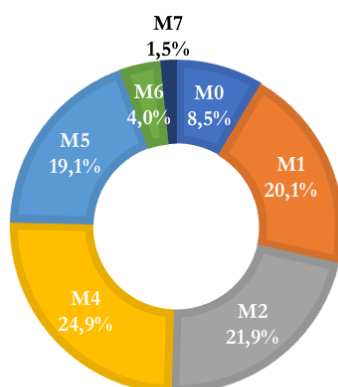
Tabla 18: *Valores de laboratorio al diagnóstico*

VARIABLE (unidades)	MEDIANA (rango)
Hemoglobina (g/dl)	9 (1,2 – 15,1)
Leucocitos (x 10 ⁹ /l)	14,5 (0,2 – 325)
Plaquetas (x 10 ⁹ /l)	63 (4 – 900)
LDH (U/l)	684 (117 – 13460)
Blastos en sangre periférica (%)	40 (0 – 100)
Blastos en médula ósea (%)	70 (3 – 100)

5.2.2. Clasificación FAB/OMS

El subtipo M4 (mielomonocítica) de la clasificación FAB fue el más frecuente (24,5%), seguido del subtipo M2 (con maduración) en un 21,9% y del M1 (sin maduración) en un 20,1%. En la Figura 9 se representa el porcentaje de pacientes en cada subgrupo de LAM según esta clasificación.

Figura 9: Pacientes en cada subgrupo según la clasificación FAB



Con el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2001 y de 2008, el subtipo de LMA más frecuente fue la leucemia mielomonocítica aguda con un 22,3% y un 19,1%, respectivamente. La LMA sin maduración, la segunda, con un 18,1% y un 17,1%, respectivamente. Con la OMS 2016, la LMA más numerosa es la que se asocia a la mutación NPM1 (26,6%) seguida de las LMA NOS, con maduración y la mielomonocítica aguda, ambas con un 10,6%. El porcentaje de pacientes en cada subgrupo se puede observar en la Tabla 19 (clasificación de 2001), en la Tabla 20 (clasificación de 2008) y en la Tabla 21 (clasificación de 2016).

Tabla 19: Pacientes en cada subgrupo según la clasificación OMS 2001

SUBTIPO OMS 2001	N (%)
LMA con t(8;21)(q22;q22), (<i>AML1/ETO</i>)	7 (2)
LMA con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22), (<i>CBFβ/MYH11</i>)	2 (0,6)
LMA con 11q23 (<i>MLL</i>)	1 (0,3)
LMA con displasia multilínea	45 (12,9)
LMA con mínima diferenciación	25 (7,2)
LMA sin maduración	63 (18,1)
LMA con maduración	54 (15,5)

SUBTIPO OMS 2001	N (%)
Leucemia mielomonocítica aguda	78 (22,3)
Leucemia monoblástica/monocítica aguda	57 (16,3)
Leucemia eritroide aguda	12 (3,4)
Leucemia megacarioblástica aguda	5 (1,4)

Tabla 20: Pacientes en cada subgrupo según la clasificación OMS 2008

SUBTIPO OMS 2008	N (%)
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9 (2,6)
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ-MYH11</i>	12 (3,4)
LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>	1 (0,3)
LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>	8 (2,3)
LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>	5 (1,4)
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	40 (11,4)
LMA con mínima diferenciación	25 (7,1)
LMA sin maduración	60 (17,1)
LMA con maduración	50 (14,3)
Leucemia mielomonocítica aguda	67 (19,1)
Leucemia monoblástica/monocítica aguda	56 (16,0)
Leucemia eritroide aguda	12 (3,4)
Leucemia megacarioblástica aguda	5 (1,4)

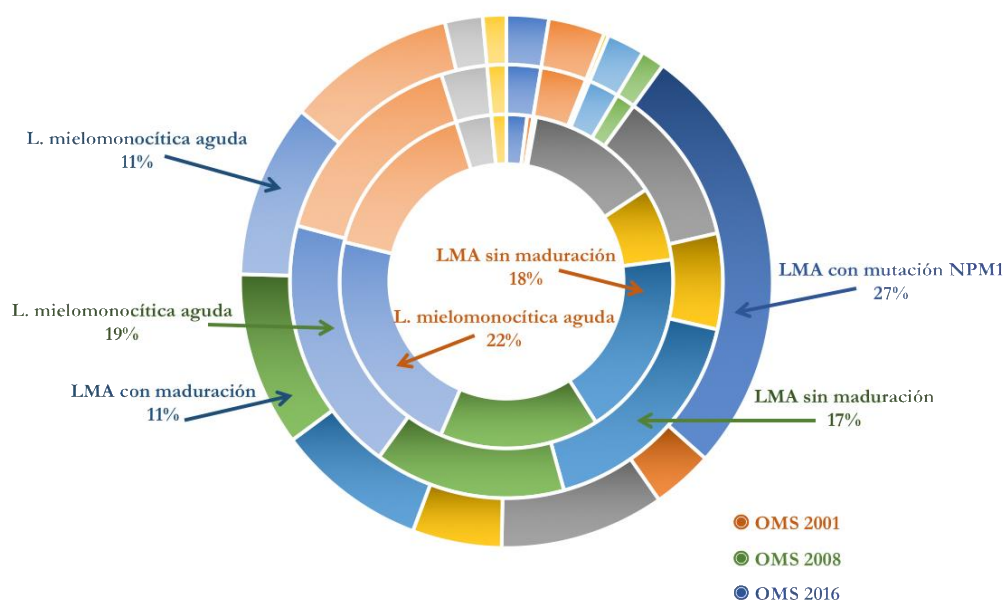
Tabla 21: Pacientes en cada subgrupo según la clasificación OMS 2016

SUBTIPO OMS 2016	N (%)
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9 (2,6)
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFBβ-MYH11</i>	12 (3,4)
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>	1 (0,3)
LMA con t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>	8 (2,3)
LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i>	5 (1,4)
LMA con <i>NPM1</i> mutado	93 (26,6)
LMA con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i>	13 (3,7)

SUBTIPO OMS 2016	N (%)
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	35 (10,0)
LMA con mínima diferenciación	19 (5,4)
LMA sin maduración	32 (9,1)
LMA con maduración	37 (10,6)
Leucemia mielomonocítica aguda	37 (10,6)
Leucemia monoblástica/monocítica aguda	36 (10,3)
Leucemia eritroide aguda	8 (2,3)
Leucemia megacarioblástica aguda	5 (1,4)

En la Figura 10 se compara el porcentaje de pacientes en cada subtipo de LMA según las clasificaciones de la OMS 2001, 2008 y 2016, y se muestran los subtipos más frecuentes de cada una de ellas.

Figura 10: Subtipos de LMA más frecuentes de las clasificaciones OMS 2001, 2008 y 2016



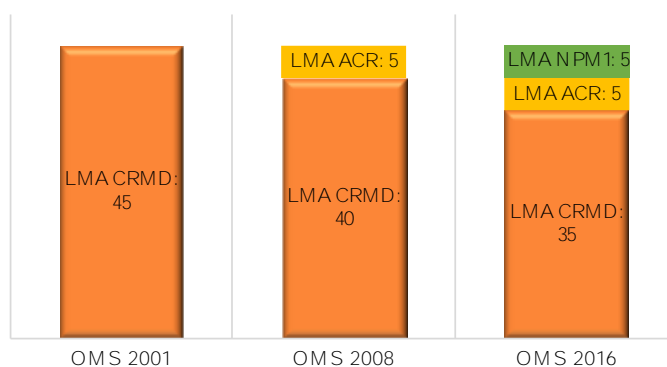
Nota. El gráfico representa los subtipos de LMA según la clasificación de la OMS 2001 (anillo interior), según la OMS 2008 (anillo medio) y según la OMS 2016 (anillo exterior). El texto y las flechas naranjas muestran los subtipos más frecuentes según la OMS 2001, los verdes según la OMS 2008 y los azules según la OMS 2016.

Con la incorporación de nuevos marcadores moleculares en la clasificación de la OMS 2016, 106 pacientes que pertenecían anteriormente a la categoría de “LMA no clasificadas en otras categorías” pasan a categorías como la “LMA con mutación NPM1” y la “LMA con mutación bialélica CEBPA”.

5.2.3. Presencia de mielodisplasia

En el estudio citomorfológico de las muestras de médula ósea se observó la presencia de rasgos displásicos en 45 pacientes (12,7%), que fueron clasificados como “LMA con displasia multilínea” según la clasificación OMS 2001. El resto de pacientes, 308 (87,3%), no tenían alteraciones morfológicas. Comparando las distintas clasificaciones de la OMS, el número de casos de la categoría “LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia” (CRMD) ha ido disminuyendo. De tal forma que, de la de 2001 a la de 2008, se pasó de 45 a 40 casos porque 5 pasaron a la categoría “LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes”, dos t(6;9) y tres t(3;3). Y de los 40 de la de 2008 en la de 2016 había 35 debido a que 5 casos pasaron a la categoría de “LMA con mutación NPM1” (Figura 11).

Figura 11: LMA CRMD según la OMS 2001, 2008 y 2016



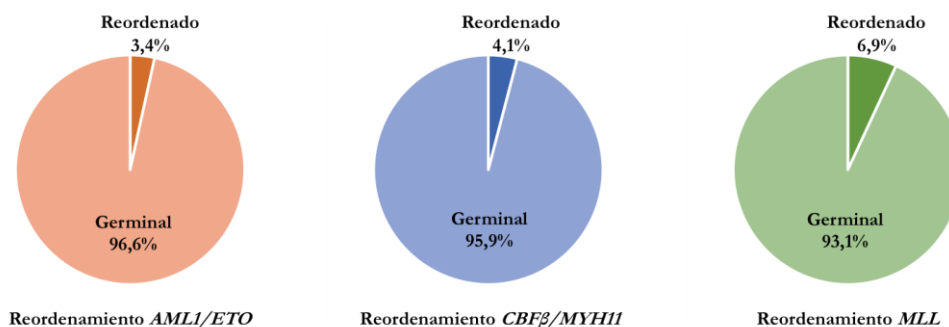
LMA: leucemia mieloide aguda. CRMD: cambios relacionados con la mielodisplasia. ACR: alteraciones citogenéticas recurrentes. NPM1: nucleofosmina.

5.2.4. Estudios citogenéticos

Se realizaron 296 estudios citogenéticos al diagnóstico (83,8%), el 48% presentaban un cariotipo normal y el 52% alterado. De los 57 pacientes (16,2%) en los que no estaban disponibles estos estudios, en 39 no se obtuvieron metafases suficientes y en 18 no se realizó el estudio.

Los reordenamientos *AML1/ETO*, *CBFB/MYH11* y *MLL* se detectaron en 11 (3,4%), 13 (4,1%) y 23 (6,9%) pacientes, respectivamente (Figura 12).

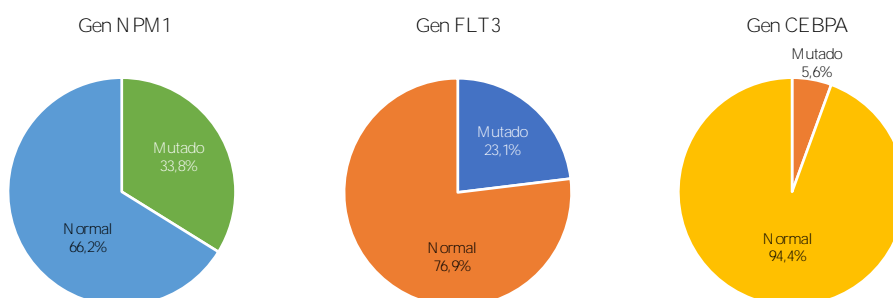
Figura 12: Representación de los reordenamientos *AML1/ETO*, *CBFβ/MYH11* y *MLL*



5.2.5. Estudios moleculares

De los genes estudiados en las muestras al diagnóstico, 93 (33,8%) pacientes tenían la mutación *NPM1*, 78 (23,1%) la mutación *FLT3-ITD* y 17 (5,6%) la mutación bialélica de *CEBPA* (Figura 13). De los 143 pacientes con cariotipo normal, 100 tenían mutaciones en algunos de los tres genes estudiados (70%).

Figura 13: Representación de los genes *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*



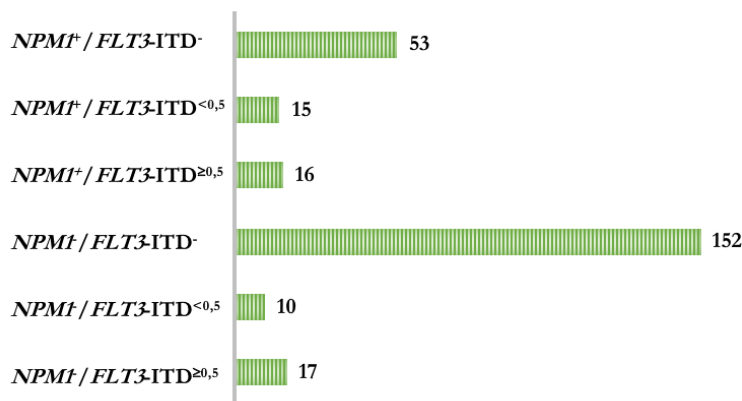
La *ratio* de *FLT3-ITD* estaba disponible en 67 (85,9%) de los 78 mutados, de los que 28 tenían una *ratio* <0,5 y 39 una *ratio* ≥0,5. La mediana de la *ratio* fue de 0,58 (0,03 – 15,17).

5.2.5.1. Estado mutacional de *NPM1/FLT3-ITD*

En la clasificación de riesgo de la ELN 2017 se incorpora la *ratio* de *FLT3-ITD* debido a su impacto pronóstico de forma que la mutación *NPM1* es un marcador de buen pronóstico en ausencia de la mutación *FLT3-ITD* o cuando *FLT3-ITD* tiene una *ratio* inferior a 0,5. Por todo ello, se decidió analizar la presencia o ausencia de ambas mutaciones y la *ratio*. Más de la mitad de los pacientes, 152 (57,8%), no presentaron ninguna de las dos mutaciones (*NPM1* / *FLT3-ITD*). El 20,2% tenían *NPM1* mutado sin *FLT3-ITD* (*NPM1*⁺ / *FLT3-ITD*). De los 93 pacientes con la mutación *NPM1*

(*NPM1*⁺), 41 asociaban la mutación *FLT3*-ITD (44,1%). Los resultados de las distintas combinaciones se muestran en la Figura 14.

Figura 14: Estado mutacional de *NPM1* y *FLT3*-ITD con la *ratio*



5.2.5.2. Estado mutacional de *NPM1*/*FLT3*-ITD en pacientes con cariotipo normal

Se analizaron las mutaciones de *NPM1* y *FLT3*-ITD así como la *ratio* sólo en los pacientes con cariotipo normal. El 40% no presentaron ninguna de las dos mutaciones, el 30,5% sólo tenían *NPM1* mutado y el 16,4% tenían ambos genes mutadas.

5.2.6. Grupos pronósticos

Según el protocolo LMA-03 del grupo CETLAM, se clasificaron en el grupo de buen pronóstico un 6% (21) de los pacientes, en el intermedio un 19,5% (69) y en el de mal pronóstico un 74,5% (263). El grupo de riesgo citogenético según el MRC fue favorable en 19 pacientes (6,4%), intermedio en 210 (70,4%) y adverso en 69 (23,2%). Con la clasificación de la ELN de 2010, 65 pacientes (22%) pertenecían al grupo de riesgo favorable, 85 (28,8%) al intermedio-I, 62 (21%) al intermedio-II y 82 (27,8%) al adverso.

No se pudo clasificar a los pacientes según la clasificación de la ELN de 2017 puesto que no tenían determinadas las mutaciones *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53*.

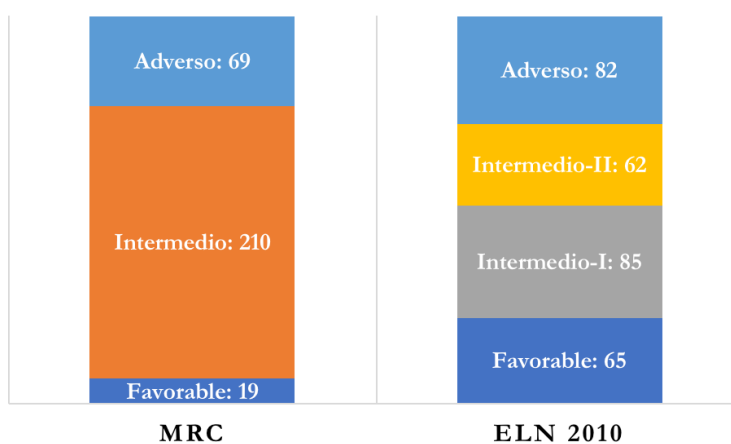
En la Tabla 22 se muestran los pacientes en cada grupo de riesgo según las clasificaciones CETLAM, MRC y ELN2010.

Tabla 22: Grupos de riesgo según las clasificaciones CELTAM, MRC y ELN2010

CETLAM		MRC		ELN2010	
Grupo	N (%)	Grupo	N (%)	Grupo	N (%)
Buen pronóstico	21 (6)	Favorable	19 (6,4)	Favorable	65 (22)
Pronóstico intermedio	69 (19,5)	Intermedio	210 (70,4)	Intermedio-I	85 (28,8)
Mal pronóstico	263 (74,5)	Adverso	69 (23,2)	Intermedio-II	62 (21)
				Adverso	82 (27,8)

En la Figura 15 se observa que el grupo de riesgo intermedio fue el más frecuente tanto con la clasificación del MRC como con la de la ELN2010.

Figura 15: Grupos de riesgo según las clasificaciones MRC y ELN2010



5.2.7. Tratamiento de la LMA

5.2.7.1. Quimioterapia

Tras el diagnóstico, 350 pacientes reciben quimioterapia de inducción a la remisión (2 fallecen antes de recibirla y del otro no se dispone de datos). El 65,4% obtuvieron una respuesta completa con la QT de inducción, el 16% una respuesta parcial, el 8,3% refractariedad y un 10,3% fallecieron durante la misma. El 17,6% recibió una QT de reinducción, obteniendo una respuesta completa el 62,9%. El 73,4% recibió una QT de intensificación. En la Tabla 23 se resume el tratamiento recibido y la respuesta alcanzada.

Tabla 23: *Quimioterapia recibida y respuesta alcanzada*

	N (%)
Quimioterapia de Inducción	
- Sí	350 (99,4)
- No	2 (0,6)
Respuesta a QT Inducción	
- Respuesta completa	229 (65,4)
- Respuesta parcial	56 (16,0)
- Refractariedad	29 (8,3)
- <i>Exitus</i> en inducción	36 (10,3)
Quimioterapia de Reinducción	
- Sí	62 (17,7)
- No	288 (82,3)
Respuesta a QT Reinducción	
- Remisión completa	39 (62,9)
- Refractario	19 (30,6)
- <i>Exitus</i>	4 (6,5)
Quimioterapia de Intensificación	
- Sí	257 (73,4)
- No	93 (26,6)

QT: quimioterapia.

5.2.7.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

Se realizaron 173 trasplantes (68 autólogos y 105 alogénicos), de tal forma que en el 59,4% de los pacientes que recibieron quimioterapia también se hizo un TPH. El donante fue familiar en 70 pacientes (66,7%) y de un donante no emparentado en 35 (33,3%). Se administró un acondicionamiento mieloablativo a 68 pacientes (64,8%) y no mieloablativo a 37 (35,2%). En la Tabla 24 se muestran las características de los trasplantes realizados.

Tabla 24: *Características de los TPH*

	N (%)
Tipo de trasplante	
- Autólogo	68 (39,3)
- Alógenico	105 (60,7)
Fuente de progenitores hematopoyéticos	

	N (%)
- Sangre periférica	151 (87,3)
- Sangre de cordón umbilical	18 (10,4)
- Médula ósea	4 (2,3)
Tipo de donante	
- Familiar	70 (66,7)
- No emparentado	35 (33,3)
Tipo de acondicionamiento	
- Mieloablatoivo	68 (64,8)
- No mieloablatoivo	37 (35,2)
Situación de la enfermedad al TPH	
- Primera remisión completa	141 (81,4)
- Segunda remisión completa	7 (4,1)
- Refractariedad	25 (14,5)

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

Según el protocolo LMA-03 del grupo CETLAM, los pacientes de los grupos pronósticos intermedio (69) y desfavorable (263) debían recibir un trasplante (autólogo o alogénico). Pero, de esos 332 candidatos a trasplante, sólo lo recibieron 173 (51,8%). Los motivos de que 159 pacientes no recibieran un TPH fueron fallecimiento durante la quimioterapia (57), recaída pre-TPH (29), ausencia de movilización de progenitores hematopoyéticos (26), refractariedad al tratamiento (24), contraindicación para el TPH (19) y participación en un ensayo clínico (3).

5.2.8. Evolución de la LMA

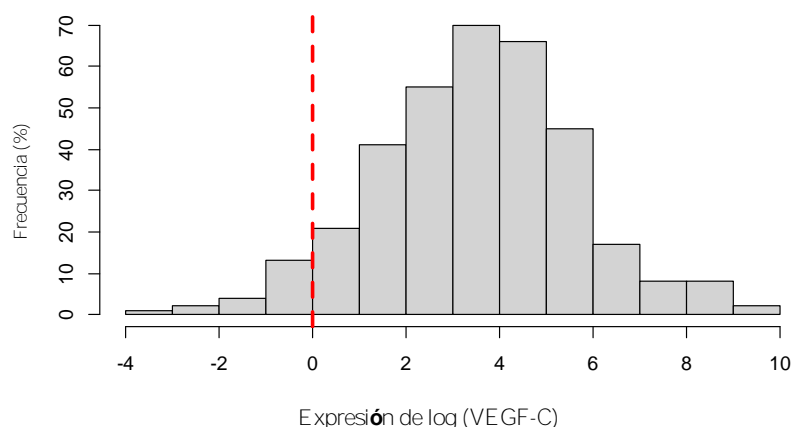
En un periodo de seguimiento de 8 años, fallecen 241 pacientes (68,3%). Más de la mitad, el 52,7%, fallecen por una recaída o una progresión de la enfermedad. El resto (45,6%) fallece por causas relacionadas con el tratamiento como las infecciones (54,5%), la toxicidad (32,7%) y la enfermedad injerto contra receptor (5,4%).

5.3. EXPRESIÓN DEL *VEGF-C* EN PACIENTES CON LMA

Se estudió la expresión del gen *VEGF-C* en células mononucleadas de médula ósea en 353 de los 436 pacientes con LMA (81%) y en 6 donantes sanos, utilizados como controles. Los resultados de la expresión del *VEGF-C* en pacientes con LMA se normalizaron utilizando como calibrador la media geométrica de la expresión del *VEGF-C* en los aspirados de médula de ósea de los donantes. Se observa que el rango de expresión del *VEGF-C* en pacientes con LMA es muy amplio, de 0,03 a

15885, con una mediana de expresión relativa del gen de 39,1 (rango: 8 – 126,7). En la Figura 16 se muestra, mediante un histograma, el logaritmo de la expresión del *VEGF-C* de toda la serie normalizada según la media geométrica del logaritmo de la expresión en los aspirados de médula ósea de los controles sanos. El 94% de las muestras expresaban niveles del *VEGF-C* superiores a la media geométrica de las muestras de los controles.

Figura 16: Logaritmo de la expresión del *VEGF-C* en pacientes con LMA



Nota. La línea roja discontinua señala la media geométrica del logaritmo de la expresión del gen *VEGF-C* en las muestras de los controles sanos.

5.3.1. Asociación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y las variables clínicas

Para analizar la relación entre los niveles de expresión del gen *VEGF-C* y las variables categóricas se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de continuidad. No se detectaron diferencias entre la mediana de expresión del *VEGF-C* de los hombres y de las mujeres ($p = 0,411$). La mediana de expresión del *VEGF-C* en pacientes con un estado funcional bueno (ECOG 0–1) comparada con los que lo presentaban malo (ECOG 2–4), no mostró diferencias significativas ($p = 0,656$) (Tabla 25).

El coeficiente de correlación de Spearman se empleó para estudiar la relación entre los niveles del *VEGF-C* y la edad (variable continua), sin observar ninguna asociación ($r_{bo} = 0,005$, $p = 0,921$).

Tabla 25: Relación entre niveles de expresión del *VEGF-C* y variables categóricas

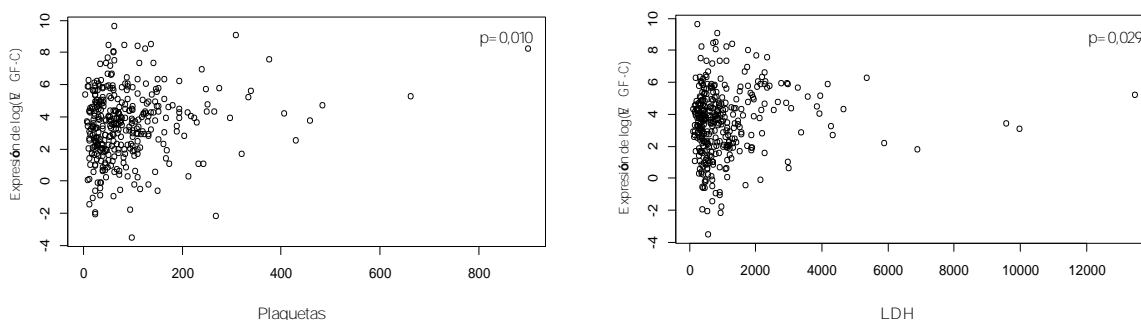
VARIABLE	VALOR	N	EXPRESIÓN DEL <i>VEGF-C</i> Mediana (Q3-Q1)	P
Sexo	Hombre	191	35,7 (104,5)	0,411

VARIABLE	VALOR	N	EXPRESIÓN DEL <i>VEGF-C</i> Mediana (Q3-Q1)	P
	Mujer	162	43,2 (124,3)	
Estado funcional (ECOG)	Bueno (0-1)	190	46,7 (128)	0,656
	Malo (2-4)	74	46,5 (162,8)	

5.3.2. Asociación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y las variables del laboratorio

Para estudiar la asociación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y las variables del laboratorio al diagnóstico de la enfermedad, se usó el coeficiente de correlación de Spearman. Se ha visto una correlación positiva entre la expresión del *VEGF-C* y la cifra de plaquetas ($\rho = 0,139$, $p = 0,010$), y la LDH ($\rho = 0,118$, $p = 0,029$) (Figura 17). De tal forma que, cuanto mayor es la expresión del gen, mayor cifra de plaquetas y de LDH.

Figura 17: Relación entre la expresión del *VEGF-C* y la cifra de plaquetas y de LDH



Sin embargo, no se ha observado una correlación con la cifra de hemoglobina, de leucocitos, de creatinina ni con el porcentaje de blastos en sangre periférica y en médula ósea (Tabla 26).

Tabla 26: Relación entre la expresión del *VEGF-C* y las variables continuas

VARIABLE	N	EXPRESIÓN del <i>VEGF-C</i>	
		ρ	p
Edad	353	0,005	0,921
Hemoglobina	339	-0.016	0,748

EXPRESIÓN del <i>VEGF-C</i>			
VARIABLE	N	<i>rho</i>	p
Leucocitos	350	0,068	0,203
Plaquetas	349	0,139	0,010*
Creatinina	330	-0,089	0,108
LDH	342	0,118	0,029*
Blastos en SP	278	-0,045	0,459
Blastos en MO	348	-0,072	0,182

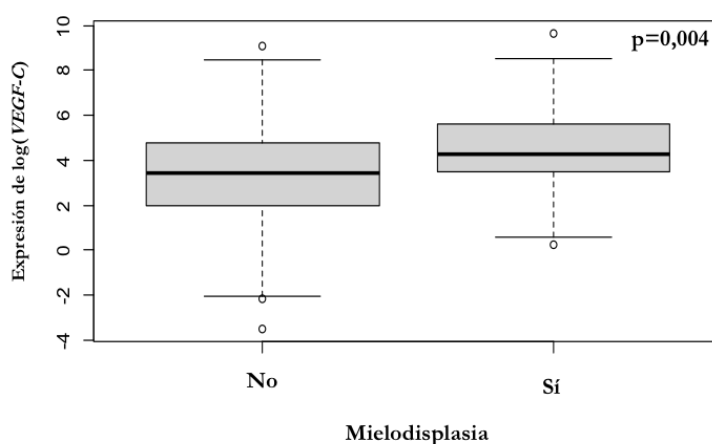
LDH: lactato deshidrogenasa, SP: sangre periférica;
MO: médula ósea.

*p < 0,05

5.3.2.1. Asociación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y la mielodisplasia

La mediana de expresión del *VEGF-C* en pacientes con LMA con mielodisplasia fue significativamente mayor que en los pacientes con otros subtipos de LMA ($p = 0,004$) (Figura 18).

Figura 18: Asociación entre la expresión del *VEGF-C* y la mielodisplasia

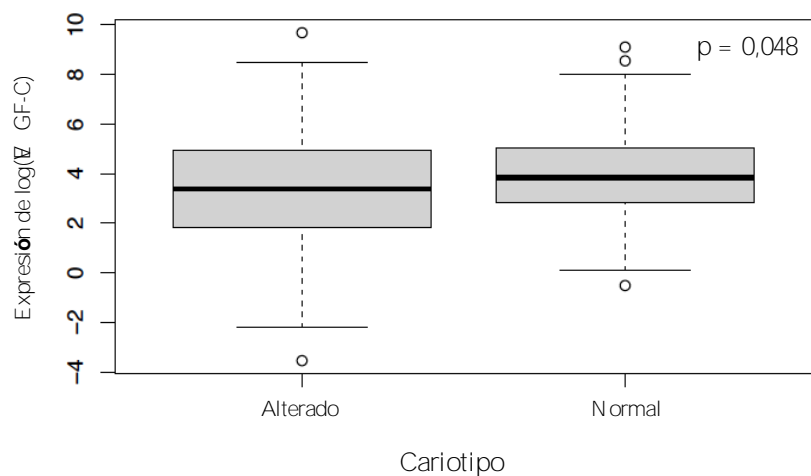


5.3.3. Relación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y marcadores pronósticos

5.3.3.1. Marcadores citogenéticos

Los pacientes con cariotipo normal presentaron una mediana de expresión del gen significativamente superior a los que no lo presentaban ($p = 0,048$) (Figura 19).

Figura 19: Asociación entre la expresión del VEGF-C y el cariotipo



No se observaron diferencias significativas en mediana de expresión del *VEGF-C* entre los pacientes con el reordenamiento *MLL* y los que no lo presentaban ($p = 0,517$).

5.3.3.2. Marcadores moleculares

Se estudió la asociación entre los niveles de expresión relativa del *VEGF-C* y los marcadores moleculares *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA*. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 27.

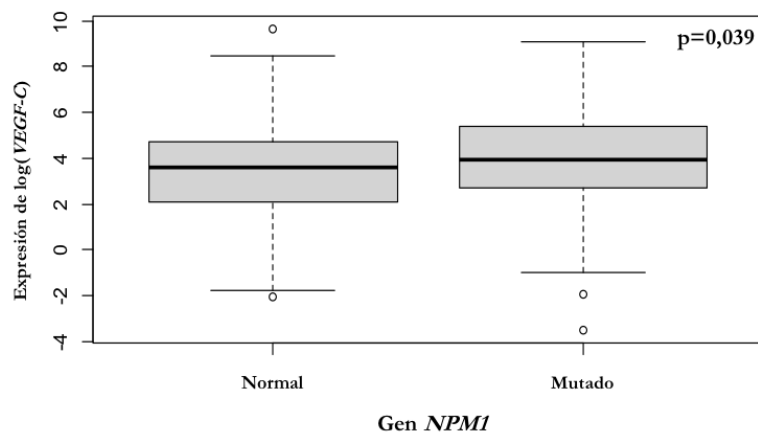
Tabla 27: Expresión del VEGF-C según los marcadores moleculares

GEN	ESTADO	N	EXPRESIÓN DEL <i>VEGF-C</i> Mediana (Q3-Q1)	P
<i>NPM1</i>	No mutado	182	35,7 (99,1)	0,039*
	Mutado	93	52,5 (218,8)	
<i>FLT3-ITD</i>	No mutado	260	35,7 (149,5)	0,288
	Mutado	78	49,0 (163,8)	
Ratio <i>FLT3-ITD</i>	Ratio <0,5	39	41,1 (103,2)	0,654
	Ratio ≥0,5	39	39,1 (195,3)	
<i>CEBPA</i>	No mutado	286	39,8 (118,9)	0,019*
	Mutación bialélica	17	9,2 (42,5)	

* $p < 0,05$

En los pacientes con la mutación *NPM1*, la mediana de expresión del *VEGF-C* fue significativamente superior a los que no la presentaban ($p = 0,039$) (Figura 20).

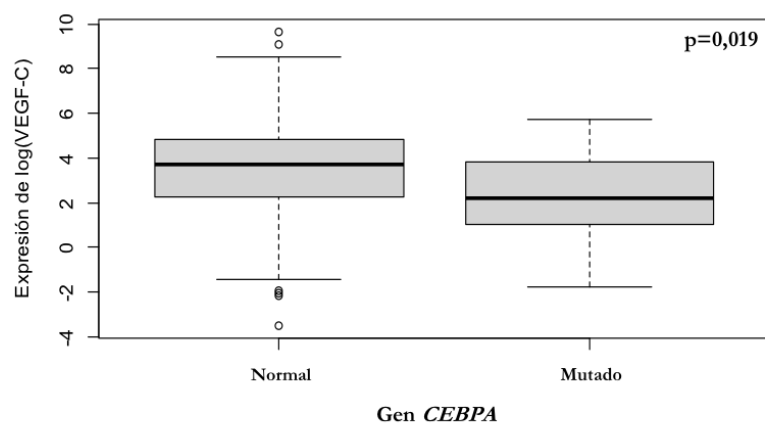
Figura 20: *Expresión del VEGF-C según el gen NPM1*



No hubo diferencias significativas en la mediana de expresión del *VEGF-C* dependiendo de si los pacientes presentaban o no la mutación del gen *FLT3-ITD* ($p = 0,288$). Al estudiar la expresión del gen según la *ratio* de *FLT3-ITD*, $<0,5$ o $\geq 0,5$, tampoco se observaron diferencias significativas ($p = 0,351$), aunque la mediana de expresión fue mayor en el grupo con la *ratio* $\geq 0,5$.

La mediana de expresión del *VEGF-C* en los pacientes con la mutación bialélica *CEBPA* fue significativamente menor comparada con los que no la tenían ($p = 0,019$) (Figura 21).

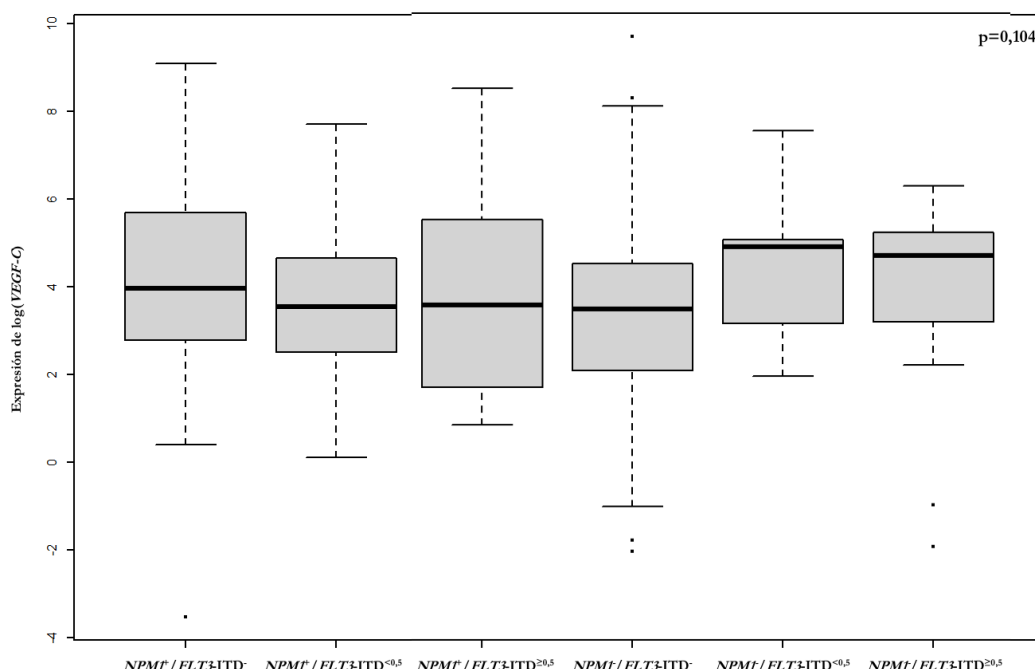
Figura 21: *Expresión del VEGF-C según el gen CEBPA*



5.3.3.2.1. Estado mutacional de *NPM1*/*FLT3-ITD*

Se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis la relación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y el estado mutacional de los genes *NPM1* y el estado mutacional y la *ratio* de *FLT3-ITD*. Las categorías fueron *NPM1* mutado (*NPM1*⁺) / *FLT3-ITD* normal (*FLT3-ITD*⁻), *NPM1* mutado / *FLT3-ITD* mutado con *ratio* <0,5 (*FLT3-ITD*^{<0,5}), *NPM1* mutado / *FLT3-ITD* mutado con *ratio* ≥0,5 (*FLT3-ITD*^{≥0,5}), *NPM1* normal (*NPM1*⁻) / *FLT3-ITD* normal, *NPM1* normal / *FLT3-ITD* mutado con *ratio* <0,5, *NPM1* normal / *FLT3-ITD* mutado con *ratio* ≥0,5. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,104$) (Figura 22) aunque el nivel de expresión fue más elevado en las categorías *NPM1*⁻ / *FLT3-ITD*^{<0,5} y *NPM1*⁻ / *FLT3-ITD*^{≥0,5}.

Figura 22: Expresión del *VEGF-C* según el estado mutacional de *NPM1* y *FLT3-ITD*



5.3.3.2.2. Estado mutacional de *NPM1*/*FLT3-ITD* en pacientes con cariotipo normal

También se estudió la expresión del gen según el estado mutacional de *NPM1* y *FLT3-ITD*, pero sólo en el subgrupo de pacientes con cariotipo normal, sin observar diferencias significativas ($p = 0,123$) (Tabla 28). En las categorías *NPM1*⁻ / *FLT3-ITD*^{<0,5} y *NPM1*⁻ / *FLT3-ITD*^{≥0,5} la mediana de expresión fue mayor que en el resto.

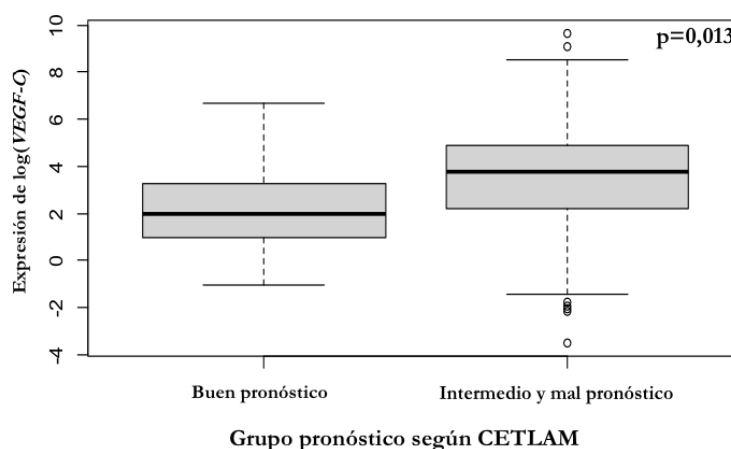
Tabla 28: Expresión del gen *VEGF-C* según el estado mutacional en pacientes con cariotipo normal

GENES	N	EXPRESIÓN DEL <i>VEGF-C</i> Mediana (Q3-Q1)	P
<i>NPM1</i> mutado / <i>FLT3-ITD</i> normal	39	52,4 (276,1)	0,123
<i>NPM1</i> mutado / <i>FLT3-ITD ratio</i> <0,5	13	34,5 (143,1)	
<i>NPM1</i> mutado / <i>FLT3-ITD ratio</i> ≥0,5	8	31 (135,8)	
<i>NPM1</i> normal / <i>FLT3-ITD</i> normal	51	43,0 (66)	
<i>NPM1</i> normal / <i>FLT3-ITD ratio</i> <0,5	7	138 (81,9)	
<i>NPM1</i> normal / <i>FLT3-ITD ratio</i> ≥0,5	10	108,8 (122,4)	

5.3.3.3. Grupos pronósticos

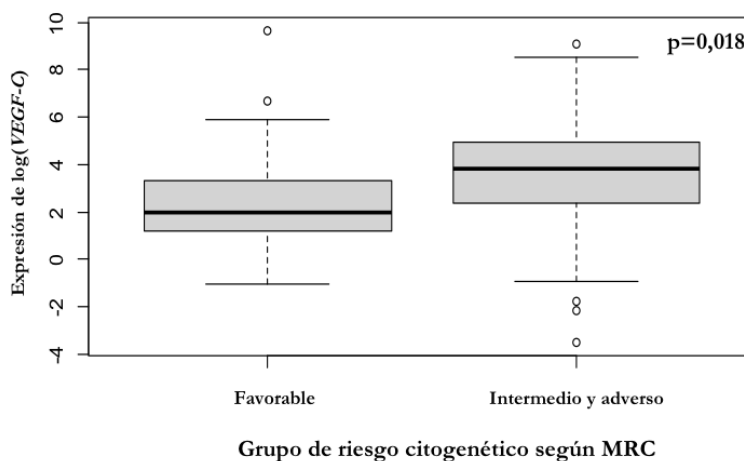
Se estudió la expresión del *VEGF-C* en los grupos pronósticos de las clasificaciones del CETLAM, del MRC y de la ELN 2010, comparando el riesgo favorable frente al intermedio y adverso. En general, se ha observado una mayor expresión en los grupos pronósticos intermedio y adverso respecto al grupo favorable.

Primero se agruparon los pacientes del grupo intermedio y mal pronóstico según el protocolo LMA-03 del grupo CETLAM y se comparó la mediana de expresión con la del grupo de buen pronóstico. La mediana de expresión del *VEGF-C* en los pacientes del grupo de buen pronóstico fue significativamente inferior que la de los grupos intermedio y mal pronóstico ($p = 0,013$) (Figura 23).

Figura 23: Expresión del *VEGF-C* según los grupos pronósticos de CETLAM

Según la clasificación de riesgo citogenético del MRC, la mediana de expresión del *VEGF-C* en los pacientes clasificados en los grupos intermedio y adverso fue significativamente superior a la del grupo favorable ($p=0,018$) (Figura 24).

Figura 24: Expresión del *VEGF-C* según los grupos pronósticos del MRC



No hubo diferencias significativas en la mediana de expresión del *VEGF-C* entre los pacientes clasificados según la ELN 2010 y agrupados por grupo favorable frente a los grupos intermedio y adverso, sin observar diferencias ($p = 0,665$). También se comparó el grupo favorable e intermedio-I frente a intermedio-II y adverso, sin observar diferencias ($p = 0,457$) (Tabla 29).

Tabla 29: Expresión del *VEGF-C* según los grupos pronósticos y las clasificaciones

CLASIFICACIÓN	GRUPO DE RIESGO	N	EXPRESIÓN del <i>VEGF-C</i> Mediana (Q3-Q1)	P
CETLAM	Buen pronóstico	21	7,1 (23,7)	0,013*
	Intermedio – mal pronóstico	332	42,9 (120,9)	
MRC	Favorable	19	7,2 (24,3)	0,018*
	Intermedio - adverso	279	46,3 (131,2)	
ELN 2010	Favorable	65	31,3 (158,4)	0,665
	Intermedio I y II - adverso	229	44,0 (132)	
	Favorable – intermedio I	150	43,7 (135,1)	
	Intermedio II - adverso	144	40,6 (134,3)	0,457

* $p < 0,05$

5.3.4. Relación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y la respuesta al tratamiento

En cuanto a la respuesta al tratamiento, no se observaron diferencias significativas en la mediana de expresión del *VEGF-C* entre en los que alcanzaron o no la remisión completa ($p = 0,622$). Tampoco hubo diferencias entre los pacientes que fallecieron o no durante la quimioterapia de inducción ($p = 0,518$).

5.4. EXPRESIÓN DEL *VEGF-C* Y SU CORRELACIÓN CON VARIABLES SIGNIFICATIVAS

La expresión de los niveles de *VEGF-C* se ha categorizado y se ha realizado un análisis de regresión logística para estimar el resultado de los niveles *VEGF-C* bajos *vs.* altos en función de las variables más significativas, mielodisplasia, grupos pronósticos y marcadores moleculares. Se ha categorizado en los cuartiles Q1 *vs.* Q2-Q3-Q4, Q1-Q2 *vs.* Q3-Q4 (mediana) y Q1-Q2-Q3 *vs.* Q4.

5.4.1. Mielodisplasia

Tras analizar el resultado de la variable niveles de *VEGF-C* bajo *vs.* alto en función de la presencia de mielodisplasia, el riesgo de tener un nivel de expresión del *VEGF-C* alto (Q3-Q4) se multiplica por 2,56 veces con un intervalo de confianza del 95% de 1,33 a 5,13 en el subtipo de LMA con mielodisplasia ($p = 0,006$).

5.4.2. Grupos pronósticos

El grupo de buen pronóstico según la clasificación CETLAM fue un factor protector para tener una expresión alta del *VEGF-C* frente al grupo de mal pronóstico ($p = 0,014$), tanto si se estudia con el modelo Q1 *vs.* Q2-Q3-Q4 como con Q1-Q2 *vs.* Q3-Q4.

En la clasificación de la MRC, el grupo de riesgo favorable fue un factor protector para tener una expresión alta del *VEGF-C* frente al grupo de mal pronóstico de forma significativa ($p = 0,013$), sólo con el modelo Q1-Q2 *vs.* Q3-Q4.

En la Tabla 30 se muestran los resultados de los tres grupos pronósticos con las *Odd ratio* y sus correspondientes intervalos de confianza al 95%.

Tabla 30: Regresión logística de los grupos pronósticos en la expresión de *VEGF-C*

		Q1 vs. Q2-Q3-Q4			Q1-Q2 vs. Q3-Q4			Q1-Q2-Q3 vs. Q4		
		ODDS RATIO	IC al 95%	P	ODDS RATIO	IC al 95%	P	ODDS RATIO	IC al 95%	P
C E T L A M	Ref. malo <i>vs.</i> bueno	0,32	0,13 – 0,80	0,014*	0,25	0,07 – 0,69	0,014*	0,66	0,19 – 1,87	0,476
	Ref. malo <i>vs.</i> intermedio	1,87	0,96 – 3,94	0,081	1,44	0,85 – 2,49	0,177	0,72	0,36 – 1,34	0,319

		Q1 vs. Q2-Q3-Q4			Q1-Q2 vs. Q3-Q4			Q1-Q2-Q3 vs. Q4		
		ODDS RATIO	IC al 95%	P	ODDS RATIO	IC al 95%	P	ODDS RATIO	IC al 95%	P
M	Ref. adverso vs. favorable	0,37	0,13 – 1,04	0,059	0,22	0,06 – 0,67	0,013*	0,65	0,17 – 2,06	0,494
	Ref. adverso vs. intermedio	1,68	0,89 – 3,12	0,102	0,94	0,54 – 1,63	0,838	0,88	0,48 – 1,63	0,667
E	Ref. adverso vs. favorable	1,12	0,53 – 2,40	0,761	0,78	0,40 – 1,49	0,450	0,76	0,37 – 1,56	0,463
	Ref. adverso vs. intermedio-I	1,86	0,88 – 4,02	0,106	1,23	0,67 – 2,28	0,499	0,75	0,38 – 1,47	0,407
	Ref. adverso vs. intermedio-II	0,83	0,40 – 1,73	0,616	0,80	0,41 – 1,54	0,501	0,69	0,32 – 1,43	0,324

Ref.: referencia. IC: intervalo de confianza

*p < 0,05

5.4.3. Marcadores moleculares

En el análisis de los marcadores moleculares, el no tener la mutación *NPM1* fue un factor protector para tener una expresión alta del *VEGF-C* de forma significativa (p = 0,044). Además, el riesgo de tener *VEGF-C* alto (Q2-Q3-Q4) se multiplica por 2,8 si un paciente no tiene la mutación *CEBPA* (p = 0,041). En la Tabla 31 se muestran los resultados de los marcadores moleculares con las *Odd ratio* y sus correspondientes intervalos de confianza al 95%.

Tabla 31: Regresión logística de los marcadores moleculares en la expresión de *VEGF-C*

		Q1 vs. Q2-Q3-Q4			Q1-Q2 vs. Q3-Q4			Q1-Q2-Q3 vs. Q4		
		ODDS RATIO	IC al 95%	P	ODDS RATIO	IC al 95%	P	ODDS RATIO	IC al 95%	P
<i>FLT3</i>	Ref. normal vs. mutado	0,40	0,37 – 2,27	0,950	0,97	0,44 – 2,11	0,938	0,67	0,30 – 1,60	0,340
<i>NPM1</i>	Ref. mutado vs. normal	0,51	0,26 – 0,96	0,044*	0,65	0,39 – 1,07	0,091	0,66	0,38 – 1,16	0,147
<i>CEBPA</i>	Ref. mutado vs. normal	2,80	1,01 – 7,59	0,041*	2,37	0,85 – 7,60	0,114	2,48	0,68 – 15,96	0,236

Ref.: referencia. IC: intervalo de confianza

*p < 0,05

5.4.4. Análisis multivariable

Se realizó un análisis multivariable con las variables que salieron significativas en el univariable de las regresiones logísticas y la única significativa fue la mutación *CEBPA* en Q1 vs. Q2-Q4. Los pacientes que no tenían la mutación tenían un mayor riesgo de tener unos niveles del *VEGF-C* elevados ($p = 0,033$) (Tabla 32).

Tabla 32: Análisis multivariable

		Q1 vs. Q2-Q3-Q4		
		ODDS RATIO	IC al 95%	p
<i>CETLAM</i>	Ref. malo vs. bueno	0,42	0,14 – 1,27	0,112
	Ref. malo vs. intermedio	1,66	0,79 – 3,80	0,204
<i>NPM1</i>	Ref. mutado vs. normal	0,56	0,27 – 1,11	0,108
<i>CEBPA</i>	Ref. mutado vs. normal	3,18	1,06 – 9,26	0,033*

Ref.: referencia. IC: intervalo de confianza

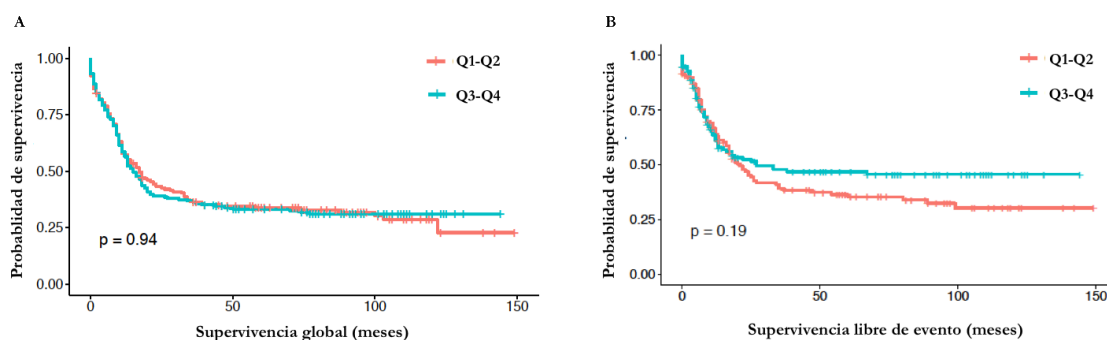
* $p < 0,05$

5.5. EXPRESIÓN DEL *VEGF-C* Y SUPERVIVENCIA

Para estudiar la influencia de los niveles de expresión del *VEGF-C* en la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) se empleó el método Kaplan-Meier. La prueba de rangos logarítmicos (*log-rank test*) se utilizó para comparar las curvas de supervivencia entre sí. El nivel de expresión del gen *VEGF-C* (variable continua) se categorizó en cuartiles. La mediana de seguimiento fue de 85 meses (2 – 149).

No se observaron diferencias significativas en la SG y la SLE según la expresión de *VEGF-C* en pacientes con LMA (Figura 25).

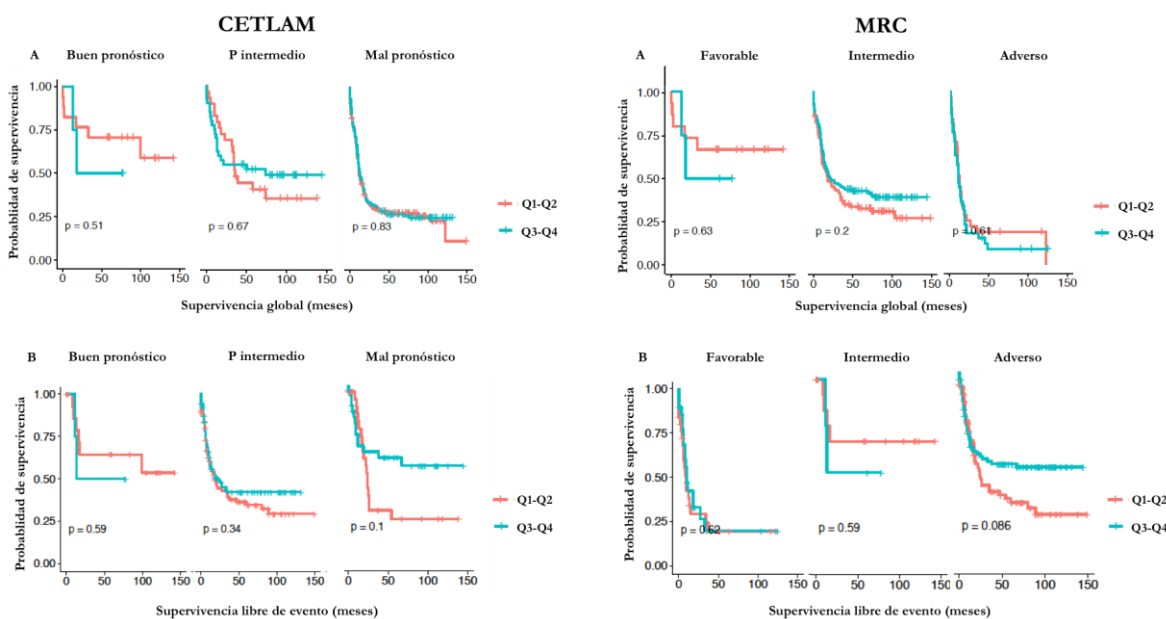
Figura 25: Supervivencia global y libre de evento según la expresión del VEGF-C en toda la serie



Nota. Curvas de Kaplan–Meier de la SG (A) y SLE (B) según la expresión del VEGF-C categorizada según la mediana en la serie global. Se muestran los valores de p de la prueba de rangos logarítmicos (*log-rank test*).

Tampoco se observaron diferencias cuando lo estudiamos por subgrupos, según la presencia o no de mielodisplasia, según los grupos pronósticos del CETLAM, el MRC (Figura 26) y la ELN 2010 y, según los marcadores moleculares NPM1 y CEBPA.

Figura 26: SG y SLE según la expresión del VEGF-C en los grupos CETLAM y MRC



Nota. Curvas de Kaplan–Meier de la SG (A) y SLE (B) según la expresión del *VEGF-C* categorizada según la mediana en grupos pronósticos de la clasificación CETLAM (curvas izquierdas) y del MRC (curvas derechas). Se muestran los valores de p de la prueba de rangos logarítmicos (*log-rank test*).

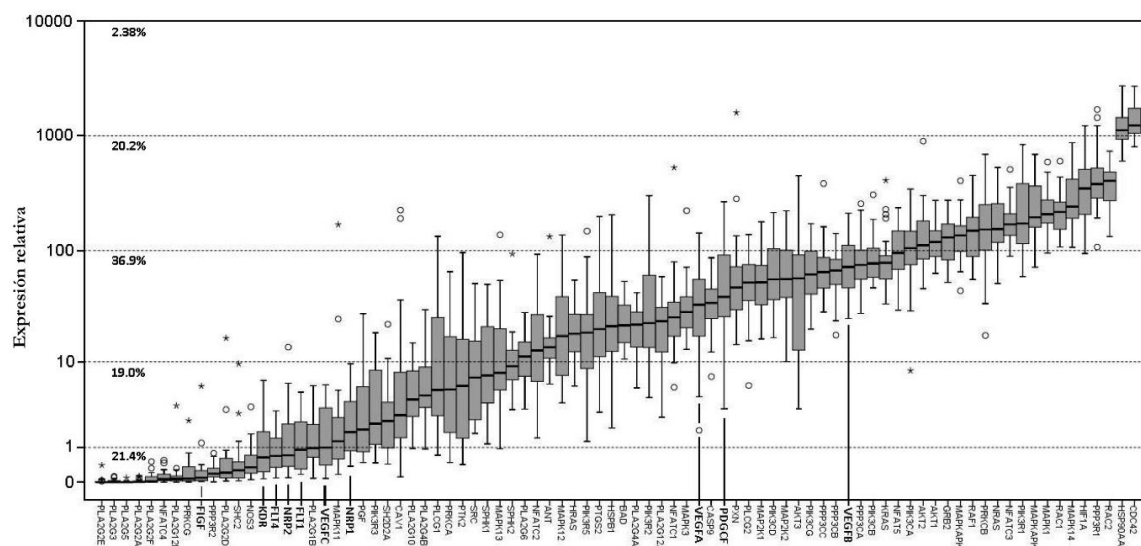
No se realizó el análisis multivariable de la supervivencia ya que ninguno de los factores fue significativo de forma individual.

5.6. EXPRESIÓN DE GENES DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL *VEGF-C*

5.6.1. Expresión relativa de los genes de las vías de señalización del *VEGF*

Se estudió la expresión relativa de 84 genes de las vías señalización del *VEGF* en 24 pacientes de la serie. La expresión de los genes se normalizó utilizando la mediana de la expresión de *VEGF-C* en los pacientes. La expresión del *VEGF-C* no estaba aumentada en comparación con otros genes de señalización, de forma que el 60% de ellos estaban expresados más de una orden de magnitud mientras que sólo el 20% estaba por debajo (Figura 27).

Figura 27: Expresión relativa de 84 genes de señalización del *VEGF*



Nota. Las cajas representan los percentiles 25 y 75, y la línea horizontal la mediana.

5.6.2. Expresión de los genes de los ligandos del *VEGF*

Se analizó la expresión de los genes de varios ligandos del *VEGF*, *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D* (*FIGF*) y *VEGF-E* (*PDGFC*). Ninguno de estos ligandos estaba en el mismo nivel de expresión que el *VEGF-C*. Los genes *VEGF-A*, *VEGF-E* (*PDGFC*) y *VEGF-B* estaban expresados

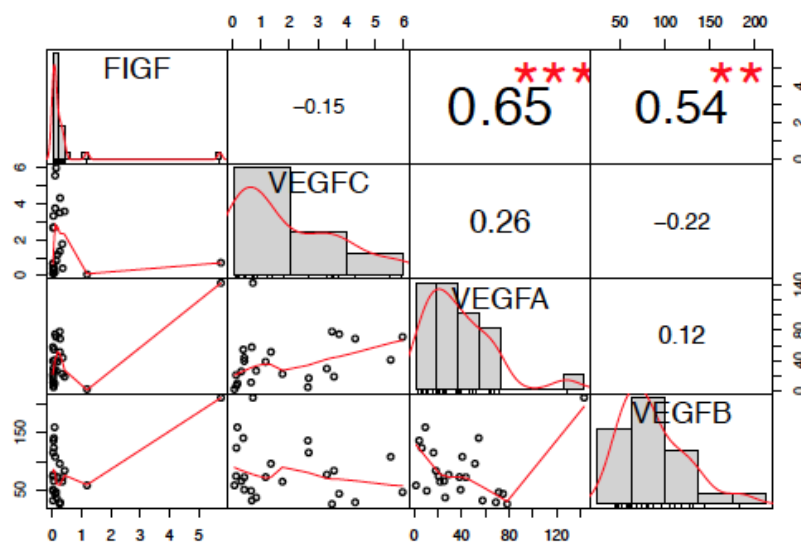
más de una orden de magnitud que el *VEGF-C* (mediana de 33,7, 39,2 y 72,3, respectivamente). Sin embargo, la expresión del *VEGF-D* (*FIGF*) estaba por debajo (mediana 0,09).

La expresión de los genes de los cinco receptores, *VEGFR-1* (*FLT1*), *VEGFR-2* (*KDR*), *VEGFR-3* (*FLT4*), *NRP1* y *NRP2* fue similar a la del *VEGF-C*.

5.6.3. Correlación de la expresión entre genes de los ligandos del *VEGF*

Con el test de correlación de Pearson se estudió la asociación lineal entre los genes de la familia *VEGF* y ninguno de los genes de los ligandos del *VEGF* estudiados se correlacionó con la expresión del *VEGF-C*. Sin embargo, se descubrieron correlaciones positivas entre *VEGF-A* y *VEGF-D* (*FIGF*) ($r_{ho} = 0,65$, $p < 0,001$), y *VEGF-B* y *VEGF-D* (*FIGF*) ($r_{ho} = 0,54$, $p < 0,01$) (Figura 28).

Figura 28: Correlación y descriptivo de la expresión entre genes de los ligandos del *VEGF*



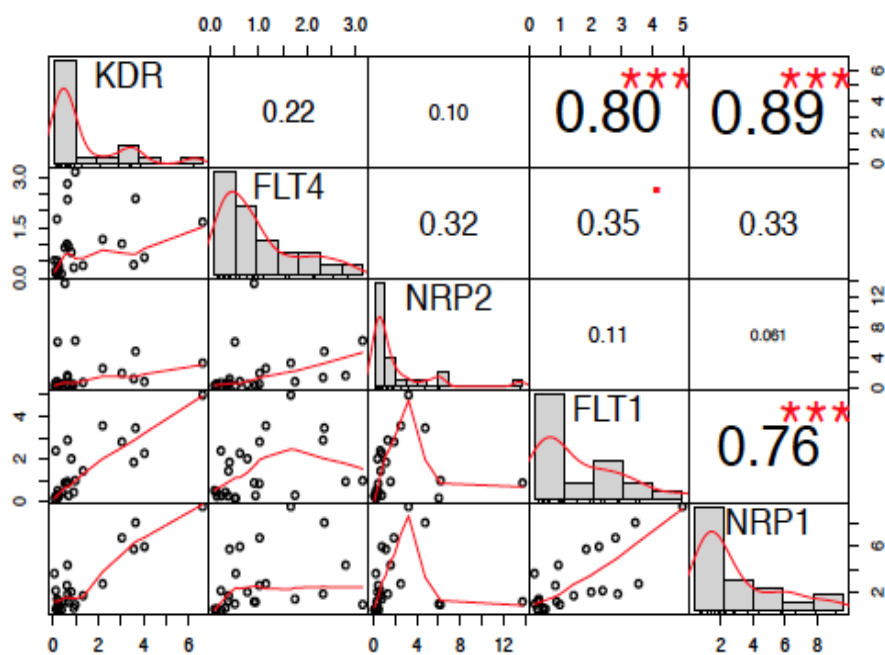
** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

Nota. Cuanto mayor es el tamaño del número r_{ho} en la figura, menor es el valor de p .

5.6.4. Correlación de la expresión entre genes de los receptores del *VEGF*

Al estudiar la asociación lineal entre los genes de los receptores de la familia *VEGF* con el test de correlación de Pearson, se observó una correlación positiva entre los receptores *VEGFR-2* (*KDR*) y *VEGFR-1* (*FLT1*) ($r_{ho} = 0,80$, $p < 0,0001$), *VEGFR-2* (*KDR*) y *NRP1* ($r_{ho} = 0,89$, $p < 0,0001$) y *VEGFR-1* (*FLT1*) y *NRP1* ($r_{ho} = 0,76$, $p < 0,0001$) (Figura 29). Por tanto, existe una correlación fuerte en la expresión de los genes de los receptores *VEGFR-1* (*FLT1*), *VEGFR-2* (*KDR*) y *NRP1*.

Figura 29: Correlación y descriptivo de la expresión entre genes de los receptores

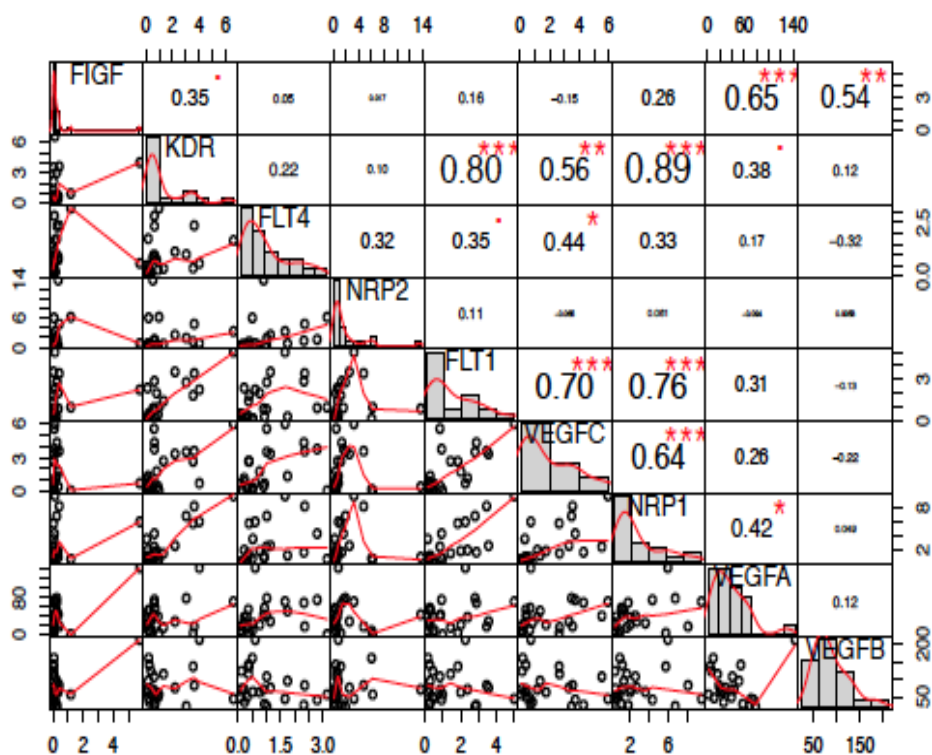


*** $p < 0,0001$

Nota. Cuanto mayor es el tamaño del número *rho* en la figura, menor es el valor de p .

En el análisis conjunto de los genes de los ligandos y los receptores, se observó una correlación positiva entre la expresión del *VEGF-C* y los receptores *VEGFR-1* (*FLT1*) ($rho = 0,70$, $p = 0,0001$), *VEGFR-2* (*KDR*) ($rho = 0,56$, $p = 0,004$), *VEGFR-3* (*FLT4*) ($rho = 0,44$, $p = 0,03$) y *NRP1* ($rho = 0,64$, $p = 0,001$). La expresión de los genes de los receptores no se correlacionó con el resto de ligandos del *VEGF*, a excepción de una correlación débil entre *NRP1* y *VEGF-A* ($rho = 0,42$, $p = 0,04$) (Figura 30).

Figura 30: Correlación y descriptivo de la expresión entre genes de la familia VEGF/VEGFR



*p < 0,05; **p < 0,001; ***p < 0,0001

Nota. Cuanto mayor es el tamaño del número rho en la figura, menor es el valor de p.

5.6.5. Correlación de la expresión de los genes de la familia VEGF/VEGFR

Con respecto al resto de genes de las vías de señalización estudiados, se observó correlación entre el VEGF-C y el gen de la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (PTGS2) (rho = 0,635, p = 0,0008). La expresión de los genes ARNT y AKT3 se correlacionaron con VEGF-A y VEGF-B pero no con VEGF-C (Figura 31).

Figura 31: Correlación de los genes estudiados de la vía de señalización del VEGF

Gen VEGF	Gen de la vía de señalización VEGF	<i>rho</i>	p
VEGF-C	<i>FLT1 (VEGFR1)</i>	0,704	0,0001
	<i>NRP1</i>	0,642	0,0007
	<i>PTGS2</i>	0,635	0,0008
	<i>KDR (VEGFR2)</i>	0,56	0,004
	<i>FLT4 (VEGFR3)</i>	0,439	0,03
	VEGF-A	<i>FIGF</i>	0,646
<i>ARNT</i>		0,622	0,001
<i>RAC1</i>		0,621	0,001
<i>CDC42</i>		0,447	0,03
<i>AKT3</i>		-0,438	0,03
<i>NRP1</i>		0,417	0,04
VEGF-B		<i>ARNT</i>	0,588
	<i>PDGFC</i>	0,573	0,003
	<i>FIGF</i>	0,544	0,006
	<i>PLA2G1B</i>	0,472	0,02
	<i>AKT3</i>	0,459	0,02
	<i>PIK3CB</i>	0,442	0,03
	<i>HRAS</i>	0,42	0,04
	<i>PPP3CA</i>	0,42	0,04
	<i>MAPK1</i>	-0,414	0,04

Gen VEGF	Gen de la vía de señalización VEGF	<i>rho</i>	p	
FIGF	<i>ARNT</i>	0,97	0	
	<i>PIK3CB</i>	0,84	0,0000003	
	<i>RAC1</i>	0,7	0,0001449	
	<i>PPP3R2</i>	0,66	0,0004345	
	<i>VEGFA</i>	0,65	0,0006446	
	<i>HSP90AA1</i>	0,63	0,0010585	
	<i>CAV1</i>	0,62	0,0011906	
	<i>HRAS</i>	0,61	0,0014304	
	<i>VEGFB</i>	0,54	0,0059624	
	<i>PLCG2</i>	0,5	0,014	
	<i>CDC42</i>	0,47	0,022	
	<i>NFATC3</i>	0,45	0,029	
	<i>RAC2</i>	0,43	0,037	
	PDGFC	<i>AKT3</i>	0,77	0,00001
		<i>PPP3CA</i>	0,68	0,0002
<i>VEGFB</i>		0,57	0,0034	
<i>HSPB1</i>		0,52	0,0085	
<i>PLA2G1B</i>		0,47	0,0202	
<i>PLA2G4B</i>		0,43	0,0358	
<i>NFATC3</i>		0,41	0,0453	
<i>PLCG1</i>		0,41	0,0469	
<i>PIK3R1</i>		0,4	0,0512	

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos de leucemogénesis y de las mejoras en el tratamiento de la LMA, un porcentaje elevado de pacientes sigue falleciendo por esta enfermedad. El estudio de las características de la enfermedad al diagnóstico es fundamental porque clasifica a los pacientes en grupos pronósticos para poder adaptar el tratamiento al riesgo de recaída y reducir la toxicidad. Sin embargo, existe un grupo de pacientes en los que no se detectan alteraciones citogenéticas o moleculares, o en los que no es posible realizar el estudio cromosómico, y cuya evolución es muy heterogénea. Para una estratificación más precisa de estos pacientes en subgrupos de riesgo, es necesario encontrar nuevos factores clínicos o biológicos que permitan personalizar el tratamiento, reducir su toxicidad y realizar un seguimiento estrecho de la enfermedad residual medible (ERM). El aumento de la angiogénesis se postula como uno de los mecanismos fisiopatológicos de la LMA, contribuyendo al crecimiento de este tipo de tumores, al igual que en los tumores sólidos. Distintos estudios han demostrado un aumento de la angiogénesis en la médula ósea de los pacientes con LMA e incluso un aumento de los niveles plasmáticos *in vitro* e *in vivo* de citoquinas proangiogénicas, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), secretadas por las células leucémicas. El VEGF es un factor proangiogénico que está implicado en la angiogénesis tumoral, actuando como regulador de la proliferación, supervivencia, angiogénesis y migración de las células neoplásicas. Diversos estudios han investigado el significado pronóstico de los niveles de expresión del VEGF en pacientes con LMA pero, en general, con un número pequeño de pacientes y con distintas técnicas no comparables. Los blastos de la LMA expresan la isoforma VEGF-C y sus receptores VEGFR-2 (KDR) y VEGFR-3 (FLT4). El papel de la expresión del gen *VEGF-C* en pacientes con LMA y su influencia en el desarrollo y en la evolución de la LMA no está todavía bien establecido. Este gen podría servir para clasificar a los pacientes en grupos pronósticos, realizar una monitorización de la ERM y ser una diana terapéutica. Tampoco se conoce bien la implicación de los genes de las vías de señalización del VEGF en el control del crecimiento de las células leucémicas, así como en la transformación de hemopatías malignas en LMA. La interrupción de estas vías de señalización podría utilizarse como diana terapéutica para prevenir, tratar o retrasar la transformación. En esta tesis doctoral, se han estudiado los niveles de expresión relativa del gen *VEGF-C* en una serie de 353 pacientes menores de 70 años con LMA *de novo* tratados homogéneamente y se ha analizado su relación con diversas variables clínicas, citogenéticas y moleculares de valor pronóstico establecido. También se ha analizado la influencia de la expresión del gen sobre la evolución de la enfermedad. Por otro lado, en 24 pacientes se ha investigado la expresión de 84 genes implicados en las vías de señalización del VEGF con el fin de dilucidar qué genes están relacionados con la expresión de *VEGF-C* así como el grado de dependencia de la expresión entre los genes de la familia *VEGF/VEGFR*.

La comparación de nuestro trabajo con otros publicados es difícil, sobre todo, por la escasez de estudios sobre este tema, el número y diferencias en la población, así como por la forma de analizar y presentar los datos obtenidos. Sin embargo, la mayoría de nuestros resultados han sido congruentes con los de otros autores. Además, se trata de un estudio exploratorio en el que se pretendía identificar un nuevo factor pronóstico biológico en pacientes con LMA y, dada la heterogeneidad de esta neoplasia es posible que dicho factor tenga influencia en el pronóstico de un subgrupo de pacientes y en otros no, y que, por lo tanto, se necesite de un tamaño muestral mayor para poder llegar a detectar relaciones significativas.

Tras el análisis de las características al diagnóstico de la LMA de la población estudiada, cabe señalar que no difieren de las descritas previamente por otros grupos. La edad media al diagnóstico, 52 años, es similar a la descrita en estudios previos [180]. En el estudio hay un predominio de varones, aunque sin diferencias significativas, al igual que en el trabajo de Wiernik *et al.* (2021), donde analizó el efecto del género en 3546 pacientes diagnosticados de la LMA e incluidos en 10 protocolos del ECOG, con una proporción de mujeres del 43,6 al 60% y, por tanto, sin diferencias en la distribución por género [181]. El estado funcional de la mayoría de los pacientes (72,4%) fue bueno (ECOG 0-1), similar al estudio de Ostgard *et al.* (2015) en población danesa con 1247 pacientes con LMA *de novo*, donde el 81% tenían un ECOG 0-1 al diagnóstico [180]. Los datos de laboratorio también fueron parecidos a los de otros estudios [159].

Al analizar los subtipos de LMA según las clasificaciones de la OMS 2001, 2008 y 2016, se observan cambios importantes con la aparición de la de 2016, gracias a la incorporación de nuevos marcadores genéticos. En nuestro estudio, 106 pacientes que fueron clasificados en las categorías de “LMA no clasificadas en otras categorías” y “LMA con CRMD” según la OMS 2008, pertenecerían a las categorías “LMA con mutación *NPM1*” y “LMA con mutación bialélica *CEBPA*” en la clasificación de la OMS 2016. De tal forma que la mayoría de esos pacientes que estaban en el grupo de riesgo genético intermedio pasarían al grupo favorable según la ELN 2017, ante la presencia de esos dos marcadores de buen pronóstico. Hoy en día, la implicación terapéutica de este cambio de grupo es fundamental puesto que los pacientes recibirían un tratamiento menos intensivo, minimizando los efectos adversos del mismo [182].

La presencia de mielodisplasia en el 12,7% de los pacientes fue ligeramente inferior al 24-35% reportado en la base de datos SEER (programa estadounidense de vigilancia, epidemiología y resultados finales) del Instituto Nacional del Cáncer [183].

En la mayoría de los pacientes se realizó el estudio citogenético al diagnóstico y casi la mitad presentaban un cariotipo normal. De éstos, la mitad presentaba una mutación del gen *NPM1*, *FLT3*-ITD o de ambos. Papaemmanuil *et al.* (2016) estudiaron 1540 pacientes combinando mutaciones conductoras con datos clínicos y citogenéticos para definir subgrupos genómicos de LMA. Encontraron que casi la mitad de los pacientes no podían ser clasificados en ninguno de los subgrupos

citogenéticos o moleculares de la clasificación de la OMS 2016 a pesar de que el 96% de estos pacientes tenía alguna mutación conductora [184]. De ahí la importancia de hallar nuevos marcadores para una mejor caracterización de la LMA al diagnóstico.

En nuestra serie, la incidencia de mutaciones *NPM1* (34%), *FLT3-ITD* (23%) y *CEBPA* (6%) fue similar a otros estudios [32][33]. En los pacientes con cariotipo normal, se detectaron mutaciones en algunos de estos genes en el 70%, con resultados similares al trabajo de Schlenk *et al.* (2008) donde analizaron los datos de 872 pacientes con citogenética normal de cuatro ensayos clínicos y la incidencia de mutaciones en *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA* fue del 53%, 31% y 13%, respectivamente [185]. Los autores destacan la importancia del estudio molecular, además del citogenético, en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia de estos pacientes. El tamaño muestral y las técnicas utilizadas para la determinación de los marcadores explicarían las diferencias en la incidencia en este subgrupo con citogenética normal.

Aunque se disponía de pocos casos, se estudió el estado mutacional de *NPM1* respecto a la *ratio* de *FLT3-ITD*. La combinación más frecuente fue *NPM1* no mutado y *FLT3-ITD* alto ($\geq 0,5$), a diferencia del estudio de Döhner *et al.* (2020) [186], donde fue *NPM1* mutado y *FLT3-ITD* alto ($\geq 0,5$). La distribución de los grupos de riesgo según el MRC y la ELN 2010 fue similar a la observada en otros estudios, con un predominio del grupo de riesgo intermedio [159][187]. El grupo favorable fue más numeroso en la clasificación de la ELN 2010 que en la del MRC, debido a la introducción de marcadores moleculares como la mutación de *NPM1* y la bialélica de *CEBPA*. El grupo adverso también fue mayor en la ELN 2010 debido a la determinación de la mutación *FLT3-ITD*. En el caso del protocolo CETLAM, observamos que se invierten los números y el grupo de mal pronóstico es el que predomina. Esto es debido a que este grupo incluía a los pacientes con insuficientes metafases o sin estudio citogenético al diagnóstico, así como a los pacientes que requerían 2 ciclos para alcanzar la remisión completa o los que, por citometría de flujo, la enfermedad mínima residual tras la intensificación era superior al 0,1%. El 16,2% de nuestros pacientes no disponían del estudio citogenético al diagnóstico y el 11,2% necesitaron 2 ciclos de quimioterapia para alcanzar una primera remisión completa. Además, según dicho protocolo, todos los pacientes con la mutación *FLT3-ITD* se clasificaban en el grupo de mal pronóstico, independientemente de la *ratio* de *FLT3-ITD* y del estado mutacional de *NPM1* [188]. Teniendo en cuenta la *ratio* de *FLT3-ITD* y el estado mutacional de *NPM1*, más de la mitad de los pacientes con la mutación *FLT3-ITD* hubieran pasado a pertenecer a los grupos favorable e intermedio (11,7%).

En nuestra serie no se pudo clasificar a los pacientes según la clasificación de la ELN de 2017 puesto que entonces no se realizaban de rutina las mutaciones *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53*.

La tasa de respuesta completa a la quimioterapia de inducción, la tasa de refractariedad y la tasa de muerte fueron similares a las de otros estudios [189][190].

En cuanto al tratamiento recibido, según el protocolo LMA-03 del grupo CETLAM, los pacientes de los grupos pronósticos intermedio y desfavorable debían recibir un trasplante (autólogo o alogénico). Sin embargo, sólo lo recibieron el 51,8% porque el resto, o falleció durante la quimioterapia, o fue refractario a la quimioterapia o recayó antes del TPH. Las características de los trasplantes realizados son similares a los descritos en la literatura [191].

Durante el periodo de seguimiento de 8 años, el 68,3% los pacientes fallecen, la mitad por recaída o por progresión de la enfermedad, y la otra mitad por complicaciones relacionadas con el tratamiento, principalmente infección y toxicidad. Según la base de datos del SEER [192], la supervivencia relativa a los 5 años de estos pacientes es del 29,5%.

Nuestros hallazgos concuerdan con diversos estudios que han demostrado niveles elevados de la proteína VEGF en pacientes con LMA en diferentes tipos de muestras (plasma [193], sobrenadante de los blastos [149], líneas celulares [194]) y con distintas técnicas (inmunohistoquímica [195], ELISA [196], PCR [163]). En nuestro estudio se han utilizado muestras de médula ósea y la PCR como técnica para cuantificar los niveles de expresión del gen *VEGF-C* y se ha observado un aumento de la expresión relativa con una media de 40 veces en pacientes con LMA con respecto a los controles sanos, al igual que en otros estudios [155][154]. Y, aunque el rango de los niveles de expresión del gen es amplio, el 94% de los pacientes tenían valores superiores a la media geométrica de las muestras de los controles. Nuestros análisis se han realizado en base a la expresión relativa del *VEGF-C* y no en niveles absolutos por lo que, para medir cuantitativamente la expresión en la práctica clínica diaria, sería necesaria la estandarización del método.

Ante el aumento de la expresión del *VEGF-C* en los pacientes con LMA, se estudió su relación con diversas variables, algunas de valor pronóstico establecido. En las variables clínicas no se observó una relación significativa entre los niveles de expresión del gen y la edad, el sexo o el estado funcional (ECOG) del paciente. En cambio, sí que se ha visto una correlación entre la expresión del gen y la cifra de plaquetas y de LDH al diagnóstico. De tal forma que, cuanto mayor es la expresión del gen, mayor cifra de plaquetas y de LDH. Zhang *et al.* (2020) encontraron una asociación entre niveles bajos de plaquetas y una mayor SG y SLE en pacientes con LMA de riesgo intermedio [197], por lo que niveles elevados podrían asociarse a una menor supervivencia. La LDH es un marcador de la carga tumoral y un factor pronóstico adverso independiente [198] y su aumento se ha relacionado con un aumento de la vascularización de la médula ósea en pacientes con LMA [199], al igual que el gen *VEGF-C*.

La expresión del *VEGF-C* fue significativamente mayor en las muestras de pacientes con LMA con mielodisplasia ($p = 0,004$). El impacto pronóstico de los rasgos displásicos en la LMA es un tema controvertido. Mientras algunos autores sostienen que la presencia aislada de displasia en las LMA no tiene significado pronóstico [200], otros afirman que predice una menor respuesta al tratamiento [201]. La categoría “LMA con CRMD” de la OMS 2016 engloba a pacientes con $\geq 20\%$ de blastos y

displasia multilinea en $\geq 50\%$ de ≥ 2 líneas en ausencia de las mutaciones *NPM1* y bialélica de *CEBPA*, con antecedentes de una neoplasia hematológica (SMD, NMP) o con alteraciones citogenéticas relacionadas con el SMD. De modo que, en ausencia de las mutaciones *NPM1* y bialélica de *CEBPA*, este subtipo de LMA se suele asociar a un peor pronóstico [202][203]. Por otra parte, con la nueva clasificación de la OMS de 2016, muchos casos de “LMA con CRMD” son asumidos por las categorías “LMA con mutación *NPM1*” y “LMA con mutación bialélica de *CEBPA*”, sin que la displasia tenga un efecto adverso [204][205][206]. Con la aparición de nuevos marcadores citogenéticos y moleculares, el número de casos en la categoría de “LMA con CRMD” ha ido disminuyendo según las distintas clasificaciones de la OMS. De hecho, en nuestro estudio se pasó de 45 casos según la OMS 2001 a 35 según la de 2016. Esto tendría una implicación pronóstica en cinco de los casos que pasarían del grupo citogenético intermedio (cariotipo normal) al favorable, según la ELN 2010, puesto que presentaban una “LMA con mutación *NPM1*” según la OMS 2016 y, por tanto, hubieran recibido un tratamiento menos agresivo. Estos cinco pacientes alcanzaron una remisión completa con la quimioterapia de inducción, que se mantenía en el momento del análisis del estudio. La presencia de la mutación del gen *ASXL1* se suele asociar con mielodisplasia [36] y confiere un pronóstico adverso [207]. Si en nuestro estudio se hubiera determinado esta mutación, los pacientes con “LMA con CRMD” clasificados en el grupo de riesgo intermedio (ELN 2010) que tuviesen dicha mutación se hubieran clasificado en grupo de riesgo adverso según la ELN 2017. Por todo ello, la presencia de unos niveles altos del *VEGF-C* en pacientes con mielodisplasia podría distinguir un subgrupo de pacientes con peor pronóstico, especialmente en aquellos sin alteraciones citogenéticas o moleculares, y en los que se podrían utilizar estrategias terapéuticas más agresivas. En un estudio de Cho *et al.* (2020) [196] en muestras de médula ósea de pacientes con LMA, SMD y NMP se cuantificaron los niveles de VEGF mediante un inmunoensayo y un ELISA sin observar diferencias significativas entre éstos y los controles. A diferencia de nuestro estudio, los niveles del VEGF fueron estadísticamente inferiores en los pacientes con LMA y SMD respecto a los que tenían NMP, aunque el método de detección fue diferente. La mediana de expresión del gen fue superior de forma significativa en pacientes con cariotipo normal ($p = 0,048$). El aumento de la expresión del gen *VEGF-C* como factor pronóstico adverso sería especialmente interesante dada la heterogeneidad de este subgrupo de pacientes [208]. Tras el análisis de la expresión en los marcadores moleculares, en los pacientes con la mutación *NPM1* los niveles del gen fueron mayores que en los que carecían de la mutación ($p = 0,039$). La asociación de niveles elevados del *VEGF-C* con la mutación *NPM1*, un marcador de buen pronóstico, podría explicarse porque las mutaciones *NPM1* están asociadas a un aumento de la cifra de blastos en médula ósea así como a una mayor infiltración extramedular [209]. Además, la presencia de esta mutación estimula la invasión, adhesión y migración de líneas celulares leucémicas [210].

Los pacientes con la mutación bialélica de *CEBPA* presentaban menores niveles de expresión del gen *VEGF-C* ($p = 0,019$), en relación al buen pronóstico de este marcador.

Los niveles de expresión según la presencia o no de la mutación *FLT3-ITD* no mostraron diferencias significativas ($p = 0,288$), al igual en el estudio de De Jonge *et al.* (2010) [163]. A pesar de que disponíamos de pocos datos, debido al impacto pronóstico de la *ratio* de *FLT3-ITD*, decidimos estudiar la expresión del *VEGF-C* según el estado mutacional de *NPM1* y la *ratio* de *FLT3-ITD*. El nivel de expresión fue más elevado en las categorías *NPM1- / FLT3-ITD*^{<0,5} y *NPM1- / FLT3-ITD*^{≥0,5}, aunque las diferencias no fueron significativas ($p = 0,104$). Al analizar la expresión del gen según la *ratio* de *FLT3-ITD*, <0,5 o ≥0,5, tampoco se observaron diferencias significativas ($p = 0,351$), aunque la mediana de expresión fue mayor en el grupo con la *ratio* ≥0,5.

También se estudió la expresión del gen según el estado mutacional de *NPM1* y la *ratio* de *FLT3-ITD* pero sólo en el subgrupo de pacientes con cariotipo normal sin observar diferencias significativas ($p = 0,123$). Sin embargo, cabe destacar que la mediana de expresión fue mayor en las categorías *NPM1- / FLT3-ITD*^{<0,5} y *NPM1- / FLT3-ITD*^{≥0,5}, la de peor pronóstico.

En cuanto a los grupos pronósticos, en general, se han observado niveles de expresión del *VEGF-C* más bajos en los pacientes del grupo de riesgo favorable y más elevados en los grupos intermedio y desfavorable. Estos resultados serían consistentes con la hipótesis de que los niveles de expresión del *VEGF-C* elevados serían un marcador pronóstico adverso.

En cuanto a los niveles de *VEGF-C* en los grupos pronósticos de las diferentes clasificaciones, la del CETLAM es con la que mayor asociación tuvo. De tal forma que, los pacientes de riesgo favorable, tuvieron seis veces menor expresión del gen que los de pronóstico intermedio y adverso ($p = 0,013$). Otras clasificaciones, como la del MRC también tuvo resultados similares con significado estadístico ($p = 0,018$). Para el estudio de los grupos de la clasificación de la ELN 2010, se agruparon en favorable e intermedio-I *vs.* intermedio-II y adverso, así como en favorable e intermedios I y II *vs.* adverso, sin encontrar diferencias significativas entre los niveles del gen y los distintos grupos ($p = 0,457$ y $p = 0,665$, respectivamente). Esto podría explicarse por la incorporación de diversos marcadores moleculares en la clasificación de la ELN, a diferencia de la de CETLAM, que sólo incluye los genes *MLL* y *FLT3-ITD*, y la del MRC, que se basa sólo en la citogenética.

En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas en la mediana de expresión del *VEGF-C* entre en los que alcanzaron o no la remisión completa, aunque con una tendencia a presentar menores niveles en los que la alcanzaban. Padró *et al.* (2002) estudiaron la expresión del VEGF por técnicas inmunohistoquímicas en muestras de médula ósea de pacientes con LMA y vieron que no predecía los resultados ni en términos de respuesta completa ni de SLE [195]. Lee *et al.* (2018) analizaron el valor predictivo de la expresión del *VEGF-C* para alcanzar una respuesta completa en pacientes diagnosticados de LMA y compararon los niveles de expresión al diagnóstico, cuando alcanzaban una RC y cuando estaban en recaída o eran refractarios. No hubo diferencias significativas

aunque observaron una tendencia a presentar menores niveles en los alcanzaban una RC respecto a los otros dos grupos [159]. Sin embargo, Aguayo *et al.* (2002) estudiaron mediante un ELISA los niveles de VEGF en plasma de pacientes con LMA y observaron una correlación entre niveles elevados al diagnóstico y menores tasas de remisión completa y de SG [193]. A diferencia de nuestro estudio, la determinación del VEGF fue en plasma mediante un ELISA y no en médula ósea por PCR. De Jonge *et al.* (2008) observaron que unos niveles de expresión del *VEGF-C* elevados en células blásticas se asociaban con un aumento de la resistencia *in vitro* a fármacos habituales para el tratamiento de la LMA como la fludarabina, la daunorubicina y el etopósido [160], lo que apoyaría la relación entre una expresión elevada del *VEGF-C* y la resistencia a la quimioterapia. Dias *et al.* (2002) demostraron el efecto protector del VEGF-C frente a la quimioterapia con daunorubicina, etopósido y Ara-C en líneas celulares leucémicas [158]. Las células endoteliales liberan VEGF-C como respuesta al estímulo de las citoquinas inducidas por los blastos. Estos hallazgos orientan a que el VEGF-C induce la supervivencia células leucémicas. De tal forma que un aumento de la producción del VEGF-C podría resultar en un aumento de la proliferación de las células leucémicas y una mayor resistencia a la quimioterapia. Todo esto sugiere que el VEGF-C es un factor pronóstico adverso independiente en pacientes con LMA. Por ello, aunque el papel de terapias inhibitoras de la producción del VEGF-C en la LMA todavía no está claro, deberían tenerse en cuenta para el tratamiento de determinados subgrupos de LAM.

Clásicamente, los estudios sobre el tratamiento de la leucemia se centran en las células leucémicas, sin embargo, se ha visto que el microambiente medular juega un papel fundamental en la regulación de la hemopoyesis. En un estudio de Lee *et al.* (2018) se estudió la población de células inmunes del microambiente medular de pacientes con LMA. En los pacientes con niveles altos de *VEGF-C* observaron una tendencia a tener un menor número de células NK y CD8+, sugiriendo que el *VEGF-C* podría tener un papel como biomarcador y diana terapéutica en el microambiente medular de pacientes con LMA [159]. Es necesario, por tanto, estudiar este microambiente para una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad, así como para encontrar nuevas terapias.

Mediante el análisis de regresión logística se estimó el resultado de los niveles *VEGF-C* en función de las variables más relevantes, mielodisplasia, grupos pronósticos y marcadores moleculares. El impacto pronóstico de los rasgos displásicos en la LMA es un tema controvertido, aunque en ausencia de las mutaciones *NPM1* y bialélica de *CEBPA*, este subtipo de LMA se suele asociar a un peor pronóstico. En nuestro estudio, la mielodisplasia es un factor de riesgo para tener unos niveles altos de expresión del *VEGF-C* ($p = 0,006$) que distingue un subgrupo de pacientes con pronóstico desfavorable y en los que se podrían utilizar estrategias terapéuticas más agresivas. Al estudiar los grupos pronósticos, el grupo de buen pronóstico según la clasificación CETLAM fue un factor protector para tener una expresión alta del *VEGF-C* frente al grupo de mal pronóstico ($p = 0,014$). También en la clasificación de la MRC el grupo de riesgo favorable fue un factor protector para tener

una expresión alta del *VEGF-C* frente al grupo de mal pronóstico ($p = 0,013$). No hubo diferencias significativas entre los grupos pronósticos según ELN 2010, probablemente debido a, entre otros factores, la asociación que observamos entre la mutación *NPM1* (grupo favorable) y niveles elevados del *VEGF-C*.

En el análisis de los marcadores moleculares, el riesgo de tener *VEGF-C* alto se multiplicaba por 2,8 si el paciente no tenía la mutación *CEBPA* ($p = 0,041$).

En nuestro estudio no encontramos una asociación entre la expresión del *VEGF-C* y la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE), ni de forma global ni por subgrupos, según la presencia o no de mielodisplasia, según los grupos pronósticos del CETLAM, el MRC y la ELN 2010 y, según los marcadores moleculares *NPM1* y *CEBPA*. Sin embargo, unos niveles altos del *VEGF-C* se han asociado a una menor SG y SLE en otros trabajos (12)[211]. Aguayo et al. (12) vieron que había una relación entre los niveles elevados de *VEGF* en los blastos y una menor SG y SLE en pacientes con LMA. No encontraron una relación entre los niveles del *VEGF* y la edad, el estado funcional, la cifra de leucocitos y de blastos, la citogenética o el antecedente de una neoplasia hematológica. De Jonge *et al.* (2010) estudiaron 525 pacientes adultos con LMA donde los niveles de expresión altos del *VEGF-C* se asociaron a una menor tasa de respuesta completa y a una menor SG y SLE [163]. Se compararon las características de los pacientes dependiendo de si presentaban niveles bajos o altos del gen y no encontraron diferencias significativas entre las características clínicas, los distintos grupos pronósticos citogenéticos y los marcadores moleculares (*NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA*). Las razones de estas diferencias entre los estudios podrían ser el tipo de análisis estadístico empleado y el menor tamaño muestral de nuestro estudio.

En el contexto del TPH, la enfermedad injerto contra receptor puede verse afectada por las vías de señalización del *VEGF* e influir en el pronóstico. Se han asociado niveles bajos de *VEGF* tras el TPH con mayor severidad de la enfermedad injerto contra receptor y con una mortalidad no relacionada con la recaída [212]. Por lo tanto, en este contexto, la expresión del *VEGF* tendría un efecto opuesto en la supervivencia [213].

Tras analizar la expresión de 84 genes implicados en la señalización del *VEGF* en 24 pacientes se ha observado que la expresión del *VEGF-C* no estaba aumentada en comparación con otros genes de señalización. Los datos muestran que el 60% de los genes de las vías de señalización del *VEGF* tienen mayores niveles de expresión que el *VEGF-C* de tal forma que ninguno de los otros ligandos del *VEGF* estaba en el mismo nivel de expresión que el *VEGF-C*.

Las interacciones entre los miembros de la vía de señalización del *VEGF* son complejas, ya que los diferentes miembros y los diferentes ligandos interactúan entre sí modulando su señalización de manera sinérgica y en ciertos casos, antagónica.

En el estudio la expresión de los genes de los ligandos *VEGF-A*, el *VEGF-B* y el *VEGF-E (PDGFC)* fue mayor que la del *VEGF-C*. Se han descubierto ciertas correlaciones positivas entre *VEGF-A* y

VEGF-D (FIGF), y *VEGF-B* y *VEGF-D (FIGF)*. Y, aunque la contribución específica de cada uno de los miembros de la familia VEGF no se ha definido todavía, la correlación detectada entre *VEGF-A* y *VEGF-D (FIGF)* podría estar relacionada con que ambos genes inducen la proliferación de las células endoteliales.

Por otro lado, el *VEGF-C* fue el único ligando que se expresó en el mismo rango que los genes de los receptores *VEGFR-1 (FLT1)*, *VEGFR-2 (KDR)*, *VEGFR-3 (FLT4)*, *NRP1* y *NRP2*. De hecho se observó una correlación fuerte entre la expresión de este gen y *VEGFR-1 (FLT1)*, *VEGFR-2 (KDR)* y *NRP1*, receptores implicados en la angiogénesis, vasculogénesis, proliferación y migración celular en la LMA [214][128]. En el estudio de De Jonge (2010) los genes *VEGFR-2 (KDR)* y *NRP1* estaban más elevados en el subgrupo de pacientes con niveles altos de *VEGF-C* [163]. Padró *et al.* (2002) estudiaron la expresión del receptor VEGFR-2 por técnicas inmunohistoquímicas en muestras de médula ósea de pacientes con LMA y, los que alcanzaban una respuesta completa, normalizaban los niveles del VEGFR-2 [195]. Lu *et al.* (2008) demostraron niveles elevados del gen *NRP1* en muestras de sangre periférica y de médula ósea de pacientes con LMA, y que *NRP1* promovía la proliferación y quimiotaxis de las células leucémicas en respuesta al VEGF [215]. Todos estos datos sugieren la importancia de la expresión elevada del *VEGF-C* y sus receptores en la fisiopatología de la LMA.

En el resto de genes de las vías de señalización estudiados se observó correlación entre el *VEGF-C* y el gen de la prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (*PTGS2*). Este gen codifica la enzima ciclooxigenasa-2 (*COX-2*), que aumenta la angiogénesis y el crecimiento tumoral. La sobreexpresión de *COX-2* se ha asociado con un aumento de la densidad microvascular y de la expresión de proteínas VEGF en tumores de cabeza y cuello y otros tumores, y es un indicador de mal pronóstico [216]. La expresión de los genes *ARNT* y *AKT3* se correlacionaron con *VEGF-A* y *VEGF-B* pero no con *VEGF-C*. El gen *AKT3* codifica proteínas involucradas en la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR. La señalización de PI3K también controla la angiogénesis, el crecimiento, la proliferación, la senescencia y otros procesos, a través de mecanismos como la activación transcripcional del VEGF. Koistinen *et al.* (2001) estudiaron el papel de la vía de señalización del VEGF en el control del crecimiento de las células leucémicas de líneas celulares y de pacientes con LMA, y vieron que se producía un descenso de la actividad de las vías PI3K y Akt cuando se inhibían VEGF y el receptor VEGFR-2 (*KDR*) [217]. Dada la contribución de la vía de señalización del *VEGF* a través del receptor VEGFR-2 a la angiogénesis tumoral, la inhibición de este receptor podría ser una diana terapéutica en estos pacientes. De hecho, se han realizado varios estudios con SU5416, un inhibidor del receptor VEGFR-2, en pacientes con LMA refractaria [218][167].

Además, la vía de señalización del *VEGF* también podría ser una de las responsables de la transformación de ciertas hemopatías malignas en LMA y una diana terapéutica para prevenir o demorar la transformación. En un estudio de Gurashi *et al.* (2021), se ha observado un aumento de

expresión de las vías de señalización del VEGF en las muestras de médula ósea de pacientes con LMA secundaria a una leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) respecto a las muestras al diagnóstico de la LMMC [219].

Todos estos hallazgos muestran la posibilidad de utilizar la interrupción de las vías de señalización del *VEGF* como diana terapéutica en pacientes con LMA y otras hemopatías malignas.

Nuestro estudio muestra por primera vez una asociación entre niveles altos de expresión del *VEGF-C* y la presencia de mielodisplasia. También se ha detectado una asociación entre los niveles de expresión del gen y otros factores pronósticos, como los grupos de riesgo genéticos y algunos marcadores moleculares. Se observó que el grupo de riesgo favorable según la clasificación citogenética del MRC era un factor protector para tener una expresión alta del *VEGF-C* y que el riesgo de tener una expresión alta se multiplicaba por 2,8 si un paciente no tenía la mutación *CEBPA*. Por tanto, con este estudio se aportan nuevos datos y se amplía el conocimiento sobre el papel del gen *VEGF-C* en la LMA, aunque se debería ampliar el número de estudios moleculares en nuestra serie para poder relacionar el grupo pronóstico de la ELN2017 con los niveles del *VEGF-C*. Además, son necesarios más estudios con un mayor número de pacientes para poder establecer el papel de la expresión del *VEGF-C* en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los niveles de expresión relativa del gen *VEGF-C* en médula ósea de pacientes adultos diagnosticados de leucemia mieloide aguda son superiores a los de las muestras de los controles sanos.
2. No se ha observado una asociación entre la mediana de expresión del gen *VEGF-C* y las variables demográficas y clínicas estudiadas. Tampoco se ha establecido una relación con la respuesta al tratamiento intensivo de la LMA en pacientes menores de 70 años.
3. Se ha detectado una correlación positiva entre la expresión del *VEGF-C* y la cifra de plaquetas y de LDH de forma que, cuanto mayor es la expresión del gen, mayor es la cifra de plaquetas y de LDH.
4. Los pacientes con LMA con mielodisplasia presentan mayor expresión del *VEGF-C*. Asimismo, los pacientes con cariotipo normal tienen una mediana de expresión del gen significativamente superior, hallazgo de especial interés en este grupo tan heterogéneo.
5. La presencia de la mutación bialélica de *CEBPA* fue un factor protector para tener una expresión alta del gen, en relación al buen pronóstico de este marcador. Los pacientes con LMA con mutación *NPM1* así como los pacientes con la combinación *NPM1-FLT3-ITD*⁺ con o sin citogenética normal, mostraron niveles más elevados del gen.
6. El riesgo de tener un nivel de expresión del *VEGF-C* alto fue mayor en los pacientes con variables de significado pronóstico adverso, como la LMA con mielodisplasia y los grupos de riesgo adverso según CETLAM y MRC. Por ello, la presencia de unos niveles altos del gen permitiría distinguir un subgrupo de pacientes con peor pronóstico en los que se podrían utilizar estrategias terapéuticas más agresivas.
7. No se ha encontrado una asociación entre los niveles de expresión del *VEGF-C* y la tasa de respuesta completa, aunque con una tendencia a presentar menores niveles en los que la alcanzaban. Tampoco ha habido una relación con la supervivencia libre de enfermedad o con la supervivencia global, ni en el análisis global ni por subgrupos.
8. La expresión de la mayoría de los genes implicados en las vías de señalización del VEGF fue superior a la del *VEGF-C*. Se observó una correlación entre el *VEGF-C* y el gen de la *PTGS2*, que participa en la angiogénesis y el crecimiento tumoral, así como entre el *VEGF-C* y los genes de los receptores *VEGFR-1 (FLT1)*, *VEGFR-2 (KDR)*, *VEGFR-3 (FLT4)* y *NRP1*, implicados en la angiogénesis, vasculogénesis, proliferación y migración celular en la LMA. La inhibición de estos receptores podría ser una diana terapéutica en pacientes con LMA.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Dictamen del CEIm



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de ordinaria de fecha 28 de abril de 2011, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Estudio del significado pronóstico de la expresión de VEGF en pacientes con leucemia aguda mieloblástica

Que será llevado a cabo en el Servicio de Oncología y cuyo investigador principal es la Dra. Mar Tormo Díaz, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea) en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la Convocatoria de Ayudas de Proyectos de Investigación en Salud.

Valencia, 28 de abril de 2011.



Fdo. : Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

Volver

8.2. Hoja de información al paciente



Hospital Clínic Universitari de València



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO	“Estudio del significado pronóstico de la expresión del <i>VEGF-C</i> y genes implicados en las vías de señalización del <i>VEGF</i> en pacientes con leucemia mieloide aguda”
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dra. M. Tormo
SERVICIO	Hematología
CENTRO	Hospital Clínico Universitario de Valencia

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de su centro, de acuerdo a la legislación vigente, Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda decidir si acepta o no participar en este estudio. Lea esta hoja de información con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, por la Dr. Tormo en el teléfono 96 1973838.

1. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Le invitamos a participar en el estudio porque ha sido diagnosticado de una leucemia mieloide aguda (LMA). Su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir NO participar. Si decide participar, puede cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad maligna resultante de la proliferación incontrolada de los blastos mieloides en la médula ósea o en otros tejidos. A pesar de los avances realizados en la comprensión de los mecanismos por los cuales se produce una LAM y de las mejoras en el tratamiento, un porcentaje elevado de los pacientes siguen falleciendo como consecuencia de esta enfermedad. Por ello, es necesario encontrar nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar los resultados del tratamiento mediante la identificación de determinados factores clínicos o biológicos que ayuden a estratificar a los pacientes según su riesgo de recaída. Uno de los factores pronósticos más importantes en los pacientes con LAM son las alteraciones cromosómicas de las células leucémicas. Sin embargo, entre un 30 y un 50% de los pacientes con LAM no tienen alteraciones en el cariotipo constituyendo un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista pronóstico. En los últimos 10 años, se han detectado varias alteraciones moleculares de significado pronóstico establecido y que se tienen en cuenta a la hora de decidir el tratamiento más adecuado. A pesar de estos marcadores pronósticos, sigue habiendo un subgrupo de pacientes con citogenética normal que no presentan ninguna de estas alteraciones moleculares en los que el pronóstico es incierto.

La angiogénesis tumoral es un proceso muy complejo y dinámico regulado por numerosas moléculas que influyen de manera clara en el desarrollo y metastatización de numerosos tumores. Sin embargo, el papel de la angiogénesis en las neoplasias hematológicas en general, y en las leucemias agudas en particular, no está



Hospital Clínic Universitari de València



claramente establecido. Una de las vías más importantes en la regulación de la angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular C (*VEGF-C*).

Por todos estos antecedentes consideramos que el estudio de la expresión de este gen y otros genes implicados en sus diferentes vías de señalización intracelular puede resultar de enorme interés para conocer mejor el pronóstico y los mecanismos de resistencia de las células leucémicas de los pacientes con LMA.

El objetivo de este estudio es conocer si el aumento de la expresión del gen *VEGF-C* en los blastos procedentes de pacientes diagnosticados de una LAM constituye un factor pronóstico independientemente. Así, con un sencillo análisis genético, podríamos seleccionar aquellos pacientes de peor pronóstico que podrían beneficiarse de un tratamiento más intensivo. El estudio de los genes implicados en las vías de señalización intracelular de la angiogénesis permitiría profundizar en los mecanismos que influyen en el desarrollo y resistencia de los blastos leucémicos y serviría de base para la investigación de nuevos fármacos diana en el tratamiento de las leucemias agudas.

3. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos muestras de sangre periférica y de médula ósea. La participación en el presente proyecto no influye ni modifica el tratamiento que esté recibiendo para la leucemia.

4. ACTIVIDADES DEL ESTUDIO

El estudio no conlleva exploraciones complementarias, análisis ni visitas extraordinarias.

5. RIESGOS Y MOLESTIAS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos para el estudio una pequeña parte de las muestras que le fueron extraídas al diagnóstico de la enfermedad.

6. POSIBLES BENEFICIOS

Es muy posible que usted no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

7. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES

El investigador y el centro son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos, la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Además, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

El acceso a su información personal identificada quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades competentes y al Comité de Ética de la Investigación, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.



Hospital Clínic Universitari de València



De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio. Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos, pero sí se utilizarán los que ya se hayan recogido.

8. INFORMACION RELATIVA A MUESTRAS BIOLÓGICAS

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica que garantiza el respeto a los derechos que le asisten.

Al firmar este documento, revisado y evaluado favorablemente por el Comité de Ética de Investigación de su centro, usted acepta que se utilicen sus muestras para las finalidades del presente estudio.

8.1 Procedimientos de obtención de muestras, molestias y posibles riesgos

En el estudio se estudiarán las muestras de médula ósea al diagnóstico de la LMA para determinar la expresión del gen VEGF mediante técnicas del laboratorio. No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos para el estudio una pequeña parte de las muestras que le fueron extraídas al diagnóstico de la enfermedad.

Las muestras estarán asociadas a un código que solo podrá ser relacionado con su identidad por personal autorizado, de la misma manera que se ha explicado previamente con los datos obtenidos durante el estudio.

Los datos que se deriven de la utilización de estas muestras se tratarán del mismo modo que el resto de datos que se obtengan durante este estudio en cuanto a la protección de datos.

Las muestras y los datos asociados se mantendrán bajo las condiciones de seguridad adecuadas y se garantiza que los sujetos no podrán ser identificados a través de medios considerados razonables por personas distintas a las autorizadas.

Es posible que sea necesario algún dato o muestras adicionales. En ese caso, su médico se pondrá en contacto con usted para solicitarle de nuevo su colaboración. Se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

8.2 Beneficios esperados

Es muy posible que usted no obtenga ningún beneficio para su salud por participar en este estudio, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

No percibirá ningún beneficio económico por la donación de las muestras y la cesión de los datos proporcionados, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación efectuada.

8.3. Lugar de análisis y almacenamiento de muestras

Durante su participación en este estudio, se utilizará una muestra de sangre periférica y de médula ósea. Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de



Hospital Clínic Universitari de València



otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital. Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos

8.4. Implicaciones de la información obtenida al analizar las muestras

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios generales del presente estudio.

En el caso de que en este estudio se obtengan datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted, e interesar a su salud o a la de su familia, podrá solicitar que le sean comunicados por su médico del estudio.

No obstante, si usted manifiesta su negativa ser informado, pero según criterio del médico responsable, la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta al Comité de Ética Asistencial del centro. La comunicación de esta información se llevará a cabo por profesionales que le podrán explicar adecuadamente su relevancia y las opciones que se pudieran plantear. En caso de información genética clínicamente relevante podrá recibir el preceptivo consejo genético.

8.5. Uso futuro de las muestras

Una vez finalizado el estudio, las muestras sobrantes serán destruidas.

Derecho de revocación del consentimiento

Si cambiara de opinión en relación con la donación de las muestras biológicas y la cesión de los datos proporcionados, tiene derecho a solicitar su destrucción o anonimización, a través de su del investigador principal de la colección o del biobanco. No obstante, debe saber que los datos que se hayan obtenido en los análisis realizados hasta ese momento podrán ser utilizados para los fines solicitados y podrán conservarse en cumplimiento de las obligaciones legales correspondientes.

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios de investigación en los que se hayan utilizado sus muestras.



Hospital Clínic Universitari de València



CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO	“Estudio del significado pronóstico de la expresión del VEGF-C y genes implicados en las vías de señalización del VEGF en pacientes con leucemia mieloide aguda”
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dra. M. Tormo
SERVICIO	Hematología
CENTRO	Hospital Clínic Universitario de Valencia

Yo, _____ <<nombre y apellidos del participante>>
 (Nombre de puño y letra por el paciente)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>
 (Nombre de puño y letra por el paciente)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Consiento al uso y tratamiento de mis datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del participante
 Fecha: ____/____/____
 (firma y fecha de puño y letra por el paciente)

Firma del investigador
 Fecha: ____/____/____



Hospital Clínic Universitari de València



CONSENTIMIENTO INFORMADO REPRESENTANTE LEGAL

TÍTULO DEL ESTUDIO	“Estudio del significado pronóstico de la expresión del VEGF-C y genes implicados en las vías de señalización del VEGF en pacientes con leucemia mieloide aguda”
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dra. M. Tormo
SERVICIO	Hematología
CENTRO	Hospital Clínic Universitario de Valencia

Yo, _____ <<nombre y apellidos del representante>>,
 (Nombre de puño y letra por el representante)
 en calidad de _____ <<indicar parentesco>>, de _____
 _____ <<nombre y apellidos del participante>>
 (Nombre de puño y letra por el representante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ <<nombre del investigador>>
 (Nombre de puño y letra por el representante)

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para su participación en el estudio

Consiento al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI NO

Deseo que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del representante legal, familiar o persona vinculada de hecho

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

(Firma y fecha de puño y letra por el representante)



Hospital Clínic Universitari de València



CONSENTIMIENTO INFORMADO ANTE TESTIGOS

TÍTULO DEL ESTUDIO	“Estudio del significado pronóstico de la expresión del VEGF-C y genes implicados en las vías de señalización del VEGF en pacientes con leucemia mieloide aguda”
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dra. M. Tormo
SERVICIO	Hematología
CENTRO	Hospital Clínic Universitario de Valencia

Yo, _____ <<nombre y apellidos del testigo>>,
 (Nombre de puño y letra por el testigo)
 como testigo, afirmo que en mi presencia se ha informado a D/Dª _____
 _____ <<nombre y apellidos del participante>>
 (Nombre de puño y letra por el testigo)

y se ha leído la hoja de información que se le ha entregado sobre el estudio, de modo que:

Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.
 Ha recibido suficiente información sobre el estudio.
 Ha hablado con _____ <<nombre del investigador>>
 (Nombre de puño y letra por el testigo)

Comprende que su participación es voluntaria.
 Comprende que puede retirarse del estudio:
 - Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
 Presta libremente su conformidad para su participación en el estudio.
 Consiente al uso y tratamiento de sus datos personales para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

Uso de Muestras

Consiente al almacenamiento y uso de las muestras y de los datos asociados para esta investigación en las condiciones explicadas en esta hoja de información.

SI NO

Desea que el médico del estudio me comunique la información derivada de la investigación (genética o no genética, a matizar dependiendo del caso) que pueda ser relevante y aplicable para mi salud o la de mis familiares:

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Consiente a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

SI NO Teléfono o e-mail de contacto _____

Recibirá una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado

Firma del testigo
 Fecha: ____/____/____
 (Firma y fecha de puño y letra por el testigo)

Firma del investigador
 Fecha: ____/____/____

8.3. Escala *Eastern Cooperative Oncology Group* (escala ECOG)

PUNTUACIÓN	DESCRIPCIÓN
0	Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos, ej., trabajo en la casa liviano, trabajo de oficina.
1	Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos, ej., trabajo en la casa liviano, trabajo de oficina.
2	Capaz de caminar y de autocuidado pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo. Deambula más de 50% de las horas que está despierto.
3	Capaz de autocuidado limitado, se mantiene postrado o en silla más de 50% de las horas que está despierto.
4	Completamente incapacitado. No puede realizar autocuidado. Totalmente confinado en cama o silla.
5	Muerte

[Atrás](#)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015;373:1136–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>.
- [2] Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115–36. [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(03)00040-7).
- [3] Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. 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* 2010;116:354–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254441>.
- [4] Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002;100:4325–36. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0772>.
- [5] Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000;96:4075–83.
- [6] Eisfeld AK, Mrozek K, Kohlschmidt J, Nicolet D, Orwick S, Walker CJ, et al. The mutational oncoprint of recurrent cytogenetic abnormalities in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2017;31:2211–8. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.86>.
- [7] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016;374:2209–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>.
- [8] Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001;98:1312–20.
- [9] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451–8.
- [10] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and

- acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937–51. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>.
- [11] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391–405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.
- [12] Klco JM, Mullighan CG. Advances in germline predisposition to acute leukaemias and myeloid neoplasms. *Nat Rev Cancer* 2021;21:122–37. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00315-z>.
- [13] Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.
- [14] Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129:424–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.
- [15] Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, Martin-Ayuso M, Bottcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 2012;26:1986–2010. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>.
- [16] Pedreira CE, Costa ESD, Lecrevisse Q, Grigore G, Fluxa R, Verde J, et al. From big flow cytometry datasets to smart diagnostic strategies: The EuroFlow approach. *J Immunol Methods* 2019;475:112631. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.07.003>.
- [17] Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25:567–74. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.312>.
- [18] Nomdedeu J, Bussaglia E, Villamor N, Martinez C, Esteve J, Tormo M, et al. Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: Prognostic impact of the leukemic compartment size. *Leuk Res* 2011;35:163–8. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.05.015>.
- [19] Brooimans RA, van der Velden VHJ, Boeckx N, Slomp J, Preijers F, Te Marvelde JG, et al. Immunophenotypic measurable residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia: Is multicentric MRD assessment feasible? *Leuk Res* 2019;76:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.11.014>.
- [20] Bataller A, Oñate G, Diaz-Beyá M, Guijarro F, Garrido A, Vives S, et al. Acute myeloid leukemia with NPM1 mutation and favorable European LeukemiaNet category: outcome after preemptive intervention based on measurable residual disease. *Br J Haematol* 2020;191:52–61. <https://doi.org/10.1111/bjh.16857>.

- [21] Paiva B, Vidriales M-B, Sempere A, Tarín F, Colado E, Benavente C, et al. Impact of measurable residual disease by decentralized flow cytometry: a PETHEMA real-world study in 1076 patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2021;35:2358–70. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01126-3>.
- [22] Grimwade D, Mrozek K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011;25:1135–61, vii. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2011.09.018>.
- [23] Gough SM, Slape CI, Aplan PD. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood* 2011;118:6247–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-328880>.
- [24] Infante MS, Piris MA, Hernandez-Rivas JA. Molecular alterations in acute myeloid leukemia and their clinical and therapeutical implications. *Med Clin Barc* 2018;151:362–7. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2018.05.002>.
- [25] Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia* 2019;33:1851–67. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0378-z>.
- [26] Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol* 2017;35:934–46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2208>.
- [27] Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016;127:29–41. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604496>.
- [28] Stanchina M, Soong D, Zheng-Lin B, Watts JM, Taylor J. Advances in Acute Myeloid Leukemia: Recently Approved Therapies and Drugs in Development. *Cancers* 2020;12:3225. <https://doi.org/10.3390/cancers12113225>.
- [29] Small D. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology* 2006;2006:178–84. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.178>.
- [30] Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98:1752–9. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.6.1752>.
- [31] Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326–35. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.12.4326>.

- [32] Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106:3740–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2164>.
- [33] Lin L-I, Chen C-Y, Lin D-T, Tsay W, Tang J-L, Yeh Y-C, et al. Characterization of CEBPA Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Most Patients with CEBPA Mutations Have Biallelic Mutations and Show a Distinct Immunophenotype of the Leukemic Cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:1372–9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1816>.
- [34] Li H-Y, Deng D-H, Huang Y, Ye F-H, Huang L-L, Xiao Q, et al. Favorable prognosis of biallelic CEBPA gene mutations in acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis. *Eur J Haematol* 2015;94:439–48. <https://doi.org/10.1111/ejh.12450>.
- [35] Mender JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Becker H, Metzler KH, et al. RUNX1 Mutations Are Associated With Poor Outcome in Younger and Older Patients With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia and With Distinct Gene and MicroRNA Expression Signatures. *J Clin Oncol* 2012;30:3109–18. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.6652>.
- [36] Metzler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood* 2011;118:6920–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-368225>.
- [37] Asghari H, Talati C. Tumor protein 53 mutations in acute myeloid leukemia: conventional induction chemotherapy or novel therapeutics. *Curr Opin Hematol* 2020;27:66–75. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000568>.
- [38] Kishtagari A, Levine RL, Viny AD. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2020;27:49–57. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000567>.
- [39] Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* 2013;121:2734–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-431122>.
- [40] Medeiros BC, Fathi AT, DiNardo CD, Pollyea DA, Chan SM, Swords R. Isocitrate dehydrogenase mutations in myeloid malignancies. *Leukemia* 2017;31:272–81. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.275>.
- [41] Rampal R, Figueroa ME. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2016;101:672–9. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.141796>.
- [42] Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, et al. Adverse Prognostic Significance of KIT Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia With inv(16)

- and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2006;24:3904–11. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.9500>.
- [43] Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2010;363:2424–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005143>.
- [44] Delhommeau F, Dupont S, Valle VD, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *N Engl J Med* 2009;360:2289–301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>.
- [45] Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006;107:3847–53. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3522>.
- [46] Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368:2059–74. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.
- [47] Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;128:686–98. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-693879>.
- [48] Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* 2014;371:2488–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.
- [49] Adamia S, Haibe-Kains B, Pilarski PM, Bar-Natan M, Pevzner S, Avet-Loiseau H, et al. A genome-wide aberrant RNA splicing in patients with acute myeloid leukemia identifies novel potential disease markers and therapeutic targets. *Clin Cancer Res* 2014;20:1135–45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0956>.
- [50] Adamia S, Bar-Natan M, Haibe-Kains B, Pilarski PM, Bach C, Pevzner S, et al. NOTCH2 and FLT3 gene mis-splicings are common events in patients with acute myeloid leukemia (AML): new potential targets in AML. *Blood* 2014;123:2816–25. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-481507>.
- [51] Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, Patel Y, Allen C, Green C, et al. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia* 2009;23:203–6. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.173>.
- [52] Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 2010;28:2739–47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.2501>.

- [53] Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;127:2451–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-688705>.
- [54] Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, Boggs K, Cheng J, Ma J, et al. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat Genet* 2016;48:1551–6. <https://doi.org/10.1038/ng.3709>.
- [55] Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:1189–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716863>.
- [56] Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2012;366:1079–89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112304>.
- [57] Ostgard LS, Norgaard JM, Sengelov H, Severinsen M, Friis LS, Marcher CW, et al. Comorbidity and performance status in acute myeloid leukemia patients: a nation-wide population-based cohort study. *Leukemia* 2015;29:548–55. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.234>.
- [58] Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 2009;113:4179–87. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-172007>.
- [59] Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107:3481–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3724>.
- [60] Ostronoff F, Othus M, Lazenby M, Estey E, Appelbaum FR, Evans A, et al. Prognostic Significance of NPM1 Mutations in the Absence of FLT3 –Internal Tandem Duplication in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia: A SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council Report. *J Clin Oncol* 2015;33:1157–64. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.0571>.
- [61] Juliusson G, Lazarevic V, Lehmann S, Derolf ÅR, Möllgård L, Garelius H, et al. Improved Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia Following Implementation of Swedish National Guidelines: Results from the AML Registry 1997-2013. *Blood* 2014;124:2269–2269. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.2269.2269>.
- [62] Boddu P, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Ravandi F, Verstovsek S, Jabbour E, et al. Treated secondary acute myeloid leukemia: a distinct high-risk subset of AML with adverse prognosis. *Blood Adv* 2017;1:1312–23. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017008227>.

- [63] Hulegårdh E, Nilsson C, Lazarevic V, Garelius H, Antunovic P, Rangert Derolf Å, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: A report from the Swedish Acute Leukemia Registry: Population-based Study of Secondary AML. *Am J Hematol* 2015;90:208–14. <https://doi.org/10.1002/ajh.23908>.
- [64] Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne C-H, Horst HA, Held G, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011;117:2137–45. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301713>.
- [65] Feng S, Zhou L, Zhang X, Tang B, Zhu X, Liu H, et al. Impact Of ELN Risk Stratification, Induction Chemotherapy Regimens And Hematopoietic Stem Cell Transplantation On Outcomes In Hyperleukocytic Acute Myeloid Leukemia With Initial White Blood Cell Count More Than $100 \times 10^9/L$. *Cancer Manag Res* 2019;Volume 11:9495–503. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S225123>.
- [66] Solh M, Solomon S, Morris L, Holland K, Bashey A. Extramedullary acute myelogenous leukemia. *Blood Rev* 2016;30:333–9. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.04.001>.
- [67] Farag SS, Ruppert AS, Mrozek K, Mayer RJ, Stone RM, Carroll AJ, et al. Outcome of induction and postremission therapy in younger adults with acute myeloid leukemia with normal karyotype: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2005;23:482–93. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.090>.
- [68] Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 2008;456:66–72. <https://doi.org/10.1038/nature07485>.
- [69] Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 2005;19:1345–9. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403838>.
- [70] Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001;27:263–70. <https://doi.org/10.1038/85820>.
- [71] Farag SS, Ruppert AS, Mrozek K, Mayer RJ, Stone RM, Carroll AJ, et al. Outcome of induction and postremission therapy in younger adults with acute myeloid leukemia with normal karyotype: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2005;23:482–93. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.090>.
- [72] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015;373:1136–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>.

- [73] Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 2018;131:1275–91. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-801498>.
- [74] Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ, Kelder A, Cloos J. Measurable residual disease in acute myeloid leukemia using flow cytometry: approaches for harmonization/standardization. *Expert Rev Hematol* 2018;11:921–35. <https://doi.org/10.1080/17474086.2018.1549479>.
- [75] Freeman SD, Hills RK, Virgo P, Khan N, Couzens S, Dillon R, et al. Measurable Residual Disease at Induction Redefines Partial Response in Acute Myeloid Leukemia and Stratifies Outcomes in Patients at Standard Risk Without NPM1 Mutations. *J Clin Oncol* 2018;36:1486–97. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.3425>.
- [76] Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood* 2012;120:2826–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-435669>.
- [77] Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med* 2016;374:422–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507471>.
- [78] Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:1189–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716863>.
- [79] Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998;92:2322–33.
- [80] Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001;98:1312–20.
- [81] Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010;115:453–74. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>.
- [82] Mrozek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and

- molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30:4515–23. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.4738>.
- [83] DiNardo CD, Wei AH. How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs. *Blood* 2020;135:85–96. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001239>.
- [84] Preisler H, Davis RB, Kirshner J, Dupre E, Richards F, Hoagland HC, et al. Comparison of three remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a cancer and leukemia group B study. *Blood* 1987;69:1441–9.
- [85] Rai KR, Holland JF, Glidewell OJ, Weinberg V, Brunner K, Obrecht JP, et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood* 1981;58:1203–12.
- [86] Wang H, Xiao X, Xiao Q, Lu Y, Wu Y. The efficacy and safety of daunorubicin versus idarubicin combined with cytarabine for induction therapy in acute myeloid leukemia: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Medicine (Baltimore)* 2020;99:e20094. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000020094>.
- [87] Li X, Xu S, Tan Y, Chen J. The effects of idarubicin versus other anthracyclines for induction therapy of patients with newly diagnosed leukaemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;CD010432. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010432.pub2>.
- [88] Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2009;361:1249–59. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904544>.
- [89] Lowenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, Schouten HC, Graux C, Ferrant A, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2009;361:1235–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901409>.
- [90] Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Cavenagh J, Kjeldsen L, et al. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. *Blood* 2015;125:3878–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-623447>.
- [91] Schiller G, Gajewski J, Nimer S, Territo M, Ho W, Lee M, et al. A randomized study of intermediate versus conventional-dose cytarabine as intensive induction for acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1992;81:170–7.
- [92] Weick JK, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Kingsbury LL, Balcerzak SP, et al. A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1996;88:2841–51.
- [93] Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid

- leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2014;15:986–96. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70281-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70281-5).
- [94] Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med* 2017;377:454–64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614359>.
- [95] Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2018;36:2684–92. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.6112>.
- [96] Reville PK, Kadia T. Individualizing Treatment for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2020;21:34. <https://doi.org/10.1007/s11864-020-0710-x>.
- [97] Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2016;127:53–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-604520>.
- [98] Versluis J, Cornelissen JJ. Risks and benefits in a personalized application of allogeneic transplantation in patients with AML in first CR. *Semin Hematol* 2019;56:164–70. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.08.009>.
- [99] Loke J, Malladi R, Moss P, Craddock C. The role of allogeneic stem cell transplantation in the management of acute myeloid leukaemia: a triumph of hope and experience. *Br J Haematol* 2020;188:129–46. <https://doi.org/10.1111/bjh.16355>.
- [100] Pei X, Huang X. New approaches in allogeneic transplantation in AML. *Semin Hematol* 2019;56:147–54. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.08.007>.
- [101] Burchert A, Bug G, Fritz LV, Finke J, Stelljes M, Röllig C, et al. Sorafenib Maintenance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With FLT3 –Internal Tandem Duplication Mutation (SORMAIN). *J Clin Oncol* 2020;38:2993–3002. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03345>.
- [102] Xuan L, Wang Y, Huang F, Fan Z, Xu Y, Sun J, et al. Sorafenib maintenance in patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia undergoing allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation: an open-label, multicentre, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2020;21:1201–12. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30455-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30455-1).
- [103] Schlenk RF, Weber D, Fiedler W, Salih HR, Wulf G, Salwender H, et al. Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. *Blood* 2019;133:840–51. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-869453>.
- [104] Maziarz RT, Levis M, Patnaik MM, Scott BL, Mohan SR, Deol A, et al. Midostaurin after allogeneic stem cell transplant in patients with FLT3-internal tandem duplication-positive

- acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2021;56:1180–9. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-01153-1>.
- [105] Oran B, de Lima M, Garcia-Manero G, Thall PF, Lin R, Popat U, et al. A phase 3 randomized study of 5-azacitidine maintenance vs observation after transplant in high-risk AML and MDS patients. *Blood Adv* 2020;4:5580–8. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002544>.
- [106] Wei AH, Döhner H, Pocock C, Montesinos P, Afanasyev B, Dombret H, et al. Oral Azacitidine Maintenance Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *N Engl J Med* 2020;383:2526–37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2004444>.
- [107] Wu W, Li X, Zuo G, Pu J, Wu X, Chen S. The Role of Angiogenesis in Coronary Artery Disease: A Double-Edged Sword: Intraplaque Angiogenesis in Physiopathology and Therapeutic Angiogenesis for Treatment. *Curr Pharm Des* 2018;24:451–64. <https://doi.org/10.2174/1381612824666171227220815>.
- [108] Wang W, Lo A. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci* 2018;19:1816. <https://doi.org/10.3390/ijms19061816>.
- [109] Ammar MJ, Hsu J, Chiang A, Ho AC, Regillo CD. Age-related macular degeneration therapy: a review. *Curr Opin Ophthalmol* 2020;31:215–21. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000657>.
- [110] Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* 2015;18:433–48. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9477-2>.
- [111] Aguayo A, O'Brien S, Keating M, Manshouri T, Gidel C, Barlogie B, et al. Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000;96:768–70.
- [112] Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:2240–5.
- [113] Marinaccio C, Nico B, Maiorano E, Specchia G, Ribatti D. Insights in Hodgkin Lymphoma angiogenesis. *Leuk Res* 2014;38:857–61. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.05.023>.
- [114] Jiang L, Li N. B-cell non-Hodgkin lymphoma: importance of angiogenesis and antiangiogenic therapy. *Angiogenesis* 2020;23:515–29. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09729-7>.
- [115] Aguayo A. The role of angiogenesis in the biology and therapy of myelodysplastic syndromes. *Curr Hematol Rep* 2004;3:184–91.
- [116] Prunerì G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferrucci PF, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer* 1999;81:1398–401. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6693515>.

- [117] Otjacques E, Binsfeld M, Noel A, Beguin Y, Cataldo D, Caers J. Biological aspects of angiogenesis in multiple myeloma. *Int J Hematol* 2011;94:505–18. <https://doi.org/10.1007/s12185-011-0963-z>.
- [118] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32A:2413–22.
- [119] Bussolino F, Albini A, Camussi G, Presta M, Viglietto G, Ziehe M, et al. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32:2401–12. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00390-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00390-5).
- [120] Moehler TM, Hillengass J, Goldschmidt H, Ho AD. Antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Curr Pharm Des* 2004;10:1221–34.
- [121] Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:87–100. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.001>.
- [122] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401–10. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>.
- [123] Belli C, Trapani D, Viale G, D’Amico P, Duso BA, Della Vigna P, et al. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2018;65:22–32. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.02.004>.
- [124] Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* 2009;23:2233–41. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.175>.
- [125] Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014;505:327–34. <https://doi.org/10.1038/nature12984>.
- [126] Trujillo A, McGee C, Cogle CR. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies. *J Oncol* 2012;2012:128608. <https://doi.org/10.1155/2012/128608>.
- [127] Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:309–13.
- [128] Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:2637–44.
- [129] Ferrara N, Gerber H-P. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106:148–56. <https://doi.org/10.1159/000046610>.
- [130] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science* 1983;219:983–5. <https://doi.org/10.1126/science.6823562>.
- [131] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851–8. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92678-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92678-8).

- [132] Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 1996;97:469–76. <https://doi.org/10.1172/JCI118437>.
- [133] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27–30. <https://doi.org/10.1038/nm0195-27>.
- [134] Roskoski R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:179–213. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.01.006>.
- [135] Park SA, Jeong MS, Ha K-T, Jang SB. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB Rep* 2018;51:73–8. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.2.233>.
- [136] Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580:2879–87. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.087>.
- [137] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000;60:203–12.
- [138] Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38:258–68. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2006.12.003>.
- [139] Shibuya M. Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001;26:25–35. <https://doi.org/10.1247/csf.26.25>.
- [140] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* 2013;273:114–27. <https://doi.org/10.1111/joim.12019>.
- [141] Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669–76. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>.
- [142] Hu C, Jiang X. Role of NRP-1 in VEGF-VEGFR2-Independent Tumorigenesis. *Target Oncol* 2016;11:501–5. <https://doi.org/10.1007/s11523-016-0422-0>.
- [143] Song G, Li Y, Jiang G. Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review). *Oncol Rep* 2012;28:1935–44. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2045>.
- [144] Pezzuto A, Carico E. Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. *Curr Mol Med* 2019;18:343–51. <https://doi.org/10.2174/1566524018666181109121849>.
- [145] Deeb G, Vaughan MM, McInnis I, Ford LA, Sait SNJ, Starostik P, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2011;35:579–84. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.10.020>.
- [146] Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005;105:1383–95. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2909>.

- [147] Fragoso R, Elias AP, Dias S. Autocrine VEGF loops, signaling pathways, and acute leukemia regulation. *Leuk Lymphoma* 2007;48:481–8. <https://doi.org/10.1080/10428190601064720>.
- [148] Han Y, Wang X, Wang B, Jiang G. The progress of angiogenic factors in the development of leukemias. *Intractable Rare Dis Res* 2016;5:6–16. <https://doi.org/10.5582/irdr.2015.01048>.
- [149] Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschlader M, et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997;89:1870–5.
- [150] Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999;59:728–33.
- [151] Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, Wu Y, Witte L, et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10857–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.191117498>.
- [152] Lee JY, Kim HJ. (Lymph)angiogenic influences on hematopoietic cells in acute myeloid leukemia. *Exp Mol Med* 2014;46:e122. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.72>.
- [153] Ndiaye PD, Pagès G. VEGF-C et vaisseaux lymphatiques: Une épée à double tranchant dans le développement tumoral et la dissémination métastatique. *Médecine/Sciences* 2019;35:132–7. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019002>.
- [154] Fielder W, Graeven U, Ergün S, Verago S, Kilic N, Stockschläder M, et al. Expression of FLT4 and its ligand VEGF-C in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997;11:1234–7. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400722>.
- [155] Liersch R, Schliemann C, Bieker R, Hintelmann H, Buechner T, Berdel WE, et al. Expression of VEGF-C and its receptor VEGFR-3 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2008;32:954–61. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.10.005>.
- [156] Hou H-A, Chou W-C, Lin L-I, Tang J-L, Tseng M-H, Huang C-F, et al. Expression of angiopoietins and vascular endothelial growth factors and their clinical significance in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008;32:904–12. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.08.010>.
- [157] Reza Aliparasti M, Almasi S, Sanaat Z, Movasaghpour A, Dizaji RK, Bazargani HS. Gene Expression of VEGF-A and VEGF-C in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Iranian Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Turk J Hematol* 2013;30:137–43. <https://doi.org/10.4274/Tjh.2011.0023>.
- [158] Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 2002;99:2179–84.

- [159] Lee S-E, Lee JY, Han A-R, Hwang H-S, Min W-S, Kim H-J. Effect of High VEGF-C mRNA Expression on Achievement of Complete Remission in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Transl Oncol* 2018;11:567–74. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.02.018>.
- [160] de Jonge HJ, Weidenaar AC, Ter Elst A, Boezen HM, Scherpen FJ, Bouma-Ter Steege JC, et al. Endogenous vascular endothelial growth factor-C expression is associated with decreased drug responsiveness in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2008;14:924–30. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1821>.
- [161] Chien M-H, Ku C-C, Johansson G, Chen M-W, Hsiao M, Su J-L, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) promotes angiogenesis by induction of COX-2 in leukemic cells via the VEGF-R3/JNK/ AP-1 pathway. *Carcinogenesis* 2009;30:2005–13. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp244>.
- [162] Hua K-T, Lee W-J, Yang S-F, Chen C-K, Hsiao M, Ku C-C, et al. Vascular endothelial growth factor-C modulates proliferation and chemoresistance in acute myeloid leukemic cells through an endothelin-1-dependent induction of cyclooxygenase-2. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 2014;1843:387–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.015>.
- [163] de Jonge HJ, Valk PJ, Veeger NJ, ter Elst A, den Boer ML, Cloos J, et al. High VEGFC expression is associated with unique gene expression profiles and predicts adverse prognosis in pediatric and adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;116:1747–54. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-270991>.
- [164] Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362:841–4. <https://doi.org/10.1038/362841a0>.
- [165] Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404–7. <https://doi.org/10.1038/37126>.
- [166] Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997;57:4593–9.
- [167] Loges S, Tinnefeld H, Metzner A, Jücker M, Butzal M, Bruweleit M, et al. Downregulation of VEGF-A, STAT5 and AKT in acute myeloid leukemia blasts of patients treated with SU5416. *Leuk Lymphoma* 2006;47:2601–9. <https://doi.org/10.1080/10428190600948253>.
- [168] Garcia-Manero G, Tibes R, Kadia T, Kantarjian H, Arellano M, Knight EA, et al. Phase 1 dose escalation trial of ilorasertib, a dual Aurora/VEGF receptor kinase inhibitor, in patients with hematologic malignancies. *Invest New Drugs* 2015;33:870–80. <https://doi.org/10.1007/s10637-015-0242-6>.

- [169] Zhang L, Song K, Zhou L, Xie Z, Zhou P, Zhao Y, et al. Heparan Sulfate D-Glucosaminyl 3-O-Sulfotransferase-3B1 (HS3ST3B1) Promotes Angiogenesis and Proliferation by Induction of VEGF in Acute Myeloid Leukemia Cells. *J Cell Biochem* 2015;116:1101–12. <https://doi.org/10.1002/jcb.25066>.
- [170] Deng M, Zha J, Zhao H, Jia X, Shi Y, Li Z, et al. Apatinib exhibits cytotoxicity toward leukemia cells by targeting VEGFR2-mediated prosurvival signaling and angiogenesis. *Exp Cell Res* 2020;390:111934. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111934>.
- [171] Zeng D, Wang J, Kong P, Chang C, Li J, Li J. Ginsenoside Rg3 inhibits HIF-1 α and VEGF expression in patient with acute leukemia via inhibiting the activation of PI3K/Akt and ERK1/2 pathways. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:2172–8.
- [172] Mattison R, Jumonville A, Flynn PJ, Moreno-Aspitia A, Erlichman C, LaPlant B, et al. A phase II study of AZD2171 (cediranib) in the treatment of patients with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2015;56:2061–6. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.977886>.
- [173] Zhang Z-H, Hao C-L, Liu P, Tian X, Wang L-H, Zhao L, et al. Valproic acid inhibits tumor angiogenesis in mice transplanted with Kasumi-1 leukemia cells. *Mol Med Rep* 2014;9:443–9. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1834>.
- [174] Kampen KR, ter Elst A, de Bont ESJM. Vascular endothelial growth factor signaling in acute myeloid leukemia. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:1307–17. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1085-3>.
- [175] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:263–73. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>.
- [176] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat Biotechnol* 1993;11:1026–30. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>.
- [177] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001;25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [178] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17:2474–86. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403136>.
- [179] Riedel G, Rüdrieh U, Fekete-Drimusz N, Manns MP, Vondran FWR, Bock M. An Extended ΔCT -Method Facilitating Normalisation with Multiple Reference Genes Suited for

- Quantitative RT-PCR Analyses of Human Hepatocyte-Like Cells. *PLoS ONE* 2014;9:e93031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093031>.
- [180] Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, Nørgaard M, Andersen MK, Dufva IH, et al. Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *J Clin Oncol* 2015;33:3641–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0890>.
- [181] Wiernik PH, Sun Z, Cripe LD, Rowe JM, Fernandez HF, Luger SM, et al. Prognostic effect of gender on outcome of treatment for adults with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2021;194:309–18. <https://doi.org/10.1111/bjh.17523>.
- [182] Pollyea DA, Bixby D, Perl A, Bhatt VR, Altman JK, Appelbaum FR, et al. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2021;19:16–27. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0002>.
- [183] SEER Hematopoietic and Lymphoid Neoplasm Database.html n.d.
- [184] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016;374:2209–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192>.
- [185] Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1909–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa074306>.
- [186] Döhner K, Thiede C, Jahn N, Panina E, Gambietz A, Larson RA, et al. Impact of NPM1/FLT3-ITD genotypes defined by the 2017 European LeukemiaNet in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2020;135:371–80. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002697>.
- [187] Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nat Genet* 2017;49:332–40. <https://doi.org/10.1038/ng.3756>.
- [188] Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:2776–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-109090>.
- [189] Moser C, Jurinovic V, Sagebiel-Kohler S, Ksienzyk B, Batcha AMN, Dufour A, et al. A clinically applicable gene expression–based score predicts resistance to induction treatment in acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 2021;5:4752–61. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004814>.

- [190] Valcárcel D, Montesinos P, Sánchez-Ortega I, Brunet S, Esteve J, Martínez-Cuadrón D, et al. A scoring system to predict the risk of death during induction with anthracycline plus cytarabine-based chemotherapy in patients with de novo acute myeloid leukemia: Induction Death Scoring System in AML. *Cancer* 2012;118:410–7. <https://doi.org/10.1002/cncr.26273>.
- [191] Rodríguez-Arbolí E, Martínez-Cuadrón D, Rodríguez-Veiga R, Carrillo-Cruz E, Gil-Cortés C, Serrano-López J, et al. Long-Term Outcomes After Autologous Versus Allogeneic Stem Cell Transplantation in Molecularly-Stratified Patients With Intermediate Cytogenetic Risk Acute Myeloid Leukemia: A PETHEMA Study. *Transplant Cell Ther* 2021;27:311.e1-311.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2020.12.029>.
- [192] SEER Acute Myeloid Leukemia — Cancer Stat Facts.html n.d.
- [193] Aguayo A, Kantarjian HM, Estey EH, Giles FJ, Verstovsek S, Manshouri T, et al. Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer* 2002;95:1923–30. <https://doi.org/10.1002/cncr.10900>.
- [194] Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri T, Gidel C, Keating M, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:3717–21.
- [195] Padró T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Bürger H, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:1302–10. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402534>.
- [196] Cho C-H, Cha J. Analysis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, vascular endothelial growth factor, and soluble receptor for advanced glycation end-products in bone marrow supernatant in hematologic malignancies. *Clin Biochem* 2020;80:19–24. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.04.002>.
- [197] Zhang Y, Gu H, Chen Q, Zhang Y, Cheng H, Yang J, et al. Low Platelet Counts at Diagnosis Predict Better Survival for Patients with Intermediate-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Acta Haematol* 2020;143:9–18. <https://doi.org/10.1159/000500230>.
- [198] Röllig C, Thiede C, Gramatzki M, Aulitzky W, Bodenstern H, Bornhäuser M, et al. A novel prognostic model in elderly patients with acute myeloid leukemia: results of 909 patients entered into the prospective AML96 trial. *Blood* 2010;116:971–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-267302>.
- [199] Teng C-L, Young J-H, Hsu S-L, Chou G, Kuo I-T, Yu C-Y, et al. Lactate Dehydrogenase, not Vascular Endothelial Growth Factor or Basic Fibroblast Growth Factor, Positively

- Correlates to Bone Marrow Vascularity in Acute Myeloid Leukemia. *J Chin Med Assoc* 2006;69:534–7. [https://doi.org/10.1016/S1726-4901\(09\)70324-7](https://doi.org/10.1016/S1726-4901(09)70324-7).
- [200] Miesner M, Haferlach C, Bacher U, Weiss T, Maciejewski K, Kohlmann A, et al. Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as “AML not otherwise specified” (AML-NOS) or “AML with myelodysplasia-related changes” (AML-MRC). *Blood* 2010;116:2742–51. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-279794>.
- [201] Duchmann M, Wagner-Ballon O, Boyer T, Cheok M, Fournier E, Guerin E, et al. Machine learning identifies the independent role of dysplasia in the prediction of response to chemotherapy in AML. *Leukemia* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01435-7>.
- [202] Arber DA, Erba HP. Diagnosis and Treatment of Patients With Acute Myeloid Leukemia With Myelodysplasia-Related Changes (AML-MRC). *Am J Clin Pathol* 2020;154:731–41. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa107>.
- [203] on behalf of Grup Català de Citologia Hematològica and Spanish CETLAM Group (Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas), Rozman M, Navarro J-T, Arenillas L, Aventín A, Giménez T, et al. Multilineage dysplasia is associated with a poorer prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia with intermediate-risk cytogenetics and wild-type NPM1. *Ann Hematol* 2014;93:1695–703. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2100-6>.
- [204] Falini B, Maciejewski K, Weiss T, Bacher U, Schnittger S, Kern W, et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). *Blood* 2010;115:3776–86. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-240457>.
- [205] Díaz-Beyá M, Rozman M, Pratcorona M, Torrebadell M, Camós M, Aguilar JLL, et al. The prognostic value of multilineage dysplasia in de novo acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics is dependent on NPM1 mutational status. *Blood* 2010;116:6147–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307314>.
- [206] Bacher U, Schnittger S, Maciejewski K, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, et al. Multilineage dysplasia does not influence prognosis in CEBPA-mutated AML, supporting the WHO proposal to classify these patients as a unique entity. *Blood* 2012;119:4719–22. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-395574>.
- [207] Prats-Martín C, Burillo-Sanz S, Morales-Camacho RM, Pérez-López O, Suito M, Vargas MT, et al. ASXL1 mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype. *Cancer Med* 2020;9:3637–46. <https://doi.org/10.1002/cam4.2947>.

- [208] Port M, Böttcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol* 2014;93:1279–86. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2072-6>.
- [209] Falini B, Brunetti L, Martelli MP. How I diagnose and treat NPM1 -mutated AML. *Blood* 2021;137:589–99. <https://doi.org/10.1182/blood.2020008211>.
- [210] Xian J, Shao H, Chen X, Zhang S, Quan J, Zou Q, et al. Nucleophosmin Mutants Promote Adhesion, Migration and Invasion of Human Leukemia THP-1 Cells through MMPs Up-regulation via Ras/ERK MAPK Signaling. *Int J Biol Sci* 2016;12:144–55. <https://doi.org/10.7150/ijbs.13382>.
- [211] Loges S, Heil G, Bruweleit M, Schoder V, Butzal M, Fischer U, et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. *J Clin Oncol* 2005;23:1109–17. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.058>.
- [212] Min C-K, Kim SY, Lee MJ, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with reduced severity of acute graft-versus-host disease and nonrelapse mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:149–56. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705410>.
- [213] Kim A-R, Lim J-Y, Jeong DC, Park G, Lee BC, Min C-K. Blockade of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Aggravates the Severity of Acute Graft-versus-host Disease (GVHD) after Experimental Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (allo-HSCT). *Immune Netw* 2011;11:368. <https://doi.org/10.4110/in.2011.11.6.368>.
- [214] Pillozzi S, Brizzi MF, Bernabei PA, Bartolozzi B, Caporale R, Basile V, et al. VEGFR-1 (FLT-1), $\beta 1$ integrin, and hERG K⁺ channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood* 2007;110:1238–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-003772>.
- [215] Lu L, Zhang L, Xiao Z, Lu S, Yang R, Han ZC. Neuropilin-1 in acute myeloid leukemia: Expression and role in proliferation and migration of leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2008;49:331–8. <https://doi.org/10.1080/10428190701809149>.
- [216] Lin Y, Shen L-Y, Fu H, Dong B, Yang H-L, Yan W-P, et al. P21, COX-2, and E-cadherin are potential prognostic factors for esophageal squamous cell carcinoma: Prognostic factors for ESCC. *Dis Esophagus* 2016. <https://doi.org/10.1111/dote.12522>.
- [217] Koistinen P, Siitonen T, Mäntymaa P, Säily M, Kinnula V, Savolainen E-R, et al. Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/AML-2 by endothelial nitric oxide synthase under

- the control of a vascular endothelial growth factor signaling system. *Leukemia* 2001;15:1433–41. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402217>.
- [218] O'Farrell A-M, Yuen HA, Smolich B, Hannah AL, Louie SG, Hong W, et al. Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2004;28:679–89. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2003.11.004>.
- [219] Gurashi K, Weightman J, Baker SM, Rouault-Pierre K, Breitweiser W, Somerville TCP, et al. Multiomic Single-Cell Sequencing Reveals Patterns of Disease Evolution and Acute Transformation in Chronic Myelomonocytic Leukaemia. *Blood* 2021;138:2586–2586. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-153540>.