



# Estudio del patrón de expresión de microRNAs en subtipos de leucemia aguda mieloblástica (LAM) poco frecuentes y análisis del valor pronóstico de microRNAs en LAM de riesgo citogenético intermedio

Marina Díaz Beyà

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Tesis Doctoral

Facultad de Medicina

**Estudio del patrón de expresión de  
microRNAs en subtipos de leucemia  
mieloide aguda (LMA) poco frecuentes y  
análisis del valor pronóstico de microRNAs  
en la LMA de riesgo citogenético intermedio**

Directores de Tesis

Dr Jordi Esteve Reyner, Dr Alfons Navarro Ponz

Marina Díaz Beyá

Barcelona, Junio 2014



A mis padres

A mis hermanas

A Alfons



## Índice

Agradecimientos.....	7
Abreviaturas utilizadas.....	13
Listado de genes .....	17
1. Introducción.....	19
1.1. Hematopoyesis.....	19
1.1.1. Orígenes del sistema hematopoyético .....	21
1.2. La Leucemia mieloide aguda.....	22
1.2.1. Definición .....	22
1.2.2. Incidencia .....	23
1.2.3. Diagnóstico.....	24
1.2.4. Clasificación.....	25
1.2.5. Pronóstico .....	27
1.2.5.1. Cariotipo.....	28
1.2.5.2 Mutaciones.....	30
1.2.5.3. Otros factores pronósticos.....	35
1.2.6. Tratamiento.....	38
1.3. LMA con translocación (8;16)(p11;p13) y reordenamiento MYST3-CREBBP.....	41
1.4. RNAs no codificantes .....	43
1.4.1. microRNAs .....	46
1.4.1.1. Historia y características .....	46
1.4.1.2. Biogénesis .....	47
1.4.1.3. Nomenclatura de los microRNAs.....	50
1.4.1.4. Mecanismos de acción.....	53
1.4.1.5. Regulación de los microRNAs.....	57
1.4.1.6. Regulación de la transcripción de los genes de microRNAs .....	57
1.4.1.7. Regulación del procesamiento de los microRNAs .....	58
1.4.1.8. Regulación de la función de microRNAs .....	58
1.4.1.9. Regulación de la destrucción de los microRNAs.....	59
1.4.1.10. <i>Decoy activity</i> sobre los efectos de los microRNAs .....	59
1.4.2. microRNAs y hematopoyesis.....	61

1.4.3. microRNAs en el cáncer .....	62
1.4.4. microRNAs en LMA .....	65
1.4.4.1. Perfiles de expresión de microRNAs en LMA .....	65
1.4.4.2. microRNAs con valor pronóstico y/o funcional en LMA .....	68
1.4.4.3. microRNAs y proteínas de fusión características en LMA.....	70
1.4.5. Búsqueda de dianas de microRNAs .....	70
1.4.5.1 Recursos informáticos.....	70
1.4.5.2. Validación funcional.....	71
2. Hipótesis y objetivos .....	77
2.1. Hipótesis .....	77
2.2. Objetivos.....	78
3. Resultados .....	79
3.1. Resumen de artículo 1 .....	79
3.2 Artículo 1.....	82
3.3. Figuras suplementarias artículo 1 .....	90
3.4. Resumen de artículo 2 .....	94
3.5. Artículo 2.....	96
3.6. Figuras suplementarias artículo 2 .....	106
4. Discusión.....	110
5. Conclusiones .....	121
6. Bibliografía.....	123
7. Anexos .....	139
7.1Revisiones artículo 1.....	139
7.1.1. Primera revision .....	139
7.1.2. Segundas revisiones.....	152
7.2.Revisiones artículo 2.....	155
7.2.1. Revisiones .....	155
8. Otros trabajos relacionados con la tesis, realizados durante este periodo sobre miRNAs y LMA .....	174
8.1. Resumen del trabajo 3.....	174
8.2. Resumen del trabajo 4.....	177
8.3. Resumen del trabajo 5:.....	179
9. Otros trabajos publicados durante este periodo .....	180
10. Donde han sido presentados estos y otros trabajos realizados durante este periodo...	183

## Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis:

A Jordi, muchas cosas que agradecer, lo primero por mantenerse así de buena gente, es un ejemplo, en muchos sentidos. Es un gran médico, es listo, rápido, pero sobre todo tenaz, muy responsable, trabajador y muy humano, no tiene ninguna clase de pereza de quedarse hasta las mil hasta resolver el problema clínico de turno, es un ejemplo de cómo hay que tenerlo todo en cuenta, cómo hay que saber a quién pedir consejo y tener la humildad de hacerlo por estar seguro de que uno hace lo que se debe hacer por resolver un problema clínico, (o al menos proporcionar la asistencia óptima en ese momento) sea cual sea. Se acuerda de todos los pacientes, es capaz de integrar gran cantidad de información tanto clínica como biológica de un gran espectro de enfermedades hematológicas. Se hace muchas preguntas interesantes... y las comparte con los demás!. Por su gran capacidad de trabajo y adaptación y además normalmente de buen humor, es de agradecer lo poco que te quejas, y que no te pasas el día criticando a nadie.

Gracias por la paciencia de enseñarme, o intentarlo al menos, casi todo lo que sé de hematología, por tener la constancia de repasar el dispe casi cada semana, y de buscar conmigo todo lo que necesitábamos en pubmed, creo que aprendí por imitación esa buena costumbre. Gracias por darme la oportunidad de hacer la beca R5 contigo, me acuerdo que me diste un recorte de una revista del ASH o algo así, que resumía lo poco que se sabía entonces de los miRNAs en LMA (en dos páginas!) y me preguntaste qué me parecía hacer ese proyecto... pues qué guay!! Gracias por la confianza depositada en ese sentido. También un capítulo divertido cuando me acuerdo los primeros protocolos que hice de LMA contigo, con las llamadas esas a deshora a EEUU cuando no funcionaba un aparato, o había que hacer un EKG a las tantas, jejejeje....Gracias por hacer juntos, mis primeros análisis estadísticos, madre mía, cuántas veces hicimos las tablas esas de 2x2 para el trabajo de displasia multilínea... Jordi, no sabía nada...y tampoco soy especialmente rápida, qué le vamos a hacer!... bueno qué te voy a contar si lo sufriste en tus carnes, jejejejeje

No sólo por tus valiosos consejos sino también, y muy importante, por tu consuelo y comprensión en los momentos duros de la sala. Por dedicarme tiempo, y aconsejarme también en los momentos de "crisis" o decisiones existenciales, consejos sinceros y con cariño, gracias por nuestra amistad!

En definitiva por inculcarme una manera de hacer medicina, honesta, translacional y divertida... gracias!

A Alfons, otro que ha gastado mucha paciencia conmigo, jeje. Alfons, me acuerdo cuando me dijiste en Madrid que si queríamos hacer un proyecto de miRNAs en LMA si queríamos podíamos colaborar.... Pues qué bien... la verdad qué lujazo lo que estaba por comenzar...



Desde que llegué al laboratorio me hiciste sentir como en casa, ¡mil gracias!, cuando ya dijimos de iniciar el proyecto un día te pedí si podías resolverme “algunas” dudas, llegué con todos esos papers subrayados y con una anotación “ALF” en lo que te tenía que preguntar, había muuuuuuchos “ALFs”, desde qué era eso de Renilla-Luciferasa, hasta las cosas más tontas de PCR, análisis, WB, ect... y tu pacientemente y con esa sonrisa y amabilidad me respondiste una a una....

Cuando fuimos a poner la primera microfluídica, los dos allí con tanto cuidado de hacerlo todo bien, las millones de veces que analizamos esas tropezientas celdillas de Excel... (el Excel tiene final!! Jejeje). Mil gracias por tomarte tan en serio, poner tanto esfuerzo, energía, tiempo y buen humor en todos los proyectos que hemos hecho juntos. Gracias por escuchar pacientemente todas las ideas de las cosas que leo, y saber discernir de todas ellas la que vale la pena tirar para adelante y la que no tengo que perder mucho más tiempo en ello.

Me has enseñado todo lo que se de trabajar en el laboratorio, y lo mejor siempre con muchísimo entusiasmo, buen humor y cariño por el propio trabajo. Desde decirme que tengo que hacerme una libreta, hasta a usar el Excel, análisis, ect, ect, ect... Además muchas de las cosas me las has tenido que decir más de dos veces, y las veces que me he equivocado siempre has conseguido quitarle hierro y aprender de ello.

Gracias por tener esa gran capacidad de trabajo, y trabajo en equipo, por tener esas brillantes ideas, por ser tñ pragmático y por ser sorprendentemente resolutivo, creativo y apasionado con tu trabajo. Por tener esa gran humanidad, por crear ese buen rollo en el laboratorio, por crear tantas risas, y tantas ganas de trabajar, y de trabajar bien. Eres una persona excepcional, buena, divertida, constante, con ánimo constante de superación. Gracias por enfrentarte a todo lo profesional como un reto divertido y apasionante, es realmente bonito cuando estas muy metido en un proyecto y contagias esa energía de a ver qué saldrá! Y después de eso.... A ver esto qué significa... y todo con honestidad, paciencia, estudio y humildad...creo que eres un gran científico y sobretodo una gran persona...

...y dejando un poco a parte lo profesional...jejeje.... pues no cabrían los agradecimientos.... Gracias por hacer que viva FELIZ, e ilusionada en todos los aspectos de mi vida ;-)

A mi familia:

A mis padres, Ramona y Ginés evidentemente sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias por tener esa bondad, por querernos tanto, por saber disfrutar de la vida gracias por transmitirnos ese amor por la vida, esa sinceridad y humildad. Gracias por supuesto por el gran apoyo incondicional siempre y esa comprensión generosa. Por hacerme todo tan fácil y divertido.... desde que nací, sois realmente un ejemplo a seguir de amor incondicional... sois geniales

A mis hermanas, Cristina, Ana y Carmen mis compañeras incondicionales también desde que nací, teneos es un verdadero tesoro, gracias por cuidarme tanto, por escucharme por hacerme sentir importante y afortunada. He aprendido mucho de vosotras, y me seguís enseñando cada día.

A mis sobrinas!!! Abril y Elba!! Qué bonicas!! Desde que llegaron el Mundo es aún más bonito.

A mi tía Adela, a mi Abuela Electra gracias por vuestra generosidad, vuestra hospitalidad, vuestra sinceridad y por desprender tanto amor. Gracias por estar siempre ahí.

A mi abuela Ramona, ejemplo de bondad y superación

A mi tía M Carmen, Paco y mis primos Fernando, Electra, Carmen y Paco por esos buenos ratos que pasamos siempre

A mis amigos:

A Salvatore, que desde luego en esta tesis ha tenido muuuuuucho que ver, mil gracias por apoyarme tanto en muchos de esos momentos que para mí fueron tan difíciles del inicio de la residencia y durante ella, mil gracias por acompañarme a las tantas de la noche a cambiar la placa de microfluidica para poner una más al día, gracias por entenderme tan bien y acompañarme simplemente porque te dabas cuenta que para mí era importante, y siempre con esa calma y con esa sonrisa, y después ir a tomarnos un helado. Gracias por apoyarme tanto durante todos estos años y por todos los momentos importantes y cotidianos compartidos. Gracias por aún ahora saber que sigues ahí.

A Georgina, qué suerte qué seamos tan amigas, qué nos entendamos tan bien, que seas tan importante para mí. Georgina es una gran persona y una gran médica, una médica de esas de verdad, y una persona de esas buenas y auténticas también de verdad. En esta tesis tú has tenido muuuuuucho que ver, me has ayudado tanto médica como sobretodo personalmente, tanto en la tesis como en mi vida en general de médico, y sobretodo como persona, mil gracias por ayudarme siempre, es genial que siempre sabemos lo que nos pasa y cómo estamos, estemos cerca o lejos, y por compartir tantos momentos bonitos, qué suerte, no?

A Paula, desde luego desde que empecé medicina mi amiga inseparable, compañera de clases, aventuras, viajes, e inquietudes tanto profesionales como vitales, siempre has sido un apoyo y un pilar para mí, además de una alegría y muchas risas, mi amiga del alma quien sieeeeeemmpre está ahí, gracias guapa!

A Berta, amiga muy fiel, desde el instituto y gran científica!! Gracias por escucharme desde que era adolescente y por tus grandes y sabios consejos. Y hablando de ciencia para mí eres un ejemplo de constancia y superación, muak!

A Sofi, por apoyarme y ser tan buena amiga, gracias!

A Jorge y Pablo, vaya par! Qué suerte teneros como amigos, por enseñarme tantas cosas, por tantas conversaciones interesantes, y por recordarme siempre la buena vida

A Raquel y Cris, la verdad es que estos últimos años me habeis ayudado mucho, y hemos compartido muchos momentos buenos ( y caipiriñas!), y esta tarde otra! Así que voy a daros prisa que aún tengo que pasar por casa que salgo de guardia y hoy hemos quedado, qué bien!...jejeje

A todos los compañeros y amigos que forman o han formado parte del Laboratorio de Marià Monzó:

A Marià Monzó, gracias por dejarme un huequecito en tu laboratorio, y hacer que me sienta allá bien... la verdad es que es un gusto cuando haces sesiones y transmites que has pensado tanto tiempo de tu vida en el proceso del cáncer, que son bonitas y siempre aprendes, además de ser un ejemplo de superación profesional

A Tania, por su paciencia... Llegamos a hacer tres veces el gel hasta que me salió, qué risas que nos hemos pegado en el laboratorio! Gracias por ser tan didáctica y escuchar siempre que una lo necesita.

A Bernat, por enseñarnos muchas cosas del análisis de manera agradable y docente, y siempre echarnos una mano cuando se lo pedimos, además de ser un gran tío

A Gerardo, quién me ha ayudado en más de una ocasión, gracias por estar siempre disponible a ayudar, escuchar, ect

A Ruti, ya que hemos "crecido" juntas en el lab, y hemos pasado muchos buenos ratos juntas

A Carmeta, la compañera de mesa ideal, discreta, simpática, amable y buena gente... y bailonga!

A Anna que me ha soportado mil veces diciéndole que se caye que estaba intentando escribir la tesis, pero siempre con esa sonrisa y amabilidad, eres muy buena compi!

A Marc que nos hace reir en el laboratorio, y siempre que le pido también me ayuda

A Sandra, gracias por ser silenciosa y tan correcta, y no hacer ruido mientras intento escribir tesis, jejejej qué bonica!

A Gloria y Dolors, gracias por tratarme siempre tan bien y ser tan acogedoras conmingo

A Renné, muchas gracias por enseñarme tantas cosas de cómo redactar, por corregirme 50 veces los papers, siempre con esas buenas sugerencias, por ayudarme a pronunciar para las presentaciones siempre con ese buen hacer, qué bien haces tu trabajo!! Y eres muy buena gente

A Kate, qué tanto me ayudó a pronunciar en inglés en la primera presentación del ASH, y tantas cosas me enseñó durante su paso por aquí, una gran hematóloga y persona

A Rosa por tu cálido recibimiento al lab y tu buen trato siempre

A las que cuando yo llegue ellas se estaban iendo, a Sonia, Aina, Silvi, gracias por hacerme sentir bien desde el principio en las cenas

A todos esos grandes hematólogos del Servicio, qué me han enseñado muchas cosas y tantas veces me han resuelto dudas:

A Paco Cervantes, que hizo que aprendiese mucho cuando tuve la suerte de rotar con él en Hospital de día, gracias por tu admirable capacidad de sistematizar, aclarar, tu talento docente, y tu buen hacer ect... un ejemplo del trabajo rigurosamente bien hecho, gracias!

A Armando, con quién también pasé una parte de la rotación muy agradable en el Hospital de Día, me ha enseñado muchas cosas sobretodo de linfoma pero también es un ejemplo de gran sentido común, buen hacer y capacidad de trabajo. Con Armando hice mi primer trabajo, revisé muchas historias e hice mi primera exposición oral en un congreso, muchas gracias por ensañarme todo eso y hacerlo de manera que pareciera fácil y agradable

Y hablando de hospital de día, gracias a Pedro, Maria del Mar, y las demás enfermeras que hacen un gran y enorme trabajo cada día.

Gracias a todas la enfermeras de las salas que nos hacen sentir que nuestros pacientes están cuidados, gracias a todas por vuestras enseñanzas y en especial a Maria José todo un ejemplo a seguir!

A Bladé, que es un ejemplo también de capacidad de trabajo hecho de manera minuciosa, del que se aprende sólo de verlo cerca.

A Montse Rovira, siempre tan humana y resolutiva.

A Laura Rosiñol, quién en mi rotación de transplante me ayudo mucho, gracias por ser tan buena gente! Y madre mia que capacidad de trabajo y adaptación!

A Rolo quien me enseñó muchas cosas en el inicio de la rotación de la escuela, me enseñó a usar el power point! y que me proporcionó tranquilidad y otro punto de vista más fresco que me sentó muy bien y me ayudó

A Carmen, quien siempre que lo he necesitado ha resuleto mis dudas de manera amable.

A los todos los demás adjuntos, Nomdedeu, Urbano, Françesc, ect...que en conjunto es un ejemplo veros cada miércoles discutiendo y exponiendo vuestras dudas para aseguaros del mejor tratamiento de cada paciente.

A mis todos compañeros del hospital, a Anna Gaya, a Eva, a Maite, a Gabi, a Silvia, a Gonzalo, a Olga, a Carlos, a Maria, a Alejandra, a Natalia, a Eukene, a Jordina, a Tycho, a Rodrigo, a Ivan, a Oscar, a Núria, a Laura, a Xavi, a Xavier, ect...realmente sin vosotros y vuestro apoyo en algún momento durante estos años estos momentos duros hubieran sido aún más duros, y gracias también por los buenos ratos y consejos.

A Marta Bistagne, la verdad es que haces que estar en el hospital sea mucho más agradable, y eres un gran apoyo y brisa de buen humor, una suerte tenerte detrás de la "mampara esa en medio del pasillo" de nuestro "despacho"

Al grupo meloide:

Marta Pratcorona por iniciarme en la base de datos, en las muestras... gracias por tu apoyo

A Meritxell, gracias por ser agradable y parlanchina

A Ruth que sus preguntas son todo un reto y nos pone las pilas a todos

A Mire que la verdad siempre ha sido para mí un ejemplo a seguir!. Cuando estaba rotando por la escuela me explicaste cuatro presentaciones de biología molecular, te lo agradezco mucho, lo disfrute un montón y gracias por explicarme cosas siempre que he necesitado, y por ser tan agradable

A Montse Torredadell, por tu amabilidad y bondad y tus siempre buenas palabras, por tu paciencia a la hora de quedar y porque colaborar contigo (y con Mire!) está guay

A la gente de la escuela:

Josep Lluís, gracias por enseñarme a mí y a todos y con esa super paciencia los encantos de la citología. Y muchas gracias porque la primera tarde que me ibas a dar una clase de citología te tiraste dos horas conmigo porque veía doble en el microscopio y no podía mirar con los dos ojos! me diste toda clase de trucos y consejos, gracias por ser tan gran persona y apoyarme siempre.... Tengo que confesar que sigo viendo doble y por tanto mirando con un ojo, jejejejeje qué le vamos a hacer

A Dolors Colomé, siempre que le pregunto alguna duda me la resuelve muy eficientemente, siempre hace preguntas pertinentes y es muy colaboradora y agradable, gracias!

A Maruja, un ejemplo de rigurosidad y diligencia, nos hace sentir seguros a los q estamos un piso más abajo

A Marta Aymerich, gracias por tu amabilidad y por enseñar cada vez que se te pide, y muchas gracias por tu paciencia cuando te pido muestras

A Neus, otra persona que nos hace sentir seguros a los que estamos un piso más abajo en la planta, gracias por enseñarme un poquito de citometría

A las citogenetistas, Anna Carrió y Dolors Costa, por proporcionarnos el factor pronóstico más importante actualmente en la LMA

Gracias a las enfermeras de la escuela por enseñarme a hacer mielogramas

Al CETLAM por su apoyo, su foro de discusión, sus muestras y datos

Gracias a los pacientes y familiares por creer en nosotros y permitirnos con su generosidad hacer investigación e intentar avanzar, y también por su cariño, paciencia y comprensión

A la hematología, esa disciplina que nos hace entretenernos cada día, que nos hace pensar, esforzarnos... porque creo que tenemos tanta suerte de poder dedicarnos a esto que tendríamos que intentar devolver al menos una parte del favor avanzando aunque sea un poquito en el mejor tratamiento (integral, en todos los sentidos) de los pacientes... Tenemos la suerte de tener muestras, información, ganas y algo de dinero que gastar en investigación, todo ello lo considero un verdadero placer y un lujo.... Así que creo que tenemos la responsabilidad y obligación de mejorar todo esto... o al menos intentarlo, con gusto y alegría.

## Abreviaturas utilizadas

1 RC: Primera remisión completa

2HG: 2-hidroxiglutarato

3'UTR: *Untranslated region*

5'-AZA: 5' azacitidina

HiDAC: dosis altas de ARA-C

AloTPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

ATRA: *all-trans-reinoic acid*

ASOs: *Antisense oligonucleotides*

BMP: *bone morphogenic proteins*

CALGB: *Cancer and Leukemia Group B* (Grupo cooperativo americano de leucemia aguda mieloblástica)

CBF: *core-binding factor*

CETLAM: grupo cooperativo de estudio y tratamiento de las leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos

DGCR8: *The Drosha-DGCR8 complex. DiGeorge síndrome critical región 8*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Dominio JM: dominio yuxtamembrana

ELN: *European LeukemiaNet*

ENCODE: *The Encyclopedia of DNA Elements*

ERM: Enfermedad residual mínima

FAB: grupo francés-americano-británico

FLT3-ITD: *fms-related tyrosine kinase 3- Internal tandem duplication*

GATA2: *GATA binding protein 2*

G-CSF: *Granulocyte colony-stimulating factor*

GW-bodies: *glycine-tryptophan bodies*

Ida: Idarrubicina

LLC: leucemia linfática crónica

LMA t(8;16): Leucemia mieloide aguda (LMA) asociada a t(8;16)(p11;p13) y reordenamiento MYST3-CREBBP

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMA-CN: Leucemia mieloide aguda con cariotipo normal

LMA-RI: LMA de riesgo citogenético intermedio

LMC: leucemia mieloide crónica

miR: microRNA maduro

miRISC: complejo RISC unido a miRNA

miRNAs: microRNAs

MLL-PTD: *MLL partial tandem duplication*

MRC: *Medical Research Council (Grupo cooperativo del Reino Unido)*

NCRI: *National Cancer Research Institute*

ncRNAs: RNAs no codificantes

NGS: next-generation sequencing

OMS: Organización Mundial de la Salud

P bodies: *processing bodies*

PASRs: *promoter-associated small RNAs*

Pb: pares de bases

PCR: *polymerase chain reaction*

piRNAs: *PIWI-associated RNAs*

rasiRNAs: *repeat-associated short interfering RNAs*

RC: remisión completa

RISC: *miRNAs induced silencing complex*

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero

SG: supervivencia global

siRNAs: *small-interfering RNAs*

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SLR: supervivencia libre de recaída

snoRNAs: *small nucleolar RNAs*

SMIRs: *small-molecule drugs that target specific miRNAs*

Sp: Especie

tel-sRNAs: *telomere specific small RNAs*

TGF-beta: factor de crecimiento de transformación beta

tiRNAs: *transcription initiation RNAs*

TKD: dominio tirosin quinasa

TSA: Tricostatin A

TU: unidad de transcripción policistrónica

VHC: virus de la hepatitis C

WHO: organización mundial de la salud (*World Health Organization*)

WB: *Western Blot*

XPO5: exportina 5





## Listado de genes

*ASXL1: additional sex combs like 1*

*BAALC: brain and acute leukemia, cytoplasmic*

*CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*

*CREBBP: CREB-binding protein (CREBBP previamente conocido como CBP)*

*DNMT3A: DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha*

*ERG: v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*

*FLT3: fms-related tyrosine kinase 3*

*HOX: Homeobox*

*IMP8: Importin 8*

*IDH1 e IDH2: isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (NADP+), soluble*

*KIT: v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*

*MECOM: MDS1 and EVI1 complex locus*

*MEIS1: Meis homeobox 1*

*MLL: mixed lineage leukemia*

*MYST 3: gen MYST histone acetyltransferase 3 (MYST 3 previamente conocido como MOZ)*

*NF-kB: tumor necrosis factor receptor*

*NPM1: nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)*

*PRL: prolactin*

*RET: ret proto-oncogene*

*RUNX1: runt-related transcription factor 1*

*TET: tet methylcytosine dioxygenase*

*TP53: tumor protein p53*

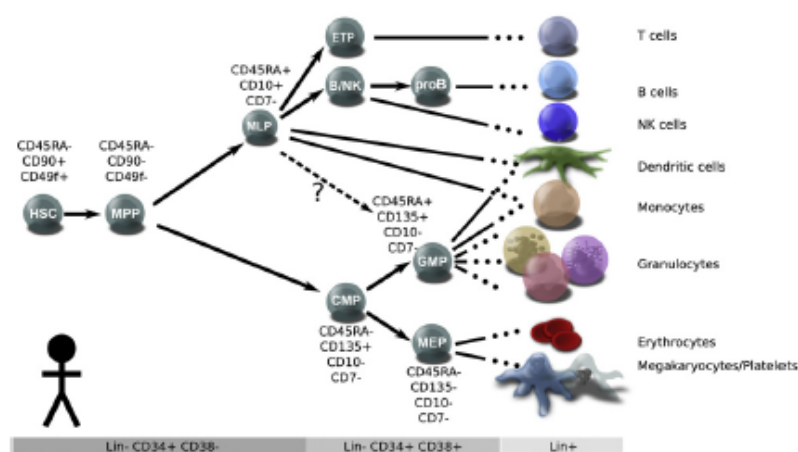
*WT1: Wilms' tumor 1*



# 1. Introducción

## 1.1. Hematopoyesis

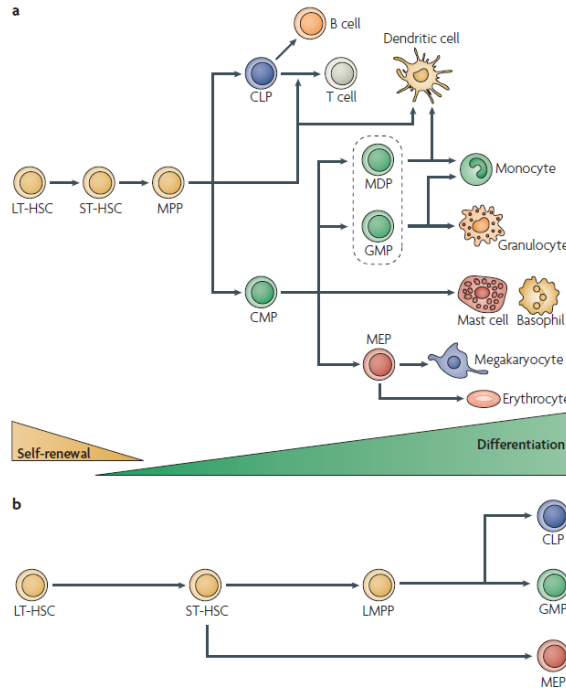
La hematopoyesis (del griego  $\alpha\mu\alpha$ , -ατος-, 'sangre' y  $\pi\alpha\iota\eta\sigma\iota\varsigma$ , 'creación') es el proceso de formación, desarrollo y maduración por el cual las células de la sangre adquieren un determinado fenotipo a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética, y como consecuencia de unos procesos coordinados de expresión específica de diferentes genes en cada célula [1] (figura 1) [2].



**Figura 1.** Modelo actual de determinación de linaje en la jerarquía hematopoyética humana [2].

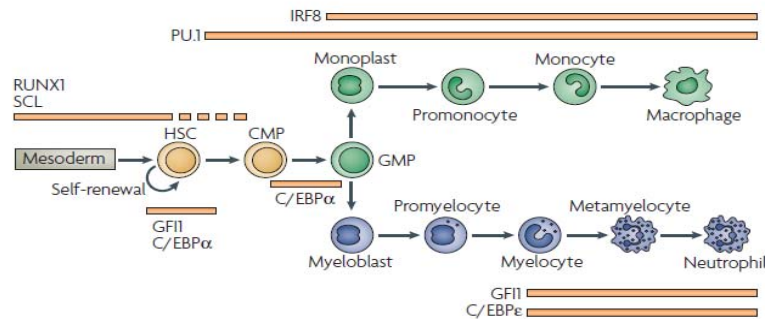
La sangre es uno de los tejidos más altamente regenerativos, originándose más de un billón de células al día la medula ósea adulta humana [2]. A principios de siglo se postuló que la hematopoyesis estaba organizada como una jerarquía celular derivada de un precursor común llamado célula madre hematopoyética [3]. Las células madre hematopoyéticas están caracterizadas por la habilidad de autorenovación y diferenciación en todas las líneas maduras sanguíneas. Son células poco frecuentes y son capaces de rescatar y reconstruir el sistema hematopoyético en individuos que han sido irradiados de manera letal [4]. La mejor evidencia de la existencia de las células madre hematopoyéticas se produjo durante la era atómica. La radiación producía un fallo medular letal, pero si a los sujetos expuestos a la radiación se les

inyectaba células de la médula ósea de individuos sanos, se podían rescatar del fallo medular [5]. La maduración de los precursores hematopoyéticos está asociada con dos procesos fundamentales: la reducción de la autorenovación y la adquisición de una identidad linaje específica (Figura 2) [6].



**Figura 2.** Conceptos actuales de la diversificación de linajes hematopoyéticos [6].

La mielopoiesis (Figura 3[6]) es el proceso que da lugar a la generación, desarrollo y maduración del componente mieloide de la sangre: eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos [7].

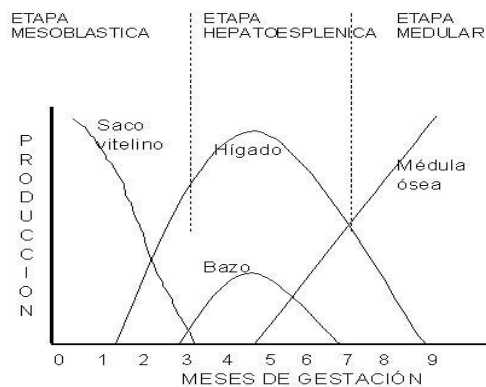


**Figura 3.** Diferenciación mieloide y factores de transcripción requeridos [6].

En un adulto sano, las células madre hematopoyéticas residen predominantemente en la médula ósea como células inactivas y quiescentes. Estas células están en contacto con células no hematopoyéticas, llamadas estroma (fundamentalmente fibroblastos, osteoblastos y adipocitos, macrófagos y osteoblastos y células endoteliales) que conforman el microambiente de la médula ósea (Hoffman, *Hematology*; 4<sup>th</sup> ed., 2005, ISBN:978-0-443-06628-3).

### 1.1.1. Orígenes del sistema hematopoyético

Las células sanguíneas derivan de la hoja mesodérmica del embrión [8]. Durante la gastrulación el mesodermo se induce por el endodermo y se sitúa a lo largo del eje dorsal-ventral. La familia de proteínas morfogénicas de hueso (*bone morphogenic proteins*, BMP) así como el factor de crecimiento de transformación crecimiento (TGF-beta) son importantes para dirigir las células a su destino, el mesodermo ventral. Parece que las proteínas Hedgehog y los retinoides pueden estar involucrados en activar las proteínas BMP. Las células del mesodermo ventral migran hasta el saco vitelino donde generan la primera ola de hematopoyesis, que se llama hematopoyesis primitiva. Esta hematopoyesis es transitoria y consiste esencialmente en células eritroides que expresan hemoglobina embrionaria (2<sup>a</sup> semana de la etapa embrionaria). La segunda ola se llama hematopoyesis definitiva y tiene lugar en la región aórtica-gonadal-mesodermo donde las células madre hematopoyéticas se expanden y migran hacia el hígado y bazo fetal (6<sup>a</sup> semana) para generar las células hematopoyéticas de todas las líneas. Durante la fase fetal tardía las células madre hematopoyéticas migran a la médula ósea donde a lo largo de la vida será donde se produzca la hematopoyesis (Figura 4) (Hoffman, *Hematology*; 4<sup>th</sup> ed., 2005, ISBN:978-0-443-06628-3).

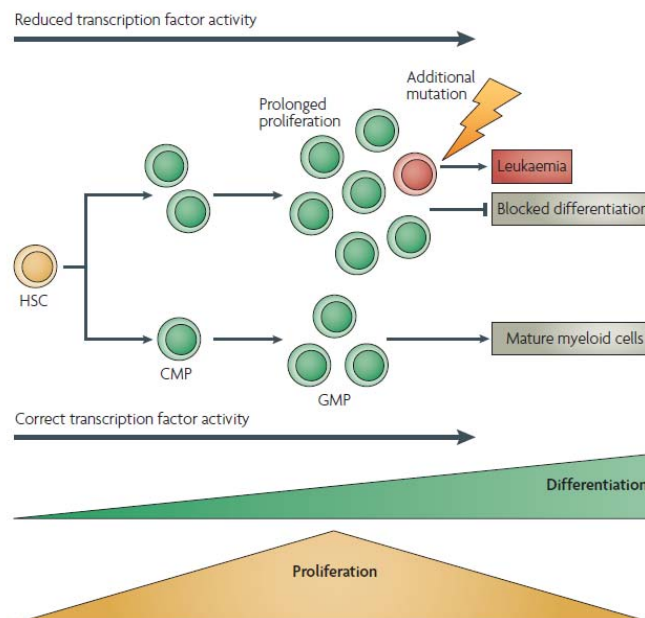


**Figura 4.** Esquema de las etapas del desarrollo del sistema hematopoyético (adaptado de [www.monografias.com/trabajos906/sangre-hemopoyesis-](http://www.monografias.com/trabajos906/sangre-hemopoyesis-)

## 1.2. La Leucemia mieloide aguda

### 1.2.1. Definición

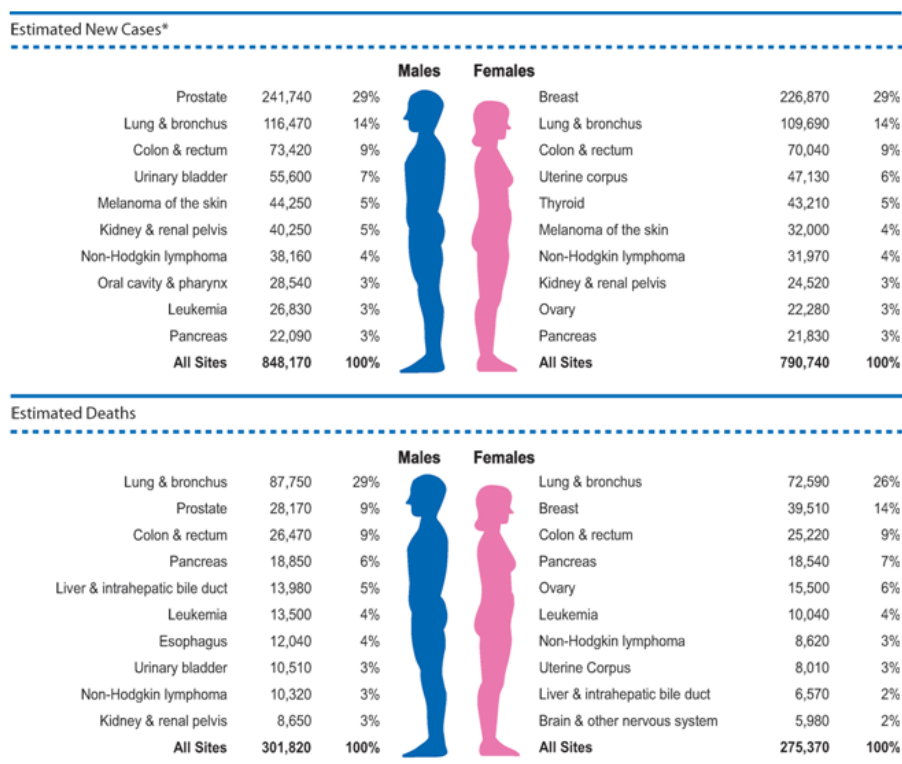
La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad clonal, maligna, agresiva y heterogénea que se origina en los progenitores de la médula ósea. Está causada por la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y, seguramente, también epigenéticas [9, 10]. Se ha demostrado que la LMA está organizada de manera jerárquica y que se origina desde una célula progenitora primitiva [7, 11]. Como consecuencia las células progenitoras hematopoyéticas pierden la habilidad de diferenciarse normalmente y de responder de manera normal a los reguladores de la proliferación celular (Figura 5[6]), produciéndose una expansión clonal de células neoplásicas de estirpe mieloide llamadas blastos [10]. Por lo tanto la LMA está caracterizada por la expansión clonal en la médula ósea, sangre periférica u otros tejidos de blastos mieloides y éstos dan lugar a insuficiencia medular, presentando granulocitopenia, trombocitopenia y/o anemia [12].



**Figura 5.** Modelo de desarrollo de leucemia a partir de un bloqueo de la diferenciación mieloide [6].

## 1.2.2. Incidencia

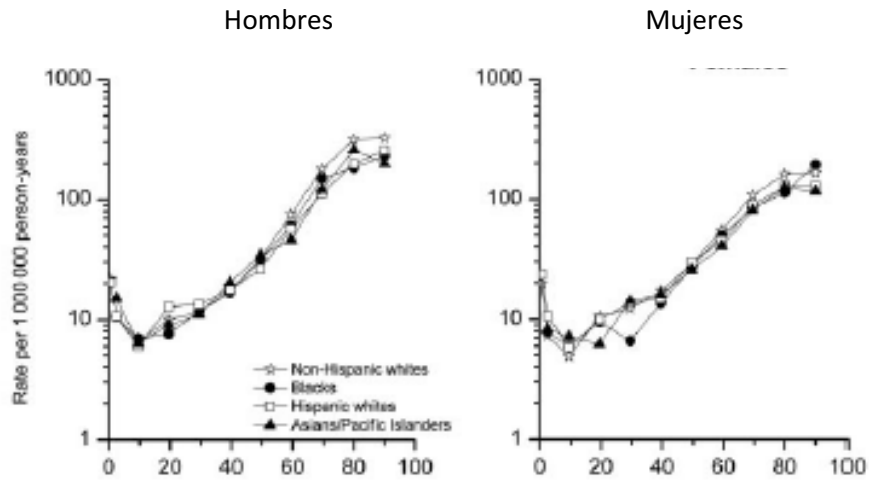
La leucemia es el noveno cáncer más frecuente en el hombre y no se encuentra entre los 10 cánceres más frecuentes entre la mujer (Figura 6), sin embargo es la sexta causa de muerte por cáncer en ambos sexos[13].



**Figura 6.** Incidencia estimada de nuevos casos y muertes por enfermedades neoplásicas [13].

La incidencia de LMA ajustada a la edad es de 3.7 por 100,000 habitantes por año y la tasa de mortalidad ajustada a la edad es de 2.8 por 100,000 habitantes por año [14]. En el periodo de 2006-2010 en Estados Unidos, la mediana de edad al diagnóstico de LMA fue de 67 años. Aproximadamente 5.8% tenían una edad por debajo de 20 años, 6.4% entre 20 y 34 años; 6.6% entre 35 y 44; 11.3% entre 45 y 54; 15.8% entre 55 y 64; 20.5% entre 65 y 74; 23.3% entre 75 y 84; y 10.3% a partir de 85 años (<http://seer.cancer.gov/statfacts/>). Por lo tanto la incidencia de la LMA aumenta con la edad (Figura 7)[14]. Se estima que en el año 2013 se diagnosticarán en Norte América 14,590 casos y fallecerán a causa de la leucemia unas 10,370 personas (<http://seer.cancer.gov/statfacts/>).





**Figura 7.** Ratio de incidencia de LMA específica por edad de acuerdo con sexo y etnia en el periodo 2001-2007 en Estados Unidos [14].

### 1.2.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la LMA se basa en la identificación de células de leucemia mielode aguda llamadas blastos en sangre periférica, médula ósea u otro tejido. Los blastos están definidos de acuerdo con los criterios del Grupo de Trabajo internacional en morfología de síndrome mielodisplásico (IWGM-MDS). Los mieloblastos se definen teniendo en cuenta varias características morfológicas del núcleo como: alto ratio núcleo/citoplasma, nucléolos fácilmente visibles, y normalmente, pero no invariablemente, cromatina nuclear fina (Figura 8). La forma del núcleo es variable, las características citoplasmáticas incluyen un grado de basofilia variable, presencia o no de gránulos o bastones de Auer pero no se detecta aparato de Golgi, la excepción a esta última afirmación es en LMA con translocación (8;21) donde puede haber blastos pequeños donde se distinga el aparato de Golgi pero sin otras características de promielocito. Los mieloblastos con gránulos deben de ser distinguidos de los promielocitos[15].



**Figura 8.** Blastos, promielocitos y promielocitos anormales[15].

Para el diagnóstico se requiere un 20% de blastos o más en médula ósea o sangre periférica. Excepto en el caso de LMA con t(8;21), inv (16), t(16;16) o t(15;17) que no es necesario llegar hasta un 20% de blastos para diagnosticar LMA, también es así en algunos casos de leucemia eritroide aguda cuando los precursores eritroides son más del 50% del total celular de la médula ósea y los blastos son más del 20% del componente no eritroide de la médula ósea[16].

El diagnóstico de sarcoma mielóide caracterizado por la presencia de blastos en otros tejidos, es sinónimo de LMA y no se tiene en cuenta el número de blastos en médula ósea y en sangre periférica.

#### 1.2.4. Clasificación

La LMA es una enfermedad muy heterogénea, distintos tipos de LMA, presumiblemente ocasionadas por mecanismos diferentes con distinto comportamiento biológico y de manera más relevante, con distinto comportamiento clínico.

La primera clasificación propuesta por un grupo de expertos, el grupo francés-americano-británico, conocida como clasificación FAB en 1976, proponía un sistema de clasificación basado en las características morfológicas y citoquímicas y más tarde fueron incorporados criterios inmunofenotípicos [17-19]. Esta clasificación subdivide las leucemias mieloides en 8 subtipos (de M0 a M7) dependiendo de su tipo celular predominante. La clasificación FAB buscaba identificar el equivalente leucémico de las células mieloides para cada estadio de diferenciación (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación FAB de las LMAs. Adaptado de [20]

Subtipo FAB	Denominación	% de casos	Comportamiento citoquímico	
			MPO	Esterasas inespecíficas
M0	LMA con diferenciación mínima	<5	-	-
M1	LMA sin maduración	15-20	+ (>3%)	-
M2	LMA con maduración	15-25	++	-
M3	Leucemia aguda promielocítica	5-10	+++	-
M4	Leucemia aguda mielomonocítica	20	+	+
M4 Eo	Leucemia aguda mielomonocítica con eosinofilia	5-10	+	+
M5	Leucemia aguda monocítica	10-20	-	+
M6	Eritroleucemia	3-5	+	-
M7	Leucemia aguda megacarioblástica	<5	-	*

\*\*M7 las células son positivas para la a-naftil acetato esterasa y negativas para la naftil butirato esterasa. Las células son positivas para el Factor VIII y la glicoproteína palquetaria Ib/IIa.

Con el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y la adquisición de nuevos conocimientos biológicos, somos capaces de reconocer más características que te permiten la identificación de entidades específicas con características citogenéticas y moleculares distintivas. Actualmente la clasificación vigente es la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuya última actualización se realizó en 2008 [16].

Brevemente, esta clasificación, que es una clasificación de consenso realizada por expertos en el campo, usa toda la información de la que disponemos, es decir, morfología, inmunofenotipo, genética y características clínicas y moleculares para definir entidades clínicamente significativas. Fruto del mayor conocimiento biológico de la LMA, en esta última clasificación del 2008 se han añadido tres nuevas entidades en LAM y dos nuevas entidades provisionales (Tabla 2) [16, 21].

**Tabla 2.** Clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2008 de LMA [16].

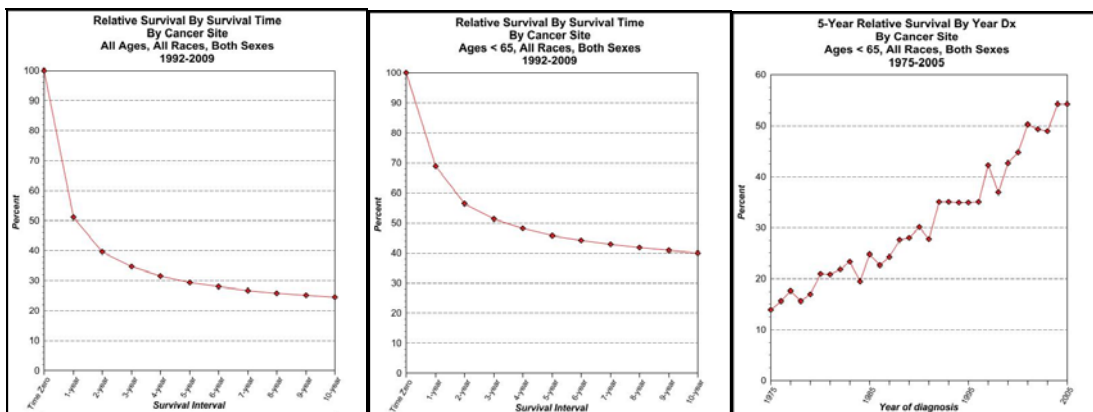
Clasificación WHO 2008 de LMA y neoplasias relacionadas
<b>LMA con alteraciones genéticas recurrentes</b> LMA con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 LMA con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 LMA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA LMA con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL LMA con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 LMA con mutación de <i>NPM1</i> * LMA con mutación de <i>CEBPA</i> *
<b>LMA No especificada de otra manera</b> LMA con diferenciación mínima LMA sin maduración LMA con maduración Leucemia mielomonocítica aguda Leucemia monoblástica/monocítica aguda Leucemia eritroide aguda Leucemia eritroide pura Eritroleucemia Leucemia aguda basofílica Panmielosis aguda con mielofibrosis
<b>LMA con cambios relacionados con mielodisplasia</b>
<b>Neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento</b>
<b>Sarcoma mielóide</b>
<b>Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down</b> Mielopoyesis anormal transitoria Leucemia mielóide aguda asociada con el síndrome de Down
<b>Neoplasia de células dendríticas plasmocitoide blástica</b>
*Entidades provisionales

### 1.2.5. Pronóstico

La LMA es una enfermedad muy grave que sin tratamiento tiene un pronóstico infausto en pocos meses. La causa de muerte de estos pacientes es derivada la mayoría de los casos, de la insuficiencia de la médula ósea para producir células hematopoyéticas maduras y normofuncionantes. Por lo tanto el paciente presentará anemia, plaquetopenia y neutropenia, como consecuencia pueden producirse hemorragias e infecciones graves.

En general la supervivencia relativa a los 5 años, (periodo analizado 2003-2009, 18 áreas geográficas de EEUU) es de 24.2% (Figura 9) (<http://seer.cancer.gov/faststats>).

Sin embargo la supervivencia relativa a los 5 años en pacientes de hasta 65 años, que se tratan con quimioterapia de manera intensiva es mejor, de un 45% (Figura 9).



**Figura 9.** Supervivencia relativa de pacientes afectados de LMA en (A) todos los pacientes, (B) pacientes de edad < 65 y (C) supervivencia relativa en <65 años dependiendo del año de diagnóstico (<http://seer.cancer.gov/faststats>).

Si analizamos la supervivencia relativa de los pacientes de hasta 65 años dependiendo del año de diagnóstico, se observa una clara mejoría de la supervivencia en el transcurso de los años (Figura 9).

En general el pronóstico de los pacientes con LMA varía dependiendo de varios factores que dependen por un lado del paciente, y por otro lado dependen de la biología intrínseca de la LMA.

De los factores que dependen del paciente destaca el incremento de edad como factor pronóstico adverso [22, 23], y las comorbilidades asociadas [24].

Respecto a los factores que dependen de la biología intrínseca de la LMA se incluyen: el cariotipo, mutaciones de determinados genes y nivel de expresión de determinados genes, así

como la respuesta al tratamiento, medida por la enfermedad residual mínima. A continuación se exponen con más detalle estos factores.

### 1.2.5.1. Cariotipo

Aproximadamente la mitad de los pacientes con LMA presentan alteraciones cromosómicas. La citogenética es el factor pronóstico al diagnóstico más importante en LMA (Figura 10). La citogenética distingue tres grupos con diferente pronóstico en cuanto a supervivencia global y tasa de recaída[25-29]: Subgrupo citogenético de riesgo favorable, de riesgo desfavorable y de riesgo citogenético intermedio (Tabla 3):

**Tabla 3.** Estratificación pronóstica de la LMA en función de las anomalías citogenéticas adaptada de [25]. En gris categorías aceptadas de pronóstico adverso que no constan como tal en la clasificación del MRC

Grupo de riesgo citogenético	Citogenética
Buen pronóstico	Inv (16)(p13q22) o t (16;16)(p13;q22), t(8;21)(q22;q22), t(15;17) (q22;q21)
Pronóstico intermedio	Citogenética normal, +8, t(9;11), otras entidades citogenéticas no clasificadas ni como favorables ni como adversas
Mal pronóstico	Cariotipo complejo, cariotipo monosómico -5, 5q-,add (5q) -7, 7q-, add (7q) Inv(3), t(3;3), abn (3q excluyendo t( 3;5)(q21 25;q31 35) t(6;9) (p26; q34) t(9;22) (q34;q11) 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)] -17, abn (17p)

#### *Subgrupo citogenético riesgo favorable*

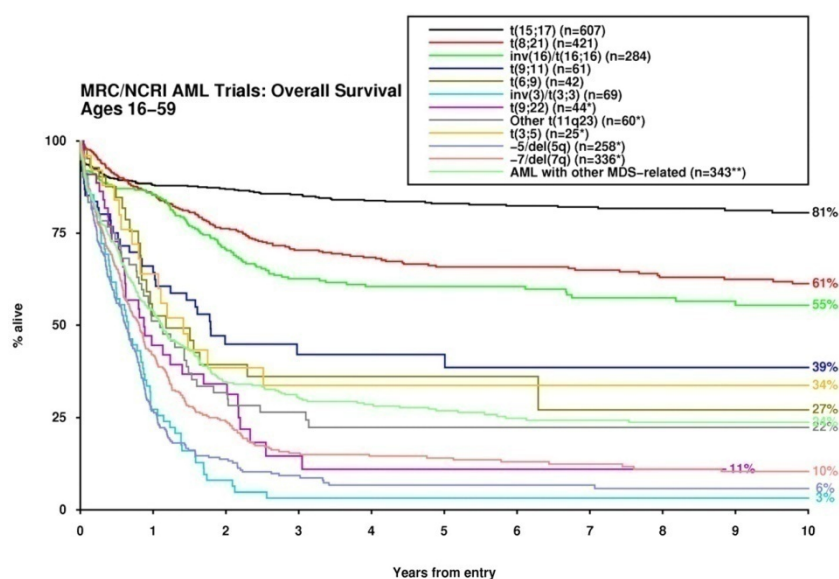
Incluye la leucemia promielocítica aguda con una supervivencia global a los 10 años de un 81%. Las leucemias con t(8;21)(q22;q21), con inv (16)(p13;q22) o las t(16, 16)(p13, q22) poseen una supervivencia global a los 10 años entorno al 60% [25], todas ellas involucran translocaciones de alguna de las subunidades del core-binding factor (CBF) que es un importante factor de transcripción en la hematopoyesis normal. Las proteínas de fusión anómalas resultantes de las translocaciones cromosómicas AML1-ETO y CBFβ-MYH11, se han identificado que actúan como represores transcripcionales [30-33]. Estos pacientes con un perfil citogenético favorable tienen relativamente buen pronóstico con tratamiento quimioterápico, es decir, tras alcanzar primera remisión completa no indicaríamos realizar una trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

### Subgrupo citogenético riesgo desfavorable

En general este grupo de leucemias presentan una supervivencia global a los 10 años de un 20%. En este grupo están incluidos entre otros, los cariotipos complejos (definidos como la presencia de tres[21], cuatro [25]o más anomalías cromosómicas en ausencia de alteraciones citogenéticas recurrentes), cariotipos monosómicos [34](definidos como la presencia de una sola monosomía (excluyendo la perdida aislada del cromosoma Y o el cromosoma X) en asociación con al menos una monosomía adicional o una anomalía cromosómica (excluyendo leucemias CBF) , y otras anomalías cromosómicas como se resume en la Tabla 3. Estos pacientes requieren de realización de un trasplante alogénico en primera remisión completa para intentar mejorar su pronóstico (reduciendo su riesgo de recaída).

### Subgrupo de riesgo intermedio

Lo conforman las entidades citogenéticas no clasificadas ni como favorables ni como adversas y aquellos con citogenética normal (definida como no alteraciones citogenéticas visualizado en cariotipo de al menos 20 metafases). A este subgrupo pertenecen más del 50% de los pacientes. Estos pacientes presentan una supervivencia global a 10 años en torno a un 40% [25]. Este grupo de riesgo citogenético intermedio es muy heterogéneo, en los últimos años se han descrito alteraciones moleculares, en concreto mutaciones de algunos genes que nos ayudan a estratificar mejor el riesgo dentro de esta amplia y heterogénea categoría molecular, éstas se explican a continuación (tabla 4).



**Figura 10.** Supervivencia global de pacientes afectados de LMA de acuerdo con la clasificación citogenética del grupo MRC. Pacientes de edades 16-59, y tratados bajo protocolos de grupos MRC/NCRI [25].

### 1.2.5.2 Mutaciones

Se han descrito mutaciones de diversos genes que pueden jugar un valor pronóstico en LMA de riesgo intermedio (LMA-RI) [35], la información de las mutaciones más relevantes en la práctica clínica se resume a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4.** Alteraciones moleculares recurrentes en LMA-RI de adulto: características biológicas y relevancia clínica. Adaptado de [35].

GEN mutado	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO/ CLÍNICO
<b>NPM1</b> 5q35.1	Encontrada en el 30% de LMA-RI Proteína de transporte nucleo- citoplasmático.	Entidad provisional en la clasificación OMS 2008.
	Su mutación conlleva la deslocalización citoplasmática de la proteína[36].  Inserción 4pb en exón 12.	Puede ser diagnosticada por inmunohistoquímica en cortes de histológicos de médula ósea. Se puede detectar por PCR cualitativa.
	Asociada con <i>FLT3</i> -ITD (aproximadamente 40%).	Mutación de <i>NPM1</i> sin mutación de <i>FLT3</i> -ITD predice mejor pronóstico [37-39]. Parece que no se benefician de AloTPH en 1RC[36, 39, 40].
	Los blastos suelen mostrar expresión alta de CD33 y CD34 negativo o ausente. Asociado con morfología monocítica o mielomonocítica y signo de impronta de dedo.	Necesidad de diferenciarlo de M3.
	Seguimiento por PCR cuantitativa.	Buen marcador estable de EMR.
<b>CEBPA</b> 19q13.1	Factor de transcripción imprescindible en la regulación de la mielopoiesis.	Entidad provisional en la clasificación WHO 2008.
	Mutaciones predominantemente en LMA-RI en aprox 10-15% de los casos[41].	Mutaciones bialélicas asociadas a mejor pronóstico[41]. Parece que no se benefician de AloTPH en 1RC[39, 40].
	Tipo de mutación variable	Determinación por secuenciación
<b>FLT3</b> 13q12	Miembro de la familia de receptor de tiroquinasa clase III. <i>FLT3</i> juega un papel importante en proliferación, supervivencia y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos [39].	
Mutación de duplicación en tandem de <i>FLT3</i> ( <i>FLT3</i> -ITD)	<i>FLT3</i> -ITD encontrado aproximadamente en el 30% de LMA-RI [42]. El sitio de inserción de la duplicación normalmente es en el dominio JM.	<i>FLT3</i> -ITD asociado con peor pronóstico. Trasplante alogénico en 1RC es el tratamiento de elección.
	La carga alélica de <i>FLT3</i> -ITD puede modular este efecto negativo[43]. No buen marcador de EMR.	Pacientes con mutación de <i>NPM1</i> y <i>FLT3</i> -ITD con ratio bajo (<0.5) de alelo mutado es posible abstención de AloTPH en 1RC y seguimiento por EMR con <i>NPM1</i> .
	Encontradas con frecuencia asociados a M3 y a LMA t(6;9).	No significado pronóstico en estos subtipos.

		Ensayos con inhibidores de FLT3: RC transitorias.
Mutaciones en el dominio tirosinkinasa (TKD) de <i>FLT3</i>	<i>FLT3</i> TKD mutaciones puntuales encontrados en 12% de LMA-RI.	El significado pronóstico es controvertido.
<b>DNMT3A</b> 2p23	DNA metiltransferasa, responsable de establecer metilación de novo de DNA.	Controvertido las consecuencias de su mutación a nivel de metilación global.
	Frecuencia de mutaciones de DNMT3A es alta (22%), más frecuente en riesgo citogenético intermedio[44]. Encontradas en todos los dominios funcionales del gen, hotspot en R882.	Mutación de DNMT3A asociado a menor supervivencia[44-46], aunque controvertido[45, 47].
<b>IDH1</b> (2q33.3), <b>IDH2</b> (15q26.1)	Enzimas metabólicas citosólica ( <i>IDH1</i> ) y mitocondrial ( <i>IDH2</i> ) que catalizan la decarboxilación oxidativa de isocitrato a $\alpha$ -ketoglutarato; involucrados en la defensa celular al daño oxidativo[48].	Mutaciones de <i>IDH1</i> [49] y posiblemente <i>IDH2</i> , aunque controvertido, parece que confieren peor pronóstico en el subgrupo molecular de bajo riesgo ( <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3</i> -ITD)[50-52].
	Mutaciones encontradas aproximadamente en 13% ( <i>IDH1</i> ) y 15% ( <i>IDH2</i> ) de LMA-RI [50, 51].	Mutación <i>IDH2</i> R172 asociada probablemente a peor pronóstico.
	Mutaciones localizadas en el residuo 132 ( <i>IDH1</i> ) y residuos 140 y 172 ( <i>IDH2</i> ); conllevan a la acumulación de un putativo metabolito oncogenico R <sup>2</sup> -2-hydroxyglutarate (2HG) que es un antagonista del producto normal $\alpha$ -ketoglutarato.	Competitivamente el 2DH inhibe la actividad de las enzimas dependientes de $\alpha$ -ketoglutarato como las enzimas TET. Mutamente excluyentes mutaciones en <i>IDH1/2</i> con mutaciones de TET2. Existen inhibidores IDH en desarrollo Inhibición de <i>IDH1</i> mutante inhibe los blastos en pacientes con <i>IDH1</i> mutado pero no en células CD34+ normales de médula ósea[53].
<b>MLL-PTD</b> 11q23 (duplicación parcial en tándem)	Proteína de unión al ADN que regula la expresión génica en hematopoyesis posiblemente mediante mecanismos epigenéticos.	En estudios iniciales asociado con RC mas corta e inferior SLE, SLR pero no asociado con SG[54] .
	<i>MLL</i> -PTD encontrada en el 5%-11% de LMA con cariotipo normal y hasta en un 90% de LMA con trisomía 11 [37].	
<b>WT1</b> 11p13	Factor de transcripción involucrado en regulación de apoptosis, proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.	Significado pronóstico controvertido, mayoría de estudios impacto pronóstico negativo.
	Encontradas en el 10%-13% de IR-AML.	<i>WT1</i> SNP rs16754 asociado con peor pronóstico en un estudio.
		Buen marcador EMR cuantitativo
<b>RUNX1</b> 21q22.3	Factor de transcripción en la hematopoyesis definitiva.	Asociado con peor pronóstico.
	Mutaciones encontradas en 5%-20% de LMA-RI; asociación con trisomía 13, trisomía 21, y cariotipo normal. Asociación con FAB MO.	



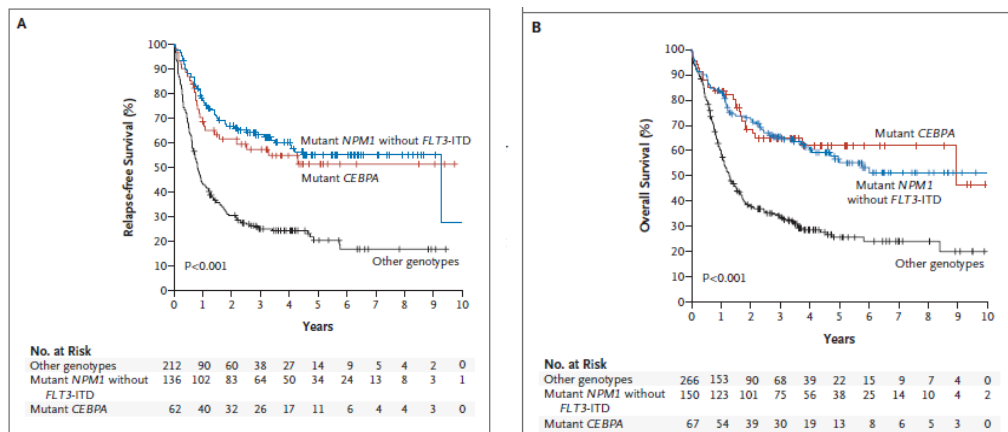
	Asociadas con <i>MLL</i> -PTD; y correlación inversa con presencia de mutación de <i>CEBPA</i> y <i>NPM1</i> .	
<b><i>TP53</i></b> 17p13.1	Codifica la proteína supresora de tumores p53, que responde a diversos estímulos de estrés celular y regula genes que inducen parada de ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación de ADN.	En LMA-RI 2%. Mayoritariamente asociado a citogenética de mal pronóstico.
	Mutaciones predominantemente en exón 4 y 8.	
<b><i>TET2</i></b> 4q24	Miembro de la familia de proteínas TET. Convierte 5- metilcitosina en 5- metilhidroxicitosina, y ésta sirve como paso intermedio de la demetilación.	Significado pronostico controvertido. Asociado con peor pronóstico en LMA RI[55] en subgrupo molecular favorable[56]. Otros no encontraron valor pronostico [57].  Mutuamente excluyente con mutaciones de IDH 1/2[58].
	Modelo murino con pérdida de TET2 demostró incremento de autorenovación y diferenciación hematopoyética dañada in vivo.	
	Mutado en 23% de LMA-RI[56].	
<b><i>ASXL1</i></b> 20q11	Codifica proteína del grupo polycomb posiblemente involucrado en remodelación de cromatina.	Mutación confiere peor pronóstico[55, 59-62].
	Aproximadamente 8%-17% LMA-RI.	

Además de las mutaciones anteriormente citadas y gracias a los últimos estudios de ultrasecuenciación, ha aumentado de manera logarítmica nuestro conocimiento sobre el tipo y la frecuencia de las mutaciones somáticas en LMA. De manera interesante, prácticamente todas las muestras de LMA tienen por lo menos una mutación no sinónima en una de las 9 categorías de genes que parecen más relevantes en LMA. Estas nueve categorías como se puede ver en al figura 11 incluyen: fusión de factores de transcripción (18% de los casos), *NPM1* (27%), genes supresores de tumores (16%), genes relacionados con el proceso de metilación de ADN (44%), genes de señalización (59%), genes que modifican cromatina(30%), factores de transcripción mieloides (22%), genes pertenecientes al complejo de cohesina (13%), genes que forman parte del complejo del spliceosoma (14%)[63].

Estos últimos años, se han desarrollado nuevos algoritmos de clasificación incorporando información mutacional de diversos genes para refinar así la estratificación pronóstica de la LMA-RI [39, 40, 55, 64, 65]. Las mutaciones más validadas y las que actualmente utilizamos en la práctica clínica para la estratificación de riesgo son la mutación de *NPM1*, duplicación en tándem de *FLT3* (*FLT3*-ITD) y la mutación bialélica de *CEBPA*[35, 40]. Con ellas podemos diferenciar dos subgrupos moleculares (Figura 12):

**Subgrupo molecular de buen pronóstico:** definido como pacientes pertenecientes a LMA-RI sin mutación de *FLT3-ITD* y con *NPM1* mutado o *CEBPA* mutado bialélico. Estos pacientes presentan una mejor supervivencia y en ellos parece no existir beneficio realizar un trasplante alogénico en primera remisión completa[39].

**Subgrupo molecular de mal pronóstico:** lo conforman los pacientes con *FLT3-ITD* y/o aquellos que presentan *NPM1* y *CEBPA* no mutado. Este grupo de pacientes presentan un mayor riesgo de recaída y una menor supervivencia, y parecen beneficiarse de un trasplante alogénico en primera remisión completa[39].



**Figura 12.** Supervivencia estimada dependiendo del genotipo (estado mutacional de *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA*)[39]. Supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia global (B). Otros genotipos están definidos como pacientes con *FLT3-ITD* y pacientes sin mutación de *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA*.

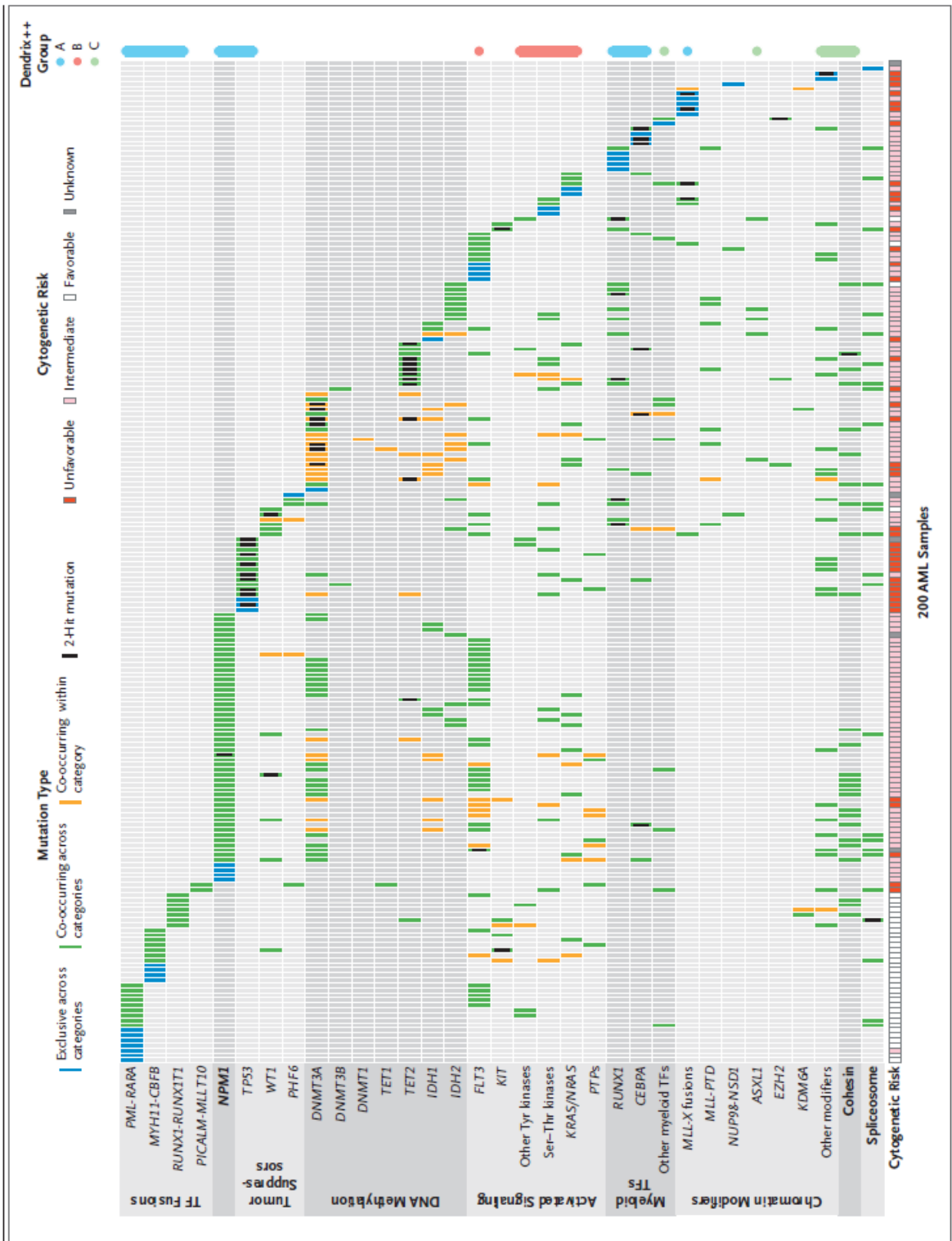


Figura 11. Organización de las mutaciones en 9 categorías funcionales de genes[63].

### 1.2.5.3. Otros factores pronósticos

Además de las alteraciones genéticas estructurales anteriormente descritas, el cambio en la expresión de genes específicos puede tener impacto pronóstico en la LMA [35]. A continuación, en la Tabla 5, se resume el significado clínico y pronóstico tanto de la expresión de genes individuales como del estudio masivo de perfiles globales de expresión génica mediante nuevas técnicas de análisis “masivo”.

#### Expresión génica de genes individuales

**Tabla 5.** Genes desregulados con significado pronóstico en LMA-RI de adulto: Características biológicas y relevancia clínica, adaptado de [35].

Gen desregulado	Características biológicas	Significado clínico/ pronóstico
<i>BAALC</i> 8q22.3	Expresado en células del tejido nervioso y células hematopoyéticas. Los progenitores CD34 positivos de médula ósea expresan <i>BAALC</i> . Los pacientes afectados de LMA sobreexpresan <i>BAALC</i> [66].	La sobreexpresión de <i>BAALC</i> correlaciona con la sobreexpresión de otros genes que están expresados en progenitores hematopoyéticos y se asocia a peor pronóstico.[37, 67, 68].
<i>ERG</i> 21q22	Miembro de la familia de factores de transcripción ETS.	La sobreexpresión de <i>ERG</i> está asociada a un peor pronóstico [37, 69, 70], especialmente en LMA con <i>NMP1</i> mutada sin mutación de <i>FLT3-ITD</i> [70].
<i>EVI1</i> 3q26.2	La proteína <i>EVI1</i> está involucrada en la regulación de factores de transcripción críticos para la hematopoyesis y es esencial para la autorenovación de las células madre hematopoyéticas [71].	En LMA-RI, la sobreexpresión de <i>EVI1</i> está asociada a peor pronóstico[70, 72]. El aloTPH en 1 RC parece proporcionar una mejor supervivencia [73].
<i>MN1</i> 22q12.1	<i>MN1</i> tiene función de coregulador de transcripción.	Alta expresión asociado a mal pronóstico [74, 75].
	La expresión elevada de <i>MN1</i> está asociada a la LMA sin mutación de <i>NMP1</i> y sobreexpresión de <i>BAALC</i> .	Se ha asociado una baja expresión de <i>MN1</i> con la [75] de respuesta a ATRA en LMA no M3.

#### Perfil de expresión génica

Varios estudios han demostrado que los distintos subtipos de LMA pueden ser identificados por análisis masivo del perfil de expresión génica [76]. En la LMA-RI se ha descrito un perfil asociado a algunas mutaciones así como la capacidad de predecir dichas mutaciones usando esta tecnología, como ocurre con los perfiles génicos asociados a las mutaciones de *NPM1* [77, 78] y la mutación bialélica de *CEBPA*[41, 78, 79].

Además, varios estudios han identificado firmas de expresión génica con valor pronóstico [76, 80-83]. Bullinger *et al* identificó dos *clusters* distintos dentro de la LMA con citogenética normal, con diferentes firmas pronósticas, una de ellas estaba caracterizada por la

sobreexpresión de algunos reguladores transcripcionales como *GATA2* y el otro estaba caracterizado por genes que forman parte de la respuesta inmune y la diferenciación leucocitaria[80]. Posteriormente Radmacher *et al* validó el valor pronóstico de esta firma en una serie independiente[82].

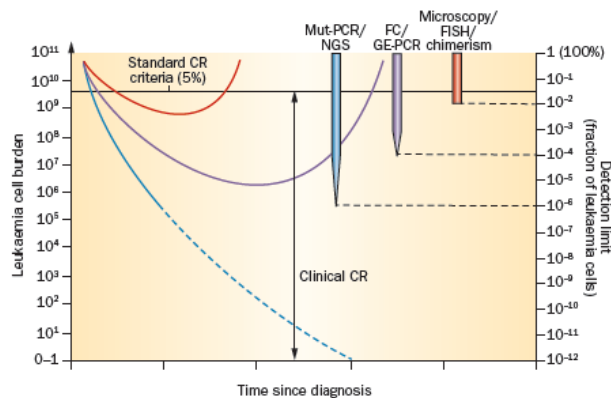
Dos grupos han descrito firmas de expresión génica relacionadas con poblaciones enriquecidas en células madre leucémicas y han analizado el valor pronóstico de estos perfiles génicos *leukemia stem-cell-like*. Así, los pacientes con una LMA que sobreexpresan genes relacionados con células madres (sobreexpresados en fracciones enriquecidas de células madre) tienen un peor pronóstico [84, 85]. Se ha demostrado que la sobreexpresión de la firma génica que caracteriza la población celular enriquecida de células madres (que incluye sobreexpresión de genes como *BAALC*, *ERG*, *MEIS1*, *MECOM*, que incluye *EVI1*, *FLT3-ITD* y algunos genes homeobox como *HOXB3*) predice un peor pronóstico dentro de LMA-RI y es un factor de riesgo independiente del estado mutacional de *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA*, siendo a su vez capaz de diferenciar grupos de pacientes con distinto pronóstico dentro de los subgrupos moleculares favorable y desfavorable [84]. La sobreexpresión de programas génicos propios de célula madre leucémica en pacientes con peor pronóstico parece indicar la desregulación de los programas celulares de célula madre en comparación con los programas de maduración [84]. Posteriormente se ha validado el valor pronóstico independiente de la firma de *stem-cell* leucémica en pacientes del grupo cooperativo americano, CALGB, tanto en el grupo de citogenética normal como dentro de los subgrupos moleculares definidos por la “European Leukemia Net” (ELN). Además se ha descrito que los pacientes con un score de *stem-cell* leucémica de mayor riesgo están asociados a mayor porcentaje de blastos en médula ósea y sangre periférica, *FLT3-ITD*, *WT* mutado, *RUNX1* mutado y que tienen mayor sobreexpresión de *ERG*, *BAALC* y miR-155, y menos frecuentemente poseen *CEBPA* mutado y *TET2* mutado [86].

Finalmente, se ha descrito y validado una firma de 24 genes con valor pronóstico en LMA en varias cohortes distintas de pacientes y que mantiene su valor dentro de los subgrupos moleculares definidos por su estado mutacional [87].

### ***Enfermedad residual mínima***

Los factores pronósticos comentados hasta el momento corresponden a variables detectables en el momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento. Pero la determinación precisa de la cinética de reducción de la población leucémica durante el tratamiento, evolutiva, que

conocemos conceptualmente como análisis de la enfermedad residual mínima (ERM), sin duda, un factor pronóstico con gran potencial predictivo del fracaso o éxito del tratamiento, que de alguna manera “recapitula” los factores pronósticos iniciales. La determinación de la enfermedad residual mínima residual (ERM) se entiende como la detección de células leucémicas por encima de un cierto punto de corte, definida para cada metodología aplicada para medirla, que predice el fracaso de mantener una remisión completa y afecta de manera negativa a la supervivencia [88, 89]. Existen diferentes técnicas para medir la ERM (Figura 13), siendo las más utilizadas en la actualidad la citometría de flujo multiparamétrica, basada en la caracterización de un fenotipo asociado a la población leucémica aberrante [90], y la PCR a tiempo real, donde podemos monitorizar la presencia de dianas moleculares específicas de leucemia como las proteínas de fusión *core binding factor* (RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11) [91-93], la mutación de *NPM1* [94], o genes sobreexpresados en LMA como *WT1* [95]. Estas técnicas nos ayudan a identificar los pacientes con mayor riesgo de recaída, en los que es aconsejable intensificar el tratamiento (p.ej realizando un trasplante alogénico de médula). En consecuencia, la monitorización de la ERM permite refinar la estratificación pronóstica basada en variables iniciales y contribuye a una mejor aplicación del tratamiento adaptado al riesgo. Así, utilizamos el resultado de la determinación de la ERM para anticiparnos a una recaída hematológica [96], y nos permite el tratamiento anticipado, en mejores condiciones, y con un mejor resultado [88]. Varios estudios avalan la utilidad del uso de la ERM en LMA [91, 92, 94, 97-103].



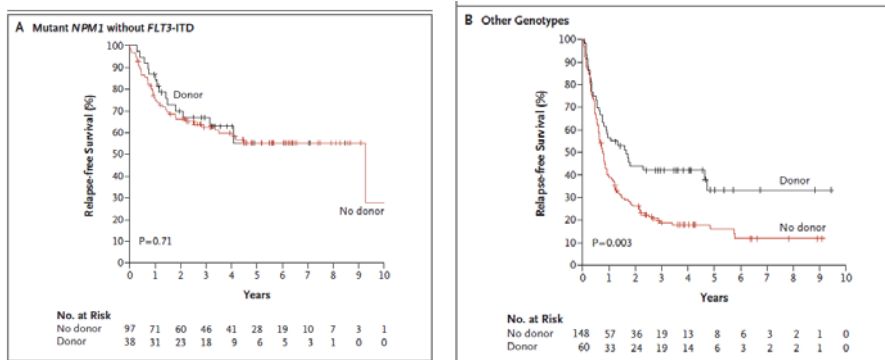
**Figura 13.** Puntos de detección de varias modalidades de detección de ERM comparado con la remisión completa definida por criterios morfológicos. Por morfología se detecta, como mucho, una reducción de dos logaritmos de la carga tumoral, mientras que por citometría de flujo ó PCR para sobreexpresión de genes se detectaría una reducción de cuatro logaritmos de reducción (es decir una célula anormal entre  $10^4$ ). Con la PCR para detectar transcritos de fusión y mutaciones específicas o técnicas de secuenciación de siguiente generación se llegaría a un nivel de sensibilidad para detectar ERM de hasta  $1 \times 10^6$  [88].

### 1.2.6. Tratamiento

#### *Tratamiento adaptado al riesgo de LMA (excluyendo leucemia promielocítica aguda)*

El tratamiento estándar, básico, de la LMA consiste en una quimioterapia de inducción con esquema "3+7", basado en una combinación de tres días de antraciclina (es decir, daunorrubicina 60-90 mg/m<sup>2</sup> ó idarrubicina 10-12 mg/m<sup>2</sup>) y 7 días de citarabina a dosis estándar (100-200 mg/m<sup>2</sup> en infusión continua IV)[40]. Con ello, la mayoría de pacientes, hasta un 80%, alcanzan una remisión completa inicial (RC)[10]. El tratamiento de consolidación o post-remisión comprende todo el tratamiento adicional administrado con el fin de evitar una recidiva leucémica, sea la administración de ciclos de quimioterapia adicionales, basados en dosis altas de citarabina, un trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos, o un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos [104]. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (aloTPH) es el procedimiento terapéutico que tiene una gran capacidad antileucémica, aunque se asocia a una alta morbi-mortalidad, de hasta de un 30%), por lo que es crítico la elección de los pacientes que puedan beneficiarse del mismo [105].

Así, por lo general, los pacientes con un perfil de bajo riesgo citogenético-molecular y con ERM negativa tras el tratamiento quimioterápico tienen un relativo buen pronóstico y bajo riesgo de recidiva, por lo que no estaría indicada la realización de un aloTPH en una fase precoz (RC1) de la enfermedad [39, 40, 105]. Por el contrario, en los pacientes con alto riesgo citogenético-molecular o con ERM positiva tienen un alto riesgo de recidiva tras la quimioterapia y pueden beneficiarse de realizar un trasplante alogénico en primera remisión completa [39, 40, 105]. Por lo tanto, tenemos necesidad de identificar marcadores que nos ayuden a predecir de manera precisa el riesgo individual que tiene cada paciente para así elegir el tratamiento más apropiado para el riesgo de cada paciente [104].

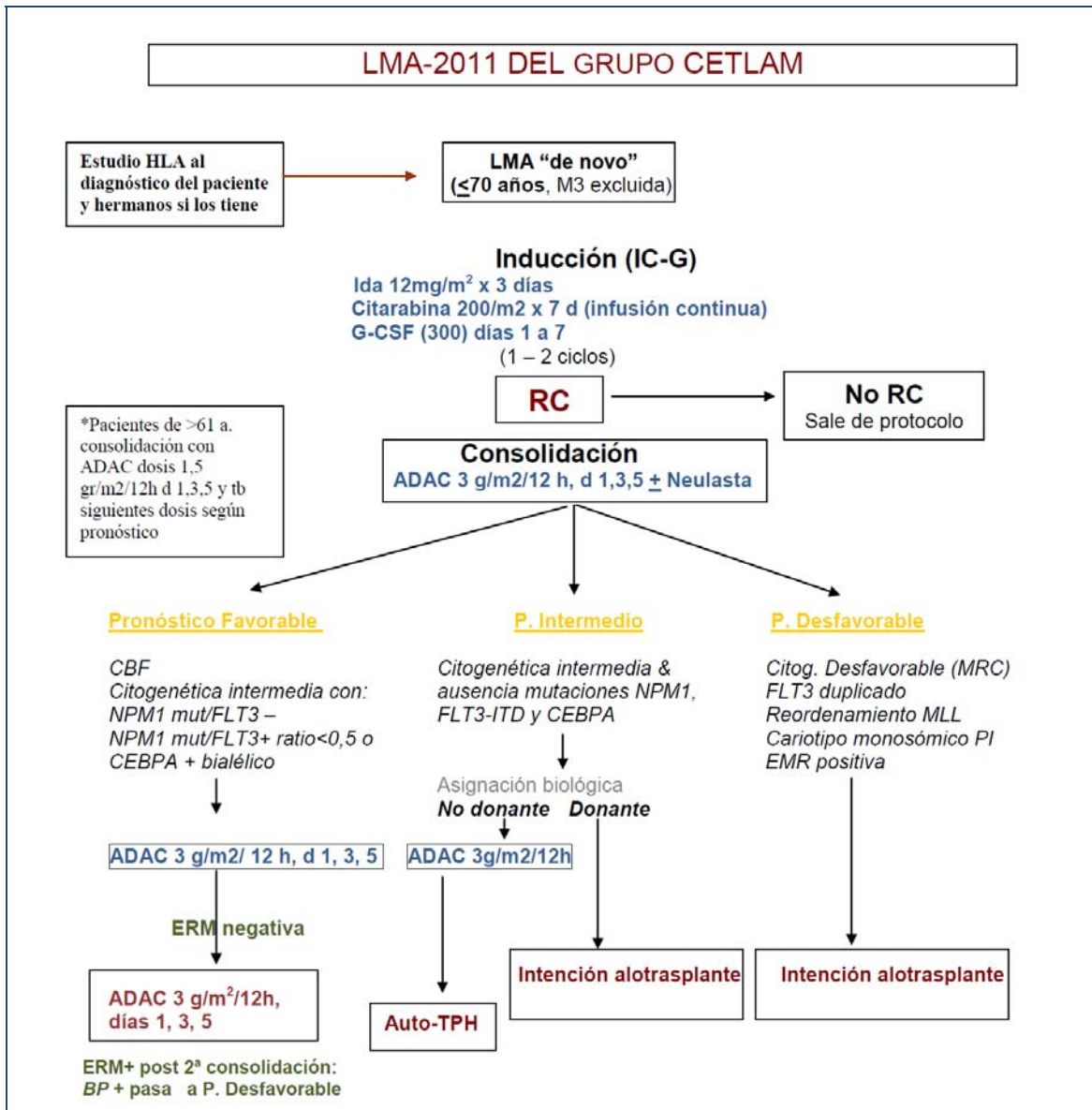


**Figura 14.** Supervivencia libre de recaída según genotipo en pacientes con LMA de cariotipo normal (cohorte de pacientes del grupo cooperativo alemán-austriaco AMLSG), en los que se recomendaba la realización de un aloTPH en RC1 en los pacientes con un donante familiar. (A) Pacientes con genotipo favorable: ausencia de beneficio en pacientes con donante familiar HLA idéntico (B) Pacientes con genotipo desfavorable: pronóstico favorable en los pacientes que disponían de un donante familiar[39].

A pesar de todos los factores pronósticos anteriormente descritos, el tratamiento postremisión óptimo en un gran número de pacientes de LMA-RI es incierto, controvertido, por lo que es necesario el desarrollo de mejores herramientas para la determinación de un pronóstico individualizado que nos ayuden a aplicar de manera más racional los tratamientos que disponemos (Figura 14). Todo ello sin menoscabo de avanzar en nuestro conocimiento sobre la LMA para identificar nuevas dianas terapéuticas y el diseño de tratamientos más eficaces.

A continuación, en la figura 15, y a modo de ejemplo, se esquematiza el tratamiento adaptado al riesgo propuesto para los pacientes con LMA “de novo” hasta 70 años en el grupo cooperativo de nuestro entorno (CETLAM):

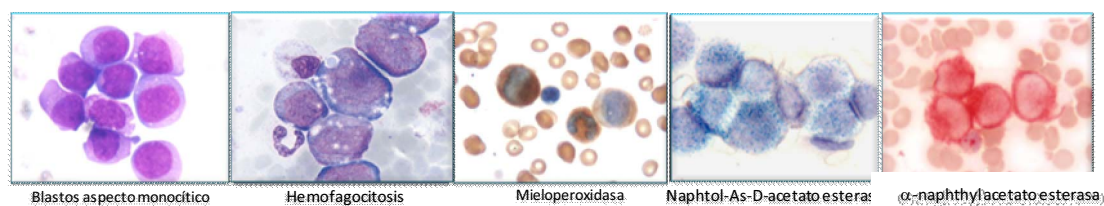




**Figura 15.** Tratamiento adaptado al riesgo según protocolo CETLAM LMA 2011

### 1.3. LMA con translocación (8;16)(p11;p13) y reordenamiento MYST3-CREBBP

La LMA con t(8;16) y reordenamiento MYST3-CREBBP, (LMA t(8;16)), es una variedad de LMA muy poco frecuente, con una frecuencia aproximada de 0,2% del global de casos de LMA, pero que parece reunir unas características clínicas y biológicas distintivas. La translocación t(8;16)(p11;p13) es una anomalía citogenética recurrente en LMA [106-110], que se puede encontrar tanto en LMA *de novo* como, de manera bastante característica, de forma secundarias a tratamiento genotóxico previo [111, 112]. Presenta características clínico-biológicas propias como son una frecuente afectación extramedular y la presencia de coagulopatía intravascular diseminada. Los blastos son de aspecto mielomonocítico y, de manera habitual, se observan fenómenos de hemofagocitosis. En la citoquímica los blastos presentan una doble positividad para las tinciones de mieloperoxidasa y esterasas inespecíficas, reflejando así su componente mieloide y monocítico (Figura 16).



**Figura 16.** Imágenes de citología y citoquímica de LMA t(8;16).

A pesar de su baja frecuencia parece que presentan mal pronóstico [107, 110, 111, 113, 114] y está recomendado, si las características clínicas del paciente lo permiten, realizar un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en primera remisión completa [115]. Como resultado de dicha anomalía citogenética, se fusiona el gen *MYST3*, (*MYST histone acetyltransferase 3*), previamente conocido como *MOZ*, que se encuentra en el cromosoma 8p11, con el gen *CREBBP* (*CREB-binding protein*), previamente conocido como *CBP*, en el cromosoma 16p13 [116, 117]. Ambos genes se han visto implicados en otros tipos de leucemias, fusionándose con otros “partners” [108, 118-124]. Ambos genes codifican proteínas con actividad histona acetiltransferasa [116, 125]. *MYST3* actúa como un coactivador de varios factores de transcripción relacionados con la hematopoyesis tales como RUNX1, PU.1, y NF-KB [126, 127]. *CREBBP*, a su vez, es un coactivador transcripcional de algunos factores de

transcripción hematopoyéticos [128, 129], interacciona con NF-KB y p53 [130] y juega un papel esencial en la regulación de las células madre hematopoyéticas [127].

Varios grupos han descrito un perfil de expresión génica característico de este subtipo de leucemia, esquematizado en la tabla 6. De manera característica, este perfil se caracteriza por la sobreexpresión de algunos genes homeobox (genes *HOXA9*, *HOX A10* y el cofactor de HOX *MEIS1*), el gen de la prolactina (*PRL*) o el proto-oncogén *RET*, y la infraexpresión de, entre otros, *CCCD2*, *STAT5 A y B* y *CREBBP* [113] .

**Tabla 6.** Genes con expresión diferencial distintiva en la LMA con t(8;16).

Symbol	P
Genes overexpressed	
<i>C20ORF103</i>	0.000000
<i>GGA2</i>	0.000000
<i>ICSBP1</i>	0.000000
<i>FLT3</i>	0.000000
<i>LMO2</i>	0.000005
<i>ITGA7</i>	0.000013
<i>AKR7A2</i>	0.000014
<i>PPARG</i>	0.000016
<i>SURF1</i>	0.000024
<i>ADAMTS2</i>	0.000036
<i>DAP</i>	0.000092
<i>IRAK1</i>	0.000093
<i>PRL</i>	0.000096
<i>HIST1H2A</i>	0.000134
<i>RET</i>	0.000260
<i>CHD3</i>	0.000264
<i>LGALS3</i>	0.000749
<i>DDB2</i>	0.000829
<i>SATB1</i>	0.001823
<i>HOXA9</i>	0.003608
<i>S100A11</i>	0.015956
<i>CEBPA</i>	0.021236
Genes underexpressed	
<i>STAT5B</i>	0.036902
<i>CREBBP</i>	0.041165
<i>STAT5A</i>	0.049642

Recientemente se ha publicado una serie de 62 pacientes pediátricos con este subtipo de leucemia, con características clínico-biológicas y un perfil de expresión génica este muy similar al descrito en los adultos. De manera interesante, en este trabajo se describen 7 casos de LMA t(8;16) en neonatos en los que se producen remisiones espontáneas [131].

Los mecanismos patogénicos de este subtipo de LMA son desconocidos en su mayor parte, aunque se supone que uno de los mecanismos podría ser la interacción anómala de la proteína anómala *MYST3-CREBBP* con varios factores de transcripción que intervienen en la hematopoyesis [30]. No se conoce, sin embargo, si existe un patrón epigenético o un perfil de expresión de microRNAs característicos.

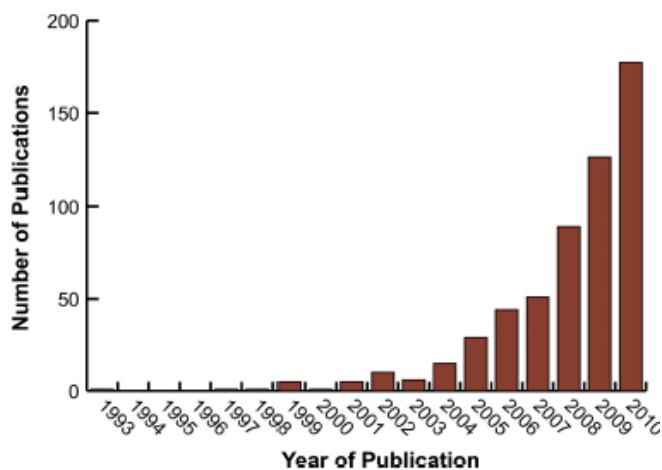
## 1.4. RNAs no codificantes

En los años 80, ante la perspectiva de que probablemente el cáncer era el resultado de mutaciones somáticas de distintos genes, Dulbecco declaró en 1986 que secuenciar el genoma humano era una prioridad crítica: “tenemos dos opciones: o intentamos descubrir genes importantes en cáncer con un acercamiento de “poco a poco”, o secuenciamos el genoma entero de algunas especies animales”[132].

En el 2000, antes de conocer el resultado de la secuenciación completa de los primeros genomas humanos, se pensaba que la transcripción parecía estar confinada a regiones del genoma que contenían genes que codificaban proteínas [133]. Cuando el genoma humano fue secuenciado en 2001[134, 135] uno de los hallazgos más sorprendentes fue el reducido número de genes codificantes de proteínas identificados, que representan aproximadamente sólo 20.000 (<2% del total del genoma), cuando en los años 90 se estimaban en más de 60.000[136-141]. La segunda gran sorpresa de la secuenciación del genoma humano [138] fue descubrir que hay una gran cantidad de DNA contenido en el genoma humano que no codifica proteínas y que aparentemente es funcional [142]. Con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis del genoma como *tiling resolution genomic microarrays* y *whole genome and transcriptome sequencing technologies*, ahora sabemos que al menos el 80% del genoma se transcribe activamente(en algún momento y en alguna célula) [140, 143-145], y ésto ha cambiado de manera dramática nuestra percepción del genoma[146]. Uno de los hallazgos más remarcables del consorcio ENCODE (*The Encyclopedia of DNA Elements*) [147] es que el 80% de los elementos contenidos en el genoma están vinculados a determinadas funciones bioquímicas, descartando de manera definitiva el antiguo y extendido concepto de que la mayoría de nuestro genoma era “genoma basura”[148] [140, 143, 147-152]. Los autores del consorcio ENCODE afirman que en el espacio entre genes se encuentran enhancers (elementos reguladores de DNA), promotores (sitios donde el DNA inicia su transcripción a RNA) y numerosas regiones que codifican transcritos de RNA que no se traduce a proteínas pero que pueden tener un papel regulatorio muy importante [147]. Cada vez son más numerosas las evidencias que sugieren que la llamada “materia oscura” del genoma presenta extensas zonas diferentes a los genes conocidos que codifican para proteínas. Entre estas zonas no codificantes de proteínas se encuentran los llamados RNAs no codificantes. Así, el descubrimiento de grandes cantidades de nuevos RNAs ha incrementado nuestra apreciación de la complejidad de genomas y transcriptomas, así como otros aspectos de la biología incluyendo la regulación génica transcripcional y posttranscripcional [146]. Centraremos esta

introducción en los ARNs no codificantes (ncRNAs), definidos como moléculas de RNA que no tienen potencial de codificar proteínas[153], es decir, regiones de DNA que son transcritas a RNA que posteriormente no se traducen a proteína.

Hay un importante incremento en estos últimos años del estudio de estos ncRNA (Figura 17)[154] y que demuestran su funcionalidad, así como su papel fundamental, aunque de momento en gran parte desconocido, en la homeostasis celular, el desarrollo embrionario y el cáncer, entre otros [155-157].



**Figura 17.** Publicaciones que describen ncRNAs asociados con cáncer. Entradas basadas en búsquedas en Pubmed usando los términos ncRNA o non-codingRNA o non-protein-coding RNA [154].

Clasificamos los ncRNAs según su tamaño como ncRNAs pequeños (hasta 200 nucleótidos) y los ncRNAs largos (> 200 nucleótidos) [154] (Tabla 7). Dentro de los ncRNAs pequeños los más ampliamente estudiados son los miRNAs, descubiertos en 1993 [158], de los que hablaremos extensamente en este trabajo debido a que han sido el objeto principal de estudio de esta tesis. Abundantes trabajos han demostrado que los ncRNAs están involucrados en distintos tipos de cáncer en humanos [146, 159]. Existe una hipótesis unificadora [160] de cómo distintos tipos de RNAs, como el RNA mensajero, pseudogenes, y RNAs largos (long non-coding RNAs) se “comunican” entre sí utilizando elementos de respuesta de miRNAs (secuencias con parcial complementariedad con los transcritos de RNAs dianas de los miRNAs, sitios de unión a miRNAs) como cartas de este nuevo lenguaje, y con una actividad de competencia de RNAs endógenos que forman a gran escala una red regulatoria a través del transcriptoma. Esta red expandiría la información genética funcional en el genoma humano y parece desempeñar un papel muy importante tanto en condiciones normales como patológicas, como en el caso del cáncer[160]. De manera muy interesante, gracias a los recientes y sistemáticos análisis del

genoma y transcriptoma, se han identificado profundas alteraciones en los ncRNAs en el proceso de tumorigénesis [160-163].

**Tabla 7.** Tipos de RNAs no codificantes en humanos.

Nombre	Tamaño	Función
<b>ncRNAs cortos</b>		
miRNAs	19–24 bp	Regular la traducción de RNAm, otras
piRNAs	26–31bp	Represión de transposones, regulación de la metilación de DNA, otras
tiRNAs	17–18bp	¿Regulación de transcripción?
snoRNAs	60–300 bp	Modificación de rRNA
PASRs	22–200 bp	Desconocido
TSSa-RNAs	20–90 bp	¿Mantenimiento de la transcripción?
PROMPTs	<200 bp	¿Activación de la transcripción?
<b>ncRNAs largos</b>		
lincRNAs	>200 bp	Intervienen en procesos de regulación de cromatina y otros
T-UCRs	>200 bp	¿Regulación de niveles de miRNA y mRNA?
Otros lncRNAs	>200 bp	Inactivación de cromosoma X, regulación de telómeros, imprinting, otros

## 1.4.1. microRNAS

### 1.4.1.1. Historia y características

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de pequeño tamaño, de 18-25 nucleótidos de longitud, y son componentes claves y altamente conservados a lo largo de la evolución de un sistema de regulación génica mediado por RNAs en eucariotas [164, 165]. Estas moléculas juegan un papel regulatorio muy importante en animales y plantas por medio de su unión a un RNA mensajero diana, dando lugar a la escisión de éste y/o la represión de su traducción a proteína [166]. Con ello, los microRNAs intervienen en el control del calendario de desarrollo, el mantenimiento de células madre, así como en otros procesos de la homeostasis celular [165].

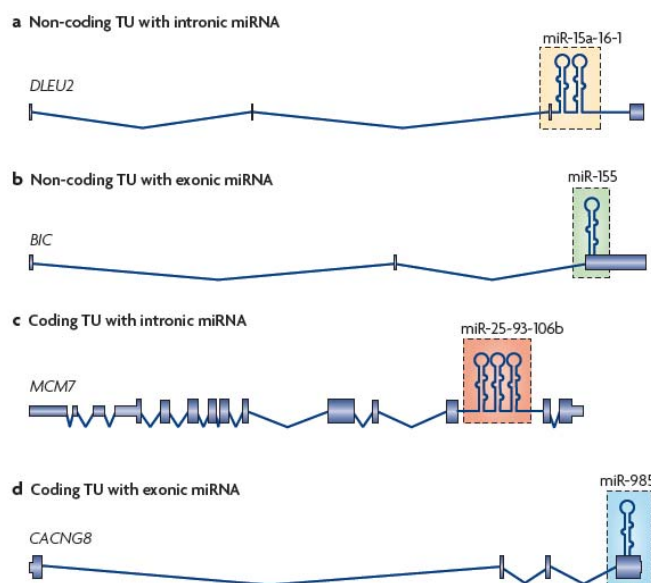
En 1993 Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum descubrieron que un gen que controla el desarrollo de la larva de *C. Elegans* llamado *lin-4* no codifica para una proteína, sino para un par de RNAs pequeños [158]: un RNA de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, que corresponde al miRNA maduro, y otro de 61 nucleótidos, éste último con estructura en forma de *stem loop* que correspondería al precursor del miRNA maduro [166]. Posteriormente observaron que *lin-4* tenía una secuencia complementaria con la región 3'UTR del gen *lin-14* [158, 167]. Más tarde se demostró que la regulación por medio de esta zona complementaria daba lugar a la disminución de las proteínas productos del gen *lin-14* sin modificarse la cantidad de su RNA mensajero. Estos hallazgos apoyaron el modelo en el que los RNAs de *lin-4* se unían a la región 3'UTR del gen *lin-14* para regular de manera post-transcripcional el RNA mensajero de *lin-14* [158, 167]. Inicialmente se pensó que era un mecanismo exclusivo en nemátodos [168], ya que en aquel momento no se encontraron homólogos de *lin-4* en otras especies [169, 170]). Siete años después de este importante descubrimiento, en el año 2000, el segundo miRNA, *let-7*, fue descubierto en nematodos [171, 172]. Dicho descubrimiento no sólo proporcionó otro ejemplo de regulación post-transcripcional por medio de RNAs pequeños [173, 174], sino que abrió las posibilidades de que estos RNAs estuviesen en otras especies [168]. Debido al elevado grado de conservación evolutiva entre especies de *let-7*, se pudo identificar por primera vez la presencia de homólogos de *let-7* entre otras especies, lo que descubrió la presencia de miRNAs en otras especies, incluyendo entre ellas la humana [175-179].

Desde su descubrimiento, el conocimiento sobre los miRNAs ha ido creciendo de forma exponencial. Así, de acuerdo con el recuento realizado en agosto del 2012 contenido en la versión 19 de mirBase (base de datos destinada al registro de miRNA, ([www.mirBase.org](http://www.mirBase.org))[180] se describen en Homo Sapiens 1600 entradas de precursores de miRNAs y 2042 de miRNAs maduros.

El conocimiento de los miRNAs ha cambiado nuestra comprensión del proceso de la regulación de la expresión de los genes, ya que actualmente se sabe que los miRNAs son capaces de regular cientos de genes y coordinar procesos de la homeostasis celular fisiológica incluyendo la proliferación, diferenciación y apoptosis, mientras que su desregulación puede contribuir al proceso de cáncer [160, 164, 176].

### 1.4.1.2. Biogénesis

La mayoría de los genes que codifican para miRNAs (90%) se encuentran en regiones intrónicas de genes que codifican para proteínas [181], aunque se cree que en la mayoría de miRNA su transcripción podría ser independiente de las regiones promotoras de los genes que codifican para proteínas que los contienen [178, 182]. También podemos encontrar los miRNAs en regiones exónicas o intergenéticas (éstas últimas en menor proporción). Aparentemente los miRNAs tendrían sus propios elementos de regulación y constituirían unidades independientes de transcripción [178, 181, 182] (Figura 18).



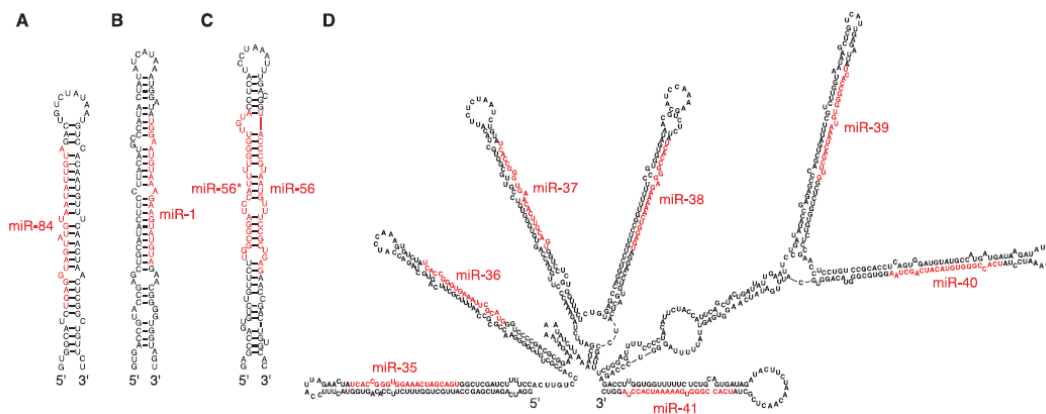
**Figura 18.** Localización genómica y estructura génica de los miRNAs [183]. TU: Unidad de transcripción.



Los genes de los miRNAs se transcriben en ambos sentidos, *sense* y *antisense* [177, 178, 184]. Muchos de los genes de miRNAs en mamíferos se encuentran en proximidad con otros miRNAs, de forma que se organizan en *clusters* [178]. Estos *clusters* de miRNAs son transcritos desde una misma unidad de transcripción (TU) policistrónica;. Hay otros casos en los que los miRNAs son derivados de promotores de genes separados [183].

Las secuencias de los genes que codifican para miRNAs están muy conservadas entre distintas especies, con genes ortólogos en otras especies, como cabría esperar si tuviesen un papel de regulación génica altamente conservado durante la evolución. Muchos de los miRNAs de mamíferos tienen múltiples parálogos que probablemente son el resultado de duplicaciones génicas [183]. También tienen homólogos dentro de su misma especie.

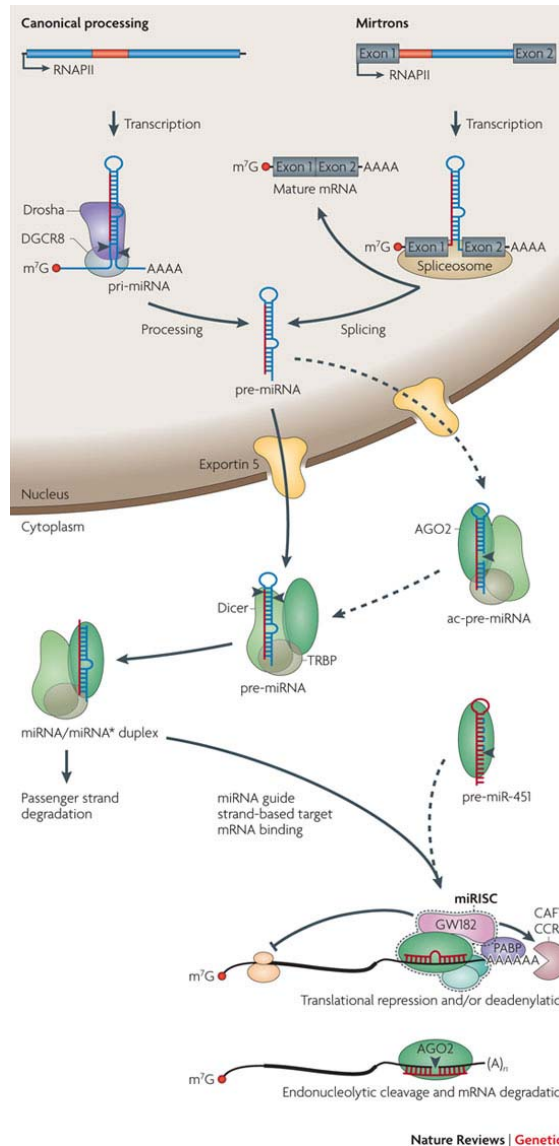
La síntesis de los miRNAs se realiza en el núcleo de la célula y su maduración se inicia en el núcleo y se completa posteriormente en el citoplasma, como se esquematiza en la figura 20. Los genes de miRNAs son transcritos en su mayor parte por la RNA polimerasa II [185, 186] y, en una minoría de casos, por la RNA polimerasa III [187], dando lugar a un transcrito primario llamado pri-miRNA, de varias kilobases de longitud y con estructura de stem-loop. Este pri-miRNA puede contener la secuencia de uno o más miRNAs (Figura 19) [188].



**Figura 19.** Estructura en hairpin stem-loop de pre-miRNAs. Podemos observar que contiene la secuencia de miRNA maduro (en rojo), que puede localizarse en el brazo 5' (A), en el 3' (B) o en los dos (C). (D) Ejemplo de miRNAs agrupados en forma de cluster. El cluster de miR-35-41 [188].

El primer paso de la maduración es la escisión de la estructura stem-loop del pri-miRNA por la endonucleasa RNasa III llamada Drosha [189], que en mamíferos está asociada a DGCR8 [190]. Esto da lugar a una estructura de unos 65 nucleótidos llamada pre-miRNA [191]. En algunos casos, de manera poco frecuente, puede no ser necesaria la escisión mediada por Drosha, como es el caso de los mirtrones, que se producen como resultado de intrones muy cortos (mirtrones) sometidos a splicing y que soslayan el paso de Drosha (Figura 20 parte derecha) [156, 183]. Posteriormente el pre-miRNA es exportado al citoplasma por la exportina 5 (XPO5),

que es un miembro de la familia de receptores de transporte nuclear [192, 193]. Una vez en el citoplasma el pre-miRNA es escindido por la endonucleasa Dicer [194, 195], asociada a las proteínas TRBP[196, 197] y PACT [198], dando lugar a una molécula de doble cadena de unos 22 nucleótidos conocida como miRNA dúplex.



**Figura 20.** Representación de la biogénesis de los miRNAs[199].

A continuación, se separan las dos cadenas y una de las cadenas del dúplex miRNA/miRNA\* dará lugar al miRNA maduro. Esta cadena se incorporará de manera preferente al complejo ribonucleoproteico conocido como RISC (*RNA induced silencing complex*)[200, 201], que pasará a llamarse entonces miRISC. Este complejo está formado por las proteínas Dicer, Argonatura (argonauta1-argonauta4), TRBP y PACT. La hebra más abundante una vez procesado el pre-miRNA por Dicer fue llamada miRNA, mientras que la menos abundante se llamó hebra pasajera o miRNA\*[200-202]. El miRNA\* en principio se pensaba que era degradado y que era

menos funcional. El porqué de que se elija una u otra cadena no está claro. Algunos estudios apuntan la posibilidad que lo que determinaría la selección de la hebra es la relativa estabilidad termodinámica de las dos cadenas de miRNAs finales del dúplex. Normalmente la cadena que se elige y pasa a formar parte del miRISC, la que se preserva de ser degradada, es la que tiene menos estabilidad en el extremo 5' [199-201]. La cadena miR\* puede también en ocasiones formar parte del complejo RISC [199, 203-205], de forma que, avalado por estudios de Renilla Luciferasa, ambas hebras de miRNA, miRNA y miRNA\*, son funcionales [206, 207].

Inicialmente, en las primeras versiones de miRBase, sólo estaban anotados un bajo porcentaje de los miRNAs\* (80 miRNAs\*, 8% de un total de 940 miRNAs, en la versión 15 de MiRbase [208]), debido en parte debido a la baja expresión de algunos miR\* y también debido a que las secuencias de los miR\* fueron añadidas más tarde a las librerías de sondas comerciales de microarrays y TaqMan. Con el advenimiento de la *next-generation sequencing* (NGS) se ha podido afinar mucho más la información sobre miRNA/miRNA\* [208]. Trabajos recientes demuestran que la ratio de miRNA/miRNA\* es extremadamente variable, que depende en gran parte de la pareja de miRNA. Un estudio interesante revela que de las parejas de miRNA estudiadas, un 50% presentan una hebra dominante, un 10% muestra expresión comparable de ambas hebras mientras el 40% restante presentan ratios muy variables. Un ejemplo interesante es la observación de que el dúplex miR-223 actúa regulando la diferenciación mielóide mediante la acción conjunta de las dos hebras [208].

Una vez la cadena seleccionada de miRNA maduro se ha unido al complejo RISC, a partir de esto momento denominado miRISC (complejo RISC unido a miRNA), la cadena hace de guía a dicho complejo y se une a la región 3' UTR del RNAm diana del que es complementario, para bloquear su traducción. La hebra madura de miRNA, por lo tanto, es importante para el reconocimiento de la diana y la incorporación de RNAm diana específico al complejo RISC [176, 209, 210].

#### **1.4.1.3. Nomenclatura de los microRNAs**

Las guías para la anotación de miRNAs fueron establecidas en el 2003 por V. Ambros, D. Bartel y colaboradores [211], y se recogen en el repositorio miRBase, que es el repositorio online central para la nomenclatura, secuencia, anotación y predicción de dianas de miRNAs [212]. Esta base de datos, miRBase, junto con otras posteriormente citadas, son la fuente de información fundamental en este resumen acerca de las reglas básicas que determinan la nomenclatura de los miRNAs (<http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>).

En la mayoría de genes de miRNAs su número es secuencial a su descubrimiento. Hay algunas excepciones a esto: así, si se describe un miRNA en una especie (sp) distinta a la humana pero que es idéntico al equivalente en humanos (hsa-miR-X), se sugiere que se nombre el miRNA de esa especie con el mismo número utilizado en la especie humana (sp-miR-X), con la única diferenciación del prefijo utilizado (hsa para la especie humana). Como muchas secuencias de genes de miRNAs se conservan entre especies [177, 178], Victor Ambros en su trabajo en el 2003 “A uniform system for miRNA annotation” [211] afirma que “dar el mismo nombre a miRNAs que son ortólogos obvios es útil y sin embargo dar el mismo nombre a secuencias no relacionadas de diferentes organismos causa confusión”.

Hay excepciones históricas como let-7 y lin-4, que se conservan su nombre histórico, y así nuevas descripciones de homólogos de estos miRNAs seguramente también adquirirán esta nomenclatura. Como se ha mencionado, las tres primeras letras hacen referencia al organismo de procedencia (p.ej, hsa-miR-21 es un miRNA humano). El miRNA maduro se nombra con la R de miR en mayúscula, mientras que el gen del que deriva el miRNA maduro se nombra sin la R mayúscula. Es decir, mir-21 se refiere al gen que codifica el miRNA-21 y también en ocasiones la porción predicha de stem loop del transcrito primario. Dependiendo de la convención adoptada para cada organismo los genes de los miRNAs se nombrarán en mayúscula o en minúscula y con guión o sin guión (p.ej. *MIR156* en *Arabidopsis* y mir-1 en *C.elegans* y *Drosophila*) [211].

Cuando tras el número principal se añade un guión seguido de un número significa que distintas secuencias precursoras y loci genómicos expresan secuencias maduras idénticas. Así, miR-21-1 y miR-21-2 corresponden a dos miRNAs maduros idénticos sintetizados a partir de genes distintos). La adición de letras distintas como sufijos tras el número de miR, como en el caso de miR-135a y miR-135b, se utiliza para denotar secuencias maduras estrechamente relacionadas, que se expresarían a partir de sus precursores mir-135a y mir-135b respectivamente.

Cuando la relativa abundancia indica cual es la hebra predominantemente expresada, la secuencia madura predominante se expresa sin asterisco (p.ej, miR-56), mientras que el número seguido de un asterisco (p.ej. miR-56\*) identifica la secuencia madura derivada del brazo opuesto del precursor. Cuando los datos no son suficientes para determinar cuál es la secuencia madura predominante, las hebras respectivas se denominan por el brazo en el que se encuentran (así, miR-142-5p del brazo 5') y miR-142-3p del brazo 3'). Actualmente, se tiende a nombrar a los miRNAs por el brazo del que se producen más que por la abundancia relativa de cada hebra. En este sentido, en la actual versión del miRBase se encuentra en

primer lugar el nombre del microRNA (p.ej, hsa-mir-96, que es el precursor stem loop, pre-miRNA) y, posteriormente, se especifican los dos microRNAs maduros ( miR-96-5p, microRNA maduro del brazo 5', previamente denominado ID miR-96, y miR-96-3p,microRNA maduro del brazo 3', previamente denominado miR-96\*, en el caso que nos ocupa.). Como la hebra predominante no siempre se encuentra en el mismo brazo, así que en otras ocasiones es al revés (p.ej., miR-223-5p corresponde al previamente conocido como miR-223\* y miR-223-3p corresponde al previamente conocido como miR-223).

The screenshot displays the miRBase entry for hsa-mir-96. Key information includes:

- Accession:** MI0000098
- Previous IDs:** hsa-mir-96-7
- Symbol:** HGNC:MIR96
- Description:** Homo sapiens miR-96 stem-loop
- Gene family:** MIPF0000072; [mir\\_96](#)
- Community annotation:** A paragraph describing the miR-96 precursor as a small non-coding RNA that regulates gene expression. It mentions its conservation in Nephrozoa and its association with hearing loss in humans and mice. It also notes that the mutant miR-96 has gained novel targets.
- Stem-loop:** A diagram showing the stem-loop structure of the precursor miRNA with a 'Get sequence' button below it.
- Deep sequencing:** A bar chart indicating 139 reads and 17 experiments, with a corresponding sequence visualization.
- Comments:** A note stating the sequence is localized to chromosome 7 and was named mir-96-7 in reference [1].
- Genome context:** Coordinates (GRCh37.p5) chr7:129414532-129414609 [-] and overlapping transcripts intergenic.
- Clustered miRNAs:** hsa-mir-183, hsa-mir-96, hsa-mir-182 with their respective coordinates.
- Database links:** EMBL: AF480534, AF480534, AF480568, AF480568; ENTREZGENE: 407053; MIR96; HGNC: 31648; MIR96.

**Figura 21.** Ejemplo extraído de la base de datos miRBase, mostrando información sobre la secuencia stem-loop del hsa-mir-96, indicando su secuencia y estructura, localización cromosómica, etc.

Mature sequence hsa-miR-96-5p	
Accession	<a href="#">MIMAT000095</a>
Previous IDs	hsa-miR-96
Sequence	9 - <a href="#">uuuggcacuagcacuuuuugcu</a> - 31 <a href="#">Get sequence</a>
Deep sequencing	<a href="#">128</a> reads, 16 experiments
Evidence	experimental; cloned [1-3]
Validated targets	TARBASE: <a href="#">hsa-miR-96-5p</a>
Predicted targets	DIANA-MICROT: <a href="#">hsa-miR-96-5p</a>
	MICRORNA.ORG: <a href="#">hsa-miR-96-5p</a>
	MIRDB: <a href="#">hsa-miR-96-5p</a>
	RNA22-HSA: <a href="#">hsa-miR-96-5p</a>
	TARGETMINER: <a href="#">hsa-miR-96-5p</a>
	TARGETSCAN-VERT: <a href="#">hsa-miR-96</a>
PICTAR-VERT: <a href="#">hsa-miR-96</a>	
Mature sequence hsa-miR-96-3p	
Accession	<a href="#">MIMAT0004510</a>
Previous IDs	hsa-miR-96*
Sequence	52 - <a href="#">aaucaugugcagugccaaauug</a> - 73 <a href="#">Get sequence</a>
Deep sequencing	<a href="#">11</a> reads, 6 experiments
Evidence	experimental; cloned [2]
Predicted targets	DIANA-MICROT: <a href="#">hsa-miR-96-3p</a>
	MICRORNA.ORG: <a href="#">hsa-miR-96-3p</a>
	MIRDB: <a href="#">hsa-miR-96-3p</a>
	RNA22-HSA: <a href="#">hsa-miR-96-3p</a>
	TARGETMINER: <a href="#">hsa-miR-96-3p</a>

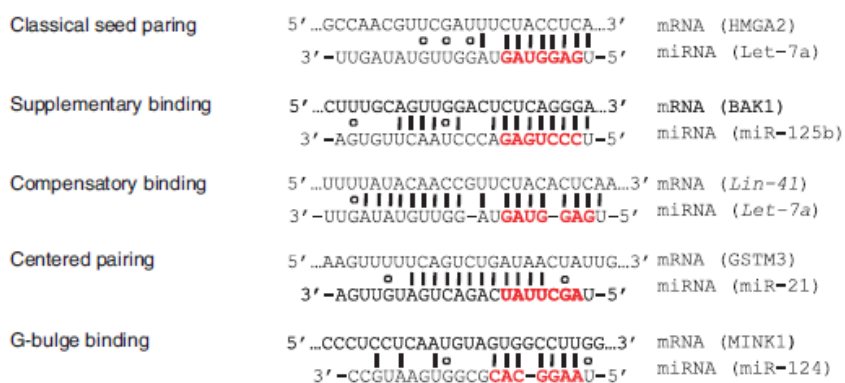
**Figura 22.** Ejemplo extraído de la base de datos miRBase, mostrando información sobre la secuencia de hsa-miR-96 maduros, secuencia hsa-miR-96-5p y hsa-miR-96-3p, se indica igualmente el nombre identificador previo, la secuencia y el link con las bases de dianas tanto validadas (TARBASE) como las predichas (Diana-microT, microrna.org, ect).

#### 1.4.1.4. Mecanismos de acción

La función mejor estudiada de los miRNAs es la de inhibir la traducción génica de sus dianas. La especificidad de las dianas de los miRNAs viene determinada principalmente por la complementariedad entre las posiciones 2-8 de la región 5' del miRNA (llamada secuencia semilla, del inglés “*seed sequence*”) con la región UTR3' de sus RNAm diana [176]. Éste es el llamado mecanismo canónico de regulación génica por miRNAs a través de interacciones con la región UTR3'. Dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con su mRNA diana se darán dos situaciones distintas: cuando son perfectamente complementarias, el complejo RISC inducirá degradación del RNAm diana, mientras que, cuando la complementariedad no sea completa, se bloqueará temporalmente la traducción de este RNAm a proteínas[176]. Independientemente del mecanismo utilizado el resultado final será la

reducción de los niveles proteicos [210]. En humanos, el mecanismo más frecuente es la represión de la traducción[166]. Los RNAm que su traducción ha sido reprimida por los miRNAs, pueden ser acumulados en “focos” citoplasmáticos llamados *processing bodies* (*P bodies*) o *glycine-tryptophan bodies* (*GW-bodies*) [27, 28]. Los *P bodies* pueden funcionar como emplazamientos de estos RNAm reprimidos o destruidos[199]; además los *P bodies* están enriquecidos de proteínas de la maquinaria de los miRNAs (AGO y GW182) así como de miRNAs maduros y RNAm reprimidos[27]. La inhibición de la biogénesis de miRNAs o la depleción de GW182 causa la desaparición de los *P bodies* [29] y existe una correlación positiva entre la represión mediada por miRNAs y la acumulación en los *P bodies* de RNAm [16, 213].

No siempre se requiere una perfecta complementariedad de bases con la secuencia semilla del miRNA para que se produzca la unión de miRNA-mRNA. Así, puede tener lugar la unión de miRNA-mRNA en casos de mismatch de la secuencia semilla del miRNA con su RNAm diana si se produce un mecanismo compensatorio. Existen varias posibilidades de unión del miRNA a su RNAm diana, tal y como se ilustra de manera esquematizada en la Figura 23[214].



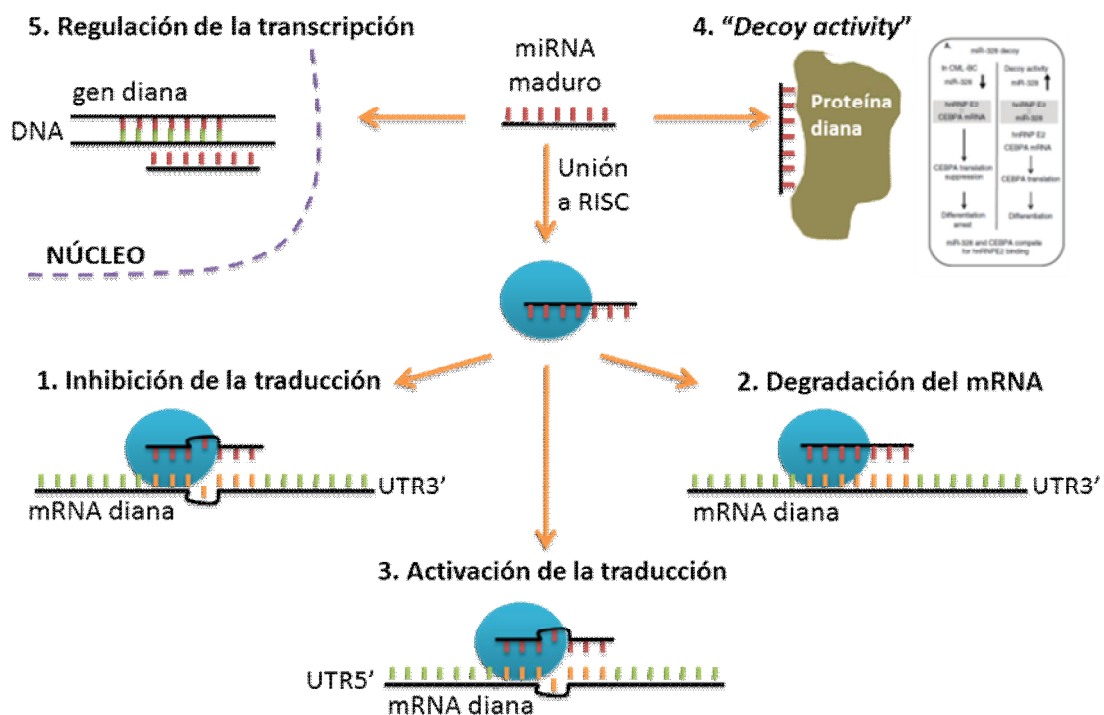
**Figura 23.** Posibilidades de unión del miRNA a su RNAm diana. La secuencia semilla de los miRNAs maduros están representados en rojo [214].

Como se ha explicado anteriormente, debido a que hacen falta pocos nucleótidos para la unión RNAm-miRNA, cada miRNA tiene el potencial de tener como diana un gran número de genes, que se estima que unos 500 por cada familia de miRNAs. A su vez, se estima que un 60% de los RNAm poseen una o más secuencias conservadas durante la evolución que podrían interactuar con miRNAs [210, 215-217]. Además, varios miRNAs pueden tener como diana un mismo gen, de forma que pueden cooperar para regular la expresión de este gen[210, 218].

Posteriormente, se han descrito otros mecanismos “no canónicos” por medio de los cuales los miRNAs ejercen otras funciones de regulación (Figura 24). Así, se ha descrito la posible

activación de la traducción por parte de algunos miRNAs, mediante diversos mecanismos. Así, el miRNA puede unirse a la región UTR 5' de su gen diana y activar de esta manera la expresión proteica de dichos genes de manera post-transcripcional. Un ejemplo de esta función sería la estimulación de la traducción del RNA en el virus de la hepatitis C por el miR-122.[25, 219, 220]. Otro mecanismo de activación de la traducción por un miRNA por un mecanismo alternativo, sin la unión directa a la región UTR5' del RNAm, lo representa miR-328, que aumenta la traducción de CEBPA en leucemia mieloide crónica, no mediante la unión directa al RNAm de CEBPA, sino mediante la unión a la proteína PCBP2, que interacciona a su vez con la región UTR5' del RNAm de CEBPA e inhibe su traducción[221].

Otros estudios han mostrado que los miRNAs pueden también regular la expresión génica a nivel transcripcional uniéndose directamente al DNA [222, 223]. Parece que existen diferentes mecanismos por los cuales los miRNAs ejercen esta regulación: regulando mecanismos epigenéticos de silenciamiento de DNA [222, 223] o guiando la formación de la heterocromatina en la región promotora [224].

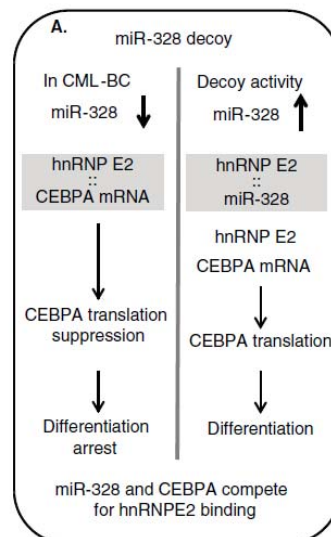


**Figura 24.** Principales funciones de los miRNAs. Adaptado de [210, 225].

Más recientemente[221], se ha descrito una nueva función de los miRNAs mediante la unión a ribonucleoproteínas (proteínas de unión al RNA) e interferencia en la unión de estas proteínas



con su RNA diana. Esta función se conoce con el nombre de *decoy activity* [221, 226]. Esto ha supuesto un cambio en el paradigma de la función de los miRNAs. Un ejemplo ilustrado en la Figura 25 [225], supone la demostración de que en células que expresan el oncogen BCR/ABL y se encuentran en crisis blástica de leucemia mieloide crónica (LMC), existe un aumento de la proteína hnRNP E2[23]. También en esta situación de crisis blástica de LMC se infraexpresa el miR-328, de manera BCR/ABL dependiente. HnRNP es una proteína de unión a RNA, es decir, está involucrada en procesamiento de RNAm, la exportación nucleo-citoplasmática y traducción de RNAm[22]. Así, hnRNP interacciona con el RNAm de CEBPA e inhibe su traducción a proteína. CEBPA es un factor de transcripción que interviene en la diferenciación mieloide, por lo que su inhibición contribuye a la parada de la diferenciación mieloide característica en la crisis blástica de la LMC. Eiring et al [221] demostraron que el miR-328, que se infraexpresa de manera dependiente de BCR/ABL, compete con el RNAm de CEBPA por el sitio de unión de hnRNP E2. Es decir, cuando se expresa menos miR-328, se une menos a hnRNP E2 y se produce una mayor unión entre CEBPA y hnRNP E2, lo que resulta en un mayor grado de inhibición de CEBPA por hnRNP E2, y una señal de parada en la diferenciación mieloide. Por otra parte, se ha demostrado que cuando se sobreexpresa miR-328, éste se une a hnRNP E2, compete con CEBPA por la unión a hnRNP E2 y previene la unión de hnRNP E2 con CEBPA, evitando por lo tanto que la traducción de CEBPA se inhiba por hnRNP E2, contribuyendo a la promoción de la diferenciación mieloide estimulada por CEBPA.



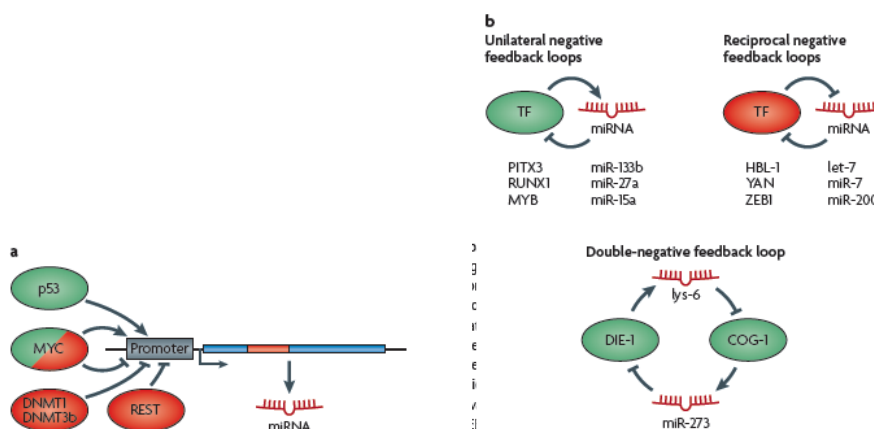
**Figura 25.** *Decoy activity* mediante miRNAs. (A) miR-328 decoy activity en el contexto de LMC [225].

### 1.4.1.5. Regulación de los microRNAs

La mayoría de los miRNAs parecen estar bajo el control de la señalización específica del estadio de desarrollo y/o de tejido[183, 227]; el control preciso de los niveles de miRNAs es indispensable para mantener la homeostasis celular. La desregulación de los niveles de miRNAs se ha demostrado que se encuentra asociado al estado de enfermedad, incluyendo el cáncer[228] [183]. A continuación se esquematizan algunos mecanismos de regulación de los niveles de expresión de miRNAs.

### 1.4.1.6. Regulación de la transcripción de los genes de microRNAs

En general, cualquiera de los procesos que pueden alterar la expresión de un gen codificador de proteínas puede afectar también a los genes de miRNAs y alterar su expresión [229, 230]. Ejemplos de estos procesos potencialmente modificadores de la expresión de miRNAs son: mutaciones, deleciones, amplificaciones, translocaciones o polimorfismos. Los genes de miRNAs pueden estar regulados, igualmente, por mecanismos epigenéticos tales como la metilación de la región promotora o modificaciones epigenéticas de histonas. (Figura 26A). Además, existe un control de la expresión de estos genes por factores de transcripción y por mecanismos de feed-back autoregulatorios. Se han descrito muchos ejemplos de miRNAs que regulan su propia transcripción; algunos de ellos los vemos ejemplificados en la Figura 26 (B)[199, 231].

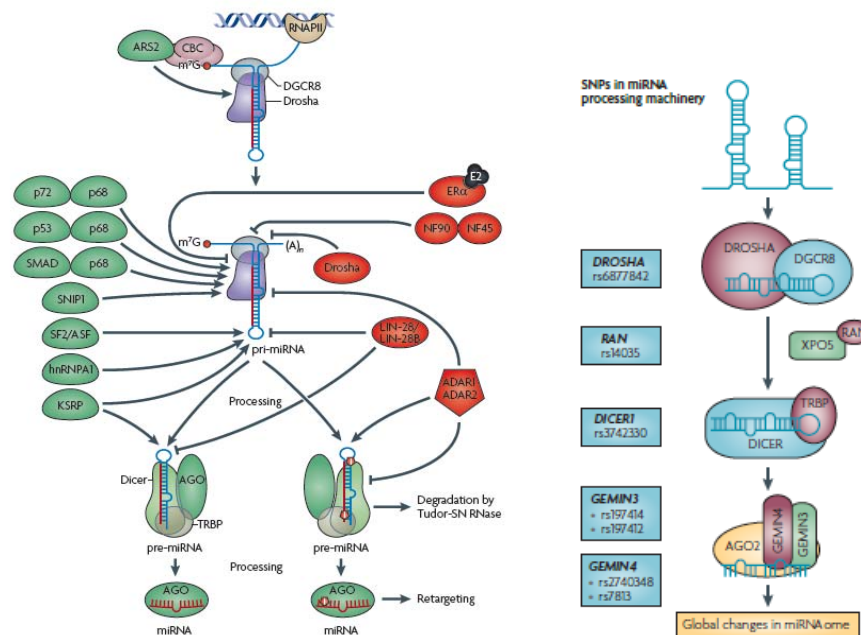


**Figura 26.** Regulación de la transcripción de los genes de miRNAs[199]. (A) Activadores (verde) y represores (rojo) de la transcripción de miRNAs

(factores de transcripción). (B) Redes regulatorias mediante la expresión de miRNAs.

#### 1.4.1.7. Regulación del procesamiento de los microRNAs

Además, la expresión de miRNAs está modulada por alteraciones en cualquiera de los elementos que intervienen en su procesamiento. En la figura 27 se esquematizan algunos de estos mecanismos que puedan alterar el procesamiento de los miRNA, tales como modificaciones en las moléculas reguladoras de este proceso a distintos niveles, la presencia de SNP o mutaciones en la maquinaria de su procesamiento.



**Figura 27.** (A) Esquema de los mecanismos reguladores del procesamiento de los miRNAs. Como se puede observar en este proceso intervienen múltiples proteínas [199]. (B) Existen alteraciones diversas que pueden afectar a la maquinaria de procesamiento de miRNAs, tales como por ejemplo la presencia de SNPs o mutaciones en las proteínas encargadas del procesamiento [232].

#### 1.4.1.8. Regulación de la función de microRNAs

Se ha descrito que después de su biogénesis los miRNAs también están estrictamente regulados por varios mecanismos[199]. Uno de estos mecanismos es la regulación de la función de los miRNAs a nivel de las proteínas AGO, la proteína GW182 y otras proteínas necesarias para la función de los miRNAs y su modulación. En los vertebrados, las cuatro

proteínas AGO tienen funciones que se solapan en cuanto a la represión de los miRNAs[9], aunque existen estudios que revelan especificidad en sus funciones. Se ha observado que los distintos componentes de la familia AGOs tienen distinta potencia a la hora de reprimir la síntesis proteica tras su unión su RNAm diana, por lo que la abundancia relativa de las distintas proteínas AGO puede afectar la intensidad de la represión de determinados miRNAs en determinadas células o tejidos[12]. Un ejemplo de ello sería el caso de miR-451 y AGO2, que parece tener una función específica en la hematopoyesis [10].

Muchas de las otras proteínas que interaccionan con el complejo miRISC pertenecen a la familia de helicasas DExD/H/RNA, algunas de las cuales intervienen en el desenrollado de los dúplex de RNA, entre otras funciones que son de gran importancia para el correcto funcionamiento de miRISC como la asociación y disociación con sus RNAm dianas[13, 199]. Existen otras muchas proteínas que pueden modular este proceso como por ejemplo el gen importin 8 (IMP8) que se asocia con las cuatro proteínas AGO humanas y que es necesario para el eficiente acoplamiento de AGO2 a un gran número de RNAm [14].

#### **1.4.1.9. Regulación de la destrucción de los microRNAs**

La destrucción, recambio o *turnover* de los miRNAs está menos descrita que su biogénesis. Se ha descrito que los miRNAs son moléculas muy estables y algunos estudios indican que la vida media de muchos miRNAs en líneas celulares o en órganos como el hígado o corazón es larga, pudiendo ser de horas e incluso de días [17, 20]. Este lento recambio no es universal para todos los miRNAs [199] ya que otros miRNAs se ha descrito que poseen un rápido recambio, como por ejemplo el miR-29b que se destruye antes en células en ciclo que en células paradas en mitosis[18]. Otro ejemplo de rápido recambio es el de algunos miRNAs en neuronas, y esto parece estar regulado por la actividad neuronal [35].

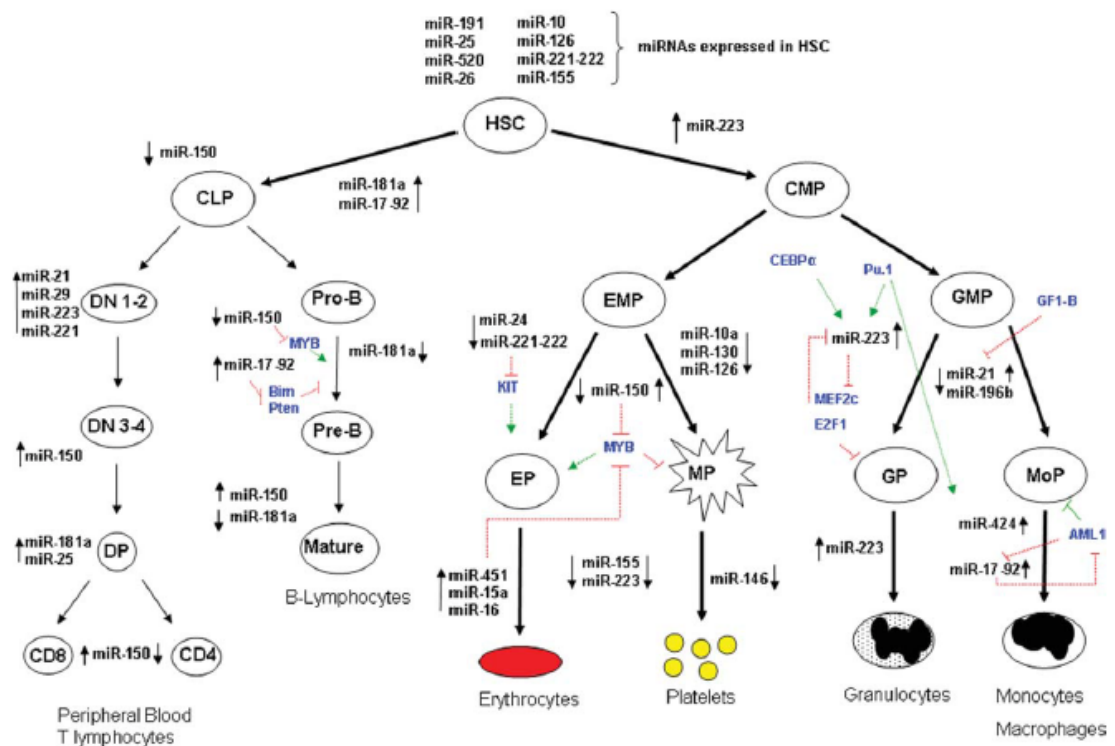
#### **1.4.1.10. Decoy activity sobre los efectos de los microRNAs**

La actividad de los miRNAs puede verse también regulada por mecanismos de *decoy activity*, ejemplificados en la figura 22 [225]. Se describió [24] que los pseudogenes podrían funcionar como un *decoy* sobre los efectos de los miRNAs en los genes codificadores de proteínas, ejemplificado por el pseudogen de *PTEN* el llamado *PTEN1*. Ambos son dianas de algunos

miRNAs como el miR-19b y miR-20a. Demostraron que cuando sobreexpresamos la región 3'UTR del pseudogen *PTENP1*, dado que los miRNA se unen a la región 3'UTR del gen *PTEN1* y que inhiben su expresión *PTEN1*, cuando aumentamos la región 3'UTR del pseudogen, estos miRNAs se unen al pseudogen y no tanto al gen y con ello observamos la “desrepresión” del gen PTEN.

### 1.4.2. microRNAs y hematopoyesis

La primera evidencia de que los miRNAs jugaban un papel en la hematopoyesis se obtuvo en un trabajo en el que se clonaron 100 miRNAs de medula ósea de ratón y se observó que miR-223, miR-181 y miR-142 se expresaban preferencialmente en tejido hematopoyético [233, 234]. A partir de ese primer trabajo se han identificado múltiples miRNAs con expresión prominente en tejido hematopoyético[235]. Mediante experimentos en ratones en los que se había dañado la maquinaria de biogénesis de los miRNAs por la delección de Dicer o Argonatura, se pudo determinar la importancia de los miRNAs en la hematopoyesis. Se observó que al dañar la vía de los miRNAs se veía afectada la reconstitución hematopoyética[236, 237]. Diferentes tipos de estudios funcionales incluyendo modelos murinos de *Knock-in* y *Knockout*, se han evidenciado diferentes miRNAs que participan en las diferentes etapas de la diferenciación hematopoyética(Figura 28[235]).



**Figura 28.** miRNAs involucrados en las diferentes etapas de la diferenciación hematopoyética [235].

En la siguiente tabla se detallan algunos de los miRNAs involucrados de forma específica en el desarrollo de la línea meeloide (como el miR-196b, miR-21 y miR-29), junto a sus dianas, función y regulación.

**Tabla 9.** Resumen de los miRNAs que participan en el desarrollo y diferenciación meeloide. Adaptado de[238].

miRNA	Regulado por	Dianas	Función
miR-9	CREB	NF-KB1, ETS, BCL6	Cuando se incrementa su expresión regula de manera negativa infraexpresando proteínas involucradas en la respuesta aguda que sigue a la activación del sistema inmune
miR-17-5p	AML-1	AML-1	En combinación con miR-20a, miR-106 y miR-17-5p, infraregula la expresión del receptor M-CSF, aumenta la proliferación de blastos e inhibe la diferenciación y maduración monocítica
miR-196b	MLL, GF-1	HOX	Su sobreexpresión en progenitores aumenta su proliferación y supervivencia y bloquea su diferenciación
miR-20a	AML-1	AML-1	En combinación con miR-20a, miR-106 y miR-17-5p, infraregula la expresión del receptor M-CSF, aumenta la proliferación de blastos e inhibe la diferenciación y maduración monocítica
miR-21	GFI-1	NFI-B, PTEN	En progenitores mieloides, su sobreexpresión bloquea la diferenciación granulocítica inducida por G-CSF
miR-27	C/EBP $\alpha$	AML-1	En progenitores granulocíticos, su sobreexpresión infraregula AML-1 y promueve su diferenciación
miR-29a	C-MYC	CDC42, HBP1	Induce capacidad de autorenovación en las células madres hematopoyéticas
miR-106a	AML-1	AML-1	En combinación con miR-20a, miR-106 y miR-17-5p, infraregula la expresión del receptor M-CSF, aumenta la proliferación de blastos e inhibe la diferenciación y maduración monocítica
miR-126	ETS1/2	HOXA9	Promueve la generación desde células madre hematopoyéticas de progenitores de linaje restringido (progenitor común linfóide y progenitor común meeloide)
miR-155	AP-1	PU.1, C/EBP $\alpha$	En células madre hematopoyéticas induce proliferación y produce enfermedades mieloproliferativas
miR-223	C/EBP $\alpha$ , NFI-A	NFI-A	Regula negativamente la proliferación y activación de los neutrófilos
miR-424	PU.1	NFI-A	La sobreexpresión de miR-424 en progenitores monocíticos estimula su diferenciación

### 1.4.3. microRNAs en el cáncer

La primera vez que se relacionó un miRNA con el proceso de tumorigénesis fue en 2002, cuando el grupo de C. M. Croce describió que en una región genómica muy frecuentemente delecionada en la leucemia linfática crónica (LLC), 13q14, no había genes codificadores de proteínas sino dos genes de miRNAs en esa región, miR-15a y miR-16-1. Estos miRNAs, delecionados o silenciados epigenéticamente en casi el 70% de los pacientes con LLC, se confirmaron como genes supresores de tumores en la enfermedad [239]. Posteriormente, se han descrito muchos miRNAs implicados en diferentes tipos de cánceres, tanto por pérdida de función (miRNAs supresores de tumores) como por ganancia de función (miRNAs que funcionarían como oncogenes u oncomiRs) (Tabla 9 [240]). Es interesante remarcar que,

debido a que un mismo miRNA puede tener varias dianas, podrá funcionar como oncogén o como gen supresor de tumor dependiendo del tejido en el que actúe. Un ejemplo de ello son los miRNAs miR-221 y miR-222, que tienen como diana el oncogen KIT y por lo tanto inhiben el crecimiento eritroblástico en leucemia funcionando como un gen supresor de tumor eritroleucemia [241]. Sin embargo, estos mismos miRNAs tienen también como dianas varios genes supresores de tumores tales como *PTEN*, *p27*, *p57* y *TIMP3*, funcionando por tanto como miRNAs oncogénicos en varios tumores sólidos [242].

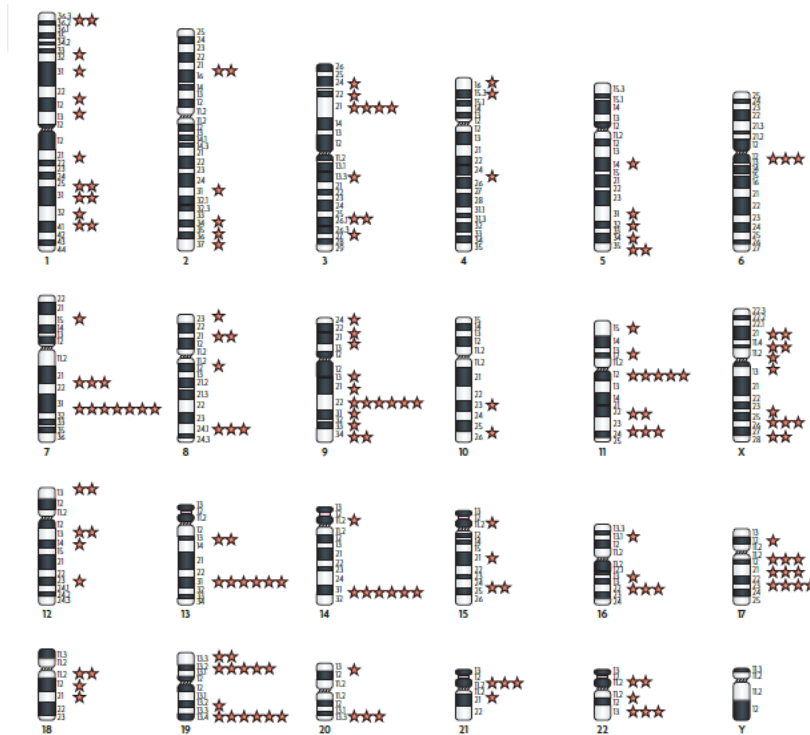
**Tabla 9.** Algunos ejemplos de miRNAs que funcionan como oncogenes o genes supresores de tumores en diferentes cánceres humanos. Adaptada de [240].

miRNA	Papel oncogénico: oncomiR (ONC) ó miR supresor de tumor (ST)	Tumores en los que se ha descrito su disregulación	Función	Dianas validadas
miR-15 y miR-16-1	ST	Pérdida en LLC, cáncer de próstata y MM	Induce apoptosis e inhibe tumorigénesis	BCL-2, WT1, RAB9B y MAGE83
Let-7(a, b, c, d, e, f, g e i)	ST	Pérdida en cáncer de mama y otros tumores solidos y hematológicos	Induce apoptosis e inhibe tumorigénesis	RAS, MYC y HMGA2
miR-29 (a, b y c)	ST	Pérdida en LLC agresiva, LMA con tMLL, SMD, cáncer de pulmón, mama y colangiocarcinoma	Induce apoptosis e inhibe tumorigénesis. Reactiva genes supresores de tumor que están silenciados	TCL1, MCL1 y DNMTs
miR-34	ST	Perdido en cáncer de páncreas, colon, mama e hígado	Induce apoptosis	CDK4, CDK6, ciclinaE2, EZF3 y MET
miR-145	ST	Perdido en cáncer de mama	Inhibe proliferación e induce apoptosis en células de cáncer de mama	ERG
miR-221 y miR-222	ST	Perdido en leucemia eritroblástica	Inhibe proliferación en eritroblastos	KIT
miR-221 y miR-222	ONC	Sobreexpresado en LLC agresiva, carcinoma de tiroides, y carcinoma hepatocelular	Promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis en varios tumores sólidos	P27, p57, PTEN y TIMP3
miR-155	ONC	Sobreexpresado en en LLC agresivo, linfoma de Burkitt, y cáncer de pulmón, mama y colon	Induce porliferación celular y leucemia o linfoma en ratón	MAF , SHIP1
Cluster miR-17-92	ONC	Sobreexpresado en linfoma, y en cáncer de mama, pulmón, colon, estómago y páncreas	Induce proliferación	E2F1, BIM y PTEN
miR-21	ONC	Sobreexpresado en glioblastoma, LMA con reordenamiento MLL, LLC agresiva y cáncer de mama, colon, páncreas, pulmón, próstata, hígado y estómago	Inhibe la apoptosis e incrementa la tumorigénesis	PTEN, PCCD4, TPM1 y TIMP3
miR-372 y miR-373	ONC	Sobreexpresado en tumores testiculares	Promueve la tumogeneicidad en cooperación con RAS	LATS 2

Por otra parte, la identificación de múltiples genes de miRNAs en puntos de rotura específicos de translocaciones cromosómicas o reordenamientos génicos característicos de determinados



tumores proporcionó importantes pistas de la función de estos miRNAs en diversos tipos de cáncer (Figura 29, [240]).

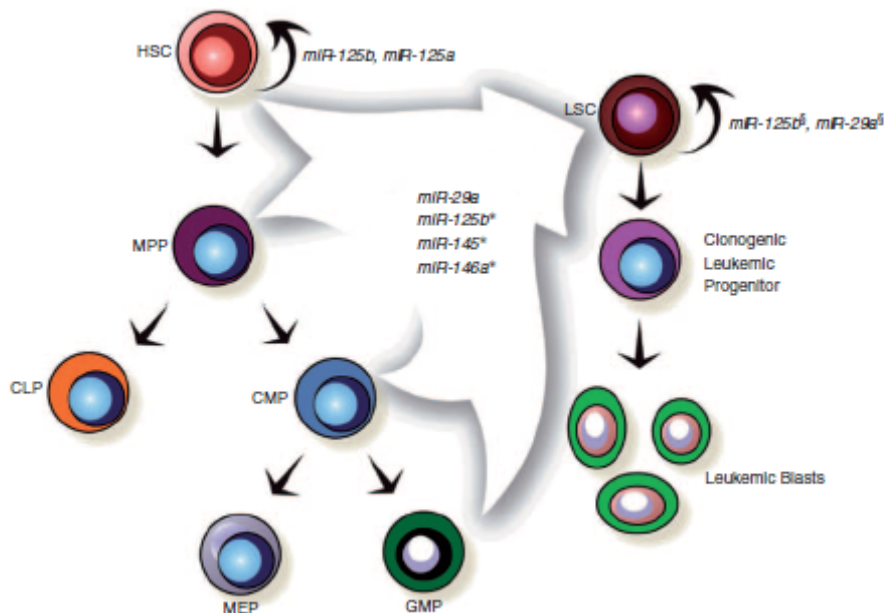


**Figura 29.** Genes de miRNAs localizados en regiones cromosómicas involucrados en cáncer humano[240].

#### 1.4.4. microRNAs en LMA

##### 1.4.4.1. Perfiles de expresión de microRNAs en LMA

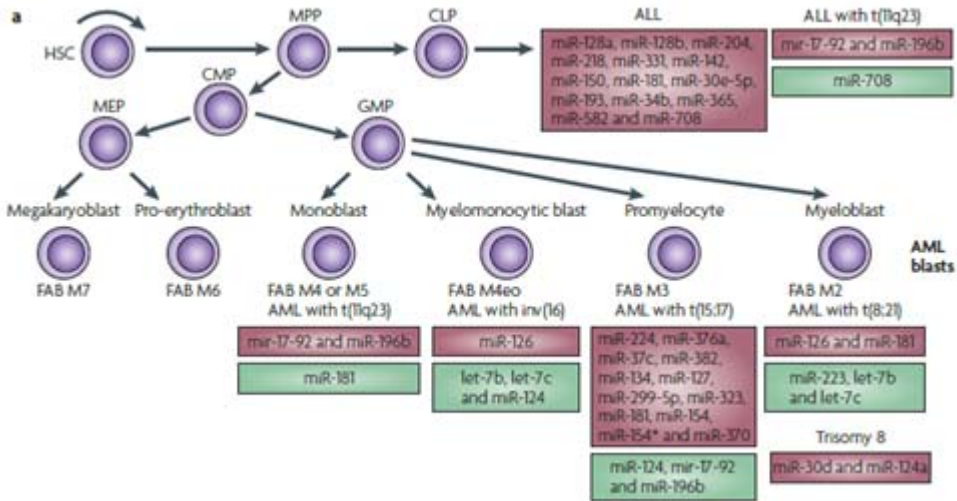
Los primeros perfiles de miRNAs que se describieron en relación con la LMA fueron aquellos que mostraban que existía diferencia de expresión de miRNAs entre CD34+ de donante sano y blastos mieloides [243-245]. De manera interesante, también se ha definido diferencias en la expresión de miRNAs entre célula madre hematopoyética y célula madre leucémica (Figura 30) [246]



**Figura. 30.** MicroRNAs con un papel relevante tanto en la célula madre hematopoyética como en la célula madre leucémica [246]. Los miRNAs contenidos en la flecha (*miR-29a*, *miR-125b*, *miR-145*, y *miR-146a*) han mostrado papel en la inducción de LMA en el sistema hematopoyético de ratón. La identificación con \* significa que no queda claro en que progenitor hematopoyético realiza su efecto. § Ambos miRNAs *miR-125b* y *miR-29a* se ha demostrado que inducen desórdenes mieloproliferativos y que en una serie de ratones trasplantables progresan a LMA, sugiriendo que estos miRNAs apoyan a la autorenovación de las células madres leucémicas.

Posteriormente, se definió que el patrón de expresión de miRNAs es capaz de discriminar entre la leucemia aguda de estirpe mieloblástica y linfoblástica [243]. Por otra parte, estudios posteriores demuestran que el patrón de expresión de miRNAs identifica algunos subtipos citogenéticos de LMA, como es el caso de la leucemia promielocítica aguda [244, 247, 248], la

LAM con reordenamiento de core-binding factor (CBF)[244, 247-249], la LMA con translocaciones que involucran la región t(11q23)/MLL [244, 245, 248, 250-252], la LMA asociada a trisomía 8[245] o la LMA asociada a cariotipo complejo con mutación de TP53[253].



**Figura 31. Enumeración de algunos** miRNAs característicos de distintos subtipos de leucemia aguda. Los miRNAs sobreexpresados están contenidos en cuadro rojo y los infraexpresados en cuadro verde [30].

Además, se han descrito patrones aberrantes de expresión de miRNAs asociados a subtipos de LMA asociados a determinadas características moleculares, como es el caso de la sobreexpresión de miR-155 en pacientes con *FLT3-ITD*[244, 245, 249, 254]. Dentro de la categoría de LMA con citogenética normal, el subgrupo de enfermos con mutaciones de *NPM1* también presenta una “firma” de miRNAs característica, incluyendo la sobreexpresión de miR-10a, 10b y 196a e infraexpresión de miR-204, miR-128a, y miR-126[244, 254-256]. Estos miRNAs residen en la región genómica de los genes homeobox (HOX), cuya sobreexpresión constituye la característica más destacada de la firma de expresión génica de esta entidad (LMA-NPM1mut) y que sería la responsable de conferir un fenotipo “stem-cell” a la población leucémica [254]. Por otra parte, la sobreexpresión de miR-181a y miR-335 así como la infraexpresión de miR-34a son características de la LMA con mutaciones de *CEBPA* [244, 257, 258]. Un estudio describe una firma de miRNAs asociado a la mutación R172 de *IDH2*[51]. También se ha descrito un perfil de expresión asociado a sobreexpresión de genes con valor pronóstico en LMA como en el caso de la sobreexpresión de *BAALC*, caracterizada por la infraexpresión de miR-148a[68], miR-10a, miR-10b y miR-9 [259] y sobreexpresión de miR-3151 [260]. Finalmente, se han descrito perfiles de miRNAs asociados a la sobreexpresión de *MN1*[74] y *ERG* [259](Tabla 11) .

**Tabla 10.** Resumen de expresión de miRNAs asociados con mutaciones y sobreexpresión de genes con valor pronóstico en LMA (adaptado de [261]).

Gen	Sobreexpresión	Infraexpresión
<b><i>NPM1 Mutado</i></b>		
	miR-10a	miR-204
	miR-10b	miR-128
	miR-196a	miR-126
	miR-196b	miR-130a
		miR-451
<b><i>CEBPA Mutado</i></b>		
	miR-181a	miR-34a
	miR-335	
<b><i>FLT3-ITD</i></b>		
	miR-155	
<b><i>R172-IDH2 mutado</i></b>		
	miR-125a-5p	miR-194-1
	miR-125b	miR-526
	miR-133	miR-520a-3p
	miR-1	miR-548
<b><i>BAALC sobreexpresado</i></b>		
	miR-3151	miR-148
<b><i>MN1 sobreexpresado</i></b>		
	miR-126	miR-148
	miR-126*	miR-16
	miR-424	miR-17-92
		miR-100
		miR-196a

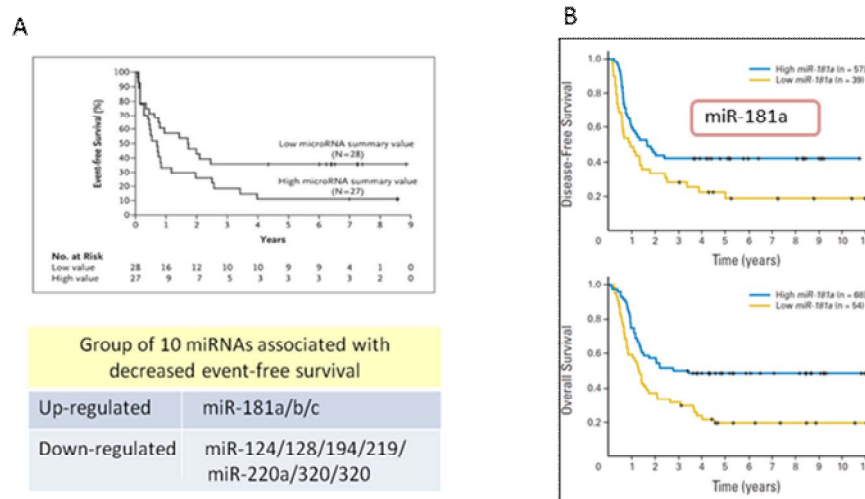
#### 1.4.4.2. microRNAs con valor pronóstico y/o funcional en LMA

La expresión de determinados miRNAs se asocia con el pronóstico tanto en el conjunto de LMA como en la LMA con citogenética normal (LMA-CN). Un estudio demostró la asociación entre la expresión elevada de miR-191 y miR-199a con una duración de la respuesta y supervivencia global acortadas en un aserie de pacientes con LMA de todos los grupos citogenéticos, asociación validada en una serie de validación[245]. En este mismo grupo de LMA, un estudio más reciente identificó miR-212 como factor pronóstico independiente, relacionando niveles de expresión elevados de miR-212 con un mejor pronóstico, resultado también validado en una serie independiente de enfermos[262]. Recientemente, se ha descrito y validado en una serie de citogenética heterogénea la sobreexpresión de miR-196b como un factor de mal pronóstico[263].

Dentro de la LMA con citogenética normal se han descrito diversos miRNAs con valor pronóstico. Así, una firma compuesta por 12 miRNAs mostró valor pronóstico dentro del grupo molecular desfavorable, definido por la presencia de (*FLT3*-ITD y/ó *NPM1* no mutada). El valor pronóstico de los miRNAs contenidos en la firma fue validado en una serie independiente, con la asociación de la sobreexpresión de miR-181a y miR-181b a un mejor pronóstico, mientras que la sobreexpresión de miR-124, miR-128-1, miR-194, miR-219-5p, miR-220a y miR-320 estaba asociada a peor pronóstico [264] (Figura 32A). Dos años despues, fue validado en una serie independiente, mediante ensayos individuales, el valor pronóstico de miR-181a dentro de LMA-CN y en el subgrupo molecular desfavorable dentro de LMA-CN (Figura 32B).

Posteriormente se ha descrito el valor de miR-181a y miR-181b como marcadores pronósticos en LMA con citogenética normal. Estudios funcionales han mostrado que el aumento de manera ectópica de miR-181b in vitro promueve la aptoptosis y se inhibe la vialilidad y proliferación de las celulas leucémicas [265] . Otro estudio demostró que miR-181a estaba infraexpresado en líneas celulares de LMA resistentes a citarabina, en comparación con las mismas líneas no resistentes al fármaco; asimismo, se identificó *bcl-2* como diana de miR-181a. Posteriormente se demostró que la sobreexpresión de este miRNA en estas líneas celulares las hacía más sensibles a citarabina, así como se activaba la apoptosis [266]. De manera interesante, en otro estudio se demostró que la proteína resultante de la mutación de CEBPA en la región N-terminal (C/EBPpalfa-p30) se unía a la región promotora del gen que codifica *mir-181a-1* y ocasionaba un aumentode los niveles de este miRNA, pudiendo este mecanismo explicar en parte la notable quimiosensibilidad asociada a la LMA con mutación

bialélica de CEBPA. En este sentido, el tratamiento con lenalidomida ha mostrado capacidad de aumentar la expresión de la proteína truncada C/EBP $\alpha$ -p30 y, secundariamente, niveles más altos de miR-181a en estudios in vitro y modelos murinos [267].



**Figura 32.** (A) “Score” de miRNA en el subgrupo molecular desfavorable en LMA-CN, adaptado de [264] (B) miR-181a validado como marcador pronóstico en LMA-CN, adaptado de [268].

En este mismo grupo de pacientes con LMA-CN, más recientemente se ha identificado como marcador de mal pronóstico la sobreexpresión de miR-155<sup>a</sup> [269] y, en pacientes mayores de 60 años, la sobreexpresión de miR-3151 como marcadores de mal pronóstico en la LMA-CN [260].

En la siguiente tabla se resumen los ejemplos más relevantes de miRNAs involucrados en distintos modelos de leucemogénesis.

**Tabla 11.** microRNAs con función documentada en leucemogénesis mieloides (adaptado de [261]).

miRNA	Expresión	Regulación por	Dianas	Efectos in vitro	Efectos in vivo
miR-155	Sobreexpresado en LMA con FLT3-ITD	<i>NFκB</i>	SHIP1	Bloquea la megacariopoyesis. Induce la formación de colonias mieloides	Induce mieloproliferación con cambios mielodisplásicos en ratón
miR-196b	Sobreexpresado en LMA con t(11q23)	<i>MLL</i>	HOXB8	En progenitores hematopoyéticos incrementa la supervivencia celular y la proliferación	
miR-223	Infraexpresado en LMA t(8;21)	<i>RUNX1/RUNX1T1, CEBPA, NFIA</i>	MEF2C	Induce la diferenciación granulocítica	En ratón KO para miR-223 se produce granulocitosis
miR-29b-1	Infraexpresado en LMA con <i>NPM1</i> no mutada, en LMA t(11q23) y del (7q)	<i>NFκB, MYC, YY1</i>	MCL1, CDK6, SP1, DNMT3A/B	Induce apoptosis, inhibe proliferación, regula negativamente la metilación de DNA	Reduce la tumorigenicidad

### 1.4.4.3. microRNAs y proteínas de fusión características en LMA

Algunas proteínas de fusión derivadas de translocaciones cromosómicas recurrentes en LMA han mostrado la capacidad de silenciamiento de la expresión de miRNAs mediante mecanismos epigenéticos [30]. Un ejemplo de este mecanismo lo constituye la proteína de fusión AML1-ETO resultante de la t(8;21)(q22.;q22), que se une a la región genómica del promotor de miR-223. Dicha proteína de fusión produce el silenciamiento de miR-223 mediante el reclutamiento de un complejo epigenético silenciador compuesto, entre otras, por proteínas con actividad histona desacetilasa y DNA metiltransferasas (DNMTs). La metilación de su gen produce la inhibición de la expresión de miR-223 y ello resulta en un bloqueo de la diferenciación mieloide. La reexpresión de miR-223 mediante desmetilación restaura la diferenciación de los blastos leucémicos [270, 271]. De manera análoga, esta proteína de fusión produce el silenciamiento epigenético del miR-193a, dando lugar a la expansión de la actividad oncogénica de la onproteína de fusión AML1-ETO [272]. De manera similar se ha descrito la represión transcripcional de miR-210, miR-23 y miR-24 por la proteína de fusión quimérica PML-RARA en la leucemia promielocítica aguda [273].

## 1.4.5. Búsqueda de dianas de microRNAs

### 1.4.5.1 Recursos informáticos

Como se ha comentado anteriormente, un mismo miRNA puede tener diversos RNAs como potenciales dianas [274]. Así, un 60% de los RNAs comparten una o más secuencias que están conservadas evolutivamente y con potencial capacidad de interactuar, por la complementariedad de sus secuencias, con miRNAs [275]. Para identificar las dianas génicas de los miRNAs se han desarrollado varias bases informáticas de predicción de dianas que tienen en cuenta diversos aspectos relacionados como su procesamiento biológico, la función de los miRNAs y parámetros complejos relacionados con su unión al gen diana [214, 276]. La mayoría de estas herramientas de predicción se basan en la complementariedad completa o incompleta de la secuencia del RNA diana con la “secuencia semilla” del miRNA, es decir, con los nucleótidos 2-7 del extremo 5’ de la secuencia madura de los miRNAs [274]. La mayoría de estas bases de predicción se limitan a la región 3’UTR de los RNAs diana. En la tabla 10 se muestran los algoritmos de predicción más comúnmente utilizados y sus principales características.

**Tabla 12.** Algoritmos de predicción de dianas de miRNAs más comúnmente utilizados y sus principales características, adaptado de [214]

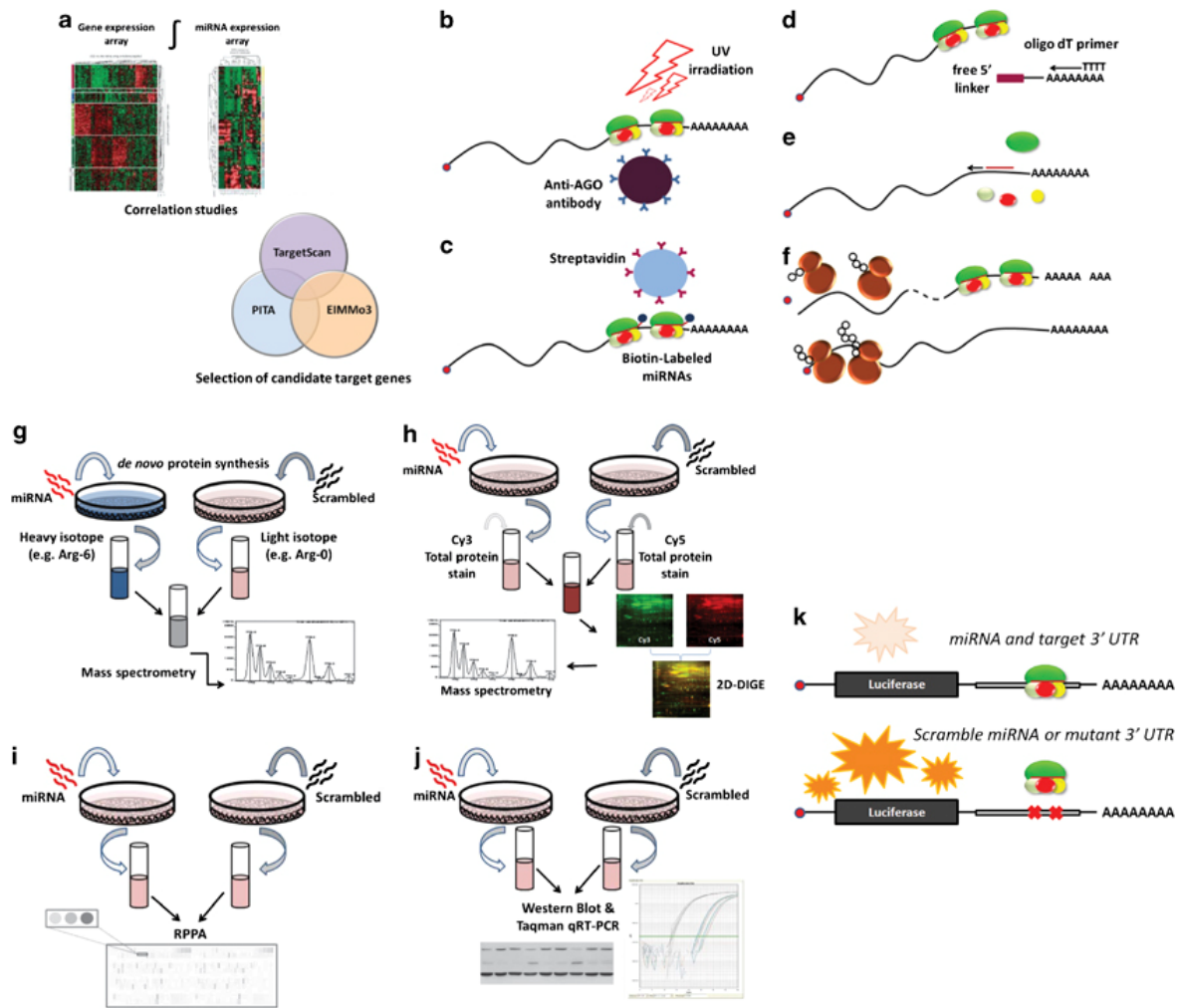
Bases que sólo consideran la región UTR 3' como diana putativa	
TargetScan	<a href="http://www.targetscan.org">http://www.targetscan.org</a>
PicTar	<a href="http://www.pictar.org">http://www.pictar.org</a>
EIMMo3	<a href="http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo3/">http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo3/</a>
Diana-microT v3.0	<a href="http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/">http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/</a>
PITA	<a href="http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html">http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html</a>
MicroRNA	<a href="http://www.microrna.org/microrna/home.do">http://www.microrna.org/microrna/home.do</a>
miRBase targets (microcosm)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/">http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/</a>
miRDB	<a href="http://mirdb.org/miRDB">http://mirdb.org/miRDB</a>
Bases que consideran otras partes del RNAm como dianas putativas	
RNA22	<a href="http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html">http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html</a>
miRWalk	<a href="http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/">http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/</a>

#### 1.4.5.2. Validación funcional

La demostración de las dianas predichas de los distintos miRNAs requiere su validación experimental, para lo que se han desarrollado diferentes métodos. Una primera aproximación experimental para identificación de dianas es el análisis de la correlación significativa entre la expresión de RNAm y miRNA, fundamentalmente inversa, en las mismas muestras y la combinación de estos resultados con las bases de predicción de dianas. Algunos programas, como el utilizado en la presente tesis, el RmiR package (Bioconductor version 2.6; <http://www.bioconductor.org/Bioconductor>) permiten relacionar la expresión de miRNAs con la expresión de RNAm teniendo en cuenta los algoritmos de predicción de dianas TargetScan and Pictar.

Una vez identificados los posibles candidatos, existen varias validaciones funcionales de estas aproximaciones, como sería el ensayo *Renilla-Luciferasa* y la medición de la cantidad de proteína tras inhibir o aumentar los niveles del miRNA en estudio mediante Western Blot o técnicas afines. En la siguiente figura (Figura 33) se resumen algunas de las técnicas que se utilizan para la validación de dianas.

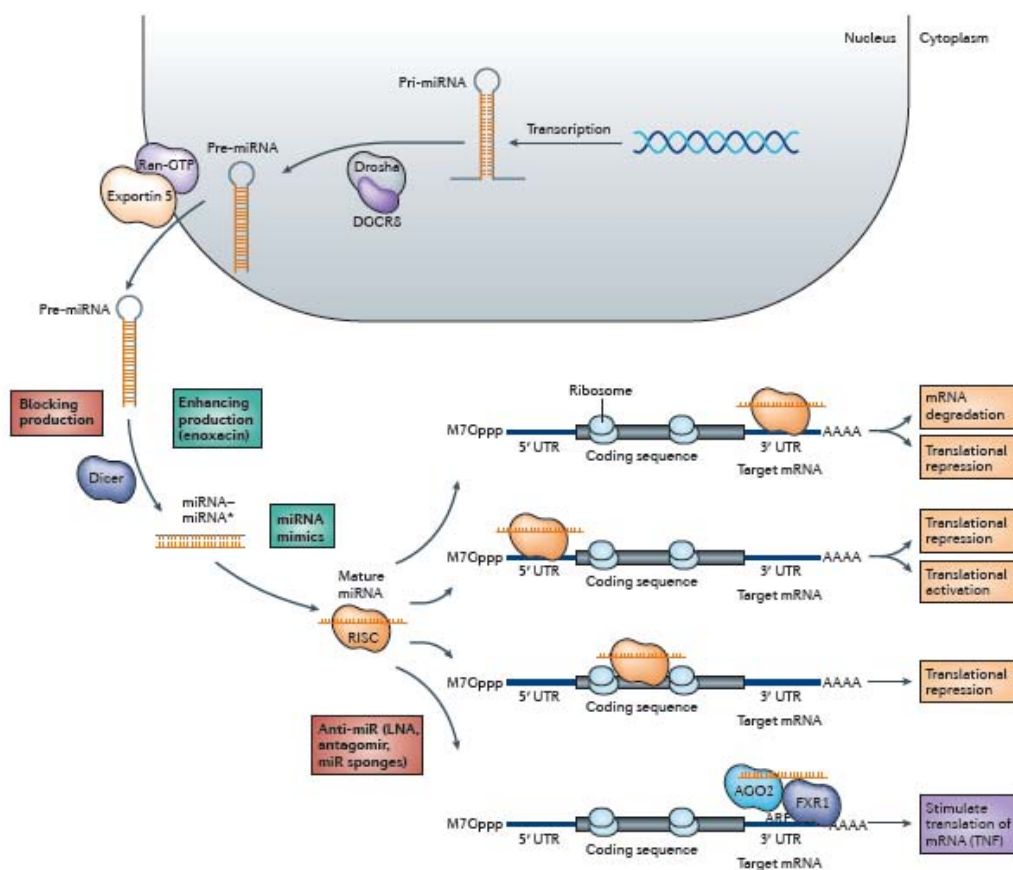




**Figura 33.** Aproximaciones más comúnmente utilizadas para la identificación de dianas de miRNAs. (a): correlación inversa entre niveles de miRNA y RNAm en combinación con bases de predicción de dianas. Estudios experimentales de interacción: (b) coimmunoprecipitación de complejos miRNA-RNAm; (c) selección de RNAm unidos a los miRNAs marcados; (d) Análisis paralelo de posibles finales de RNA (RNA ends, PARE) después de su unión con los RNAm dianas; (e) Usando miRNAs como primers para la síntesis de cDNA después de que RISC y otras proteínas se hayan eliminado; (f) “polysome profiling” en el cual los RNAm unidos a los ribosomas sirven como input para hacer perfil de expresión génica o secuenciación. (g-i): Estudio de síntesis proteica. (k): Estudios de validación de dianas: el estudio de la especificidad de la interacción miRNA-RNAm es generalmente validado por el estudio de la unión del miRNA a la región UTR3’ del RNAm mediante el ensayo de *Renilla Luciferasa*. Adaptado de [214].

### 1.4.6. Modificación de la expresión de miRNAs: posibles aplicaciones terapéuticas

En la actualidad se están desarrollando varias estrategias para utilizar los miRNAs como una herramienta terapéutica (Tabla 13, Figura 34). Una teórica ventaja de la terapia del cáncer basada en miRNAs sería que éstos tienen como diana varios genes a la vez, implicados en la misma vía celular o en vías con función redundante, involucrados en el desarrollo de cáncer, lo cual supondría una ventaja teórica respecto al empleo de RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), diseñados específicamente para reducir la expresión de un único gen determinado. Las terapias basadas en miRNAs tendrán como objetivo inhibir la función de un miRNAs considerado oncogénico (oncomiR), o restablecerla función o aumentar la expresión de un miRNAs supresores de tumores [277].



**Figura 34.** Mecanismos de acción de miRNAs y el potencial uso de agentes terapéuticos para activar o bloquear su función. Las estrategias para disminuir la actividad de un miRNAs están contenidas en cajas rojas y aquellas destinadas a aumentarla en cajas verdes [277].

En el caso de los oncomiR, algunas de las estrategias ideadas para bloquear la función de estos miRNAs están basadas en oligonucleótidos:

- Oligonucleotidos antisentido (*antisense*, ASOs), también llamados antimirRNA, que incluyen *locked nucleic acids (LNA)*, es decir, ASOs modificados para alcanzar una mayor afinidad con los miRNAs diana.
- Pequeñas moléculas antagomiRs o diminutos LNA anti-miRs.
- “Esponjas” de miRNA.
- Fármacos basados en pequeñas moléculas que tienen como diana miRNAs (SMIRs).

En el caso contrario, cuando el objetivo del tratamiento son los miRs supresores de tumor, las principales estrategias para aumentar su función son:

- Revertir su silenciamiento epigenético (p.ej, con agentes hipometilantes)
- Aumentar su biogénesis (p. ej., con sustancias como la neomicina)
- Administración o “entrega dirigida” del miRNA en cuestión, tanto “desnudo” como acoplado a un *carrier* o liberado por un vector viral.

El desarrollo de estas estrategias se ha encontrado con bastantes obstáculos, entre ellos los problemas de “entrega” del agente terapéutico en el tejido diana que debe enfrentarse con con diversas dificultades como su posible degradación por nucleasas, el aclaramiento renal, la dificultad en atravesar el endotelio capilar o la posible eliminación por el sistema inmune.

Problemas adicionales serían la toxicidad de la molécula portadora (*carrier*) del miRNA, trombogenicidad, o activación del complemento [278-280]. Otro elemento importante a tener en cuenta respecto al tratamiento basado en miRNAs es la relativa falta de especificidad de la acción, debido precisamente a la potencial multiplicidad de dianas. Un ejemplo de ello sería la posibilidad de inducción de defectos congénitos esqueléticos y de crecimiento en humanos cuando se realiza la delección del grupo de miRNAs (*cluster*) oncogen miR-17-92 [281].

A pesar de todo ello, ya se están ensayando con éxito varias terapias basadas en anti-miR, para el tratamiento de enfermedades como la fibrosis, la infección por el virus de la hepatitis C, la arterioesclerosis o cáncer [277]. Por ejemplo MRX34 (desarrollado por Mirna Therapeutics) es un agente mimético de miR-34, formulado en forma de liposoma que induce respuestas en hepatocarcinoma, sin toxicidad inesperadas en tejidos normales, y con el que se está llevando a cabo un ensayo fase I (ClinicalTrials.gov identificador: NCT01829971). Otro ejemplo terapéutico es un agente con diana en el miR-122, microRNA abundantemente expresado en hepatocitos. El virus de la hepatitis C (VHC) utiliza el miR-122 del huésped para

replicarse y propagarse. Recientemente se han publicado los resultados de un ensayo clínico fase II para el tratamiento de virus de la hepatitis C, basado en el empleo de una molécula que bloquea la acción del miR-122 y que resulta en una reducción de la carga vírica del VHC con buena tolerancia [282]. Otra estrategia terapéutica interesante tiene como objetivo la combinación de miRNAs con el tratamiento oncológico convencional para aumentar la sensibilidad a la quimioterapia y/o radioterapia [283-285]. Recientemente se han desarrollado plataformas *in vivo* para el ensayo de terapias basadas en RNAs en LMA. En concreto, se ha demostrado que la inhibición terapéutica del miR-21 y miR-196b inhibe la formación de colonias y depleciona *in vivo* las células iniciadoras de leucemia en variedades de LMA con sobreexpresión de genes HOX, lo que conlleva una prolongación de la supervivencia en el modelo murino [286].



## 2. Hipótesis y objetivos

### 2.1. Hipótesis

La LMA es una enfermedad muy heterogénea tanto desde el punto de vista clínico como fisiopatológico y especialmente la categoría de riesgo citogenético intermedio, que es la más frecuente. Por otra parte, el tratamiento óptimo postremisión varía de acuerdo a factores citogenéticos y moleculares que permiten hacer una estimación del riesgo de recaída de la LMA, y resulta incierto en muchos casos. En este contexto, y debido a la capacidad discriminatoria que poseen los perfiles de expresión de miRNAs para diferenciar distintas enfermedades, el análisis del patrón de expresión de miRNAs en la LMA y su correlación con la información citogenética y molecular disponible, puede contribuir a definir y delimitar entidades con un perfil biológico homogéneo, incluyendo una firma de expresión de miRNAs distintiva. Además, el análisis pormenorizado de las posibles dianas genéticas moduladas por la expresión de determinados miRNAs, puede contribuir a comprender el patrón de expresión génica y los mecanismos de leucemogénesis de distintos subtipos de LMA. Además, el estudio de la expresión de los perfiles de miRNAs puede aportar información pronóstica adicional a la que proporcionan parámetros clínicos, las anomalías citogenéticas o determinadas lesiones moleculares, ayudándonos así a mejorar la estrategia terapéutica adaptada al riesgo en la LMA, especialmente en el grupo con mayor incertidumbre, de riesgo citogenético intermedio.

## 2.2. Objetivos

### Generales:

1. Análisis del perfil de expresión de miRNAs en los distintos subgrupos citogenéticos y moleculares de LMA, así como en células CD34+ normales.
2. Caracterización del perfil de miRNAs en el grupo de LMA-RI y estudio de su valor pronóstico.

### Específicos:

- Caracterización del patrón de expresión de miRNAs de la LMA con traslocación (8;16) y reordenamiento MYST3-CREBBP
- Estudio de los mecanismos de regulación de expresión de miRNAs específicos de LMA con t(8;16).
- Identificación de dianas génicas de miRNAs identificados como específicos de LMA t(8;16).
- Estudio de perfiles de miRNAs asociados a mutaciones frecuentes en LMA.
- Analizar el valor pronóstico del patrón de miRNAs junto a otras variables clínicas y biológicas relevantes.

## 3. Resultados

### 3.1. Resumen de artículo 1

Artículo 1: “La leucemia aguda mieloide con translocación (8;16)(p11;p13) y reordenamiento MYST3-CREBBP tiene una firma de microRNA distintiva que tiene como diana el protooncogén *RET*”

La leucemia mieloide aguda (LMA) con t(8;16)(p11;p13) (LMA t(8;16)) tiene un perfil clínico-biológico característico, pero su patrón de expresión de microRNAs es desconocido. En el presente trabajo hemos analizado 670 miRNAs maduros en 7 pacientes con LMA con t(8;16) y en 113 pacientes con otros subtipos de LMA, así como en tres controles CD34+ de donante sano. El análisis jerárquico de grupos (“Hierarchical cluster analysis”) demostró que todos los pacientes con LMA t(8;16) se agruparon en un grupo (“cluster”) independiente. Asimismo, el análisis supervisado reveló una firma distintiva de 94 miRNAs, la mayoría de los cuales estaban infraexpresados, entre los que se encontraban el miR-21 y el cluster miR-17-92. Con el objetivo de entender por qué miR-21 y el cluster miR-17-92 se encontraban infraexpresados en este subgrupo en comparación con el resto de grupos de LMA, se estudió la expresión de sus factores de transcripción STAT3 y c-Myc respectivamente. El análisis de expresión del RNAm de dos conocidos factores de transcripción de estos miRNAs (STAT3 y c-Myc) mostró una infraexpresión significativa de STAT3 (P=0.04). Por otra parte, el análisis bioinformático mostró que 29 de los miRNAs que estaban infraexpresados podrían estar regulados por metilación. Con el fin de comprobar si estos miRNAs podían estar regulados por metilación, tratamos una muestra de células primarias de LMA t(8;16) con 5-aza-2'-deoxycytidina (5-AZA-dC) y Tricostatin A (TSA) y encontramos que 27 miRNAs se reexpresaron después de dicho tratamiento. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el estado de metilación entre las LMA con t(8;16) y los otros subtipos ni en metilación global, ni en metilación de promotores de miRNAs. Finalmente, se correlacionó la expresión de RNAm (de la que disponíamos de un estudio previo: *Camós, Esteve et al; Cancer Res 2006*) con la expresión de miRNAs para identificar posibles dianas reguladas por los miRNAs de la firma. La correlación entre la expresión de mRNA y la de miRNAs identificó *RET* como una potencial diana de tres de los miRNAs característicos de esta entidad. Mediante ensayo de Renilla-Luciferas y citometría de flujo tras la transfección con pre-miRNAs se confirmó que *RET* estaba regulado por los miRNAs



de la firma miR-218, miR-128, miR-27b, miR-15a y miR-195. En conclusión, la LMA t(8;16) presenta una firma característica de miRNAs que está regulada parcialmente mediante mecanismos epigenéticos y que tienen como diana el protooncogén *RET*.





## ORIGINAL ARTICLE

Acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and *MYST3-CREBBP* rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting *RET* proto-oncogeneM Díaz-Beyá<sup>1,6</sup>, A Navarro<sup>2,6</sup>, G Ferrer<sup>1</sup>, T Díaz<sup>2</sup>, B Gel<sup>3</sup>, M Camós<sup>4</sup>, M Pratcorona<sup>1</sup>, M Torredadell<sup>4</sup>, M Rozman<sup>5</sup>, D Colomer<sup>5</sup>, M Monzo<sup>2</sup> and J Esteve<sup>1</sup>

Acute myeloid leukemia (AML) with t(8;16)(p11;p13) (t(8;16) AML) has unique clinico-biological characteristics, but its microRNA pattern is unknown. We analyzed 670 microRNAs in seven patients with t(8;16) AML and 113 with other AML subtypes. Hierarchical cluster analysis showed that all t(8;16) AML patients grouped in an independent cluster. Supervised analysis revealed a distinctive signature of 94-microRNAs, most of which were downregulated, including miR-21 and cluster miR-17–92. The mRNA expression analysis of two known transcription factors of these microRNAs (*STAT3* and *c-Myc*, respectively) showed significant downregulation of *STAT3* ( $P = 0.04$ ). A bioinformatic analysis showed that 29 of the downregulated microRNAs might be regulated by methylation; we treated a t(8;16) AML sample with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-dC) and trichostatin A and found that 27 microRNAs were re-expressed after treatment. However, there was no difference in methylation status between t(8;16) and other AML subtypes, either overall or in the microRNA promoter. Cross-correlation of mRNA and microRNA expression identified *RET* as a potential target of several microRNAs. A Renilla-luciferase assay and flow cytometry after transfection with pre-microRNAs confirmed that *RET* is regulated by miR-218, miR-128, miR-27b, miR-15a and miR-195. In conclusion, t(8;16) AML harbors a specific microRNA signature that is partially epigenetically regulated and targets *RET* proto-oncogene.

Leukemia (2013) 27, 595–603; doi:10.1038/leu.2012.278

**Keywords:** t(8;16) AML; MYST3; CREBBP; microRNA; RET; MOZ-CBP

## INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) with t(8;16)(p11;p13) (t(8;16)AML) is an infrequent leukemia subtype with characteristic clinical features, including presentation as therapy-related AML, coagulation disorder, frequent extramedullary involvement and poor prognosis. t(8;16)AML blast cells exhibit a myelomonocytic stage of differentiation and frequent hemophagocytosis.<sup>1,2</sup>

Translocation (8;16)(p11;p13) fuses *MYST histone acetyltransferase 3* (*MYST3*, also known as *MOZ*) on chromosome 8p11 with *CREB-binding protein* (*CREBBP*, previously known as *CBP*) on chromosome 16p13.<sup>3</sup> Both *MYST3* and *CREBBP* encode proteins with histone acetyltransferase activity.<sup>3,4</sup> *MYST3* acts as coactivator of several transcription factors related to hematopoiesis, such as *RUNX1*, *PU.1* and *NF-κB*.<sup>5,6</sup> *CREBBP* is a transcriptional coactivator of some hematopoietic transcription factors,<sup>7,8</sup> interacts with *NF-κB* and *p53*,<sup>9</sup> and has an essential role in hematopoietic stem cell stemness regulation.<sup>6</sup> Recently, structural alterations that lead to inactivation of *CREBBP* have been observed in several lymphoma subtypes<sup>10</sup> and in acute lymphoblastic leukemia.<sup>11</sup> Although the precise pathogenic pathways of t(8;16) AML are mostly unknown, one of the essential mechanisms underlying the disease may be the disruption of several hematopoietic pathways owing to the interaction of the *MYST3-CREBBP* chimeric protein

with several key transcription factors.<sup>12</sup> Interestingly, t(8;16) AML harbors a specific gene signature consisting in the overexpression of several homeobox genes (*HOXA9*, *HOXA10* and *HOX* cofactor *MEIS1*), *PRL* and *RET* proto-oncogene<sup>1,2</sup> and the underexpression of *CCND2* and members of the *JAK-STAT* pathway *STAT3* and *STAT5A/B*. *RET* proto-oncogene encodes a tyrosine kinase that transduces signals for cell growth and differentiation. *RET* mutations have been associated with papillary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type IIA and IIB.<sup>13</sup> In addition, *RET* overexpression is highly characteristic of t(8;16) AML.<sup>1,2</sup>

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs (22–24 nucleotides in length) that negatively regulate mRNA translation by binding to 3'-UTR of the target mRNA.<sup>14</sup> miRNAs have an important regulatory role in most biological processes, including development, regulation of cell proliferation and apoptosis, and stem cell self-renewal and differentiation.<sup>14–16</sup> Moreover, their expression is altered in cancer, where they can function as both oncogenes and tumor suppressor genes.<sup>17–19</sup> Their expression is regulated by transcription factors and by epigenetic mechanisms such as histone acetylation and methylation of the CpG islands in the promoter region of the gene.<sup>20–22</sup> miRNA deregulation has also been shown to contribute to the leukemogenic process, and in fact, distinctive miRNA profiles have been identified in several

<sup>1</sup>Department of Hematology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Genetic Variation and Cancer Group, Institute of Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Badalona, Spain; <sup>4</sup>Department of Pediatric Hematology Department, Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, Esplugues de Llobregat, Spain and <sup>5</sup>Hematopathology Unit, Hospital Clinic Barcelona, University of Barcelona, Barcelona Spain. Correspondence: Dr J Esteve, Department of Hematology, Hospital Clinic, IDIBAPS, C/Ilarroel 170, Barcelona, 08036, Spain. E-mail: jesteve@clinic.ub.es

This research was presented in part at ASH 2010 meeting as an oral presentation.

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 19 January 2012; revised 11 September 2012; accepted 18 September 2012; accepted article preview online 1 October 2012; advance online publication, 26 October 2012

AML subtypes.<sup>12,23,24</sup> To date, however, no specific miRNA signature has been described for t(8;16) AML.

In order to further examine the role of miRNAs in t(8;16) AML, we have characterized the miRNA expression profile of the disease and have assessed the role of *RET* as a target of miRNAs associated with t(8;16) AML.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients, cell samples and RNA isolation

A total of 117 patients diagnosed with AML at Hospital Clinic of Barcelona during the period 1994–2009 were included in the study, together with three t(8;16) AML samples from other institutions (Hospital Tor Vergata, Rome; Guy's Hospital, London; Hospital Vall d'Hebron, Barcelona). AML diagnosis and classification was based on accepted FAB or WHO criteria, depending on the year of diagnosis.<sup>25,26</sup> The main characteristics of patients, including FAB classification, are summarized in Table 1. The availability of cytogenetic and molecular information on *NPM1* and *CEBPA* mutational status in all these patients allowed us to reclassify them following the WHO 2008 criteria (Supplementary Table S1).

Samples were obtained from bone marrow aspirates in 106 patients and from peripheral blood with a minimum blast infiltration of 60% in 14 patients. Mononuclear cells were purified by Ficoll density gradient centrifugation and total RNA was isolated using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Paisley, UK). In addition, CD34+ cells from the bone marrow of three healthy donor subjects were purchased from AllCells (Emeryville, CA, USA). All patients provided their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the Ethics Committee of Hospital Clinic of Barcelona approved the study.

### Molecular analysis

Gene rearrangement of *RUNX1/RUNX1T1* and *CBFβ/MYH11* in core-binding factor AML, *PML/RARα* rearrangement in acute promyelocytic leukemia, and mutations of *NPM1*, *CEBPA*, and *FLT3* genes were analyzed following

Characteristics	N = 120
Diagnosis (years)	1994–2009
Gender (male/female)	61/59
Age (years) <sup>1</sup>	52 (18–82)
<i>FAB classification</i>	
M0	2
M1/M2	47
M3	4
M4/M5	67
Leukocyte count, ( $\times 10^9/l$ ) <sup>a</sup>	23 (1–282)
Bone marrow blast (%) <sup>a</sup>	79 (20–100)
<i>Cytogenetics</i>	
Normal karyotype	61
t(15;17)(q22;q12)	4
t(8;21)(q22;q22)	3
inv(16)(p13;q22)	2
3q26 (EVI1)-rearranged	3
t(6;9)(p23;q34)	8
11q23 (MLL)-rearranged	3
t(8;16)(p11;p13) <sup>b</sup>	7
Complex karyotype	4
Trisomy 8	5
Others	20
<i>Molecular features</i>	
<i>NPM1</i> mutated	42
<i>CEBPA</i> mutated	11
<i>FLT3</i> -ITD mutated	46

<sup>a</sup>Median (range). <sup>b</sup>All t(8;16) AML patients were FLT3-ITD negative.

standard methods. In addition, *MYST3/CREBBP* rearrangement in t(8;16) AML was confirmed by a previously reported method.<sup>27</sup>

### miRNA profiling

miRNA profiling using a multiplex real-time quantitative reverse transcription (RT)-PCR strategy was performed using TaqMan Array Human MicroRNA Set Cards v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This method is based on a multiplexing RT-PCR method for the detection of 670 mature human miRNAs. RT reactions of 4.50  $\mu$ l contained: 0.80  $\mu$ l of 10 RT buffer (Applied Biosystems), 0.2  $\mu$ l dNTPs (100 mM each), 1.5  $\mu$ l multiscribe reverse transcriptase (50 U/ $\mu$ l), 0.10  $\mu$ l RNase inhibitor (20 U/ $\mu$ l), 0.80  $\mu$ l Megaplex RT primers (10  $\times$ ), 0.90  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub> (20 U/ $\mu$ l) and 500 ng of total RNA. RT reactions were incubated in a PTC-100 thermocycler for 2 min at 16 °C and 1 min at 42 °C for 40 cycles, 1 s at 50 °C and 5 min at 85 °C, and then held at 4 °C. Real-time quantitative PCR reactions were performed on an ABI 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) and contained 450  $\mu$ l of TaqMan Universal PCR Master Mix No Amperase (2  $\times$ ) (Applied Biosystems), 6  $\mu$ l Megaplex RT product and 444  $\mu$ l nuclease-free water.

### Normalization and filtering of miRNA data

Relative miRNA expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Normalization was performed with RNU48, based on preliminary analyses comparing the stability of RNU6B, RNU24, RNU43, RNU44, RNU48 and MammU6; RNU48 had the lowest variability of expression in the miRNA expression patient data set (Supplementary Figure S1) and was therefore used in this study. As calibrator sample, we used the mean miRNA value of the CD34+ control samples. All miRNAs that expressed <10% or with an unreliable quantification were excluded from further analysis, leaving a set of 387 miRNAs.

### mRNA expression analysis

cDNA was synthesized from total RNA using TaqMan Reverse Transcription Reagent Kit (Applied Biosystems). TaqMan Gene expression assays (Applied Biosystems) were used to determine mRNA levels of *cMyc* (Hs00905030\_m1), *STAT3* (Hs01047980\_m1) and *p53* (Hs01034249\_m1). *GUSB* gene (Hs00939627\_m1) was used as housekeeping gene. Real-time PCR was performed in the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). All samples for each gene were run in triplicate.

### Cell culture and treatment with 5-AZA-dC and trichostatin A (TSA)

The K562, HL-60 and TPH-1 cell lines were obtained from the DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Cells were grown in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin (Invitrogen, UK). Cryopreserved blasts from one t(8;16) AML patient were grown in StemSpan Serum-Free Expansion Medium with StemSpan CC-100 cytokine cocktail (StemCell Technologies, Sirocco, France) to a final concentration of 100 ng/ml recombinant human Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, 100 ng/ml recombinant human stem cell factor, 20 ng/ml recombinant human interleukin-3 and 20 ng/ml recombinant human interleukin-6.

Only one t(8;16) AML patient had available cryopreserved cells for treatment with 5-AZA-dC (decitabine) and TSA. This patient sample was treated for 72 h with 5-AZA-dC (2  $\mu$ M dissolved in dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) with drug replacement every 24 h. For TSA (Sigma-Aldrich) experiments, TSA (250 nM; dissolved in dimethyl sulfoxide) was added for the final 12 h of the 72 h 5-AZA-dC treatment period.

### Global quantification of DNA methylation

About 200 ng of genomic DNA were used for quantification of global DNA methylation using the Methylamp Global DNA Methylation Quantification Kit (Epigentek, New York, NY, USA). The methylated fraction of DNA was recognized by a 5-methylcytosine antibody and quantified through an enzyme-linked immunosorbent assay-like reaction included in this kit.

### Semi-quantitative DNA methylation analysis of miRNA genes

Genomic DNA for methylation analysis of five t(8;16) AML patient samples and nine other cytogenetic AML samples was extracted using DNEasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and treated with RNase A (Qiagen) prior to methylation analysis. The analysis of promoter methylation of 24 genes encoding mature miRNAs was performed using the Human

Cancer miRNA Genes EpiTect Methyl Signature qPCR Arrays (Qiagen). This method allows a semi-high throughput DNA methylation profiling based on the detection of remaining input DNA after cleavage with a methylation-sensitive and/or methylation-dependent restriction enzyme.

#### RET 3'-UTR cloning

The 3'-UTR region of the RET gene sequence was amplified using primers with SgfI (forward) and PmeI (reverse) restriction sites (underlined): Forward primer 5'-GCGATCGCGCGGCAAAATTAATGGACAC-3' and reverse primer 5'-GTTTAAACTCTGTTGTTCCAACTAGAATGTT-3'. PCR products were ligated into a pCR-XL-TOPO vector from TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Breda, NL, USA) and transformed into TOP10F<sup>-</sup>-competent cells (Invitrogen, UK). Using SgfI (Promega, Madison, WI, USA) and PmeI (New England Biolabs, Hertfordshire, UK) endonucleases, the insert was cut out, purified, and ligated into the 3' UTR of Renilla-luciferase in the psiCHECK2 vector (Promega). This vector also contains a firefly luciferase gene used to normalize for transfection efficiency. The constructs were sequenced to check for the proper insert.

#### Pre-miRNA transfection and luciferase assay

The K562 cell line was transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, UK) with 1.2 µg of the modified psiCheck2 vector containing the RET 3'-UTR region and with 500 nm of pre-miRNA Precursor or pre-miR Negative Control #2 (Ambion, Applied Biosystems). Pre-mir-135a, which has no complementary sequences to the 3'-UTR region of RET gene, was included as a negative control. The Renilla-luciferase and firefly luciferase activity was measured at 24 h after transfection with the Promega Dual Luciferase reporter assay system (Promega) in an Orion II microplate luminometer (Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Germany). The transfection efficiency was normalized with the firefly luciferase gene.

#### Measurement of RET expression by flow cytometry

RET expression after transfection with pre-miRNAs on TPH-1 and HL-60 cell lines was analyzed by flow cytometry. After 24 h of transfection, the cells were fixed and permeabilized using FIX & PERM reagents (Invitrogen, UK) according to the manufacturer's recommendations. The cells were then stained with saturating amounts of rabbit anti-human RET primary antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 60 min at room temperature in phosphate-buffered saline supplemented with 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) (fluorescence-activated cell sorter (FACS) buffer), washed and then counterstained with anti-rabbit fluorescein

isothiocyanate-labeled secondary antibody (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. After two washes, the cells were analyzed on a FACSCantoll (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Flow cytometry data were analyzed with FACSDiva Software (Becton Dickinson).

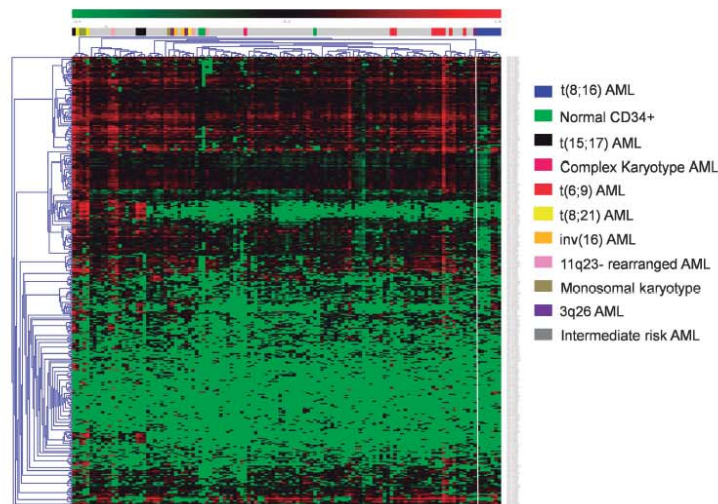
#### Statistical analysis

Data on miRNA expression were analyzed using BRB Array Tools version 3.5.0 software (Richard Simon & BRB-ArrayTools Development Team, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>), TIGR Multiexperiment viewer version 4.0 software (The Institute for Genomic Research, and ArrayAssist software, Stratagene, <http://www.tm4.org/mev>), R software version 2.9.0 (The R Foundation for Statistical Computing c/o Institute for Statistics and Mathematics, Wirtschaftsuniversität Wien, <http://www.r-project.org/>) and GraphPad software 5.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com/>). Hierarchical clustering was performed using Pearson squared correlation and average linkage. To identify miRNAs with significant differential expression between AML subgroups, two multivariate permutation tests were performed: significance analysis of microarrays and Student's *t*-test based on multivariate permutation (with random variance model). Differences between miRNAs were considered statistically significant if the *P*-value was <0.001 (*t*-test) or false discovery rate <0.1% (significance analysis of microarray).

In order to identify miRNA targets, we used the RmiR package (Bioconductor version 2.6; <http://www.bioconductor.org/Bioconductor>) to cross-correlate the miRNA expression data from the present study with our previous findings on the gene expression signature in the same patient samples,<sup>1</sup> based on the predicted targets from TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) and Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) databases. For this cross-correlation analysis, we used the miRNA expression data from the four t(8;16) AML patients from the present study, and the mRNA expression data of a selection of 46 genes were obtained using TaqMan Low Density Arrays (Applied Biosystems). These 46 genes had been selected on the basis of their differential expression in t(8;16) AML or their oncogenic potential in leukemia.<sup>1</sup>

## RESULTS

t(8;16) AML patients cluster together in the unsupervised analysis Using an approach of unsupervised ordering, 120 cases with different AML cytogenetic and/or molecular subtypes were classified according to their miRNA expression pattern. The hierarchical cluster analysis showed the seven t(8;16) AML cases aggregated in an independent cluster (Figure 1).



**Figure 1.** Hierarchical cluster based on microRNA expression pattern of 120 AML patient samples and three CD34<sup>+</sup> healthy controls samples. Columns represent samples and rows represent miRNAs ordered by hierarchical cluster analysis using average linkage and Pearson square correlation. Shading indicates relative expression of each miRNAs with respect to the miRNA mean expression of CD34<sup>+</sup> healthy controls (black equal to, red above and green below the median value). Interestingly, the seven t(8;16) AML grouped together in an independent cluster.

**Table 2.** Specific t(8;16) AML miRNA signature

Mature microRNA	Chromosomal localization	t(8;16) AML (mean)	Other AMLs (mean)
hsa-let-7a	21q22.11	- 2.4082	0.6983
hsa-let-7c	21q21.1	- 3.3012	- 0.9312
hsa-let-7d	9q22.32	- 2.2290	- 0.2476
hsa-let-7f	9q22,32, Xp11,22	- 5.0387	- 1.0121
hsa-let-7g*	3p21.1	- 2.9849	- 6.4729
hsa-miR-100	11q24.1	- 7.6855	- 1.3954
hsa-miR-101	1p31.3, 9p24.1	- 5.1010	0.3849
hsa-miR-103	5q34, 20p13	0.0788	0.5085
hsa-miR-106a	Xq26.2	- 0.9947	0.0143
hsa-miR-106b	7q22.1	- 0.6793	0.3692
hsa-miR-10a	17q21.3	- 6.4069	- 1.3338
hsa-miR-10b	2q31.1	- 7.3628	- 1.9333
hsa-miR-125b	11q24.1, 21q21.1	- 5.7918	- 0.6622
hsa-miR-128	2q21.3, 3p22.3	- 3.2711	- 0.6857
hsa-miR-130a	11q12.1	- 5.5546	0.1007
hsa-miR-130b	22q11.21	- 1.9079	- 0.0076
hsa-miR-132	17p13.3	- 2.5879	1.2275
Hsa-miR-133a	18q11.2, 20q13.3	- 7.7256	- 2.3212
hsa-miR-133b	6p12.2	- 9.0000	- 4.8077
hsa-miR-135a	3p21.1, 12q23.1	- 9.0000	- 3.3463
hsa-miR-135b	1q32.1	- 7.5942	- 3.1098
Hsa-miR-140-5p	16q22.1	- 0.4577	0.4747
hsa-miR-142-3p	17q22	- 0.1399	1.1330
hsa-miR-142-5p	17q22	- 0.5713	0.4986
hsa-miR-143	5q32	- 5.0099	- 0.0330
hsa-miR-1	18q11.2, 20q13.33	- 1.5021	- 0.5166
hsa-miR-145	5q32	- 1.1181	0.0743
hsa-miR-146a	5q33.3	- 1.2610	- 0.1511
hsa-miR-146b-3p	10q24.32	- 9.0000	- 4.0385
hsa-miR-148a	7q15.2	- 4.7632	- 0.5850
hsa-miR-148b	12q13.13	- 6.3087	- 0.5565
hsa-miR-151-3p	8q24.3	0.7278	- 0.8918
hsa-miR-15a	13q14.2	- 2.2014	0.0340
hsa-miR-15b	Xq12	- 0.9982	0.1072
hsa-miR-17	13q31.3	- 1.0014	0.0543
hsa-miR-181a*	1q32.1, 9q33.3	- 1.7215	0.0705
hsa-miR-181a	1q32.1, 9q33.3	- 0.8686	0.4566
hsa-miR-18a	13q31.3	- 0.9166	0.1832
hsa-miR-18b	Xq26.2	- 5.4821	0.2616
hsa-miR-194	1q41, 11q13.1	- 3.7912	- 0.5991
hsa-miR-199a-3p	19p13.2, 1q24.3	- 1.0775	- 0.2994
hsa-miR-19a	13q31.3	- 0.7566	0.2332
hsa-miR-19b	13q31.3, Xq26.2	- 0.9116	0.1900
hsa-miR-202	10q26.3	- 9.0000	- 6.1604
hsa-miR-20a	13q31.3	- 1.3635	0.2467
hsa-miR-20b	Xq26.2	- 1.5331	- 0.4454
hsa-miR-21	17q23.1	- 0.7012	0.7918
hsa-miR-218	4p15.31, 5q34	- 6.4358	- 1.7154
hsa-miR-221	Xp11.3	- 3.2831	- 0.0647
hsa-miR-222	Xp11.3	- 0.7996	- 0.1535
hsa-miR-223	Xq12	- 0.4153	0.6834
hsa-miR-23a	19p13.13	- 7.6794	- 1.3552
hsa-miR-23b	9q22.32	- 2.4298	- 1.1343
hsa-miR-25	7q22.1	- 2.2363	- 0.0096
hsa-miR-26a	3p22.2, 12q14.1	- 1.2341	0.1370
hsa-miR-26b	2q35	- 0.6657	0.3714
hsa-miR-27a	19p13.13	- 0.7899	0.5139
hsa-miR-27b	9q22.32	- 2.5264	- 0.3885
hsa-miR-29a	7q32.3	- 0.3075	0.7196
hsa-miR-29b	7q32.3, 1q32.2	- 4.8481	- 1.0510
hsa-miR-301a	17q22	- 1.1915	0.3968
hsa-miR-301b	22q11.21	- 3.9445	- 0.7477
hsa-miR-30b	8q24.22	- 0.8370	0.2472
hsa-miR-30c	1p34.2, 6q13	- 1.2965	- 0.1761
hsa-miR-32	9q31.3	- 4.0490	- 0.5603
hsa-miR-324-5p	17p13.1	- 5.1759	- 0.6004
hsa-miR-326	11q13.4	- 2.6986	- 1.6169
hsa-miR-335	7q32.2	- 5.5281	- 0.7503
hsa-miR-339-5p	7p22.3	- 5.4294	- 0.5319
hsa-miR-340	5q35.3	- 0.9040	0.2694

**Table 2.** (Continued)

Mature microRNA	Chromosomal localization	t(8;16) AML (mean)	Other AMLs (mean)
hsa-miR-361-5p	Xq21.2	-4.3845	-0.4228
hsa-miR-410	14q32.31	-9.0000	-4.0675
hsa-miR-423-5p	17q11.2	-5.4216	-0.7363
hsa-miR-424*	Xq26.3	-1.9380	-7.2236
hsa-miR-451	17q11.2	-1.5815	0.9986
hsa-miR-485-3p	14q32.31	-9.0000	-6.0971
hsa-miR-494	14q32.31	-3.6225	-0.8889
hsa-miR-495	14q32.31	-9.0000	-6.1961
hsa-miR-511	10p12.33, 10p12.33	-9.0000	-4.8782
hsa-miR-579	5p13.3	-5.1309	-0.6551
hsa-miR-597	8p23.1	-6.2467	-2.5308
hsa-miR-625	14q23.3	-4.2802	-0.6365
hsa-miR-628-3p	15q21.3	0.5412	-4.6430
hsa-miR-652	Xq23	-1.7993	0.4447
hsa-miR-671-3p	7q36.1	-5.2586	-0.9877
hsa-miR-708	11q14.1	-4.7019	-1.0818
hsa-miR-885-5p	3p25.3	-6.2996	-1.9548
hsa-miR-92a	13q31.3, Xq26.2	-1.8025	-0.4161
hsa-miR-93	7q22.1	-1.2707	-0.0020
hsa-miR-941	20q13.33	0.3042	-3.9895
hsa-miR-99a	21q21.1	-8.0144	-0.5858
hsa-miR-99b	19q13.41	-5.2674	-0.6551

Mean expression level in t(8;16) and the remaining AML subtypes is provided in two separate columns. All these microRNA showed a lower expression in t(8;16) AML except in four individual miRNAs (shaded in gray).

#### miRNA signature of t(8;16) AML

A supervised analysis using significance analysis of microarray and *t*-test based on permutations identified a miRNA profile for t(8;16) AML characterized by 90 downregulated and 4 upregulated miRNAs compared with the remaining AML subtypes (Table 2). An analysis of variance analysis including the main AML cytogenetic subtypes confirmed these differentially expressed miRNAs (data not shown). Interestingly, the downregulated t(8;16) AML signature included tumor suppressor miRNAs (let-7 family, miR-34a, miR-15a, miR-26a/b and miR-125b), miRNAs regulating hematopoiesis (miR-142 and miR-223), miRNAs targeting DNA methyltransferase genes (miR-29b, miR-148, miR-143 and miR-21) and miRNAs widely described in the tumorigenesis process (cluster miR-17-92 and paralogs and miR-21). These findings were further validated in a partial subset of eight miRNAs (Supplementary Figure S2).

In order to rule out the possibility that the t(8;16) AML miRNA profile was a consequence of the monocytic differentiation stage of this subtype, we compared the miRNA expression of t(8;16) AML with that of 53 AMLs with a monocytic phenotype (namely, M4 and M5 of FAB classification) and found a 47-miRNA signature, which differentiated t(8;16) AML from monocytic AMLs. Interestingly, 21 of the 47 miRNAs in this signature overlapped with the t(8;16) AML 94-miRNA signature (Supplementary Figure S3).

#### Transcriptional regulation of the t(8;16) AML miRNA signature

The transcription of several miRNAs in the signature has been shown to be regulated by key genes such as *STAT3*, *c-Myc* and *p53*. The oncogenic miRNAs miR-21 and cluster miR-17-92, which are usually overexpressed in other cancers, were underexpressed in the t(8;16) AML 94-miRNA signature. To further investigate this issue, we analyzed the expression of the known transcription factors of miR-21 and cluster miR-17-92 (*STAT3* and *c-Myc*, respectively) in seven t(8;16) AML patients and 36 patients with other AML cytogenetic subtypes. *STAT3* mRNA levels were significantly downregulated in the t(8;16) AML patients ( $P=0.04$ ). Analysis of variance analysis yielded different gene expression profiles among groups ( $P=0.005$ ) (Supplementary Figure S3). There was a non-significant difference of *cMyc*

expression levels between the t(8;16) AML and other AML subtypes (data not shown). Several miRNAs downregulated in the t(8;16) AML miRNA signature, such as miR-34a, are known to be regulated by p53. However, the quantification of p53 mRNA showed no statistical differences between the t(8;16) AML and the remaining samples (data not shown).

#### Epigenetic regulation of the t(8;16) AML miRNA signature

In order to elucidate the potential mechanisms of the downregulation of 90 miRNAs of the t(8;16) AML miRNA signature, we examined the presence of CpG islands in the promoter regions of the miRNA genes and in the promoter regions of the genes where the intronic miRNAs are embedded. The bioinformatic analysis showed that 29 downregulated miRNAs could potentially be regulated by methylation. Therefore, we used two different approaches: the global methylation analysis of genomic DNA and the treatment of patient samples with 5-AZA-dC and TSA. Firstly, when we compared three t(8;16) AML patient samples with 18 non-t(8;16) AML samples, we did not observe any statistical differences in the overall pattern of methylation (Figure 2a). However, when we treated a t(8;16) AML sample for 72 h with 5-AZA-dC, 14 miRNAs were re-expressed more than twofold change. Interestingly after treatment with 5-AZA-dC and TSA, 27 of 29 miRNAs were re-expressed more than 2 fold change after treatment (Supplementary Figure S4). These results indicate that the miRNA downregulation may be explained in part by epigenetic mechanisms.

#### Semi-quantitative DNA methylation analysis

In order to further examine the potential role of methylation as a mechanism of downregulation of some of the miRNAs in our t(8;16) AML signature, we analyzed the CpG island DNA methylation profiles of 12 miRNA genes corresponding to 15 mature miRNAs of our signature included in the Human Cancer miRNA Genes EpiTect Methyl Signature qPCR Arrays. We observed that four miRNA genes, corresponding to seven mature miRNAs, showed more than 40% hypermethylation (Figure 2b): *MIRLET7G*, *MIR1*, *MIR 218* and *MIR23B* (miR-23b, miR-24-1, miR-27b). Of note, *MIR23B* showed a remarkable hypermethylation.

Nonetheless, when we compare the miRNA promoter methylation in the t(8;16) AML samples with that of the nine samples of other AML subtypes, we found no significant differences. However, the hierarchical cluster analysis taking into account the percentage of miRNA promoter hypermethylation (Figure 2c) showed that the t(8;16) samples were closer to high-risk cytogenetics samples than good-prognosis cytogenetics samples.

RET is a target of the t(8;16) AML miRNA signature

In order to identify potential targets of the miRNAs in the t(8;16) AML miRNA signature, we cross-correlated the miRNA expression with gene expression data in the same t(8;16) AML patient samples. We found an inverse correlation of miR-130a and miR-130b with *HOXA3* ( $r^2 = -0.5$  and  $-0.8$ , respectively), of miR-1 and miR-23b with *MEIS1* ( $r^2 = -0.62$ ), and of miR-15b, miR-195 and miR-218 with *RET* ( $r^2 = -0.92$ ,  $-0.58$  and  $-0.87$ , respectively). As miRNAs targeting *RET* showed the highest correlation, we focused further analyses on *RET* target validation. Strikingly, further analysis of the 3'UTR regions of *RET* with TargetScan v5.1 showed the presence of target sites for nine miRNAs of the signature. In addition to miR-15b, miR-195 and miR-218, *RET* was a putative target of miR-15a, miR-34a, miR-424, miR-128 and miR-27a/b (Supplementary Figure S5). Interestingly, *RET* harbors two putative binding sites for miR-218.

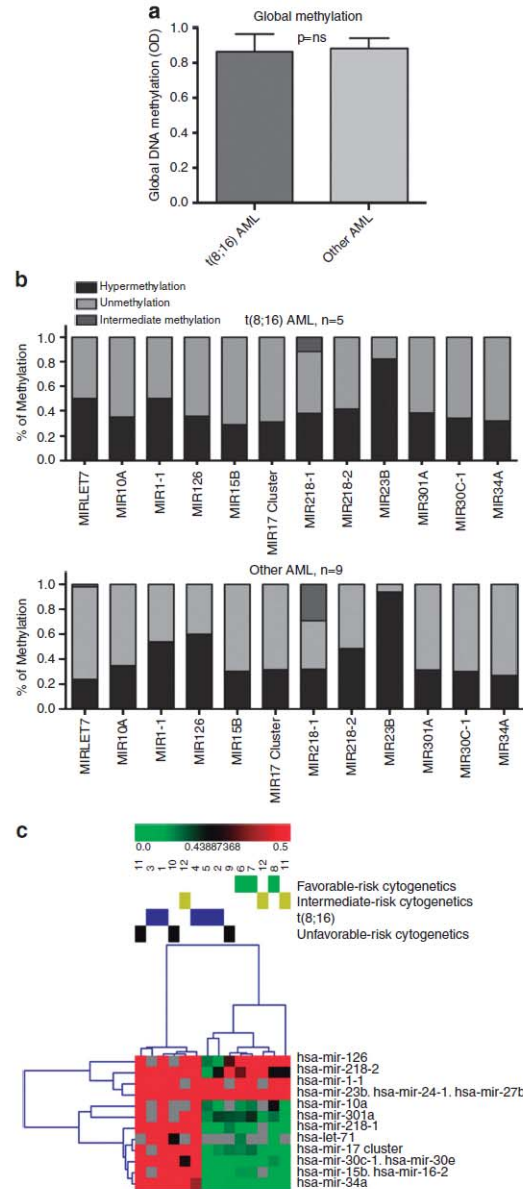
In the Renilla-luciferase assay, we inserted the 3'-UTR region of *RET* in the 3'-UTR of *Renilla* gene in psiCheck2 vector (modified psiCheck2 vector). When we transfected the cells with either the modified psiCheck2 vector and each pre-miRNA of interest or the modified vector and pre-miRNA-negative control, we found that five miRNAs (miR-218, miR-128, miR-27b, miR-15a, miR-195) significantly downregulated Renilla translation by binding to the *RET* 3'-UTR region, as observed by a reduction of 41–49% in Renilla activity at 24 hours after transfection (Figure 3a), indicating that *RET* is a target of these miRNAs. To further validate these results, we then analyzed *RET* expression in TPH-1 and HL-60 cell lines, which overexpress *RET*, by flow cytometry after transfection with each of the five pre-miRNAs. We observed a cell-line-dependent downregulation of *RET* protein levels after pre-miRNA transfection (Figure 3b).

**DISCUSSION**

t(8;16) AML is a leukemia subtype resulting from the fusion of two genes, *MYST3* and *CREBBP*, with chromatin-modifying properties.<sup>12</sup> Although prior studies have shown that miRNAs may define tumor entities better than microarray expression data from thousands of mRNAs,<sup>18</sup> no previous studies have focused on the miRNA profile of t(8;16) AML. In the present study, we have for the first time identified a specific miRNA signature that characterizes this AML subtype. In addition, as miRNA expression in cancer can be affected by epigenetic changes like DNA methylation and histone modification,<sup>22</sup> which contribute significantly to the leukemogenic phenotype, we analyzed possible mechanisms of epigenetic regulation of the t(8;16) AML miRNA signature,<sup>12</sup> and found that one-third of miRNAs were re-expressed after treatment with epigenetic modification agents. Importantly, we have also validated *RET* as a target of five miRNAs in the signature.

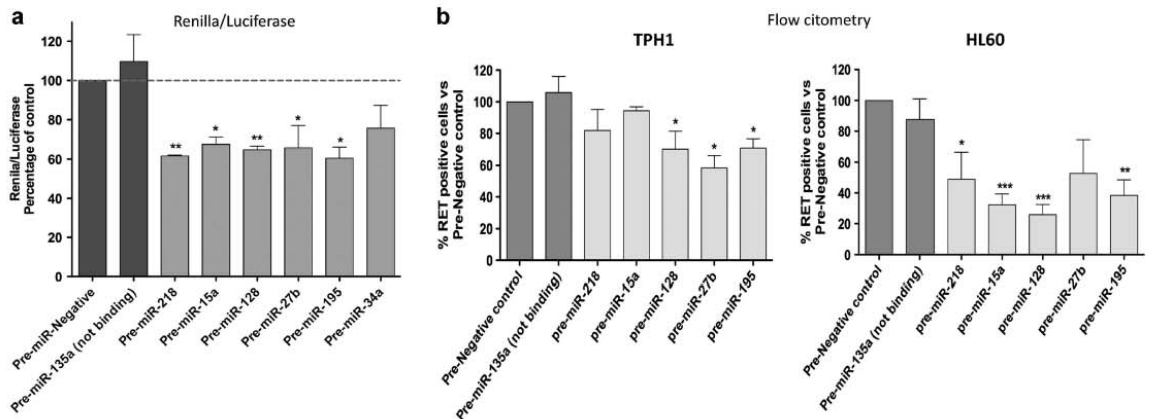
t(8;16) AML showed a highly distinctive, tightly clustered miRNA signature when compared with a wide variety of molecularly defined AML subtypes, confirming its biological uniqueness. Moreover, a specific 47-miRNA signature clearly differentiated t(8;16) AML from other AML subtypes with monocytic differentiation, indicating that the t(8;16) AML miRNA signature was not a result of the characteristic monocytic differentiation of t(8;16) AML.

We observed an overall downregulation of the miRNAs in our t(8;16) signature, some of which have previously been



**Figure 2.** Epigenetic analysis of miRNA signature in t(8;16) AML. (a) Overall methylation analysis of genomic DNA of t(8;16) AML patient samples in comparison with non-t(8;16) AML samples. (b) CpG island DNA methylation profiles, in five t(8;16) AML patient samples and nine samples of other AML subtypes, of 12 miRNA genes (corresponding to 15 mature miRNAs of our signature) included in the Human Cancer miRNA Genes EpiTect Methyl Signature qPCR Arrays. Hypermethylated: more than 60% methylated DNA; unmethylated: 0% methylated. Intermediate methylated: the total amount of input DNA minus the hypermethylated and unmethylated DNA fractions (0–60% methylated). (c) Hierarchical cluster analysis using average linkage and Pearson square correlation, representing hypermethylation percentage in five t(8;16) AML patient samples and 9 additional AML patients with diverse cytogenetic abnormalities (three from each of the cytogenetic prognostic categories).





**Figure 3.** Validation of RET as target of t(8;16) miRNA signature. **(a)** Renilla-luciferase assay at 24 hours after transfection with pre-miRNAs 218, 15a, 128, 27b and 195 showed a significant downregulation (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Pre-miR-135a was included as negative control as no complementarity has been observed between RET 3'-UTR sequence and this miRNA. **(b)** Percentage of RET positive cells, analyzed by flow cytometry, in TPH-1 and HL60 cell lines 24 hours after transfection with pre-miRNAs selected from the Renilla-luciferase assay. In the TPH-1 cell line, the percentage of RET-positive cells was reduced after transfection with three of five pre-miRNAs, whereas a significant reduction of RET expression in HL-60 cell line was observed with four of five miRNAs.

described as tumor suppressor genes,<sup>19,28</sup> including let-7 family, miR-34a, miR-15a, miR-26a/b and miR-125b. However, our t(8;16) AML miRNA signature also includes downregulated miRNAs that are usually upregulated in other cancers, such as miR-21 and cluster miR-17–92.<sup>29</sup> miR-21 is known to be transcriptionally regulated by *STAT3*,<sup>30</sup> and we found that *STAT3* is downregulated in t(8;16) AML, although the functional consequences of this deregulation are unknown. To further elucidate a potential mechanism of the downregulation of miR-17–92 cluster, we measured the mRNA expression of *c-Myc*, a transcriptional regulator of miR-17–92 cluster, in t(8;16) AML specimens and did not find significant differences in *c-Myc* levels.

*MYST3* and *CREBBP* have a role in leukemogenesis, both as partners in *MYST3-CREBBP* rearrangement and separately with other partners.<sup>31–35</sup> *MYST3* interacts directly with p53 protein, and the p53-*MYST3* complex increases after DNA damage, contributing to cell-cycle arrest in G1 phase.<sup>36</sup> *MYST3* is essential for self-renewal of hematopoietic stem cells.<sup>37,38</sup> *CREBBP* has multiple functions in development and hematopoiesis.<sup>8,39</sup> Heterozygous inactivation of *CREBBP* in mice impairs hematopoietic stem cell self-renewal, induces multiple defects in multilineage hematopoietic differentiation, and increases the incidence of hematologic malignancies.<sup>40,41</sup> Interestingly, structural inactivating alterations of *CREBBP* hamper its p53 acetylation function in some lymphoma subtypes.<sup>10</sup> As 11 of the downregulated miRNAs in our signature are related to p53<sup>refs 42,43</sup> and some of the downregulated miRNAs in our signature, such as miR-34a, are related to DNA damage response, we investigated a possible p53 downregulation in t(8;16) AML, but no differences in p53 mRNA levels in t(8;16) AML compared with other AML subtypes were observed. However, other mechanisms, such as acetylation and phosphorylation, can also affect p53 activity.<sup>44</sup> Interestingly, *MYST3-CREBBP* fusion protein has been described to inhibit p53-mediated transcription by decreasing p53 acetylation,<sup>36</sup> leading us to hypothesize that the infraexpression of p53-related miRNAs in our t(8;16) AML signature could be in part because of abnormal acetylation of p53. *CREBBP* mutations have also been found in acute lymphoblastic leukemia, where they impair histone acetylation and transcriptional regulation of *CREBBP* targets.<sup>10,11</sup> *MYST3* and *CREBBP* chromosomal rearrangements may deregulate acetylation, leading to a disruption in the balance between proliferation and differentiation during

hematopoiesis. This may contribute—at least in part—to the leukemogenic phenotype through epigenetic modifications caused by transcriptional deregulation.<sup>12</sup> In the present study, we have observed a re-expression of several miRNAs after treatment with a demethylating agent. Interestingly, this re-expression was higher when histone deacetylase inhibitor (TSA) was added to the demethylating agent (5'-AZA), leading us to speculate that acetylation can have an important role in our downregulated signature. This hypothesis is further supported by the fact that there were no differences in promoter methylation between t(8;16) AML and other cytogenetic subtypes. Previous studies analyzing gene methylation in AML have shown a correlation between determined molecular subtypes and the methylation profile, but not all AML subtypes were associated to a characteristic methylation pattern.<sup>45</sup> Although the experiments on miRNA re-expression after exposure to epigenetic modifying agents could be only performed in one patient due to the lack of additional available samples, we believe that our findings have potential physiopathological implications and warrant validation.

Other well-characterized fusion oncoproteins that arise from chromosomal translocations in AML have been associated with epigenetic silencing of miRNAs, such as miR-repression of miR-223 by AML1-ETO<sup>46</sup> and transcriptional repression of miR-210, miR-23 and miR-24 by PML-RARA.<sup>47</sup> Further study is warranted to clarify whether the fusion protein *MYST3-CREBBP* is responsible for the specific mechanisms involved in this epigenetic silencing.

*RET* proto-oncogene encodes one of the tyrosine kinase receptors that transduce signals for cell growth and differentiation. *RET* mutations have been associated with papillary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type IIA and IIB.<sup>13</sup> Moreover, *RET* may affect the differentiation or growth of hemopoietic cells.<sup>48,49</sup> Our group and others<sup>1,2</sup> have observed that *RET* mRNA is typically overexpressed in t(8;16) AML. In the present study, we have found that *RET* mRNA expression levels showed a strong inverse correlation with three miRNAs. In addition, four other miRNAs that are downregulated in our signature were also predicted to bind to the 3'-UTR region of *RET*. We therefore investigated if these downregulated miRNAs could explain *RET* overexpression. The Renilla-luciferase assay showed that miR-218, miR-128, miR-27b, miR-15a and miR-195 target *RET*, and these results were validated in two cell lines overexpressing *RET*, TPH-1 and HL-60. Transfection with these miRNAs produced a

significant downregulation of RET protein in both HL-60 (except miR-27b) and TPH1 (except miR-218 and miR-15a) cell lines. The differences of the specific miRNAs leading to RET downregulation observed between these two cell lines could be attributed to differences in baseline levels of RET protein and diversities in the accessibility to individual miRNA binding sites. These findings functionally validate for the first time the modulation of RET expression by several miRNAs characteristic of t(8;16) AML.

Our unique t(8;16) AML miRNA signature has confirmed the biologic uniqueness of this AML subtype. Its specific clinical features and distinct mRNA signature, together with the miRNA signature reported here indicate that despite its low incidence, t(8;16) AML deserves recognition as a distinct entity in the WHO classification.

In summary, t(8;16) AML harbors a specific miRNA signature characterized mainly by downregulation of multiple miRNAs, some of which are responsible for the high RET levels previously observed in this subtype. Finally, this miRNA signature may be the result of the deregulation of epigenetic machinery in leukemic cells, although the precise mechanisms involved remain to be elucidated.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Francesco Lo Coco and Dr Tiziana Ottone (Hospital Tor Vergata, Rome), Dr David Grimwade and Dr Adam Ivey (Guy's Hospital, London), and Dr Olga Salameo (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona) for kindly providing us with three additional cases of AML associated to translocation t(8;16). This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias/Instituto de Salud Carlos III PI080158, FIS-PI0900547 and N-2004-FS041085, and RETICS RD06/0020/0004. Marina Diaz-Beyá is supported by a 'Premi Fi de Residència Emili Letang' of the Hospital Clínic de Barcelona and Tania Díaz is an FI fellow supported by AGAUR, Generalitat de Catalunya and Fondo Social Europeo. Gerardo Ferrer is the recipient of a grant from 'Instituto de Salud Carlos III' (PFIS).

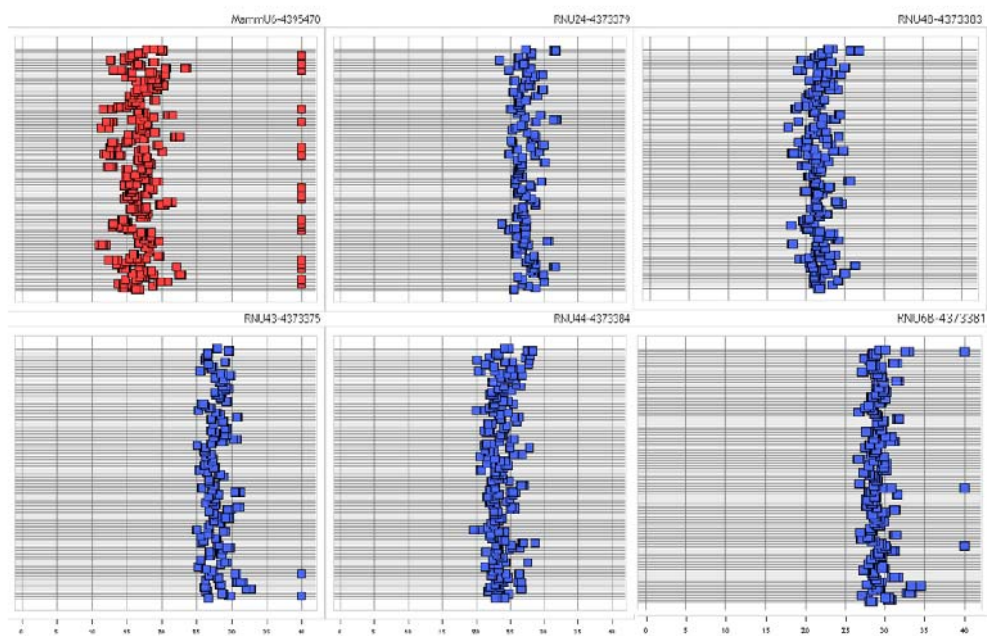
#### REFERENCES

- 1 Camos M, Esteve J, Jares P, Colomer D, Rozman M, Villamor N *et al*. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. *Cancer Res* 2006; **66**: 6947–6954.
- 2 Haferlach T, Kohlmann A, Klein HU, Ruckert C, Dugas M, Williams PM *et al*. AML with translocation t(8;16)(p11;p13) demonstrates unique cytological, cytogenetic, molecular and prognostic features. *Leukemia* 2009; **23**: 934–943.
- 3 Borrow J, Stanton Jr VP, Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS *et al*. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 1996; **14**: 33–41.
- 4 Champagn N, Pelletier N, Yang XJ. The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase. *Oncogene* 2001; **20**: 404–409.
- 5 Yang XJ, Ullah M. MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene* 2007; **26**: 5408–5419.
- 6 Chan EM, Chan RJ, Comer EM, Goulet 3rd RJ, Crean CD, Brown ZD *et al*. MOZ and MOZ-CBP cooperate with NF-kappaB to activate transcription from NF-kappaB-dependent promoters. *Exp Hematol* 2007; **35**: 1782–1792.
- 7 Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 13505–13508.
- 8 Blobel GA. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* 2000; **95**: 745–755.
- 9 Wadgaonkar R, Phelps KM, Haque Z, Williams AJ, Silverman ES, Collins T. CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1879–1882.
- 10 Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V *et al*. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011; **471**: 189–195.
- 11 Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA *et al*. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2011; **471**: 235–239.

- 12 Chen J, Odenike O, Rowley JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 23–36.
- 13 Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; **145**: 5448–5451.
- 14 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215–233.
- 15 Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 2008; **7**: 1545–1549.
- 16 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**: 281–297.
- 17 Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 2009; **60**: 167–179.
- 18 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D *et al*. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; **435**: 834–838.
- 19 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 857–866.
- 20 Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 597–610.
- 21 Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 2008; **7**: 2643–2646.
- 22 Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1148–1159.
- 23 Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008; **15**: 352–358.
- 24 Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F *et al*. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; **111**: 3183–3189.
- 25 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al*. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC: Lyon, France, 2008.
- 26 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**: 451–458.
- 27 Rozman M, Camos M, Colomer D, Villamor N, Esteve J, Costa D *et al*. Type I MOZ/CBP (MYST3/CREBBP) is the most common chimeric transcript in acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **40**: 140–145.
- 28 Fabbri M, Garzon R, Andreeff M, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Calin GA. MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. *Leukemia* 2008; **22**: 1095–1105.
- 29 He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernandez-Monge E, Mu D, Goodson S *et al*. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; **435**: 828–833.
- 30 Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulcyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell* 2010; **39**: 493–506.
- 31 Stark B, Resnitzky P, Jeison M, Luria D, Blau O, Avigad S *et al*. A distinct subtype of M4/M5 acute myeloblastic leukemia (AML) associated with t(8;16)(p11;p13), in a patient with the variant t(8;19)(p11;q13)—case report and review of the literature. *Leuk Res* 1995; **19**: 367–379.
- 32 Chaffanet M, Gressin L, Preudhomme C, Soenen-Cornu V, Birnbaum D, Pebusque MJ. MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **28**: 138–144.
- 33 Panagopoulos I, Teixeira MR, Micci F, Hammerstrom J, Isaksson M, Johansson B *et al*. Acute myeloid leukemia with inv(8)(p11q13). *Leuk Lymphoma* 2000; **39**: 651–656.
- 34 Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Samuelsson U, Billstrom R, Strombeck B *et al*. Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13). *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 395–404.
- 35 Glassman AB, Hayes KJ. Translocation (11;16)(q23;p13) acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Clin Lab Sci* 2003; **33**: 285–288.
- 36 Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y, Kitabayashi I. Monocytic leukemia zinc finger (MOZ) interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest. *J Biol Chem* 2009; **284**: 237–244.
- 37 Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T *et al*. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 2006; **20**: 1321–1330.
- 38 Thomas T, Corcoran LM, Gugasyan R, Dixon MP, Brodnicki T, Nutt SL *et al*. Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Genes Dev* 2006; **20**: 1175–1186.
- 39 Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 2000; **14**: 1553–1577.
- 40 Kung AL, Rebel VI, Bronson RT, Ch'ng LE, Sieff CA, Livingston DM *et al*. Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev* 2000; **14**: 272–277.
- 41 Rebel VI, Kung AL, Tanner EA, Yang H, Bronson RT, Livingston DM. Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 14789–14794.

### 3.3. Figuras suplementarias artículo 1

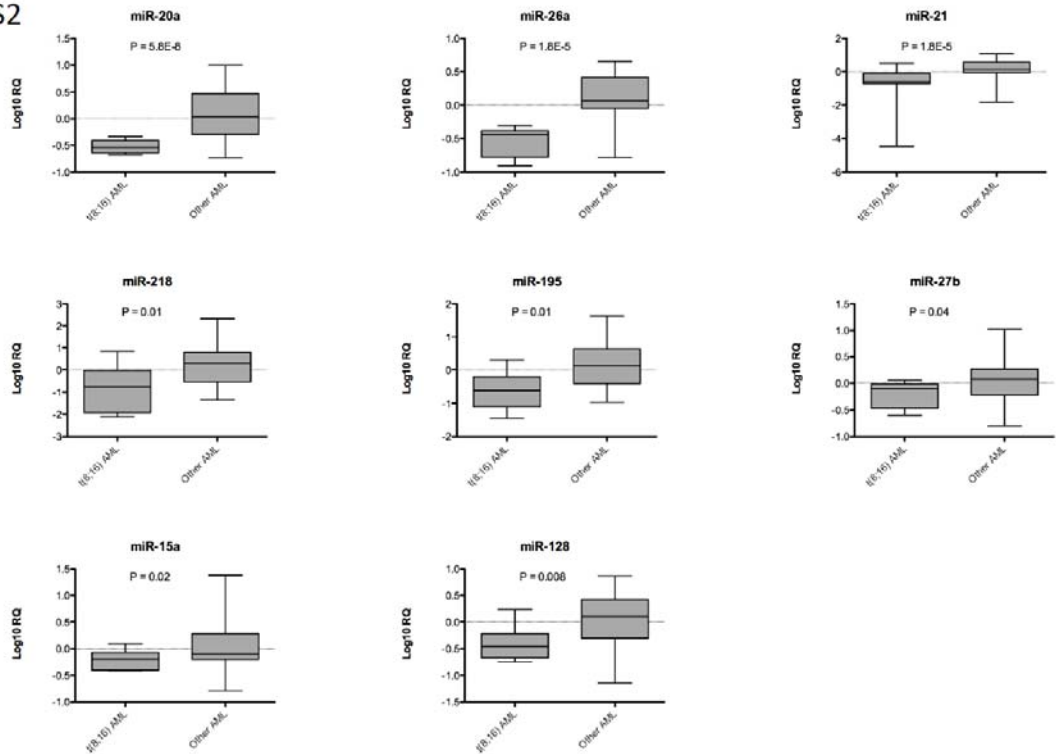
#### Supplementary Figure 1



**Figure S1. Endogenous control expression analysis.**

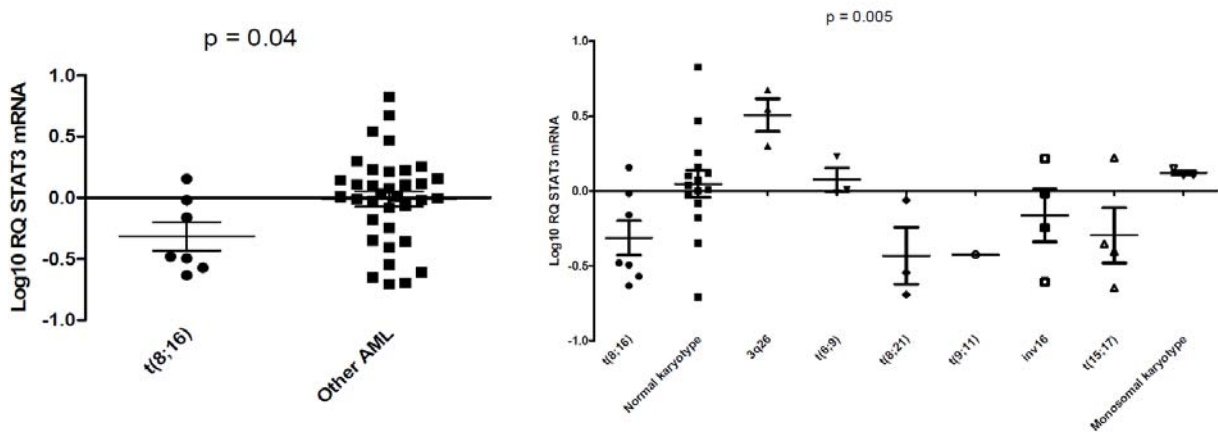
The expression level of all the endogenous controls in the TaqMan® Array Human MicroRNA Set Cards v2.0. RNU48 had the most stable expression in all samples

Figure S2



**Validation of the differential expression of miRNAs in the t(8;16) miRNA signature.** Ten miRNAs, including some of the most differentially expressed and those microRNA associated with *RET* target gene, were analyzed by a second method. Total RNA was amplified using miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR kit (Exiqon, Denmark) according to the manufacturer's recommendations LNA PCR primers from Exiqon were used for RT-PCR amplification and RNU 48 was used as endogenous control. Eight of these ten miRNAs were validated.

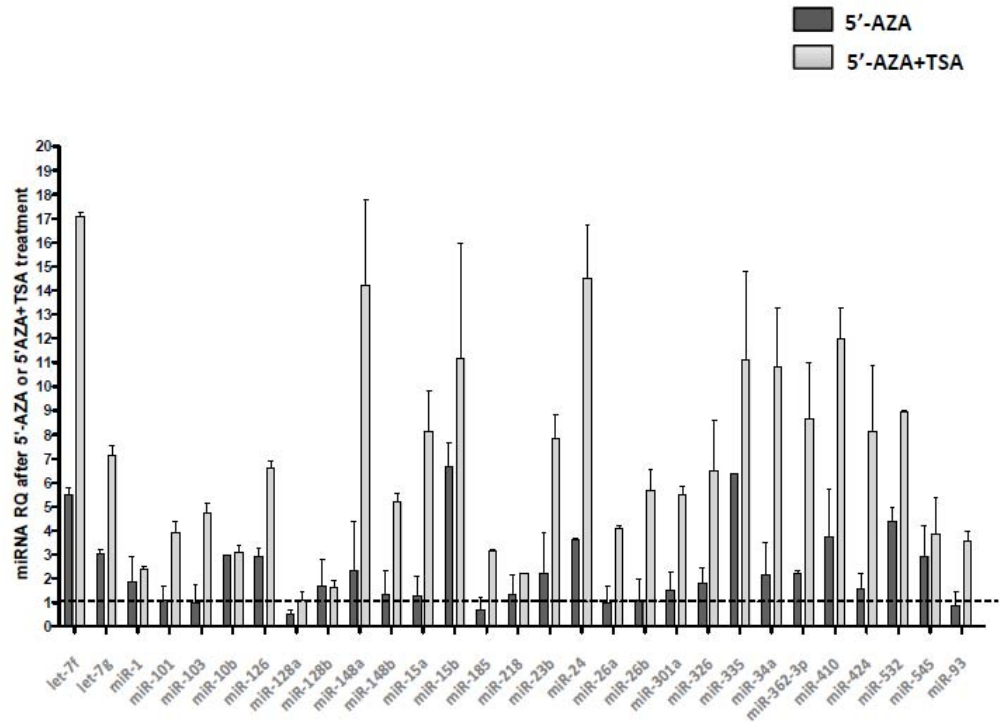
Figure S3



**Figure S3. Analysis of mRNA expression levels of STAT3.**

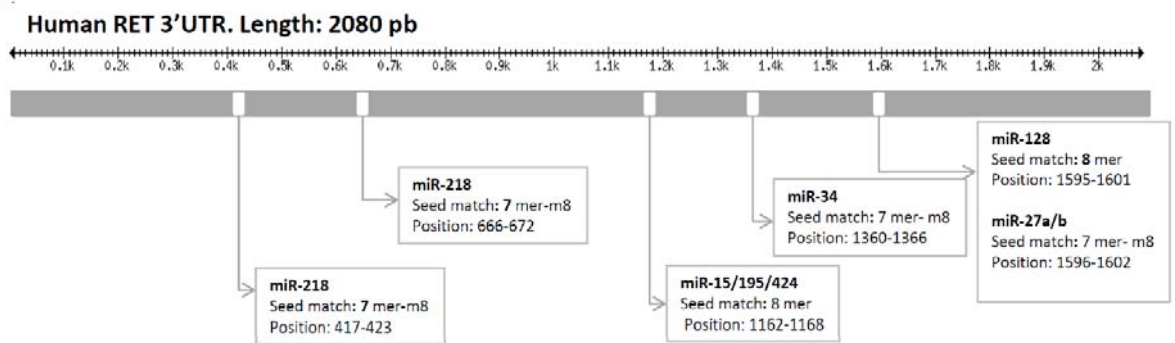
Comparison of quantitative expression level of STAT3 between t(8;16) and 36 additional AML samples by means of t-test analysis (A). ANOVA analysis of comparison of expression level of STAT3 (B) among well-defined AML groups.

**Figure S4**



Expression of miRNA after exposure to 5'-AZA-dc and 5'-AZA-dc plus TSA was analyzed in 29 miRNAs of the t(8;16) AML signature selected by the presence of CpG islands in their promoter regions. Interestingly, miRNA levels were re-expressed more than 2-fold change in 27 of these 29 miRNAs when treated with 5'-AZA-dc plus TSA. These data are shown as mean  $\pm$  SEM of three independent replicates.

**Figure S5**



Schematic representation of the *RET* 3' UTR region, with predicted binding sites for miR-218, miR-15, miR-195, miR-424, miR-34, miR-128 and miR-27a/b.

**Table S1.** Classification according to WHO 2008 criteria of 120 patients in this study

<b>WHO-2008 category</b>	<b>n=120</b>
<b>AML with recurrent genetic abnormalities</b>	
- AML with t(8;21)(q22;q22)/ <i>RUNX1-RUNXT1</i>	3
- AML with inv(16) or t(16;16)(p13;q22)/ <i>CBFβ-MYH11</i>	2
- Acute promyelocytic leukemia [t(15;17) & <i>PML-RAR-α</i> ]	4
- AML with t(9;11)(p22;q23)/ <i>AF9(MLLT3)-MLL</i>	2
- AML with t(6;9)(p23;q34)/ <i>DEK-CAN(NUP214)</i>	8
- AML with inv(3) or t(3;3)(q21;q26)/ <i>RPN1-EVI1</i>	3
- AML with mutated <i>NPM1</i>	42
- AML with normal karyotype and <i>CEBPA</i> mutation	11
<b>AML with myelodysplasia-related changes</b>	11
<b>AML, NOS</b>	
- AML with minimal differentiation	0
- AML without maturation	14
- AML with maturation	5
- Acute myelomonocytic leukemia	11
- Acute monoblastic & monocytic leukemia	4

### 3.4. Resumen de artículo 2

Artículo 2: "Los microRNAs añaden información pronóstica relevante a la categorización molecular en la leucemia mieloide aguda de riesgo citogenético intermedio "

La LMA es una enfermedad heterogénea cuyo tratamiento óptimo varía de acuerdo a los factores de riesgo citogenéticos y los marcadores moleculares. Varios estudios han demostrado la importancia pronóstica de los miRNAs en LMA. En este trabajo analizamos en una serie de 238 pacientes con LMA de riesgo citogenético intermedio (LMA-RI) que provienen de 16 instituciones que forman parte del grupo cooperativo CETLAM, la asociación entre la expresión de algunos miRNAs y el pronóstico clínico. En primer lugar mediante el estudio de expresión de 670 miRNAs en un subgrupo de 85 pacientes de LMA-RI que provenían de una sola institución identificamos 10 miRNAs con valor pronóstico. Posteriormente validamos estos 10 miRNAs mediante ensayos individuales en toda la cohorte (n=288) confirmando el impacto pronóstico de 4 miRNAs. Niveles altos de miR-196b y miR-644 se asociaron de manera independiente con una supervivencia acortada y niveles bajos de miR-135a y miR-409-3p se asociaron con un mayor riesgo de recaída. De manera interesante miR-135a y miR-409-3p mantuvieron su valor pronóstico independiente dentro del subgrupo molecular de mal pronóstico (*NPM1* no mutado y *CEBPA* no mutado y/o *FLT3-ITD*), y miR-644 mantuvo su valor pronóstico en el subgrupo molecular favorable. En conclusión, en el presente trabajo se han identificado 4 miRNAs con valor pronóstico en LMA-RI, y que además añaden información pronóstica adicional a los marcadores moleculares.





## ORIGINAL ARTICLE

## MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia

M Díaz-Beyá<sup>1,2</sup>, S Brunet<sup>2,3</sup>, J Nomdedéu<sup>2,4</sup>, R Tejero<sup>5</sup>, T Díaz<sup>5</sup>, M Pratcorona<sup>1,2</sup>, M Tormo<sup>6</sup>, JM Ribera<sup>7</sup>, L Escoda<sup>8</sup>, R Duarte<sup>9</sup>, D Gallardo<sup>10</sup>, I Heras<sup>11</sup>, MP Queipo de Llano<sup>12</sup>, J Bargay<sup>13</sup>, M Monzo<sup>3</sup>, J Sierra<sup>2,3</sup>, A Navarro<sup>5,14</sup> and J Esteve<sup>1,2,14</sup> on behalf of the Cooperative AML group CETLAM (Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias)

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous disease, and optimal treatment varies according to cytogenetic risk factors and molecular markers. Several studies have demonstrated the prognostic importance of microRNAs (miRNAs) in AML. Here we report a potential association between miRNA expression and clinical outcome in 238 intermediate-risk cytogenetic AML (IR-AML) patients from 16 institutions in the CETLAM cooperative group. We first profiled 670 miRNAs in a subset of 85 IR-AML patients from a single institution and identified 10 outcome-related miRNAs. We then validated these 10 miRNAs by individual assays in the total cohort and confirmed the prognostic impact of 4 miRNAs. High levels of miR-196b and miR-644 were independently associated with shorter overall survival, and low levels of miR-135a and miR-409-3p with a higher risk of relapse. Interestingly, miR-135a and miR-409-3p maintained their independent prognostic value within the unfavorable molecular subcategory (wild-type NPM1 and CEBPA and/or FLT3-ITD), and miR-644 retained its value within the favorable molecular subcategory. miR-409-3p, miR-135a, miR-196b and miR-644 arose as prognostic markers for IR-AML, both overall and within specific molecular subgroups.

*Leukemia* advance online publication, 18 October 2013; doi:10.1038/leu.2013.281

**Keywords:** miRNA; AML; miR-135a; miR-196b; miR-409-3p; miR-644

## INTRODUCTION

The biological heterogeneity of acute myeloid leukemia (AML) results in a markedly diverse prognosis and highly differential sensitivity to current standard therapy. The most accurate prognostic stratification is based on cytogenetics, further refined with the analysis of several gene<sup>1–4</sup> mutations. In intermediate-risk cytogenetic AML (IR-AML), the largest subset of AML representing ~50% of all AML patients, the analysis of mutations of *NPM1*, internal tandem duplication of *FLT3* (FLT3-ITD) and *CEBPA* define molecular subcategories with different biological risk and diverse outcomes.<sup>2,4</sup> Therefore, many current AML treatment protocols adapt their therapeutic algorithm to this biological risk. Nonetheless, despite several attempts to precise stratification based on these molecular subcategories, the prognosis of many patients with IR-AML is still uncertain and the optimal post-remission therapy is unclear.

Several studies have shown the importance of microRNA (miRNA) deregulation in AML.<sup>5–7</sup> Distinctive miRNA profiles have been identified corresponding to specific cytogenetic subtypes, such as

AML associated with translocation t(8;21), t(15;17), inv(16), *MLL*-rearranged AML<sup>8,9</sup> or translocation t(8;16).<sup>10</sup> Moreover, specific miRNA signatures have been associated with mutations<sup>11</sup> of *NPM1*,<sup>9,12</sup> *FLT3*,<sup>9,13</sup> and *CEBPA*.<sup>8–10,14–16</sup> From the prognostic standpoint, some studies have identified several miRNAs associated with clinical outcome.<sup>11</sup> Three different studies, which included heterogeneous cytogenetic AML cohorts, identified that expression levels of miR-191 and miR-199a,<sup>15</sup> miR-196b<sup>17</sup> and miR-212<sup>18</sup> were associated with overall survival (OS). In patients with normal cytogenetics AML (CN-AML) and high-risk molecular features, a 12-miRNA prognostic signature was proposed by the CALGB group; this signature included five members of the miR-181 family.<sup>15</sup> Later, the individual prognostic value of miR-181a was confirmed in a cohort of CN-AML patients by the same group.<sup>19</sup> More recently, it has been demonstrated that *miR-3151* interplays with its host gene *BAALC* and independently affects the outcome of CN-AML patients equal or older than 60 years.<sup>20</sup>

Given the relevant regulatory role of miRNAs in hematopoiesis<sup>21,22</sup> and their deregulated expression in hematological

<sup>1</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>José Carreras Leukemia Research Institute (IJC), Barcelona, Spain; <sup>3</sup>Hematology Service, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Banc de Sang i Teixits de Catalunya, Spain; <sup>4</sup>Laboratory of Hematology Service, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Hematology Department, Hospital Clínic, Valencia, Spain; <sup>7</sup>Hematology Department, Catalan Institute of Oncology (ICO), Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; <sup>8</sup>Hematology Department, Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain; <sup>9</sup>Department of Hematology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Spain; <sup>10</sup>Hematology Department, Catalan Institute of Oncology (ICO), Girona, Spain; <sup>11</sup>Department of Hematology, University Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain; <sup>12</sup>Department of Hematology, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain and <sup>13</sup>Department of Hematology, Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Spain. Correspondence: Dr J Esteve, Hematology Department, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona, 08036, Spain. E-mail: jesteve@clinic.ub.es

This research was presented in part as an oral presentation at the 53rd annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego, CA, USA, December, 2011 and selected for highlights of ASH 2011.

<sup>14</sup>These authors share the senior authorship.

Received 4 June 2013; revised 9 August 2013; accepted 13 September 2013; accepted article preview online 27 September 2013

malignancies,<sup>23–26</sup> including AML, we have analyzed their prognostic value in a large cohort of patients with IR-AML treated within the Spanish cooperative group CETLAM (Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias). We first screened a subset of these patients for the expression of 670 miRNAs and identified a set of individual miRNAs with prognostic value. We then evaluated these miRNAs in the entire cohort of patients and in recognized molecular subcategories. We identified four miRNAs that add relevant prognostic information to the current molecular stratification of IR-AML patients.

**MATERIALS AND METHODS**

**Patients and treatment**

We selected patients with untreated, *de novo* IR-AML according to the Medical Research Council classification<sup>3</sup> and with available samples at diagnosis for miRNA analysis. The analysis included 238 patients from 16 centers of the CETLAM group with a median follow-up of 33 months (range 2–159 months); the main characteristics of these patients are summarized in Table 1.

All patients were treated in consecutive CETLAM trials from 1994 to 2009 based on intensive chemotherapy for fit patients. The majority of patients were included in protocol AML-03 (*n* = 202, 84%). Briefly, the remission induction regimen in protocols AML-99 and AML-03 consisted of one or two courses of idarubicin, intermediate-dose cytarabine and VP-16, with or without priming with granulocyte colony-stimulating factor, respectively, whereas the induction regimen of AML-94 was idarubicin, standard-dose cytarabine and etoposide. All patients achieving complete response

(CR) received an additional course of chemotherapy with mitoxantrone and high-dose cytarabine and, afterwards, a transplant decision was made. In protocols AML-99 and 2003, an autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) was planned for patients harboring a normal karyotype without additional risk factors, whereas an allogeneic HSCT (alloHSCT) in first CR (CR1) was recommended for the remaining patients with an available donor. Risk factors considered for risk assignment were the need for two induction courses to achieve CR, detectable minimal residual disease by flow cytometry (AML-03) and presence of *FLT3*-ITD (AML-03). In AML-94, post-remission strategy (autologous vs alloHSCT) depended exclusively on the availability of a human leukocyte antigen-identical sibling.

**Molecular analysis**

*NPM1* and *FLT3*-ITD mutations were assessed on genomic DNA as previously described<sup>27,28</sup> with labeled primers and analyzed by fragment analysis (3130XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *CEBPA* mutations were analyzed as previously described.<sup>14,29</sup>

**RNA extraction**

Samples were obtained from bone marrow aspirates in 226 (95%) patients and from peripheral blood, with a minimum blast infiltration of 80%, in the remaining 12 patients. Mononuclear cells were purified by Ficoll density gradient centrifugation and total RNA was isolated using Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Paisley, UK). All patients provided their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the Ethics Committee of each participating institution approved the study.

**miRNA quantification**

We had previously performed a comprehensive miRNA expression analysis, comprising 670 mature human miRNAs, in tumor samples from 85 IR-AML patients from the Hospital Clinic of Barcelona, median follow-up 67 months (range 2–159 months)<sup>10</sup> using TaqMan Array Human MicroRNA Set Cards v2.0 (Applied Biosystems). In the present study, we first correlated miRNA expression in this cohort of 85 patients with clinical outcome in order to select a group of miRNAs with potential prognostic value. These miRNAs were subsequently analyzed in the entire cohort of 238 patients by individual assays. Ten nanograms of total RNA was used for each miRNA quantification. TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems) for miR-644, miR-196b, miR-409-3p, miR-135a, let-7a\*, miR-23a\*, miR-627, miR-200c, miR-23b and miR-361-3p were used as previously described<sup>30</sup> in an Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. Relative quantification was calculated using 2<sup>-ΔΔCt</sup>. Normalization was performed with RNU48 as this miRNA was found to be the most stably expressed in all the samples. We used the median expression value in normal CD34+ cells as calibrator.

**Identification of miRNAs with prognostic value**

Data obtained from our previously identified miRNA profile<sup>10</sup> were analyzed using BRB Array Tools version 3.5.0 software (Richard Simon & BRB-ArrayTools Development Team, <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA), SPSS v.15.0 (Chicago, IL, USA), and R software version 2.13.0 (The R Foundation for Statistical Computing c/o Institute for Statistics and Mathematics, Wirtschaftsuniversität Wien, <http://www.r-project.org/>). The Survival Analysis Tool from BRB Array tools was used to identify miRNAs whose expression correlated with survival.<sup>31</sup> This method fits proportional hazards models relating survival to each miRNA, one miRNA at a time, and computes the *P*-value for each miRNA for testing the hypothesis that survival time is independent of the expression level for that particular miRNA. This method uses the Cox proportional hazards model and the Efron method of handling ties. This latter method is a regression model in which the hazard function for an individual is a function of predictor variables; the predictor variables are introduced as log expression levels.

Kaplan–Meier survival curves were then drawn for all miRNAs predicted to show a survival risk either above or below average risk, using cutoff points of miRNA expression levels identified by MaxStat package of R software.

**Table 1.** Main clinical characteristics of patients from the discovery cohort (*n* = 85) and the overall series (*n* = 238) included in the study

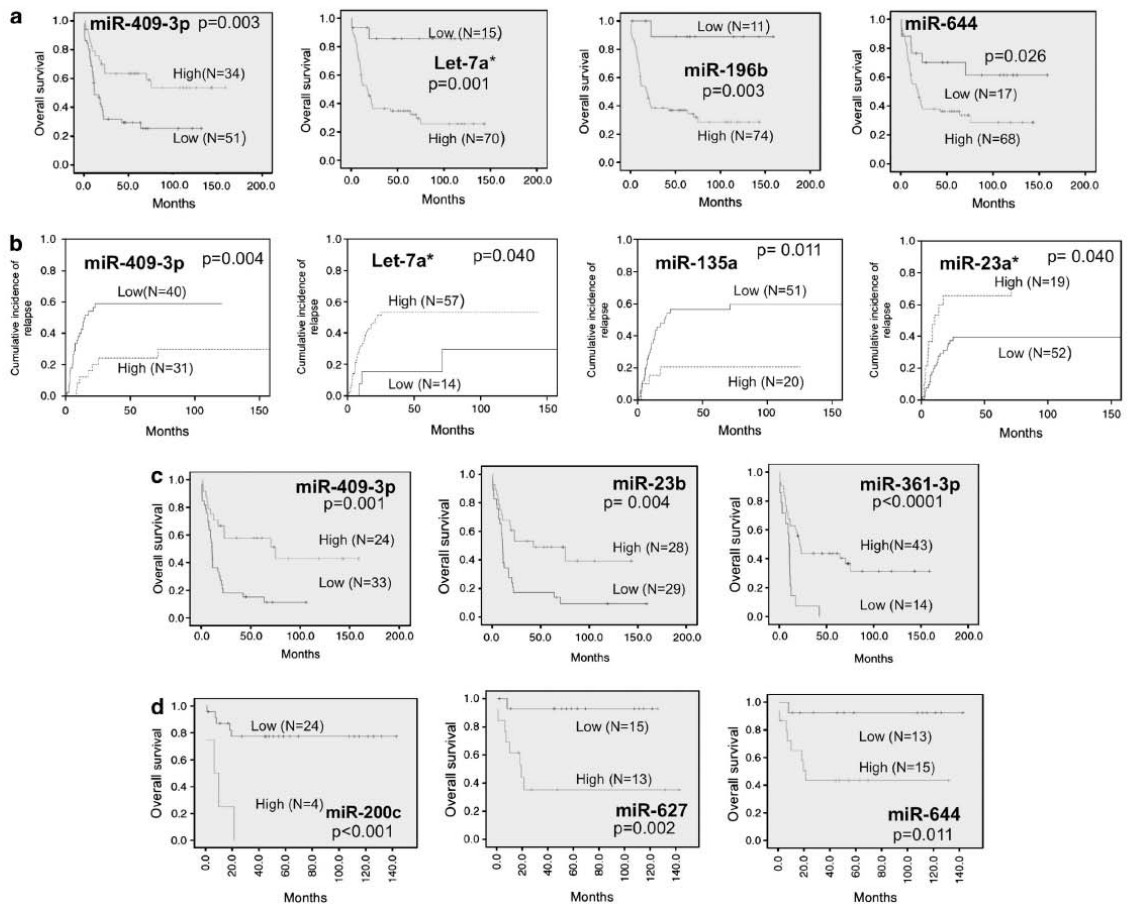
	Discovery cohort <i>n</i> = 85	Overall series <i>n</i> = 238
Year of diagnosis (range)	1994-2009	1994-2009
Gender <i>n</i> (%)		
Male	44 (52%)	121 (51%)
Female	41(48%)	117 (49%)
Median age, years (range)	52 (18–71)	52 (18–73)
Leukocyte count at diagnosis, × 10 <sup>9</sup> /L median (range)	47 (1–408)	28 (0.7–408)
<i>FAB</i> subtype ( <i>n</i> )		
M0	2	13
M1	29	57
M2	10	40
M4	21	59
M5	23	57
M6	0	10
M7	0	2
<i>Cytogenetics</i> <i>n</i> (%)		
Normal karyotype	61 (72%)	173 (72%)
Other intermediate-risk	24 (28%)	65 (28%)
<i>Molecular features</i> <i>n</i> (%)		
<i>NPM1</i> mutation	43 (50%)	102 (43%)
<i>FLT3</i> -ITD	37 (43%)	82 (34%)
<i>CEBPA</i> biallelic mutation	7 (8%)	17 (10%)
<i>Therapeutic protocol (CETLAM group)</i>		
AML-94	9 (10%)	9 (4%)
AML-99	29 (34%)	29 (12%)
AML-2003	47(56%)	202 (84%)
<i>Outcome</i>		
Complete response to induction regimen	84%	81%
Overall survival (5 years)	43 ± 11%	44 ± 8%
Risk of relapse (5 years)	55 ± 14%	42 ± 7%

Definitions of clinical end points and statistical methods

OS was calculated from diagnosis to death and estimated with the method of Kaplan and Meier. Comparison of OS between groups of patients was performed with log-rank test. Risk of relapse (RR) was calculated from CR to relapse and estimated using the cumulative incidence method computed with the *cmprsk* package for R 2.12 software. The competing event in the RR analysis was death without relapse. Comparison of RR between groups of patients was performed using the Gray test.<sup>32</sup> Characteristics between groups were compared using the  $\chi^2$ -test and Fisher's exact test, when applicable, for categorical variables, and *t*-test for continuous variables, respectively. A multivariate analysis for OS was performed using the Cox proportional hazards model including age, white blood cell count at diagnosis, mutational status of *NPM1*, *FLT3*-ITD and *CEBPA* biallelic mutation and all miRNAs with statistical significance. A multivariate analysis for RR was performed using the subdistribution regression model of Fine and Gray<sup>33</sup> with the *cmprsk* package. The proportional hazard assumption was tested for each variable by analyzing the Schoenfeld residuals. The multivariate analysis for achievement of a complete remission was performed by binary logistic regression. The Mantel–Byar test was performed using *RcmdrPlugin.EZR* from R software.<sup>34</sup>

RESULTS

Screening and identification of miRNAs with prognostic value  
In a previous study of our group,<sup>10</sup> we had examined the overall expression level of 670 miRNAs in three samples of bone marrow CD34+ cells from healthy donors and from 120 patients diagnosed with AML from our institution, including 85 patients with IR-AML. The main characteristics and outcome of this cohort of patients is presented in Table 1. In the present study, we have analyzed the prognostic value of the expression level of these miRNAs, within the cytogenetic intermediate-risk category, performing a multivariate permutations test with the Survival Analysis package from BRB Array Tools. Using the cutoff level obtained with the MaxStat package, we performed a univariate analysis and identified 10 different miRNAs associated with outcome, either in all 85 patients or in one of the molecularly defined subcategories. Eight miRNAs were significantly related to OS (miR-409-3p, miR-let-7a\*, miR-196b, miR-644, miR-23b, miR-361-3p, miR-200c and miR-627) and four miRNAs (miR-409-3p, miR-let-7a\*, miR-135a and miR-23a\*) were related to RR (Figure 1).



**Figure 1.** Univariate analysis of miRNAs related to prognosis in IR-AML in the initial screening in the discovery cohort of 85 patients from the Hospital Clinic of Barcelona. **(a)** OS of patients according to expression levels of miR-409-3p, miR-let-7a\*, miR-196b and miR-644. **(b)** Cumulative incidence of relapse according to expression levels of miR-409-3p, miR-let-7a, miR-135a and miR-23a\*. **(c)** Survival of patients according to expression levels of miR-409-3p, miR-23b and miR-361-3p in the unfavorable molecular subcategory (wild-type *NPM1* and *CEBPA* and/or *FLT3*-ITD). **(d)** Survival of patients according to expression levels of miR-200c, miR-627 and miR-644 in the favorable molecular subcategory (mutated *NPM1* or *CEBPA* without *FLT3*-ITD).

These ten miRNAs (let-7a\*, miR-23a\*, miR-23b, miR-135a, miR-196b, miR-200c, miR-361-3p, miR-409-3p, miR-627 and miR-644) were selected to be examined by individual assays in the entire cohort of 238 patients from the cooperative group CETLAM (Table 1). A flowchart describing all the steps performed for these analyses is depicted in Supplementary Figure 1.

miR-196b and miR-644 have prognostic value in OS

After analyzing the expression level of these 10 selected miRNAs in the overall series of 238 AML patients, only two miRNAs, miR-196b and miR-644, showed prognostic value in term of OS. Using the cutoff level with maximum discriminative value obtained with the MaxStat package of R, patients were classified in two groups with different outcome according to their miR-196b and miR-644 levels (Figures 2a and b, respectively). Patients with either a high miR-644 or miR-196b expression showed a shorter OS (5-year OS: 39 ± 7% vs 63 ± 19%,  $P=0.041$ ; 37 ± 9.8% vs 48 ± 10%,  $P=0.014$ , respectively; Figures 2c and d, respectively).

No significant differences in the proportion of alloHSCT performed in first CR according to miRNA-644 (25% vs 23% in patients with low and high expression, respectively,  $P=0.8165$ ) and miR-196b (21% vs 26% in patients with low and high expression, respectively,  $P=0.3749$ ) expression level were observed.

A decreased expression of miR-196b was associated with biallelic *CEBPA* mutation, with 71% of patients with biallelic *CEBPA* mutation showing a decreased expression of miR-196b ( $P<0.001$ ). Moreover, low miR-196b expression correlated with the absence of *FLT3*-ITD ( $P<0.001$ ) and *NPM1* mutations ( $P<0.001$ ). On the contrary, we did not identify any molecular feature related to miR-644 expression level. The prognostic value of both miRNAs was analyzed in a multivariate analysis adjusting for main clinical and hematological variables (see Statistical methods) and both miR-196b (odds ratio (OR): 0.42, 95% confidence interval (CI): 0.19–0.94;  $P=0.036$ ) and miR-644 (OR: 0.51, 95% CI: 0.51–0.85;  $P=0.004$ ) retained its prognostic value, together with age, leukocyte at diagnosis, *NPM1* mutation and *FLT3*-ITD (Table 2).

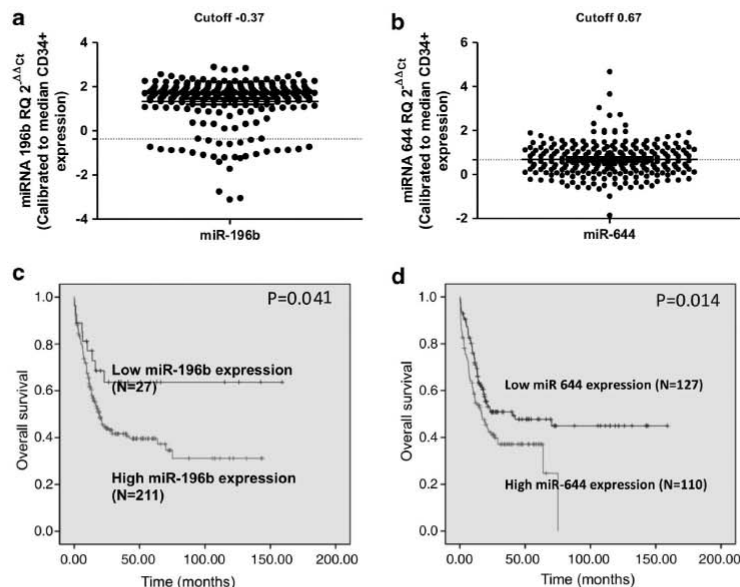
In addition, miR-644 was the only miRNA whose level measure was predictive of achievement of a complete remission, with patients with lower levels showing a higher response rate compared with patients with higher miR-644 levels (87.4% vs 76.3%,  $P=0.008$ ). Analyzing variables associated to response by means of multivariate binary logistic regression, miR-644 expression confirmed its independent prognostic value (OR = 5.64, 95% CI: 2.67–15.35,  $P=0.001$ ) together with *NPM1* wild-type configuration (OR = 0.30, 95% CI: 0.10–0.86,  $P=0.031$ ) and lower white blood cell count (OR = 0.991, 95% CI: 0.984–0.99;  $P=0.006$ ).

miR-135a and miR-409-3p level are related to relapse risk

Two miRNAs, miR-135a and miR-409-3p, were associated to RR. Using the cutoffs identified by the MaxStat package of R, two groups of patients with different outcome were identified according to miR-135a and miR-409-3p levels (Figures 3a and b, respectively). Patients with low expression levels of miR-135a were associated with a higher cumulative incidence of relapse at 5 years ( $P=0.00032$ ; 47 ± 9% vs 13 ± 11%; Figure 3c). A positive association between higher levels of miR-135a and *NPM1* mutation status was observed ( $P<0.001$ ). Low levels of miR-409-3p identified a subset of patients with higher cumulative incidence of relapse at 5 years ( $P=0.04103$ ; 46 ± 11% vs 33 ± 10%; Figure 3d). An association between low levels of miR-409-3p and *NPM1* mutations ( $P<0.001$ ), *FLT3*-ITD ( $P<0.001$ ) and high white blood cell count ( $P<0.001$ ) were observed.

When we performed a multivariate analysis for RR including *NPM1* status, *FLT3*-ITD status, age, white blood cell count, levels of miR-135a and miR-409-3p, higher miR-135a expression levels retained its favorable prognostic value (OR: 0.23; 95% CI: 0.08–0.62;  $P=0.0038$ ), together with the absence of *FLT3*-ITD. *NPM1* mutation and miR-409-3p (OR: 0.067; 95% CI: 0.37–1.03;  $P=0.06$ ) showed a trend to statistical significance (Table 2).

miRNAs with prognostic value within IR-AML molecular subcategories  
The presence or absence of *FLT3*-ITD, *NPM1* and *CEBPA* mutations allow stratification of patients with IR-AML into distinct prognostic categories.<sup>2,4</sup> Thus, patients with *NPM1* mutation without *FLT3*-ITD



**Figure 2.** miRNAs associated with survival in the entire cohort. The expression level range of (a) miR-196b and (b) miR-644, with the cutoff with prognostic value for each miRNA. Kaplan and Meier curves for OS according to (c) miR-196b and (d) miR-644 expression levels.

or biallelic *CEBPA* mutations, corresponding to the favorable genetic group of European LeukemiaNet, have a better outcome (favorable molecular subcategory), whereas those patients harboring *FLT3*-ITD and/or lacking *NPM1* and *CEBPA* mutations, grouped in the intermediate-I and intermediate-II genetic groups of European LeukemiaNet, have a worse prognosis (unfavorable

molecular subcategory). In order to elucidate the contribution of miRNAs expression on prognosis of IR-AML, we analyzed the specific impact of more relevant miRNAs in these two molecular subcategories of IR-AML.

One-hundred and sixty-seven patients of this series belonged to the unfavorable molecular subcategory. In this group, we found that patients with low levels of miR-409-3p (using the same cutoff than that in the overall series) had shorter 5-year OS ( $P=0.056$ ;  $21 \pm 11\%$  vs  $38 \pm 11\%$ , Figure 4a). In the multivariate analysis, miR-409-3p expression retained its prognostic value together with age, *FLT3*-ITD and *NPM1* (Table 2). In addition, in this molecular category, low miR-409-3p ( $P=0.002$ ;  $60 \pm 14\%$  vs  $37 \pm 12\%$ ) and low miR-135a expression (using the same cutoff point than that in the overall series) conferred a higher RR ( $P<0.001$ ;  $56 \pm 10\%$  vs  $13 \pm 14\%$ ), as observed in the overall series (Figures 4b and c, respectively). In the multivariate analysis, both miR-135a and miR-409-3p emerged as the only independent prognostic factors for RR (Table 2).

Among the 71 patients belonging to the favorable molecular subcategory, those with high miR-644 expression had shorter 5-year OS ( $74 \pm 11\%$  vs  $45 \pm 10\%$ ;  $P=0.023$ ; Figure 4d) similar to the overall IR-AML group.

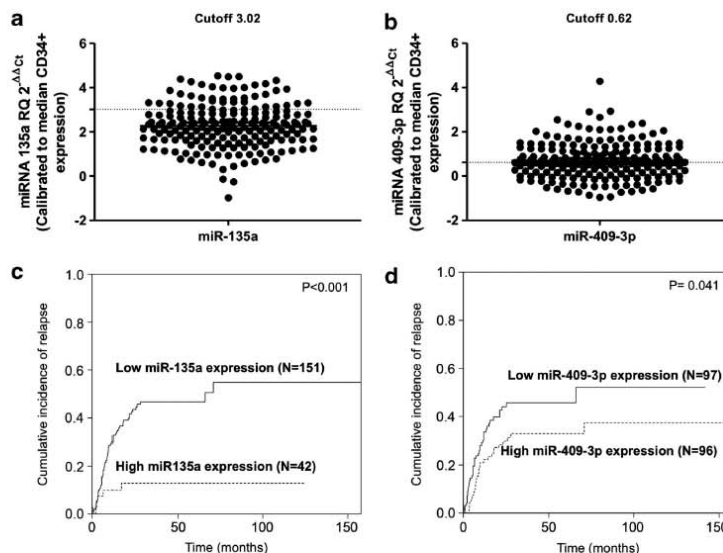
Outcome according to the expression of four miRNA in combination and the effect of post-remission therapy

Given the prognostic value shown by the expression level of miR-196b, miR-644, miR-135a and miR-409-3p as individual markers, we then constructed a miRNA risk score based on the effect of these miRNAs in combination that could identify prognostic subgroups of IR-AML patients. We then evaluated the effect of post-remission treatment in each of these subgroups. In order to increase the clinical applicability of the miRNA risk score, we restricted the analysis to patients  $\leq 60$  years. High miR-196b and miR-644 expression and low miR-135a and miR-409-3p were defined as high-risk factors. Patients were classified into three groups according to the number of high-risk factors: low-risk miRNA score, 0–1 factor; intermediate-risk miRNA score, 2–3 factors; and high-risk miRNA score, 4 factors. RR at 5 years for the

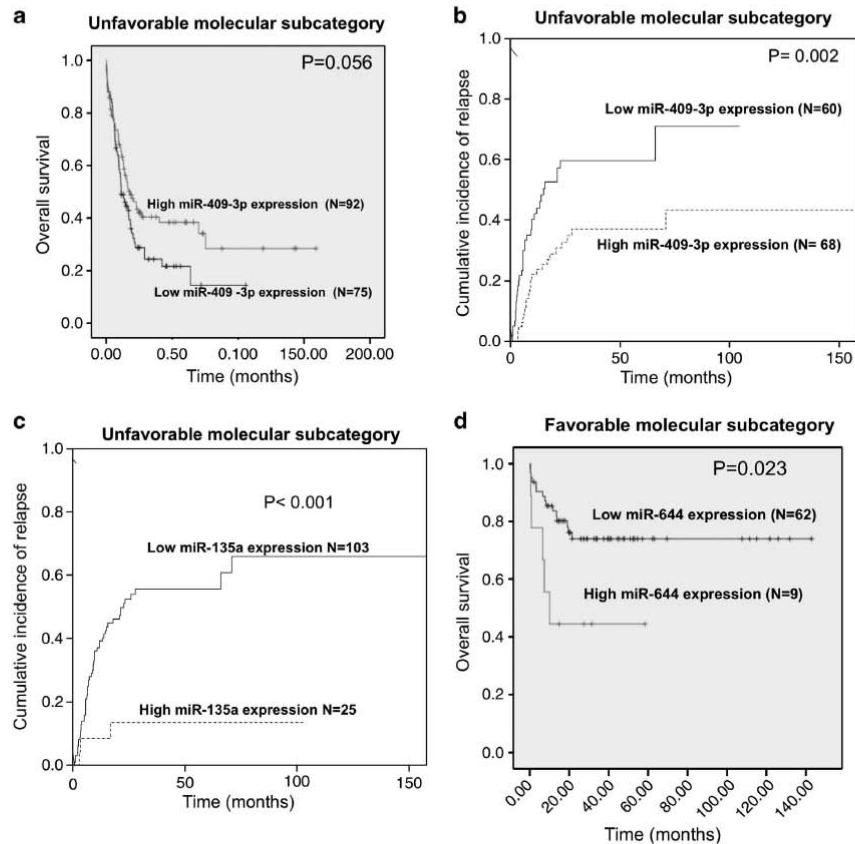
**Table 2.** Summary of multivariate analyses for survival and relapse risk both in the overall series of patients and in the molecularly unfavorable subcategory

Variables in the final model	P	OR	95% CI
<b>Multivariate analysis for OS in the overall series</b>			
Age	0.004	1.027	1.009–1.046
WBC	<0.001	1.007	1.003–1.010
<i>CEBPA</i> biallelic mutated	0.519	0.71	0.251–2.008
<i>FLT3</i> -ITD	0.002	2.167	1.329–3.536
<i>NPM1</i> mutated	0.024	0.562	0.341–0.927
miR-196b level (low vs high)	0.036	0.424	0.190–0.947
miR-644 level (low vs high)	0.004	0.512	0.325–0.805
<b>Multivariate analysis for RR in the overall series</b>			
Age	0.25	1.01	0.9924–1.029
WBC	0.41	0.99	0.9930–1.003
<i>FLT3</i> -ITD	0.011	1.93	1.1595–3.220
<i>NPM1</i> mutated	0.07	0.62	0.3713–1.052
miR-135a levels (high vs low)	0.003	0.23	0.0863–0.624
miR-409 levels (high vs low)	0.067	0.62	0.3762–1.033
<b>Multivariate analysis for OS in the unfavorable molecular subcategory</b>			
Age	0.000	1.033	1.016–1.049
WBC	0.24	1.002	0.999–1.004
<i>FLT3</i> -ITD	0.002	2.218	1.350–3.642
<i>NPM1</i> mutated	0.020	0.534	0.316–0.904
miR-409-3p level (high vs low)	0.052	0.6644	0.4405–1.003
<b>Multivariate analysis for RR in the unfavorable molecular subcategory</b>			
Age	0.22	1.014	0.9921–1.036
WBC	0.47	1.002	0.9973–1.006
<i>FLT3</i> -ITD	0.76	1.1337	0.4990–2.5773
<i>NPM1</i> mutated	0.84	0.9099	0.3736–2.215
miR-135a (high vs low)	0.0039	0.146	0.0396–0.540
miR-409-3p level (high vs low)	0.0035	0.397	0.2136–0.738

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio; OS, overall survival; RR, risk of relapse; WBC, white blood cell count.



**Figure 3.** miRNAs associated with the RR in the entire cohort. The expression level range of (a) miR-135a and (b) miR-409-3p, with the cutoff with prognostic value for each miRNA. (c) and (d) show the cumulative incidence of relapse according to (c) miR-135a and (d) miR-409-3p expression levels.



**Figure 4.** miRNAs with prognostic value within molecularly defined subcategories. In the unfavorable molecular subcategory, lower miR-409-3p expression was associated with **(a)** shorter OS and **(b)** higher RR, and **(c)** lower miR-135a expression was associated with a higher RR. **(d)** In the favorable molecular subcategory, lower miR-644 expression was associated with longer OS.

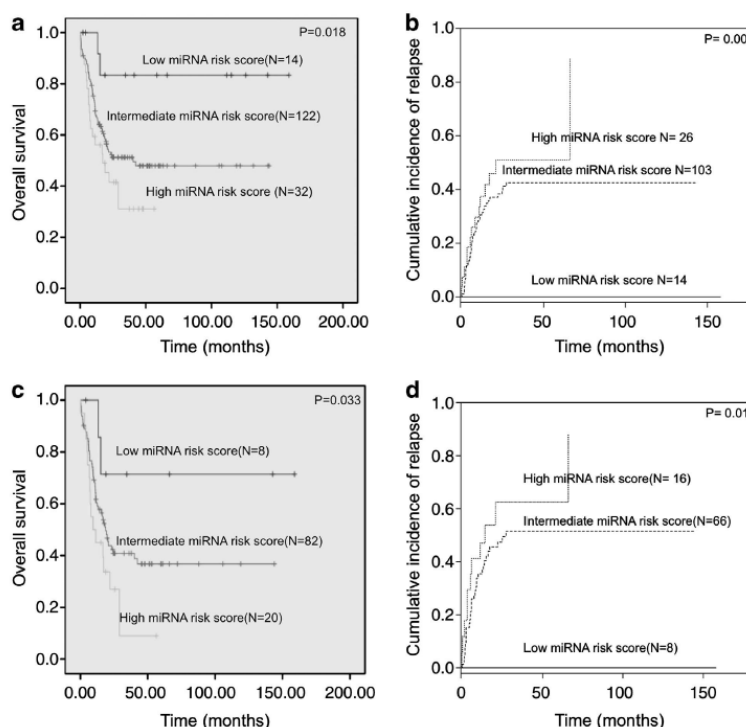
low-, intermediate- and high-risk groups was  $0 \pm 0\%$ ,  $43 \pm 9.8\%$  and  $51 \pm 19\%$ , respectively ( $P = 0.006$ ; Figure 5b). Five-year OS was  $83 \pm 19\%$ ,  $48 \pm 9.8\%$  and  $31 \pm 17\%$ , respectively ( $P = 0.018$ ; Figure 5a). Interestingly, this miRNA risk score showed a greater prognostic impact in the unfavorable molecular subcategory, with a RR at 5 years for the low-, intermediate- and high-risk miRNA score groups of  $0 \pm 0\%$ ,  $52 \pm 11\%$  and  $63 \pm 25\%$ , respectively ( $P = 0.01$ ; Figure 5d). Five-year OS was  $71 \pm 33\%$ ,  $37 \pm 9.8\%$  and  $9 \pm 15\%$ , respectively ( $P = 0.033$ ; Figure 5c). The multivariate analysis for OS confirmed the miRNA risk score as an independent prognostic factor both within the overall series (OR: 2.147; 95% CI: 1.287–3.580;  $P = 0.003$ ) and within the unfavorable molecular subcategory (OR: 1.626; 95% CI: 1.086–2.435;  $P = 0.018$ ) after adjustment for other well-recognized molecular and clinical prognostic markers (Supplementary Table 1).

In order to examine the applicability of the miRNA risk score for evaluating post-remission strategy in each risk group of patients, we compared outcome in patients receiving an allogeneic stem cell transplantation (alloHSCT) in first complete remission (allo-CR1) with that of patients in CR1 treated with other post-remission strategies (non-allo-CR1). An alloHSCT in CR1 was performed in 5/14 (35%), in 39/122 (32%) and in 9/32 (28%) patients in the low-, intermediate- and high-risk miRNA score groups, respectively. Intermediate- and high-risk patients were grouped together, and a Mantel-Byar test was performed with allo-CR1 as a time-dependant variable. Among these intermediate- and high-risk patients, those treated with allo-CR1 showed a

significant reduction of relapse compared with non-allo-CR1 patients (5-yr RR:  $52 \pm 9.8\%$  vs  $35 \pm 13\%$ ;  $P = 0.02144$ ; Supplementary Figure 2A). Moreover, when the analysis was restricted to patients within the unfavorable molecular subcategory with intermediate- and high-risk miRNA scores, allo-CR1 was associated with an even more significant reduction of RR compared with non-allo-CR1 patients (5-yr RR:  $36 \pm 15\%$  vs  $68 \pm 13\%$ ;  $P = 0.005693$ ; Supplementary Figure 2B). No differences in OS were observed according to allo-CR1 vs non-allo-CR1 in CR1 in patients with an intermediate- or high-risk miRNA score (data not shown). Nonetheless, among patients in the unfavorable molecular subcategory, a landmark analysis among the intermediate/high-risk patients with a minimum CR duration of 3 months showed that allo-CR1 patients had longer OS than non-allo-CR1 patients (5-yr OS:  $66 \pm 16\%$  vs  $28 \pm 15\%$ ;  $P = 0.031$ ; Supplementary Figure 3B). A similar, but nonsignificant, trend was observed in the overall series of intermediate/high-risk patients (5-yr OS:  $73 \pm 13\%$  vs  $48 \pm 13\%$ ;  $P = 0.081$ ; Supplementary Figure 3A). In the low-risk miRNA score group, no differences in outcome were observed between allo-CR1 and non-allo-CR1 patients (data not shown).

#### DISCUSSION

IR-AML,<sup>11,13,19</sup> the largest AML subgroup comprises patients with diverse prognosis, and optimal therapeutic strategies for these patients are still largely unclear. Prognostic stratification in these



**Figure 5.** Outcome according to the miRNA risk score. High miR-196b and miR-644 expression and low miR-135a and miR-409-3p were defined as high-risk factors. Patients  $\leq 60$  years were classified into three groups according to the number of high-risk factors: low-risk miRNA score, 0–1 factor; intermediate-risk miRNA score, 2–3 factors; and high-risk miRNA score, 4 factors. **(a)** OS according to miRNA risk score in all patients. **(b)** Cumulative incidence of relapse according to miRNA risk score in all patients. **(c)** OS according to miRNA risk score within the unfavorable molecular subcategory. **(d)** Cumulative incidence of relapse according to miRNA risk score within the unfavorable molecular subcategory.

patients is mainly based on the analysis of a limited number of molecular markers,<sup>1–4</sup> yet the discovery of new molecular mutations and interactions among coexisting mutations make molecular risk stratification a complex process.<sup>35,36</sup> miRNAs are involved in diverse essential functional pathways both in normal and neoplastic cells,<sup>24,37,38</sup> and analysis of miRNA expression in a biologically heterogeneous model such as AML can shed light on underlying biological pathways with strong prognostic implications, thus adding useful information to molecular stratification based on the analysis of *NPM1*, *FLT3-ITD* and *CEBPA* mutations.

We have performed a large-scale screening of 670 miRNAs in a series of IR-AML patients and identified 10 miRNAs with a potentially strong prognostic impact. In a second step, we investigated the prognostic value of these 10 miRNAs in a series of 238 IR-AML patients who received similar therapeutic regimens. Four miRNAs (miR-196b, miR-644, miR-135a and miR-409-3p) were identified as independent prognostic factors in IR-AML.

miR-196b, located at 7p15 between *HOXA9* and *HOXA10*, is upregulated in AML patients with *MLL* rearrangement and, interestingly, miR-196b expression seems to be induced by *MLL* fusion proteins.<sup>8,9,15,16,39</sup> Overexpression of miR-196b resulted in a partial differentiation block and in the activation of proliferation and survival signals.<sup>39</sup> Moreover, treatment of bone marrow cells transformed with the *MLL-AF9* fusion gene with the miR-196b antagomir decreased their proliferative capacity.<sup>39</sup> A recent study found that miR-196b directly targets *HOXA9/MEIS1* oncogenes and *FAS* tumor suppressor; moreover, miR-196b expression correlated inversely with outcome in a cytogenetically heterogeneous set of AML patients.<sup>17</sup> However, despite this preliminary report, the prognostic significance of miR-196b in a large cohort of IR-AML

patients has not been previously analyzed. In the present study, we have observed that decreased miR-196b expression confers a favorable outcome in IR-AML. Low expression of miR-196a and miR-196b has been found in *CEBPA*-mutated pediatric AML patients.<sup>9,40</sup> Along these same lines, we have also found an association between low miR-196b expression and the presence of biallelic *CEBPA* mutations, which may be related to molecular mechanisms conferring chemosensitivity in patients harboring this type of mutation. Nonetheless, the impact of miR-196b expression was independent of *CEBPA* mutations, and miR-196b retained its prognostic value in a multivariate model that included this molecular marker.

miR-644 overexpression has been observed in bladder cancer<sup>41</sup> but the role of miR-644 in cancer—and specifically in AML—is largely unknown. We have identified miR-644 as a marker of OS and CR, in the entire cohort and of OS in patients with a favorable molecular genotype. miR-644 could thus be useful to identify a subgroup of patients with worse outcome in spite of a molecularly favorable prognosis. miR-135a has been related to several types of cancer, where it has a dual role—as a tumor suppressor in some cases<sup>42–44</sup> and with an oncogenic function in others.<sup>45–48</sup> In patients with Hodgkin lymphoma, lower miRNA-135a expression was associated with a higher RR.<sup>42</sup> Similarly, in the present study, we have found that lower miR-135a expression was also associated with a higher RR, both in the entire cohort and in the subset of patients with the unfavorable molecular genotype, which suggests that in this setting, miR-135a may act as a tumor suppressor.

Lower miR-409-3p expression was also associated with a higher RR, again both in the entire series of patients and in those

belonging to the unfavorable molecular subcategory, where the 5-year relapse rate was over 50% in patients with low miR-409-3p expression. Two recent studies<sup>49,50</sup> have reported a tumor suppressor function for miR-409-3p. The first study, in fibrosarcoma, demonstrated that miR-409-3p inhibits tumor growth, vascularization and metastasis through downregulating angiotensin expression.<sup>50</sup> The second study, in gastric cancer, showed that miR-409-3p may function as a tumor suppressor through direct targeting and inhibition of transcriptional factor PHF10.<sup>49</sup> Moreover, regulation of miR-409-3p expression seems to be produced by methylation of its promoter region, as observed in gastric cancer cell lines exhibiting a decreased expression level. Interestingly, the expression of miR-409-3p was restored after treatment with demethylating agents.<sup>51</sup> A similar mechanism of regulation can be hypothesized in IR-AML, a context without apparent cytogenetic abnormalities in most patients, and suggests a possible benefit for the use of demethylating agents in this setting.

Given the independent prognostic value of miR-196b, miR-644, miR-135a and miR-409-3p, we designed a miRNA risk score based on their expression levels and assessed its prognostic value in a cohort of patients  $\leq 60$  years. This four-miRNA risk score showed independent prognostic value after adjustment for other well-recognized molecular and clinical prognostic markers and allowed the stratification of IR-AML patients into three different prognostic categories. Moreover, the prognostic impact of the risk score was even more marked within the unfavorable molecular subcategory where it was able to identify a small group of patients with very favorable outcome and a second group with a RR of over 70% and a dismal prognosis. Moreover, when we evaluated the effect of post-remission therapy according to this miRNA risk score, we found that alloHSCT in CR1 seemed beneficial for patients in the intermediate- or high-risk miRNA group, with a significantly reduced RR, especially among patients in the unfavorable molecular subcategory. Of course, these findings need further validation in a larger series of patients to validate the clinical usefulness of this score. Nonetheless, the expression of these four miRNAs or other miRNAs with a strong prognostic value might contribute to refine the current molecular risk stratification of IR-AML, which is based on the analysis of mutations of a limited number of genes, as attempted in several molecular stratification systems such as the European LeukemiaNet proposal. Abnormal expression of certain miRNAs may reflect specific dysfunction of determined cell pathways with a profound impact on chemosensitivity, not captured by the analysis of individual gene mutations. Therefore, the information resulting from miRNA expression analysis might provide an additional tool to predict the potential benefit of alloHSCT in the intermediate-risk cytogenetic category of AML, which still constitutes the group with a higher degree of uncertainty on the appropriateness of this procedure. Other previously identified prognostic miRNAs, such as miR-181a and miR-3151,<sup>19,20</sup> are not included in our four-miRNA risk score. miR-181a was found to be a prognostic marker in a miRNA array containing 368 probes,<sup>13</sup> and its prognostic value was further confirmed by individual PCR in CN-AML.<sup>19</sup> Although we observed different outcomes according to miR-181a, expression level in our initial series of 85 patients (Supplementary Figure 4), wide-spectrum profiling of more than 600 miRNAs in these patients revealed 10 other miRNAs with a stronger prognostic value, and these miRNAs were the ones selected for confirmation by individual PCR analysis in our larger series of 238 patients. Moreover, our series of patients included all types of IR-AML—not only CN-AML—as grouping patients with CN-AML together with other types of IR-AML in the same prognostic category seems to be fully warranted from the clinical standpoint.<sup>2</sup> Nevertheless, this difference in patient inclusion criteria may well have resulted in slightly different prognostic miRNA profiles. miR-3151 has been only recently identified<sup>52,53</sup> and as it was not included in the miRNA-profiling platform used for our initial screening,

we were unable to confirm the prognostic value suggested for this novel miRNA.<sup>20</sup>

In summary, measurement of expression levels of miR-196b, miR-644, miR-135a and miR-409-3p at diagnosis provided relevant prognostic information in a large series of IR-AML patients and refined risk stratification based on common molecular markers. Confirmation of the prognostic value of our four-miRNA risk score may be useful in assigning post-remission therapy. In addition, the future investigation of targets of these miRNAs might elucidate the biological mechanisms accounting for chemosensitivity and refractoriness to current AML treatments.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research is supported by Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia and by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias/Instituto de Salud Carlos III N-2004-F5041085, PI080158, FIS-PI0900547 and PI1100872, and, RETICS RD06/0020/0004, RD12/0036/0010, and RD12/0036/0071 and SDCSD from School of Medicine. Marina Díaz-Beyá is supported by Fundación Española de Hematología y Hemoterapia. Rut Tejero is an APIF fellow from University of Barcelona.

#### REFERENCES

- Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F *et al*. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood* 2012; **120**: 2963–2972.
- Döhner 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**: 453–474.
- 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**: 354–365.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L *et al*. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1909–1918.
- Chen J, Odenike O, Rowley JD. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 23–36.
- Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E *et al*. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 2009; **113**: 6411–6418.
- Schotte D, Pieters R, Den Boer M. MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. *Leukemia* 2011; **26**: 1–12.
- Dixon-McIver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T *et al*. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One* 2008; **3**: e2141.
- Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Lowenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; **111**: 5078–5085.
- Díaz-Beyá M, Navarro A, Ferrer G, Díaz T, Gel B, Camos M *et al*. Acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting RET proto-oncogene. *Leukemia* 2012; **27**: 595–603.
- Marcucci G, Mrozek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* 2011; **117**: 1121–1129.
- Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C *et al*. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3945–3950.
- Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrozek K, Ruppert AS, Paschka P *et al*. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1919–1928.
- Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Vukosavljevic T, Paschka P *et al*. Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 5078–5087.



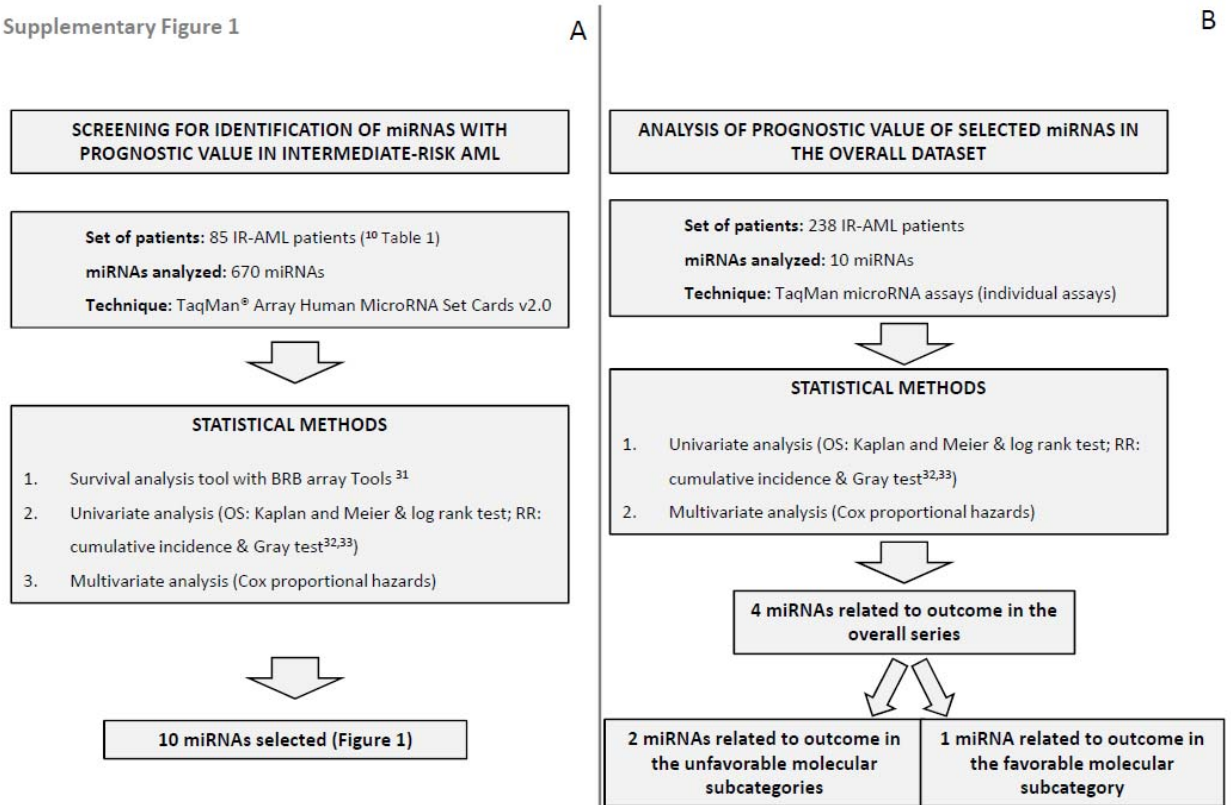
- 15 Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F *et al*. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; **111**: 3183–3189.
- 16 Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT *et al*. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 15535–15540.
- 17 Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Amovitz S *et al*. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nat Commun* 2012; **3**: 688.
- 18 Sun SM, Rockova V, Bullinger L, Dijkstra MK, Dohner H, Lowenberg B *et al*. The prognostic relevance of miR-212 expression with survival in cytogenetically and molecularly heterogeneous AML. *Leukemia* 2012; **27**: 100–106.
- 19 Schwind S, Mahary K, Radmacher MD, Mrozek K, Holland KB, Margeson D *et al*. Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 5257–5264.
- 20 Eisfeld AK, Marcucci G, Mahary K, Schwind S, Radmacher MD, Nicolet D *et al*. miR-3151 interplays with its host gene BAALC and independently affects outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; **120**: 249–258.
- 21 Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008; **15**: 352–358.
- 22 Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol* 2010; **84**: 1–16.
- 23 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D *et al*. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; **435**: 834–838.
- 24 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 857–866.
- 25 Agirre X, Martínez-Climent JÁ, Otero M, Prósper F. Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia* 2011; **26**: 395–403.
- 26 Shaham L, Binder V, Gefen N, Borkhardt A, Izraeli S. MiR-125 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 2012; **26**: 2011–2018.
- 27 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**: 4326–4335.
- 28 Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM *et al*. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; **106**: 3618–3620.
- 29 Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S *et al*. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 624–633.
- 30 Navarro A, Marrades RM, Vinolas N, Quera A, Agusti C, Huerta A *et al*. MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology* 2009; **76**: 162–169.
- 31 Simon R, Lam A, Li MC, Ngan M, Menendez S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform* 2007; **3**: 11–17.
- 32 Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat* 1988; **16**: 1141–1154.
- 33 Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc* 1999; **94**: 496–509.
- 34 Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2012; **48**: 452–458.
- 35 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**: 1079–1089.
- 36 The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; **368**: 2059–2074.
- 37 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**: 215–233.
- 38 Rücker F, Russ A, Cocciardi S, Kett H, Schlenk R, Botzenhardt U *et al*. Altered miRNA and gene expression in acute myeloid leukemia with complex karyotype identify networks of prognostic relevance. *Leukemia* 2012; **27**: 353–361.
- 39 Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ *et al*. Regulation of miR-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* 2009; **113**: 3314–3322.
- 40 Danen-van Oorschot AA, Kuipers JE, Arentsen-Peters S, Schotte D, de Haas V, Trka J *et al*. Differentially expressed miRNAs in cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2012; **58**: 715–721.
- 41 Scheffer AR, Holdenrieder S, Kristiansen G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J. Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer? *World J Urol* 2012; doi:10.1007/s00345-012-1010-2.
- 42 Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, Gel B *et al*. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009; **114**: 2945–2951.
- 43 Wu S, Lin Y, Xu D, Chen J, Shu M, Zhou Y *et al*. MiR-135a functions as a selective killer of malignant glioma. *Oncogene* 2012; **31**: 3866–3874.
- 44 Yamada Y, Hidaka H, Seki N, Yoshino H, Yamasaki T, Itesako T *et al*. Tumor-suppressive microRNA-135a inhibits cancer cell proliferation by targeting the c-MYC oncogene in renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2012; **104**: 304–312.
- 45 Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A *et al*. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 5795–5802.
- 46 Liu S, Guo W, Shi J, Li N, Yu X, Xue J *et al*. MicroRNA-135a contributes to the development of portal vein tumor thrombus by promoting metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; **56**: 389–396.
- 47 Chen Y, Zhang J, Wang H, Zhao J, Xu C, Du Y *et al*. miRNA-135a promotes breast cancer cell migration and invasion by targeting HOXA10. *BMC Cancer* 2012; **12**: 111.
- 48 Zhou W, Li X, Liu F, Xiao Z, He M, Shen S *et al*. MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 *in vitro*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2012; **44**: 838–846.
- 49 Li C, Nie H, Wang M, Su L, Li J, Yu B *et al*. MicroRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer. *Cancer Lett* 2012; **320**: 189–197.
- 50 Weng C, Dong H, Chen G, Zhai Y, Bai R, Hu H *et al*. miR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and metastasis by targeting angiogenin. *Cancer Lett* 2012; **323**: 171–179.
- 51 Tsai KW, Wu CW, Hu LY, Li SC, Liao YL, Lai CH *et al*. Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *Int J Cancer* 2011; **129**: 2600–2610.
- 52 Stark MS, Tyagi S, Nancarrow DJ, Boyle GM, Cook AL, Whiteman DC *et al*. Characterization of the melanoma miRNAome by deep sequencing. *PLoS One* 2010; **5**: e9685.
- 53 Schotte D, Akbari Moqadam F, Lange-Turenhout EA, Chen C, van Ijcken WF, Pieters R *et al*. Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011; **25**: 1389–1399.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)



### 3.6. Figuras suplementarias artículo 2

Supplementary Figure 1



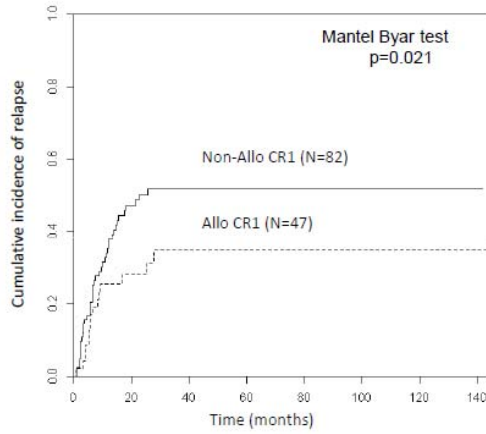
**Supplementary figure 1 The methodological process followed for identification of miRNAs with independent prognostic value.** (A) The statistical procedure for screening and initial identification of outcome-related miRNAs (n=85). (B) The statistical procedure used for the analysis of the prognostic value of selected miRNAs in the overall data set (n=238).

Supplementary Figure 2

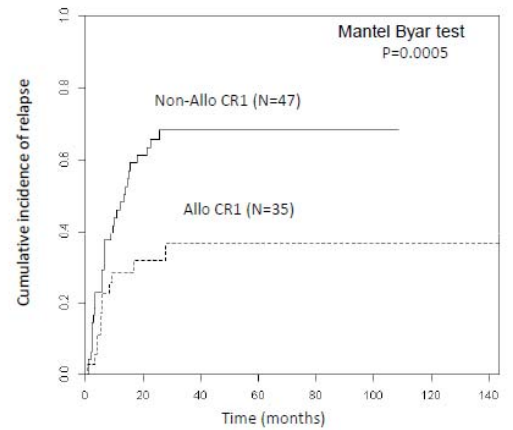
A

B

All patients with intermediate/high miRNA risk score



Patients in the unfavorable molecular subcategory with intermediate/high miRNA risk score

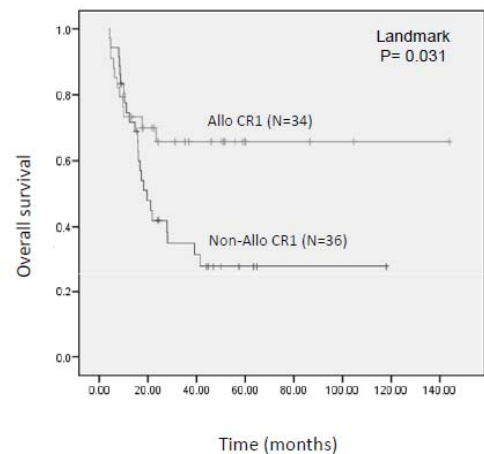
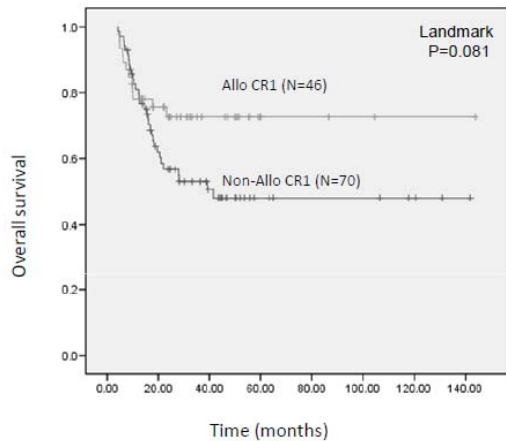


**Supplementary Figure 2. Cumulative risk of relapse according to post-remission treatment in patients with intermediate/high-risk miRNA score. (A) In all patients  $\leq 60$  years. (B) In patients  $\leq 60$  years in the unfavorable molecular subcategory.**

Supplementary Figure 3

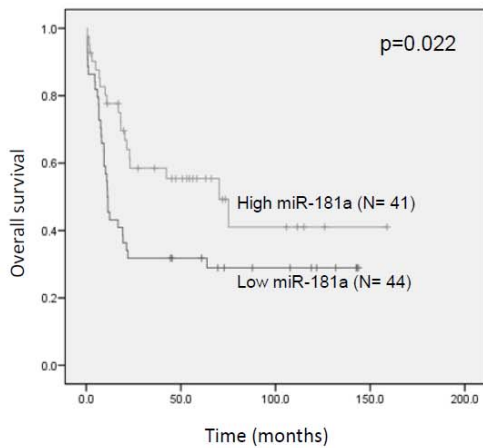
A

B



**Supplementary Figure 3. Overall survival according to post-remission treatment in patients with intermediate/high-risk miRNA score and CR > 3 months. (A) In all patients  $\leq 60$  years. (B) In patients  $\leq 60$  years in the unfavorable molecular subcategory.**

Supplementary Figure 4



**Supplementary Figure 4.** Overall survival according to miR-181 expression in the initial screening of 85 patients from Hospital Clínic of Barcelona.

Supplementary Table 1

Variables in the final model	p	OR	95%CI
<b>Multivariate analysis for OS in the overall series</b>			
Age	0.002	1.030	1.011-1.050
WBC	0.002	1.005	1.002-1.009
<i>CEBPA biallelic mutated</i>	0.887	0.933	0.359—2.424
<i>FLT3-ITD</i>	0.001	2.345	1.432-3.839
<i>NPM1 mutated</i>	0.041	0.601	0.369-0.980
miRNA-risk score	0.002	2.107	1.317-3.372
<b>Multivariate analysis for OS in the unfavorable molecular subcategory</b>			
Age	0.000	1.036	1.019-1.053
WBC	0.086	1.002	1.000-1.005
<i>FLT3-ITD</i>	0.007	2.038	1.211-3.429
<i>NPM1 mutated</i>	0.060	0.598	0.350-1.021
miRNA-risk score	0.018	1.626	1.086-2.435

**Supplementary Table 1.** Summary of multivariate analyses for overall survival both in the overall series of patients and in the molecularly unfavorable subcategory including miRNA risk score



## 4. Discusión

Estudios previos han demostrado que los miRNAs juegan un papel muy importante en infinidad de procesos celulares, y son imprescindibles para la correcta homeostasis celular. Su desregulación ha sido ampliamente descrita en cáncer y también en concreto en LMA. En este sentido algunos estudios han demostrado que la expresión de miRNAs puede definir entidades de forma más precisa que el estudio de expresión mediante microarrays de miles de RNAm [287]. A partir de este fundamento en esta tesis llevamos a cabo la caracterización del perfil de expresión de miRNA en una amplia cohorte de pacientes con LMA diagnosticados y tratados en nuestro centro y en otros centros del grupo cooperativo CETLAM, correspondientes a una amplia diversidad de variedades citogenéticas y moleculares, con un doble objetivo: una mejor caracterización de los mecanismos biológicos subyacentes de algunas variedades biológicas, menos conocidas, y, por otra parte, el análisis del posible valor pronóstico del nivel de expresión de algunos miRNAs expresados en la enfermedad. Así, y como resultado de los estudios de esta tesis, obtuvimos la firma de miRNA distintiva de la LMA t(8;16). Por otra parte, en un segundo estudio, pudimos identificar algunos miRNA cuyo nivel de expresión proporcionaba información pronóstica adicional a las mutaciones de los genes más habitualmente analizados en la categoría de pacientes con riesgo citogenético intermedio.

### **Perfil de expresión de miRNA en la LMA con t(8;16)**

La LMA con t(8;16) es un subtipo de LMA resultante de la fusión de dos genes, *MYST3* y *CREBBP*, ambos con propiedades modificadoras de la cromatina[30]. A pesar de conocerse el patrón de expresión de RNAm de esta entidad, en parte por estudios realizados por nuestro grupo, no se había estudiado previamente el perfil de expresión de miRNA asociado a éste subtipo de LMA. En el primer artículo de esta tesis hemos caracterizado por primera vez una firma específica de miRNAs asociada la LMA t(8;16). La expresión de los miRNAs en cáncer puede verse afectada por cambios epigenéticos, como cambios en la metilación de DNA ó modificaciones de la cromatina [288] , que pueden contribuir de manera significativa al fenotipo leucémico[30]. En este estudio analizamos también algunos de los posibles mecanismos de regulación epigenética de la firma de miRNAs de la LMA t(8;16) y observamos que un tercio de los miRNAs se reexpresaron tras el tratamiento con agentes modificadores

epigenéticos. En cuanto a las dianas de estos miRNAs característicos de LMA t(8;16) hemos identificado y validado *RET*, protooncogén previamente identificado como característicamente sobreexpresado en este subtipo de LMA, como la diana de cinco miRNAs distintivos de la firma.

La LMA t(8;16) mostró una firma de miRNAs distintiva que, cuando la comparamos con una amplia variedad de otros subtipos de LMA, se agrupaba de manera muy homogénea, confirmando su singularidad biológica. Como la LMA t(8;16) tiene un fenotipo con una característica maduración mielomonocítica, y la mayoría de pacientes pertenecen a los subtipos M4 y M5 de la FAB, nos preguntamos si parte de esta firma específica era se debía a este estado de maduración. Para ello comparamos este subtipo molecular con otras leucemias clasificadas en las categorías M4 y M5 de la FAB y correspondientes a diversidad de subgrupos citogenéticos y moleculares. Tras este análisis, identificamos una firma que claramente diferenciaba la LMA t(8;16) del resto de LMA monocíticas, compuesta por 47 miRNAs expresados de forma diferencial, que venía a indicar que la firma de miRNAs de la LMA t(8;16) no era el mero resultado del fenotipo mielo-monocítico propio de sus blastos.

Por otra parte, observamos en esta firma de la LMA t(8;16) una infraexpresión global de miRNAs, muy característica, en comparación con otros subtipos de LMA. De manera interesante, alguno de estos miRNAs infraexpresados habían sido previamente descritos con una función de genes supresores de tumor, como en el caso de miR-let-7, el miR-34a, miR-15a, miR-26a/b y miR-125b, lo que podría presentar una hipotética pérdida de esta función supresora de tumores [228, 289]. Sin embargo esta firma también incluye miRNAs infraexpresados que previamente habían sido descritos como sobreexpresados en otros tipos de cáncer como el miR-21 y el cluster miR-17-92[290]. Esta aparente discordancia confirmaría el efecto biológico diverso de los miRNAs dependiendo del tejido en el que se expresa. Para dilucidar los mecanismos que conducen a la infraexpresión de algunos de estos últimos miRNAs, interrogamos el estado de algunos de sus reguladores. Así, al conocerse la regulación transcripcional de miR-21 por el gen *STAT3* [291], analizamos los niveles de *STAT3* en la enfermedad y observamos su expresión disminuída, aunque las consecuencias funcionales de esta desregulación son desconocidas. Por otra parte, para dilucidar el potencial mecanismo de infraexpresión del cluster miR-17-92, regulado transcripcionalmente a su vez por *c-MYC*, medimos la expresión del RNAm de *c-myc* y no encontramos, en este caso, diferencias significativas en su expresión entre la LMA t(8;16) y los demás subtipos de LMA. En consecuencia, los bajos niveles de miR-17-92 no parecen deberse a su modulación por el factor transcripcional *c-myc*.





Los genes *MYST3* y *CREBBP* están involucrados en el proceso de leucemogénesis en diversas variedades de LMA, tanto como componentes del producto de fusión *MYST3-CREBBP* resultante de la translocación t(8;16)(p11;p13) como parte de otros productos de fusión [108, 118, 121-123]. *MYST3* interacciona directamente con la proteína p53 y el complejo *MYST3-p53* aumenta después del daño al DNA, contribuyendo a la parada del ciclo celular en fase G1 [292]. *MYST3* es esencial para la autorenovación de la célula madre hematopoyética [293] [294]. También se ha descrito que *CREBBP* tiene múltiples funciones en el desarrollo y en la hematopoyesis [129, 295]. La inactivación heterocigota de *CREBBP* en ratones daña la autorenovación de las células hematopoyéticas, induce defectos en la diferenciación hematopoyética multilineal e incrementa la incidencia de enfermedades hematológicas [296, 297]. Así, la inactivación resultado de alteraciones estructurales de *CREBBP* impide su función de acetilar p53 en alguna clase de linfoma [298]. Como once de los miRNAs de la firma de la LMA t(8;16) que estaban infraexpresados se han relacionado con p53 [299] [300] y otros, como miR-34, están relacionados con la respuesta al daño de ADN, investigamos una posible infraexpresión de p53 en este subtipo de LMA, pero no se encontraron diferencias a nivel de RNAm de p53 en las LMA t(8;16) con respecto a los demás subgrupos. Sin embargo, la actividad de p53 puede estar modulada por otros mecanismos, como acetilación o fosforilación [301]. De manera interesante, se ha descrito que la proteína de fusión *MYST3-CREBBP* inhibe la transcripción mediada por p53 a través de una disminución de la acetilación de p53 [292], lo que nos lleva a hipotetizar que la expresión de los miRNAs relacionados con p53 en nuestra firma distintiva de LMA t(8;16) podría ser en parte por una acetilación anormal de p53. Las mutaciones de *CREBBP* también se han descrito en la leucemia aguda linfoblástica, con el resultado de una desregulación de la acetilación de histonas y la regulación transcripcional de las dianas de *CREBBP* [302]. El reordenamiento entre *MYST3* y *CREBBP* podría dar lugar a una acetilación anómala, responsable, entre otras consecuencias funcionales, de una disrupción durante la hematopoyesis, lo que podría ser responsable, al menos en parte, del fenotipo leucémico. [30]. En este estudio, observamos la reexpresión de algunos miRNAs después del tratamiento con un agente desmetilante. De manera interesante, esta reexpresión fue mayor cuando se añadió un agente inhibidor de histona desacetilasa (TSA) al agente desmetilante (5'-AZA), lo que apoyaría a especular que la acetilación puede jugar un papel importante en la infraexpresión de algunos miRNAs de esta firma asociada a LMA t(8;16). En este sentido, cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas en la metilación de los promotores de algunos genes de estos miRNAs entre la LMA t(8;16) y

otros subtipos de LMA, por lo que diferencias en la metilación de las regiones promotoras de estos miRNAs no sería el mecanismo causante de esta menor expresión. Estudios previos que han analizado la metilación en LMA han mostrado correlación entre algunos tipos de LMA y el patrón de metilación, pero no en todos los subtipos [303]. Aunque los experimentos sobre la reexpresión de miRNAs después del tratamiento con modificadores epigenéticos sólo se pudo realizar en una muestra primaria debido a la falta de material adecuado de otros pacientes, pensamos que nuestros resultados tienen potenciales implicaciones fisiopatológicas y requieren investigación futura para su confirmación.

Otras oncoproteínas de fusión bien caracterizadas que resultan de translocaciones cromosómicas en LMA dan lugar al silenciamiento epigenético de miRNAs, como es el caso de la represión de miR-223 por AML1-ETO[270] y la represión transcripcional de miR-210, miR-23 y miR-24 por PML-RARa [273]. Por ello, se necesitan futuros estudios para clarificar si la proteína de fusión MYST3-CREBBP es responsable del silenciamiento de estos miRNAs, así como de los mecanismos implicados.

El protooncogén *RET* codifica un receptor tirosín quinasa que transduce señales de crecimiento celular y diferenciación. Las mutaciones de *RET* han sido asociadas con el carcinoma papilar de tiroides y la neoplasia endocrina múltiple tipo IIA y IIB[304]. Además *RET* puede afectar la diferenciación y el crecimiento de las células hematopoyéticas [305, 306]. Nuestro grupo y otros [113, 114] han observado que el RNAm de *RET* está típicamente sobreexpresado en la LMA t(8;16). En el presente estudio, hemos identificado una marcada correlación inversa entre los niveles de RNAm de *RET* y los niveles de tres miRNAs. Además, otros cuatro miRNAs de los que están infraexpresados en la firma de miRNAs de la LMA t(8;16) también tienen como potencial diana informáticamente predicha, la región 3' UTR del gen *RET*. Por esta razón, investigamos si los niveles disminuidos de estos miRNAs podrían explicar la sobreexpresión de *RET*. En efecto, el ensayo Renilla-Luciferasa mostró *RET* como diana de miR-218, miR-128, miR-27b, miR-15a, y miR-195, y estos resultados se validaron en dos líneas celulares que sobreexpresan *RET*, TPH1 y HL-60. La transfección con estos miRNAs produjo una infraexpresión significativa de la proteína *RET* en ambas líneas HL-60 (excepto miR-27b) y TPH1 (excepto miR-218 y miR-15a). Las diferencias en cuanto a la infraexpresión de *RET* entre las dos líneas celulares podrían ser debidas a diferencias en los niveles basales de la proteína *RET* y a diferencias en la accesibilidad a los sitios de unión de miRNAs individuales. Estos resultados validan funcionalmente, por primera vez, la modulación de la expresión de *RET* por varios miRNAs característicos de la LMA t(8;16).

Nuestra firma de miRNAs de LMA t(8;16) confirma la singularidad de este subtipo de LMA. Sus características clínicas específicas y su homogeneidad en el perfil biológico, sustentada en la existencia de una firma de expresión de RNAm característica, junto con la firma de miRNA distintivas descrita en este trabajo, justifican, pese a su baja incidencia, la consideración de la LMA t(8;16) como una entidad específica.

En resumen, la LMA t(8;16) presenta una firma específica de miRNAs, caracterizada principalmente por la infraexpresión de múltiples miRNAs, algunos de los cuales son responsables de los altos niveles de *RET* observados previamente en este subtipo. Por último, esta firma de miRNAs podría ser el resultado de la desregulación de la maquinaria epigenética en las células leucémicas, aunque los mecanismos concretos involucrados aún no se han esclarecido.

### **El análisis de la expresión de miRNAs contribuye a refinar el pronóstico en la LMA de riesgo citogenético intermedio**

Aunque diversos estudios ya habían identificado algunos miRNAs individuales con valor pronóstico en la LMA, en el segundo trabajo de esta tesis nos propusimos evaluar el valor pronóstico del perfil de expresión de miRNAs en un contexto clínico bien definido, en el que el refinamiento en la estratificación pronóstica puede tener implicaciones clínicas relevantes. Así, analizamos el impacto pronóstico de un extenso repertorio de miRNAs en una serie de pacientes de hasta 70 años, portadores de una citogenética de riesgo intermedio, que incluyó el cariotipo normal junto a otras anomalías citogenéticas de esta categoría pronóstica, y que habían recibido un tratamiento contemporáneo homogéneo. Esta evaluación pronóstica incluyó, además, el análisis del posible beneficio clínico de trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos en este contexto. La LMA-RI comprende un grupo heterogéneo de pacientes con distinto pronóstico, y la mejor estrategia terapéutica postremisión para estos pacientes no está bien establecida. La estratificación pronóstica en estos pacientes está basada principalmente en el análisis de un número limitado de factores pronósticos[39, 65].

Actualmente con el descubrimiento de nuevas mutaciones e interacciones entre ellas hacen de la estratificación pronóstica basada en el análisis molecular un proceso complicado[55, 63].

El análisis de la expresión de miRNAs en un modelo biológico heterogéneo como es la LMA puede dar pistas sobre los procesos biológicos subyacentes con importantes implicaciones pronósticas y añadir información práctica a la actual estratificación pronóstica basada en el análisis de las mutaciones de *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA*.

Inicialmente realizamos un amplio cribaje de 670 miRNAs maduros en una serie de LMA-RI e identificamos 10 miRNAs con un potencial valor pronóstico. En un segundo paso, investigamos el valor pronóstico de estos 10 miRNAs en una serie de 285 pacientes con LMA-RI que recibieron el mismo esquema terapéutico. Cuatro miRNAs (miR-196b, miR-644, miR-135a y miR-409-3p) fueron finalmente identificados como factores pronósticos independientes en LMA-RI.

miR-196b está localizado en la región genómica 7p15 entre el gen *HOXA9* y *HOXA10*, está sobreexpresado en pacientes con LMA con reordenamiento del gen *MLL* y, de manera interesante, su expresión parece estar inducida por las proteínas de fusión con *MLL* [244, 245, 247, 248, 250]). La sobreexpresión de miR-196b resulta en un bloqueo parcial de la diferenciación y en la activación de las señales de proliferación y supervivencia celular. Además, el tratamiento de las células de médula ósea transformadas con el gen de fusión *MLL-AF9* con el antagomiR-196b disminuye su capacidad proliferativa [250]. Un estudio reciente descubrió que miR-196b tiene como dianas los oncogenes *HOXA9/MEIS1* y el gen supresor de tumores *FAS*. Por otra parte, la expresión de miR-196b había mostrado una correlación inversa con el pronóstico en una serie de pacientes con LMA de citogenética heterogénea [263]. Sin embargo, aparte de este trabajo preliminar, el significado pronóstico de miR-196b no ha sido previamente analizado en una serie extensa de pacientes con LMA-RI. En el presente estudio hemos observado que la baja expresión de miR-196b confiere un pronóstico favorable en la LMA-RI. Previamente, ya se había descrito la infraexpresión de miR-196a y miR-196b en pacientes pediátricos con LMA asociada a mutación de *CEBPA* [244, 307]. En la misma línea, confirmamos la asociación entre unos niveles de expresión de miR-196b bajos y la presencia de mutaciones de *CEBPA* bialélicas, lo que puede estar relacionado con los mecanismos moleculares que confieren un mayor grado de quimiosensibilidad, propio de esta entidad. Sin embargo, el impacto pronóstico del nivel de expresión de miR-196b fue independiente del estado mutacional de *CEBPA*, y miR-196b retuvo su valor pronóstico en el estudio multivariado que incluía el estado mutacional de *CEBPA*.

La sobreexpresión de miR-644 se ha observado en cáncer de vejiga [308] aunque el papel oncogénico de miR-644 en general, y en LMA en particular, es desconocido. En este estudio, miR-644 se mostró como un marcador pronóstico predictivo de la respuesta al tratamiento quimioterápico de inducción y de la supervivencia global y para, tanto en la serie global como en el subgrupo molecular de riesgo favorable. En este sentido, miR-644 podría ser útil para identificar un subgrupo de pacientes con peor pronóstico a pesar de pertenecer al subgrupo

molecular favorable, definido por la mutación de *NPM1* ó *CEBPA* sin mutación concomitante de *FLT3-ITD*.

Se ha relacionado miR-135a con diversas neoplasias, en las que se ha identificado una función oncogénica dual, tanto como gen supresor de tumor en algunos casos [309, 310], como con una función de oncogén en otros tumores [311, 312](revisado en [313]). Así, en los pacientes con linfoma de Hodgkin, la infraexpresión de miR-135a se asocia a un mayor riesgo de recaída [309]. De manera similar, en el actual estudio, hemos observado como la expresión baja de miR-135a está asociada a un mayor riesgo de recaída tanto en la serie general como en el subgrupo de pacientes del subgrupo molecular desfavorable, lo que sugiere que en este contexto miR-135a podría actuar como un gen supresor de tumor.

También hemos identificado con mayor riesgo de recaída, superior al 50% a los 5 años, en los pacientes con una baja expresión de miR-409-3p, tanto en la serie global como en el subgrupo molecular de mal pronóstico. Dos estudios recientes han descrito miR-409-3p con función de supresor de tumores. El primer estudio, en fibrosarcoma, demostró que miR-409-3p inhibe el crecimiento tumoral, la vascularización y las metástasis a través de la infraexpresión de la angiotensina[314]. El segundo estudio, en cáncer gástrico, mostró que miR-409-3p puede funcionar como un gen supresor de tumor mediante la interacción e inhibición transcripcional de *PHF10* [315]. Además, se observó una reexpresión de miR-409-3p tras tratamiento hipometilante, lo que podría apoyar la existencia de un mecanismo similar en un subgrupo de pacientes con LMA-RI [316].

Dado el valor pronóstico independiente mostrado por estos cuatro miRNAs (miR-196b, miR-644, miR-135a y miR-409-3p), diseñamos una *score* de riesgo pronóstico basado en los niveles de expresión de dichos miRNAs y comprobamos su valor pronóstico en pacientes de hasta 60 años. Esta escala pronóstica mostró un valor pronóstico independiente después de ajustarlo para otros marcadores pronósticos clínicos y moleculares bien reconocidos y permitió la estratificación de pacientes de LMA-RI en tres categorías pronósticas diversas.

Adicionalmente, el impacto pronóstico de esta escala fue aún más marcado cuando se aplicaba al subgrupo molecular de riesgo desfavorable, en el que fue útil para identificar un pequeño grupo de pacientes con buen pronóstico y un segundo grupo de mal pronóstico, con un riesgo de recaída del 70%. Al evaluar el efecto del tratamiento post-remisión teniendo en cuenta esta escala pronóstica de miRNAs, la realización de un trasplante alogénico en primera remisión completa parecía beneficioso para el grupo de pacientes con un *score* de miRNAs de riesgo intermedio o alto, con una reducción del riesgo de recaída significativa, especialmente

entre los pacientes de la categoría molecular desfavorable. Por supuesto, estos hallazgos necesitan de validación en series de pacientes independientes, extensas, para confirmar la posible utilidad clínica de este *score* de riesgo derivado de la expresión de miRNAs. En consecuencia, la determinación de la expresión de estos cuatro miRNAs, a los que podrían añadirse otros que se identifiquen en el futuro, podrían contribuir a refinar la actual estratificación pronóstica en la LMA-RI, basada actualmente en el análisis mutacional de un número reducido de genes. La expresión alterada de ciertos miRNAs podría reflejar la disfunción de algunas vías celulares con un importante impacto en la quimiosensibilidad, quizá no capturada en su totalidad por el análisis de mutaciones de algunos genes. Por lo tanto, la información proporcionada por el análisis de la expresión de miRNAs podría proporcionar una herramienta adicional para predecir el potencial beneficio del trasplante alogénico en LMA-RI, ya que en este grupo es donde existe más incertidumbre acerca de su papel en primera remisión completa.

Otros dos miRNAs no incluidos en este score pronóstico, miR-181a[268] y miR-3151[260], han mostrado valor pronóstico en otros estudios. miR-181a fue identificado como un marcador pronóstico en un primer estudio realizado mediante microarrays que contenían 368 sondas [257] y su valor pronóstico fue posteriormente confirmado mediante RT-PCR individual en una serie de pacientes de LMA de citogenética normal[268]. Aunque en nuestro estudio inicial de cribado con un amplio (>600 miRNAs) panel de miRNAs en la serie de 85 pacientes observamos diferencias en el pronóstico dependiendo del nivel de miR-181a, identificamos otros 10 miRNAs con un mayor valor pronóstico, y éstos fueron los seleccionados para su posterior confirmación por RT-PCR individual en una serie de 238 pacientes. Además, nuestra serie de pacientes incluyó todos los de LMA de riesgo citogenético intermedio, no únicamente aquellos de cariotipo normal. Agrupar los pacientes de citogenética normal con otras citogenéticas de riesgo intermedio parece lo aconsejable desde el punto de vista clínico [40]. Estas diferencias en los criterios de inclusión podrían explicar algunas de los diferentes resultados observados. Por otra parte, miR-3151 ha sido identificado más recientemente [317, 318] y no fue incluido en nuestra plataforma inicial de cribado de miRNAs ya que no había sido descrito al inicio de nuestro estudio. Se ha descrito que la sobreexpresión de miR-3151 es un factor pronóstico desfavorable en pacientes con LMA-CN y mayores de 60 años. No obstante, un estudio preliminar realizado en nuestro grupo y presentado en forma de póster (contenido en los anexos de esta tesis), confirmó el pronóstico de este miRNA también en pacientes más jóvenes [260]

En resumen, el análisis de la expresión de los niveles de miR-196b, miR-644, miR-135a y miR-409-3p en el momento del diagnóstico nos proporciona información pronóstica relevante en una amplia serie de pacientes de LMA-RI y refina la estratificación pronóstica realizada basada en las mutaciones genéticas más comúnmente analizadas. La confirmación del valor pronóstico de este *score* pronóstico compuesto por cuatro miRNAs podría ser útil, además, para la elección del tratamiento postremisión. Por otra parte, la investigación futura de las dianas de estos miRNAs podría esclarecer algunos de los mecanismos biológicos responsables de la quimiosensibilidad a los tratamientos habitualmente empleados en la LMA.





## 5. Conclusiones

1. Algunos subtipos específicos de LMA muestra una firma de miRNAs característica como la LMA con mutación de *NPM1*, la LMA con mutación bialélica de *CEBPA* y la LMA con t(6;9)

En la LMA con t(8;16) y reordenamiento MYST3-CREBBP:

2. Existe un perfil de miRNAs específico caracterizado por la infraexpresión de un conjunto de 90 miRNAs en comparación con otros subtipos de LMA
3. Existe una asociación entre los niveles de expresión de miR-21 y *STAT3*, su regulador transcripcional
4. La infraexpresión observada en la firma de miRNAs que caracteriza la LMA t(8;16) puede explicarse, al menos en parte, por mecanismos epigenéticos, como se demuestra por la reexpresión observada de 27 miRNAs tras el tratamiento con un agente hipometilante y un inhibidor de histona desacetilasa.
5. La sobreexpresión del protooncogén *RET* característica de la LMA t(8;16) viene explicada por la infraexpresión de 5 miRNAs que conforman parte de la firma distintiva de esta entidad

El análisis del nivel de expresión de miRNAs aporta información pronóstica independiente en los pacientes con LMA de riesgo citogenético intermedio:

6. Los niveles bajos de miR-196b y de miR-644 permiten identificar pacientes con mejor supervivencia global
7. Los niveles de miR-135a y de miR-409-3p permiten estratificar a los pacientes según su riesgo de recaída, incluso en el subgrupo molecular de mal pronóstico.
8. El *score* resultante del nivel de expresión de estos 4 microRNAs (*microRNA score*) mejora la estratificación pronóstica resultante del estudio mutacional de *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPA*
9. Los pacientes con un *microRNA score* pronóstico de riesgo intermedio o alto parecen beneficiarse de un trasplante alogénico en primera remisión completa.



## 6. Bibliografía

1. Shivdasani, R.A. and S. Orkin, *The transcriptional control of hematopoiesis [see comments]*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4025-4039.
2. Doulatov, S., et al., *Hematopoiesis: a human perspective*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(2): p. 120-136.
3. Weidenreich, F., *Zur Morphologie und morphologischen Stellung der ungranulierten Leucocyten—Lymphocyten—des Blutes und der Lymphe*. Archiv für mikroskopische Anatomie, 1908. **73**(1): p. 793-882.
4. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-168.
5. Lorenz, E., et al., *Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections*. Journal of the National Cancer Institute, 1951. **12**(1): p. 197.
6. Rosenbauer, F. and D.G. Tenen, *Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(2): p. 105-117.
7. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. 1994.
8. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nature Reviews Genetics, 2000. **1**(1): p. 57-64.
9. Jan, M., et al., *Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia*. Sci Transl Med, 2012. **4**(149): p. 149ra118.
10. Estey, E. and H. Döhner, *Acute myeloid leukaemia*. The Lancet, 2006. **368**(9550): p. 1894-1907.
11. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nature medicine, 1997. **3**(7): p. 730-737.
12. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett, *Acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(14): p. 1051-1062.
13. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians, 2012. **62**(1): p. 10-29.
14. Dores, G.M., et al., *Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007*. Blood, 2012. **119**(1): p. 34-43.
15. Mufti, G.J., et al., *Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts*. Haematologica, 2008. **93**(11): p. 1712-1717.
16. Swerdlow, S., E. Campo, and N. Harris, *International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue, 2008*: p. 1-439.
17. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. British journal of haematology, 1982. **51**(2): p. 189-199.
18. Bloomfield, C.D. and R.D. Brunning, *The revised French-American-British classification of acute myeloid leukemia: is new better?* Ann Intern Med, 1985. **103**(4): p. 614-6.
19. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group*. British journal of haematology, 1976. **33**(4): p. 451-458.

20. Bennett, J.M., et al., *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group.* Ann Intern Med, 1985. **103**(4): p. 620-5.
21. Vardiman, J.W., 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**(5): p. 937-951.
22. Appelbaum, F.R., et al., *Age and acute myeloid leukemia.* Blood, 2006. **107**(9): p. 3481-3485.
23. Juliusson, G., 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**(18): p. 4179-4187.
24. Giles, F.J., et al., *The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia.* British journal of haematology, 2007. **136**(4): p. 624-627.
25. Grimwade, D., 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**(3): p. 354-365.
26. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial.* Blood, 1998. **92**(7): p. 2322-2333.
27. Berger, R., et al., *Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia: a study of 343 patients.* Cancer genetics and cytogenetics, 1987. **28**(2): p. 293-299.
28. Slovak, M.L., 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**(13): p. 4075-4083.
29. Byrd, J.C., 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) Presented in part at the 43rd annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 10, 2001, and published in abstract form. 59.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4325-4336.
30. Chen, J., O. Odenike, and J.D. Rowley, *Leukaemogenesis: more than mutant genes.* Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(1): p. 23-36.
31. Wang, J., et al., *ETO, fusion partner in t (8; 21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(18): p. 10860-10865.
32. Wang, J., et al., *Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells.* Cancer research, 1999. **59**(12): p. 2766-2769.
33. Lutterbach, B., et al., *The inv (16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(22): p. 12822-12827.
34. Breems, D.A., et al., *Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype.* Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(29): p. 4791-4797.
35. Marcucci, G., T. Haferlach, and H. Döhner, *Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications.* Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(5): p. 475-486.

36. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(3): p. 254-266.
37. Mrózek, K., et al., *Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?* Blood, 2007. **109**(2): p. 431-448.
38. Döhner, K. and H. Döhner, *Molecular characterization of acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2008. **93**(7): p. 976-982.
39. Schlenk, R.F., et al., *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2008. **358**(18): p. 1909-1918.
40. Döhner, H., 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**(3): p. 453-474.
41. Wouters, B.J., et al., *Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome*. Blood, 2009. **113**(13): p. 3088-3091.
42. Thiede, C., 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 Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334)*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4326-4335.
43. Gale, R.E., 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**(5): p. 2776-2784.
44. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(25): p. 2424-2433.
45. Ribeiro, A.F.T., et al., *Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(24): p. 5824-5831.
46. Renneville, A., et al., *Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association*. Leukemia, 2012. **26**(6): p. 1247-1254.
47. Gaidzik, V.I., et al., *Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG)*. Blood, 2013. **121**(23): p. 4769-4777.
48. Ward, P.S., et al., *The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting  $\alpha$ -ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate*. Cancer cell, 2010. **17**(3): p. 225-234.
49. Schnittger, S., et al., *IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5486-5496.
50. Paschka, P., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(22): p. 3636-3643.
51. Marcucci, G., et al., *IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(14): p. 2348-2355.
52. Boissel, N., et al., *Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(23): p. 3717-3723.
53. Chaturvedi, A., et al., *Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML*. Blood, 2013. **122**(16): p. 2877-2887.

54. Döhner, K., et al., *Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm*. Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(15): p. 3254-3261.
55. Patel, J.P., et al., *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(12): p. 1079-1089.
56. Metzeler, K.H., et al., *TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(10): p. 1373-1381.
57. Gaidzik, V.I., et al., *TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group*. Journal of Clinical Oncology, 2012. **30**(12): p. 1350-1357.
58. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. Cancer cell, 2010. **18**(6): p. 553-567.
59. Schnittger, S., et al., *ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome*. Leukemia, 2012.
60. Chou, W.-C., et al., *Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4086-4094.
61. Metzeler, K.H., 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**(26): p. 6920-6929.
62. Pratorcorna, M., et al., *Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value*. Haematologica, 2012. **97**(3): p. 388-392.
63. Ley, T., et al., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N. Engl. J. Med, 2013. **368**(22): p. 2059-2074.
64. Shen, Y., et al., *Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2011. **118**(20): p. 5593-5603.
65. Grossmann, V., et al., *A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations*. Blood, 2012. **120**(15): p. 2963-2972.
66. Tanner, S.M., et al., *BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(24): p. 13901-13906.
67. Baldus, C.D., et al., *BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1613-1618.
68. Langer, C., et al., *High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study*. Blood, 2008. **111**(11): p. 5371-5379.
69. Metzeler, K.H., et al., *ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(30): p. 5031-5038.
70. Marcucci, G., et al., *High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(22): p. 3337-3343.

71. Kataoka, K., et al., *Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity*. The Journal of experimental medicine, 2011. **208**(12): p. 2403-2416.
72. Rockova, V., et al., *Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers*. Blood, 2011. **118**(4): p. 1069-1076.
73. Gröschel, S., et al., *High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(12): p. 2101-2107.
74. Langer, C., et al., *Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(19): p. 3198-3204.
75. Heuser, M., et al., *MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1639-1647.
76. Valk, P.J., et al., *Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(16): p. 1617-1628.
77. Verhaak, R.G., et al., *Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3747-3754.
78. Kohlmann, A., et al., *Gene expression profiling in AML with normal karyotype can predict mutations for molecular markers and allows novel insights into perturbed biological pathways*. Leukemia, 2010. **24**(6): p. 1216-1220.
79. Fröhling, S., et al., *CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations*. Journal of Clinical Oncology, 2004. **22**(4): p. 624-633.
80. Bullinger, L., et al., *Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(16): p. 1605-1616.
81. Bullinger, L., et al., *An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4490-4495.
82. Radmacher, M.D., et al., *Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1677-1683.
83. Metzeler, K.H., et al., *An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **112**(10): p. 4193-4201.
84. Eppert, K., et al., *Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia*. Nature medicine, 2011. **17**(9): p. 1086-1093.
85. Gentles, A.J., et al., *Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia*. JAMA: the journal of the American Medical Association, 2010. **304**(24): p. 2706-2715.
86. Metzeler, K., et al., *A stem cell-like gene expression signature associates with inferior outcomes and a distinct microRNA expression profile in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2013.
87. Li, Z., et al., *Identification of a 24-gene prognostic signature that improves the European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: an international collaborative study*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(9): p. 1172-1181.
88. Hourigan, C.S. and J.E. Karp, *Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2013. **10**(8): p. 460-471.
89. Paietta, E., *Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age*. ASH Education Program Book, 2012. **2012**(1): p. 35-42.



90. Freeman, S.D., J.V. Jovanovic, and D. Grimwade. *Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia*. in *Seminars in oncology*. 2008: Elsevier.
91. Yin, J.A.L., et al., *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**(14): p. 2826-2835.
92. Jourdan, E., et al., *Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2013. **121**(12): p. 2213-2223.
93. Corbacioglu, A., et al., *Prognostic Impact of Minimal Residual Disease in CBF-MYH11-Positive Acute Myeloid Leukemia*. *Journal of Clinical Oncology*, 2010. **28**(23): p. 3724-3729.
94. Krönke, J., et al., *Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group*. *Journal of Clinical Oncology*, 2011. **29**(19): p. 2709-2716.
95. Cilloni, D., et al., *Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. **27**(31): p. 5195-5201.
96. Ommen, H.B., et al., *Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBF-MYH11 acute myeloid leukemias*. *Blood*, 2010. **115**(2): p. 198-205.
97. Terwijn, M., et al., *High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013: p. JCO. 2012.45. 9628.
98. Rossi, G., et al., *Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets*. *Leukemia research*, 2012. **36**(4): p. 401-406.
99. Kwon, M., et al., *Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2012. **18**(8): p. 1235-1242.
100. Buccisano, F., et al., *Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(13): p. 2295-2303.
101. Platzbecker, U., et al., *Azacitidine for treatment of imminent relapse in MDS or AML patients after allogeneic HSCT: results of the RELAZA trial*. *Leukemia*, 2011. **26**(3): p. 381-389.
102. Yan, C.-H., et al., *Risk stratification-directed donor lymphocyte infusion could reduce relapse of standard-risk acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2012. **119**(14): p. 3256-3262.
103. Zhu, H.-H., et al., *MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t (8; 21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial*. *Blood*, 2013. **121**(20): p. 4056-4062.
104. Patel, J.P. and R.L. Levine, *How do novel molecular genetic markers influence treatment decisions in acute myeloid leukemia?* *ASH Education Program Book*, 2012. **2012**(1): p. 28-34.
105. Cornelissen, J.J., et al., *The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach*. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2012.
106. Heim, S., et al., *A new specific chromosomal rearrangement, t (8; 16)(p11; p13), in acute monocytic leukaemia*. *British journal of haematology*, 1987. **66**(3): p. 323-326.

1107. Hanslip, J., et al., *The translocation t (8; 16)(p11; p13) defines an AML subtype with distinct cytology and clinical features*. *Leukemia & Lymphoma*, 1992. **6**(6): p. 479-486.
1108. Stark, B., et al., *A distinct subtype of M4/M5 acute myeloblastic leukemia (AML) associated with t (8; 16)(p11: p13), in a patient with the variant t (8; 19)(p11: q13)—case report and review of the literature*. *Leukemia research*, 1995. **19**(6): p. 367-379.
1109. Velloso, E.R.P., et al., *Translocation t (8; 16)(p11; p13) in acute non-lymphocytic leukemia: report on two new cases and review of the literature*. *Leukemia & Lymphoma*, 1996. **21**(1-2): p. 137-142.
1110. Sun, T. and E. Wu, *Acute monoblastic leukemia with t (8; 16): a distinct clinicopathologic entity; report of a case and review of the literature*. *American journal of hematology*, 2001. **66**(3): p. 207-212.
1111. Bernasconi, P., et al., *Translocation (8; 16) in a patient with acute myelomonocytic leukemia, occurring after treatment with fludarabine for a low-grade non-Hodgkin's lymphoma*. *Haematologica*, 2000. **85**(10): p. 1087-1091.
1112. Tasaka, T., et al., *Secondary acute monocytic leukemia with a translocation t (8; 16)(p11; p13): case report and review of the literature*. *Leukemia & Lymphoma*, 2004. **45**(3): p. 621-625.
1113. Camós, M., et al., *Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t (8; 16)(p11; p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression*. *Cancer research*, 2006. **66**(14): p. 6947-6954.
1114. Haferlach, T., et al., *AML with translocation t (8; 16)(p11; p13) demonstrates unique cytomorphological, cytogenetic, molecular and prognostic features*. *Leukemia*, 2009. **23**(5): p. 934-943.
1115. Bacher, U., et al., *Interactive diagnostics in the indication to allogeneic SCT in AML*. *Bone marrow transplantation*, 2009. **43**(10): p. 745-756.
1116. Borrow, J., et al., *The translocation t (8; 16)(p11; p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein*. *Nature genetics*, 1996. **14**(1): p. 33-41.
1117. Aguiar, R.C., et al., *Abnormalities of chromosome band 8p11 in leukemia: two clinical syndromes can be distinguished on the basis of MOZ involvement*. *Blood*, 1997. **90**(8): p. 3130-3135.
1118. Chaffanet, M., et al., *MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t (8; 22)*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2000. **28**(2): p. 138-144.
1119. Coulthard, S., et al., *Two cases of inv (8)(p11q13) in AML with erythrophagocytosis: a new cytogenetic variant*. *British journal of haematology*, 1998. **100**(3): p. 561-563.
1120. Liang, J., et al., *Acute mixed lineage leukemia with an inv (8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2*. *Blood*, 1998. **92**(6): p. 2118-2122.
1121. Panagopoulos, I., et al., *Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t (10; 16)(q22; p13)*. *Human Molecular Genetics*, 2001. **10**(4): p. 395-404.
1122. Panagopoulos, I., et al., *Acute myeloid leukemia with inv (8)(p11q13)*. *Leukemia & Lymphoma*, 2000. **39**(5-6): p. 651-656.
1123. Glassman, A.B. and K.J. Hayes, *Translocation (11; 16)(q23; p13) acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2003. **33**(3): p. 285-288.
1124. Gervais, C., et al., *Acute myeloid leukaemia with 8p11 (MYST3) rearrangement: an integrated cytologic, cytogenetic and molecular study by the groupe francophone de cytogenetique hematologique*. *Leukemia*, 2008. **22**(8): p. 1567-1575.
1125. Champagne, N., N. Pelletier, and X.-J. Yang, *The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase*. *Oncogene*, 2001. **20**(3): p. 404-409.
1126. Yang, X. and M. Ullah, *MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(37): p. 5408-5419.

127. Chan, E.M., et al., *MOZ and MOZ-CBP cooperate with NF- $\kappa$ B to activate transcription from NF- $\kappa$ B-dependent promoters*. *Experimental hematology*, 2007. **35**(12): p. 1782-1792.
128. Vo, N. and R.H. Goodman, *CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(17): p. 13505-13508.
129. Blobel, G.A., et al., *CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(5): p. 2061-2066.
130. Wadgaonkar, R., et al., *CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor- $\kappa$ B and p53 signaling*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(4): p. 1879-1882.
131. Coenen, E.A., et al., *Pediatric acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13), a distinct clinical and biological entity: a collaborative study by the International-Berlin-Frankfurt-Munster AML-study group*. *Blood*, 2013. **122**(15): p. 2704-13.
132. Dulbecco, R., *Sequencing the Human*. 1986.
133. Lander, E.S., *Initial impact of the sequencing of the human genome*. *Nature*, 2011. **470**(7333): p. 187-197.
134. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature*, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
135. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. *Science Signaling*, 2001. **291**(5507): p. 1304.
136. Pertea, M. and S.L. Salzberg, *Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes*. *Genome Biol*, 2010. **11**(5): p. 206.
137. Stein, L.D., *Human genome: end of the beginning*. *Nature*, 2004. **431**(7011): p. 915-916.
138. Ponting, C.P. and T.G. Belgard, *Transcribed dark matter: meaning or myth?* *Human Molecular Genetics*, 2010. **19**(R2): p. R162-R168.
139. Claverie, J.-M., *Fewer genes, more noncoding RNA*. *Science*, 2005. **309**(5740): p. 1529-1530.
140. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 101-108.
141. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. *Science*, 2005. **309**(5740): p. 1559-1563.
142. Ponting, C.P., *The functional repertoires of metazoan genomes*. *Nature Reviews Genetics*, 2008. **9**(9): p. 689-698.
143. Birney, E., et al., *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. *Nature*, 2007. **447**(7146): p. 799-816.
144. Costa, F.F., *Non-coding RNAs: Meet thy masters*. *Bioessays*, 2010. **32**(7): p. 599-608.
145. Skipper, M., R. Dhand, and P. Campbell, *Presenting ENCODE*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 45-45.
146. Kim, T. and A. Reitmair, *Non-coding RNAs: functional aspects and diagnostic utility in oncology*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. **14**(3): p. 4934-4968.
147. Ecker, J.R., et al., *Genomics: ENCODE explained*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 52-55.
148. Dunham, I., et al., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. 2012.
149. Thurman, R.E., et al., *The accessible chromatin landscape of the human genome*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 75-82.
150. Neph, S., et al., *An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 83-90.
151. Gerstein, M.B., et al., *Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 91-100.
152. Sanyal, A., et al., *The long-range interaction landscape of gene promoters*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 109-113.

153. Gutschner, T. and S. Diederichs, *The Hallmarks of Cancer: A long non-coding RNA point of view*. RNA biology, 2012. **9**(6): p. 703-719.
154. Gibb, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas*. Mol Cancer, 2011. **10**(38): p. 116.
155. Mercer, T.R., M.E. Dinger, and J.S. Mattick, *Long non-coding RNAs: insights into functions*. Nature Reviews Genetics, 2009. **10**(3): p. 155-159.
156. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nature Reviews Genetics, 2011. **12**(12): p. 861-874.
157. Nana-Sinkam, S.P. and C.M. Croce, *Non-coding RNAs in cancer initiation and progression and as novel biomarkers*. Molecular Oncology, 2011. **5**(6): p. 483-491.
158. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14**. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-854.
159. Sana, J., et al., *Novel classes of non-coding RNAs and cancer*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 103.
160. Salmena, L., et al., *A *ceRNA* Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language?* Cell, 2011. **146**(3): p. 353-358.
161. Futreal, P.A., et al., *A census of human cancer genes*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(3): p. 177-183.
162. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-724.
163. Beroukhi, R., et al., *The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers*. Nature, 2010. **463**(7283): p. 899-905.
164. Lujambio, A. and S.W. Lowe, *The microcosmos of cancer*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 347-355.
165. Carrington, J.C. and V. Ambros, *Role of microRNAs in plant and animal development*. Science Signaling, 2003. **301**(5631): p. 336.
166. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.
167. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-862.
168. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nature Reviews Genetics, 2004. **5**(7): p. 522-531.
169. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. Genome Biol, 2004. **5**(3): p. R13.
170. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Current Biology, 2002. **12**(9): p. 735-739.
171. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-906.
172. Lin, S.-Y., et al., *The C. elegans hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target*. Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 639-650.
173. Vella, M.C., et al., *The C. elegans microRNA *let-7* binds to imperfect *let-7* complementary sites from the *lin-41* 3' UTR*. Genes & development, 2004. **18**(2): p. 132-137.
174. Slack, F.J., et al., *The *lin-41* RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor*. Mol. Cell, 2000. **5**(4): p. 659-669.
175. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-89.

176. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-233.
177. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science Signaling, 2001. **294**(5543): p. 853.
178. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science Signaling, 2001. **294**(5543): p. 858.
179. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science Signaling, 2001. **294**(5543): p. 862.
180. Griffiths-Jones, S., *The microRNA registry*. Nucleic acids research, 2004. **32**(suppl 1): p. D109-D111.
181. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome research, 2004. **14**(10a): p. 1902-1910.
182. Zeng, Y., *Principles of micro-RNA production and maturation*. Oncogene, 2006. **25**(46): p. 6156-6162.
183. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(2): p. 126-139.
184. Rana, T.M., *Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(1): p. 23-36.
185. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. The EMBO journal, 2004. **23**(20): p. 4051-4060.
186. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. Rna, 2004. **10**(12): p. 1957-1966.
187. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nature structural & molecular biology, 2006. **13**(12): p. 1097-1101.
188. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-862.
189. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-419.
190. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes & development, 2004. **18**(24): p. 3016-3027.
191. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-235.
192. Kim, V.N., *MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export*. Trends in cell biology, 2004. **14**(4): p. 156-159.
193. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-98.
194. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science Signaling, 2001. **293**(5531): p. 834.
195. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-366.
196. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-744.
197. Haase, A.D., et al., *TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing*. EMBO reports, 2005. **6**(10): p. 961-967.
198. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. The EMBO journal, 2006. **25**(3): p. 522-532.
199. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(9): p. 597-610.
200. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-216.

201. Du, T., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**: p. 199-208.
202. Mah, S.M., et al., *miRNA\*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex?* Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2010. **20**(2): p. 141-8.
203. Tomari, Y., T. Du, and P.D. Zamore, *Sorting of Drosophila small silencing RNAs*. Cell, 2007. **130**(2): p. 299.
204. Czech, B., et al., *Hierarchical Rules for Argonaute Loading in < i> Drosophila</i>*. Molecular cell, 2009. **36**(3): p. 445-456.
205. Okamura, K., N. Liu, and E.C. Lai, *Distinct Mechanisms for MicroRNA Strand Selection by< i> Drosophila</i> Argonautes*. Molecular cell, 2009. **36**(3): p. 431-444.
206. Murakami, Y., et al., *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues*. Oncogene, 2005. **25**(17): p. 2537-2545.
207. Ro, S., et al., *Tissue-dependent paired expression of miRNAs*. Nucleic acids research, 2007. **35**(17): p. 5944-5953.
208. Kuchenbauer, F., et al., *Comprehensive analysis of mammalian miRNA\* species and their role in myeloid cells*. Blood, 2011. **118**(12): p. 3350-3358.
209. Tang, G., *siRNA and miRNA: an insight into RISCs*. Trends in biochemical sciences, 2005. **30**(2): p. 106.
210. Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**(10): p. 775-789.
211. Ambros, V., et al., *A uniform system for microRNA annotation*. Rna, 2003. **9**(3): p. 277-279.
212. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic acids research, 2008. **36**(suppl 1): p. D154-D158.
213. Brunning, R., et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Chapter 5, Myelodysplastic syndromes/neoplasms overview, 2008: p. 88-93.
214. Moqadam, F.A., R. Pieters, and M. den Boer, *The hunting of targets: challenge in miRNA research*. Leukemia, 2012. **27**(1): p. 16-23.
215. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-798.
216. Krek, A., et al., *Combinatorial microRNA target predictions*. Nature genetics, 2005. **37**(5): p. 495-500.
217. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome research, 2009. **19**(1): p. 92-105.
218. Ivanovska, I. and M.A. Cleary, *Combinatorial microRNAs: working together to make a difference*. Cell Cycle, 2008. **7**(20): p. 3137-3142.
219. Stark, A., et al., *Discovery of functional elements in 12 Drosophila genomes using evolutionary signatures*. Nature, 2007. **450**(7167): p. 219-232.
220. Ørom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Molecular cell, 2008. **30**(4): p. 460-471.
221. Eiring, A.M., et al., *miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts*. Cell, 2010. **140**(5): p. 652-665.
222. Khraiwesh, B., et al., *Transcriptional control of gene expression by microRNAs*. Cell, 2010. **140**(1): p. 111.
223. Kim, D.H., et al., *MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(42): p. 16230-16235.
224. Gonzalez, S., D.G. Pisano, and M. Serrano, *Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs*. Cell Cycle, 2008. **7**(16): p. 2601-2608.
225. Almeida, M.I., R.M. Reis, and G.A. Calin, *Decoy activity through microRNAs: the therapeutic implications*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2012. **12**(9): p. 1153-1159.

226. Beitzinger, M. and G. Meister, *MicroRNAs: from decay to decoy*. Cell, 2010. **140**(5): p. 612-614.
227. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1401-1414.
228. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-866.
229. Davis, B.N. and A. Hata, *Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms*. Cell Commun Signal, 2009. **7**(1): p. 18.
230. Turner, M.J. and F.J. Slack, *Transcriptional control of microRNA expression in C. elegans: promoting better understanding*. RNA biology, 2009. **6**(1): p. 49-53.
231. Johnston Jr, R.J., et al., *From the Cover: MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision*. Science Signaling, 2005. **102**(35): p. 12449.
232. Ryan, B.M., A.I. Robles, and C.C. Harris, *Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(6): p. 389-402.
233. Chen, C.-Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science, 2004. **303**(5654): p. 83-86.
234. Garzon, R. and C.M. Croce, *MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis*. Current opinion in hematology, 2008. **15**(4): p. 352-358.
235. Havelange, V. and R. Garzon, *MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis*. American journal of hematology, 2010. **85**(12): p. 935-942.
236. Cobb, B.S., et al., *T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer*. The Journal of experimental medicine, 2005. **201**(9): p. 1367-1373.
237. O'Carroll, D., et al., *A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway*. Genes & development, 2007. **21**(16): p. 1999-2004.
238. El Gazzar, M. and C.E. McCall, *MicroRNAs regulatory networks in myeloid lineage development and differentiation: regulators of the regulators*. Immunology and Cell Biology, 2011. **90**(6): p. 587-593.
239. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(24): p. 15524-15529.
240. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. Nature Reviews Genetics, 2009. **10**(10): p. 704-714.
241. Felli, N., et al., *MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18081-6.
242. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer research, 2005. **65**(16): p. 7065-7070.
243. Mi, S., et al., *MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(50): p. 19971-19976.
244. Jongen-Lavrencic, M., et al., *MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(10): p. 5078-5085.
245. Garzon, R., et al., *MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3183-3189.
246. Chung, S.S., W. Hu, and C.Y. Park, *The role of microRNAs in hematopoietic stem cell and leukemia stem cell function*. Therapeutic advances in hematology, 2011. **2**(5): p. 317-334.
247. Li, Z., et al., *Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(40): p. 15535-15540.

248. Dixon-Mclver, A., et al., *Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia*. PloS one, 2008. **3**(5): p. e2141.
249. Cammarata, G., et al., *Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia*. American journal of hematology, 2010. **85**(5): p. 331-339.
250. Popovic, R., et al., *Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization*. Blood, 2009. **113**(14): p. 3314-3322.
251. Mi, S., et al., *Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(8): p. 3710-3715.
252. Jiang, X., et al., *miR-495 is a tumor-suppressor microRNA down-regulated in MLL-rearranged leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(47): p. 19397-19402.
253. Rucker, F., et al., *Altered miRNA and gene expression in acute myeloid leukemia with complex karyotype identify networks of prognostic relevance*. Leukemia, 2012. **27**(2): p. 353-361.
254. Garzon, R., et al., *Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(10): p. 3945-3950.
255. Becker, H., et al., *Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene-and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(4): p. 596-604.
256. Coskun, E., et al., *The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloid leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia*. Leuk Res, 2011. **35**(2): p. 208-13.
257. Marcucci, G., et al., *Prognostic significance of, and gene and microRNA expression signatures associated with, CEBPA mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with high-risk molecular features: a Cancer and Leukemia Group B Study*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(31): p. 5078-5087.
258. Pulikkan, J.A., et al., *C/EBPalpha regulated microRNA-34a targets E2F3 during granulopoiesis and is down-regulated in AML with CEBPA mutations*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5638-49.
259. Schwind, S., et al., *BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene and microRNA expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. Blood, 2010. **116**(25): p. 5660-5669.
260. Eisfeld, A.-K., et al., *miR-3151 interplays with its host gene BAALC and independently affects outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(2): p. 249-258.
261. Marcucci, G., et al., *The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1121-1129.
262. Sun, S., et al., *The prognostic relevance of miR-212 expression with survival in cytogenetically and molecularly heterogeneous AML*. Leukemia, 2012. **27**(1): p. 100-106.
263. Li, Z., et al., *miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia*. Nature communications, 2012. **2**: p. 688.
264. Marcucci, G., et al., *MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. New England Journal of Medicine, 2008. **358**(18): p. 1919-1928.
265. Li, Z., et al., *Up-regulation of a HOXA-PBX3 homeobox-gene signature following down-regulation of miR-181 is associated with adverse prognosis in patients with cytogenetically abnormal AML*. Blood, 2012. **119**(10): p. 2314-2324.



266. Bai, H., et al., *miR-181a sensitizes resistant leukaemia HL-60/Ara-C cells to Ara-C by inducing apoptosis*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2012. **138**(4): p. 595-602.
267. Hickey, C.J., et al., *Lenalidomide-mediated enhanced translation of C/EBP $\alpha$ -p30 protein up-regulates expression of the antileukemic microRNA-181a in acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **121**(1): p. 159-169.
268. Schwind, S., et al., *Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(36): p. 5257-5264.
269. Marcucci, G., et al., *Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(17): p. 2086-2093.
270. Fazi, F., et al., *Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein*. Cancer cell, 2007. **12**(5): p. 457-466.
271. Pagano, F., et al., *Epigenetic role of miRNAs in normal and leukemic hematopoiesis*. Epigenomics, 2013. **5**(5): p. 539-552.
272. Li, Y., et al., *Epigenetic silencing of microRNA-193a contributes to leukemogenesis in t(8; 21) acute myeloid leukemia by activating the PTEN/PI3K signal pathway*. Blood, 2013. **121**(3): p. 499-509.
273. Saumet, A., et al., *Transcriptional repression of microRNA genes by PML-RARA increases expression of key cancer proteins in acute promyelocytic leukemia*. Blood, 2009. **113**(2): p. 412-421.
274. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
275. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review*. EMBO molecular medicine, 2012. **4**(3): p. 143-159.
276. Thomas, M., J. Lieberman, and A. Lal, *Desperately seeking microRNA targets*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(10): p. 1169-1174.
277. Ling, H., M. Fabbri, and G.A. Calin, *MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development*. Nature Reviews Drug Discovery, 2013. **12**(11): p. 847-865.
278. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nature Reviews Genetics, 2007. **8**(3): p. 173-184.
279. Pecot, C.V., et al., *RNA interference in the clinic: challenges and future directions*. Nature Reviews Cancer, 2010. **11**(1): p. 59-67.
280. Broderick, J.A. and P.D. Zamore, *MicroRNA therapeutics*. Gene therapy, 2011. **18**(12): p. 1104-1110.
281. de Pontual, L., et al., *Germline deletion of the miR-17 [sim] 92 cluster causes skeletal and growth defects in humans*. Nature genetics, 2011. **43**(10): p. 1026-1030.
282. Janssen, H.L., et al., *Treatment of HCV infection by targeting microRNA*. New England Journal of Medicine, 2013. **368**(18): p. 1685-1694.
283. Kotani, A., et al., *A novel mutation in the miR-128b gene reduces miRNA processing and leads to glucocorticoid resistance of MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells*. Cell Cycle, 2010. **9**(6): p. 1037-1042.
284. Bockhorn, J., et al., *MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11*. Nature communications, 2013. **4**: p. 1393.
285. Kim, S.-J., et al., *Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer*. Journal of controlled release, 2011. **155**(3): p. 427-434.
286. Velu, C.S., et al., *Therapeutic antagonists of microRNAs deplete leukemia-initiating cell activity*. The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(1): p. 222.

287. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-838.
288. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. New England Journal of Medicine, 2008. **358**(11): p. 1148-1159.
289. Fabbri, M., et al., *MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications*. Leukemia, 2008. **22**(6): p. 1095-1105.
290. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-833.
291. Iliopoulos, D., et al., *STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer*. Molecular cell, 2010. **39**(4): p. 493-506.
292. Rokudai, S., et al., *Monocytic leukemia zinc finger (MOZ) interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(1): p. 237-244.
293. Katsumoto, T., et al., *MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells*. Genes & development, 2006. **20**(10): p. 1321-1330.
294. Thomas, T., et al., *Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells*. Genes & development, 2006. **20**(9): p. 1175-1186.
295. Goodman, R.H. and S. Smolik, *CBP/p300 in cell growth, transformation, and development*. Genes & development, 2000. **14**(13): p. 1553-1577.
296. Kung, A.L., et al., *Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP*. Genes & development, 2000. **14**(3): p. 272-277.
297. Rebel, V.I., et al., *Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(23): p. 14789-14794.
298. Pasqualucci, L., et al., *Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma*. Nature, 2011. **471**(7337): p. 189-195.
299. Hermeking, H., *p53 enters the microRNA world*. Cancer cell, 2007. **12**(5): p. 414-8.
300. Suzuki, H.I. and K. Miyazono, *Dynamics of microRNA biogenesis: crosstalk between p53 network and microRNA processing pathway*. Journal of molecular medicine, 2010. **88**(11): p. 1085-1094.
301. Prives, C. and J.L. Manley, *Why is p53 acetylated?* Cell, 2001. **107**(7): p. 815-818.
302. Mullighan, C.G., et al., *CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia*. Nature, 2011. **471**(7337): p. 235-239.
303. Figueroa, M.E., et al., *DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia*. Cancer cell, 2010. **17**(1): p. 13-27.
304. Santoro, M., et al., *Minireview: RET: normal and abnormal functions*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5448-5451.
305. Takahashi, M. and G.M. Cooper, *ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases*. Molecular and cellular biology, 1987. **7**(4): p. 1378-1385.
306. Gattei, V., et al., *Expression of the RET receptor tyrosine kinase and GDNFR- $\alpha$  in normal and leukemic human hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow microenvironment*. Blood, 1997. **89**(8): p. 2925-2937.
307. Danen-van Oorschot, A.A., et al., *Differentially expressed miRNAs in cytogenetic and molecular subtypes of pediatric acute myeloid leukemia*. Pediatric blood & cancer, 2012. **58**(5): p. 715-721.
308. Scheffer, A.-R., et al., *Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer?* World journal of urology, 2012: p. 1-6.
309. Navarro, A., et al., *Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma*. Blood, 2009. **114**(14): p. 2945-2951.

310. Yamada, Y., et al., *Tumor-suppressive microRNA-135a inhibits cancer cell proliferation by targeting the c-MYC oncogene in renal cell carcinoma*. *Cancer science*, 2012.
311. Nagel, R., et al., *Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer*. *Cancer research*, 2008. **68**(14): p. 5795-5802.
312. Zhou, W., et al., *MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2012. **44**(10): p. 838-846.
313. Navarro, A., M. Díaz-Beyá, and M. Monzó, *MIR135A1 (microRNA 135a-1)*. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2014.
314. Li, C., et al., *MicroRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer*. *Cancer Letters*, 2012. **320**(2): p. 189-197.
315. Weng, C., et al., *miR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and metastasis by targeting angiogenin*. *Cancer Letters*, 2012. **323**(2): p. 171-179.
316. Tsai, K.W., et al., *Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer*. *International Journal of Cancer*, 2011. **129**(11): p. 2600-2610.
317. Stark, M.S., et al., *Characterization of the melanoma miRNAome by deep sequencing*. *PLoS one*, 2010. **5**(3): p. e9685.
318. Schotte, D., et al., *Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2011. **25**(9): p. 1389-1399.
319. Döhner, H., 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**(3): p. 453-74.
320. Schlenk, R.F., et al., *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(18): p. 1909-18.

## 7. Anexos

### 7.1 Revisiones artículo 1

#### 7.1.1. Primera revision

Barcelona, 18th July, 2012

Prof. Nicole Muller-Berat Killmann

Editor-in-Chief

Leukemia

Re: Resubmission of manuscript no. MILLIE12-LEU-0066 (*Acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting RET protooncogene*)

Dear Prof. Muller-Berat,

We thank you for your letter of 24 February 2012 with the reviewers' comments on our referenced manuscript. We greatly appreciate your decision to reconsider our manuscript.

In order to answer the main comments of the reviewers and the Section Editor, Prof. Krzysztof Mrozek, we have enlarged the sample size of our target population of patients diagnosed with acute myeloid leukemia with t(8;16) with three additional samples – for a final total of seven – kindly provided by collaborators from three different institutions. We have repeated the miRNA profiling, the assessment of mRNA levels of selected genes and the analysis of methylation of several miRNA promoter genes with the inclusion of these new samples. These new experiments have confirmed the distinctive miRNA signature associated with acute myeloid leukemia with t(8;16). In addition, we have addressed all other issues raised by the reviewers and have modified the manuscript accordingly. Replies to reviewers and corresponding modifications in the new version of the manuscript are detailed in the enclosed documents.

We believe that with these modifications, our manuscript is significantly improved and we hope that it is now acceptable for publication in *Leukemia*.

Looking forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Jordi Esteve, MD  
Hematology Department  
Hospital Clínic  
Barcelona  
Spain  
Phone: +34932275428  
Fax: +34932275484  
E-mail: [jesteve@clinic.ub.es](mailto:jesteve@clinic.ub.es)

## Reply to Section Editor

Dear Prof. Krzysztof Mrozek:

Please find enclosed the answer to your request concerning our submitted article MILLIE12-LEU-0066, entitled "*Acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting RET protooncogene*".

*Although the study is interesting and potentially important, it is vital that the number of patients with t(8;16) is increased to substantiate the findings and conclusions.*

In order to answer the main comments of the reviewers and the Section Editor, Prof. Krzysztof Mrozek, we have enlarged the sample size of our target population of patients diagnosed with acute myeloid leukemia with t(8;16) with three additional samples – for a final total of seven – kindly provided by collaborators from three different institutions. We have repeated the miRNA profiling, the assessment of mRNA levels of selected genes and the analysis of methylation of several miRNA promoter genes with the inclusion of these new samples. These new experiments have confirmed the distinctive miRNA signature associated with acute myeloid leukemia with t(8;16). In addition, we have addressed all other issues raised by the reviewers and have modified the manuscript accordingly. Replies to reviewers and corresponding modifications in the new version of the manuscript are detailed in the enclosed documents.



## Replies to Reviewers

### Reviewer no.1

1. *Genes should be written in italics*

All gene denominations used in the manuscript have now been written in italics.

2. *The citation of the references should follow the guidelines of the journal, as given here in brackets is not correct.*

All the citations of the references included in the manuscript have been given following the guidelines of the journal and the instructions for *Leukemia* output style provided in the journal webpage, as follows: "EndNote users should select the *Leukemia* output style for the correct reference style. [http://mts-leu.nature.com/cgi-bin/main.plex?form\\_type=display\\_auth\\_instructions#preparation](http://mts-leu.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=display_auth_instructions#preparation)".

We have noticed, however, that in the online version of Leukemia articles, the references are cited using parentheses, while in the print version, the citations are given in superscript. We will be happy to change the format of the citations, but it is not clear to us which format is required.

3. *It seems to be very unlikely that the diagnosis of all AML patients (n=117) between the years 1994 and 2009 had been following the WHO criteria, the first version of the WHO book was published in 2001 and changed during the second version for 2008. So the authors should rephrase this paragraph and may give information on FAB subtype as well as retrospective information on the WHO subtype.*

Effectively, diagnostic and classification criteria changed during this period, following contemporary FAB and WHO classification. Therefore, the sentence describing the criteria used for diagnosis and classification has been modified in the Material & Methods section, as follows:

AML diagnosis and classification was based on accepted FAB or WHO criteria, depending on the year of diagnosis. The main characteristics of patients, including FAB classification, are summarized in Table 1. The availability of cytogenetic and molecular information on *NPM1* & *CEBPA* mutational status in all these patients



allowed us to reclassify them following the WHO 2008 criteria (Table S1).

Information on FAB subtype of all patients included in the study is now provided in the revised Table 1. Moreover, complete cytogenetic and molecular information, corresponding to main WHO diagnostic categories, is also given in Table 1. In fact, the availability of cytogenetic and molecular information on *NPM1* & *CEBPA* mutational status in all these patients allowed us to reclassify them following WHO 2008 criteria. We have included this information in Table S1, shown below.

<b>WHO-2008 category</b>	<i>n</i> =120
<b>AML with recurrent genetic abnormalities</b>	
– AML with t(8;21)(q22;q22)/ <i>RUNX1-RUNXT1</i>	3
– AML with inv(16) or t(16;16)(p13;q22)/ <i>CBFβ-MYH11</i>	2
– Acute promyelocytic leukemia [t(15;17) & <i>PML-RAR-α</i> ]	4
– AML with t(9;11)(p22;q23)/ <i>AF9(MLLT3)-MLL</i>	2
– AML with t(6;9)(p23;q34)/ <i>DEK-CAN(NUP214)</i>	8
– AML with inv(3) or t(3;3)(q21;q26)/ <i>RPN1-EVI1</i>	3
– AML with mutated <i>NPM1</i>	42
– AML with normal karyotype and <i>CEBPA</i> mutation	11
<b>AML with myelodysplasia-related changes</b>	11
<b>AML, NOS</b>	
– AML with minimal differentiation	0
– AML without maturation	14
– AML with maturation	5
– Acute myelomonocytic leukemia	11
– Acute monoblastic & monocytic leukemia	4

4. *The authors refer to further molecular genes that were investigated: what about FLT3-ITD? Table 1 gives information on NPM1 mutated and CEBPA mutated cases, in addition to the point raised above, it seems necessary to also know about the FLT3 status of these patients. It would also be worthwhile to know this in the cases with t(8;16).*

As shown in the revised Table 1, 46 patients (38%) harbored an internal tandem duplication of FLT3 gene, 36 (42%) of them corresponding to intermediate-risk cytogenetics. Interestingly, FLT3-ITD was not observed in any of the seven t(8;16) AML cases included in this study.

5. *Why were only a low number of cases with monosomal karyotype or complex karyotype detected? If the median age is 52 and the range is up to 82, normally around 10% of cases should be with complex aberrant karyotype in a study with 117 patients. Could the authors please comment on their cohort and how selection was performed?*

Patients included in the study were not consecutively diagnosed with AML within the study period but correspond to a wide selection of different AML subtypes in order to allow an extensive comparison of t(8;16) miRNA profiling over all the AML biological spectrum. Thus, this series was enriched with younger patients, included in intensive therapy protocols, and determined AML subtypes, such as t(8;16) AML for focused study purposes.

6. *How many patients had a normal karyotype?*

Sixty-one patients, accounting for 51% of the entire cohort, had a normal karyotype. This information has been now included in the revised Table 1.

7. *How was favourable risk, intermediate risk and high risk defined, according to which score?*

Cytogenetic prognostic categories were based on the refined MRC classification (Grimwade D *et al*, Blood 2010). Nonetheless, t(8;16) AML, which was not specifically analyzed in the Grimwade study due to its low frequency, was included among high-risk patients based on reported series of t(8;16) AML patients. However, in the revised

Table 1, in order to avoid confusion on the part of the reader, the prognostic categorization of cytogenetic abnormalities has been omitted.

8. *In supplemental figure S2 the authors refer to FAB subtypes M4 and M5, this brings up again the question of classification: WHO or FAB? Please clarify these aspects for the reader, I would suggest both as suggested above.*

Please see our reply to comment 3, above. In addition, please note that we have clarified for the reader that the AML classification used depended on the year of diagnosis. We have included the FAB classification in Table 1 and the WHO 2008 classification in Supplementary Table 1.

Since t(8;16) AML cases typically display a monocytic stage of differentiation and are generally classified as M4 or M5 subtypes of FAB classification, we aimed to analyze if part of its miRNA profile could be attributed, at least in part, to its monocytic component. For this reason, we selected a group of non-t(8;16) AML patients with partial or total monocytic differentiation, corresponding to M4 or M5 FAB subtypes, as control group for comparison of their miRNA profile with that of t(8;16) AML patients.

9. *As a matter of fact, patients with t(8;16) normally show a very strong myeloperoxidase as well as non-specific esterase summing up to more than 100% within their blast cells. Is there anything known about these four cases with respect to this data?*

This information was available for five patients. All except one patient exhibited a characteristic dual, simultaneous positivity for both myeloperoxidase and NSE staining in virtually 100% of blast cells. The remaining patient was negative for myeloperoxidase staining and only showed positivity for NSE. We have included this information in Table 1.

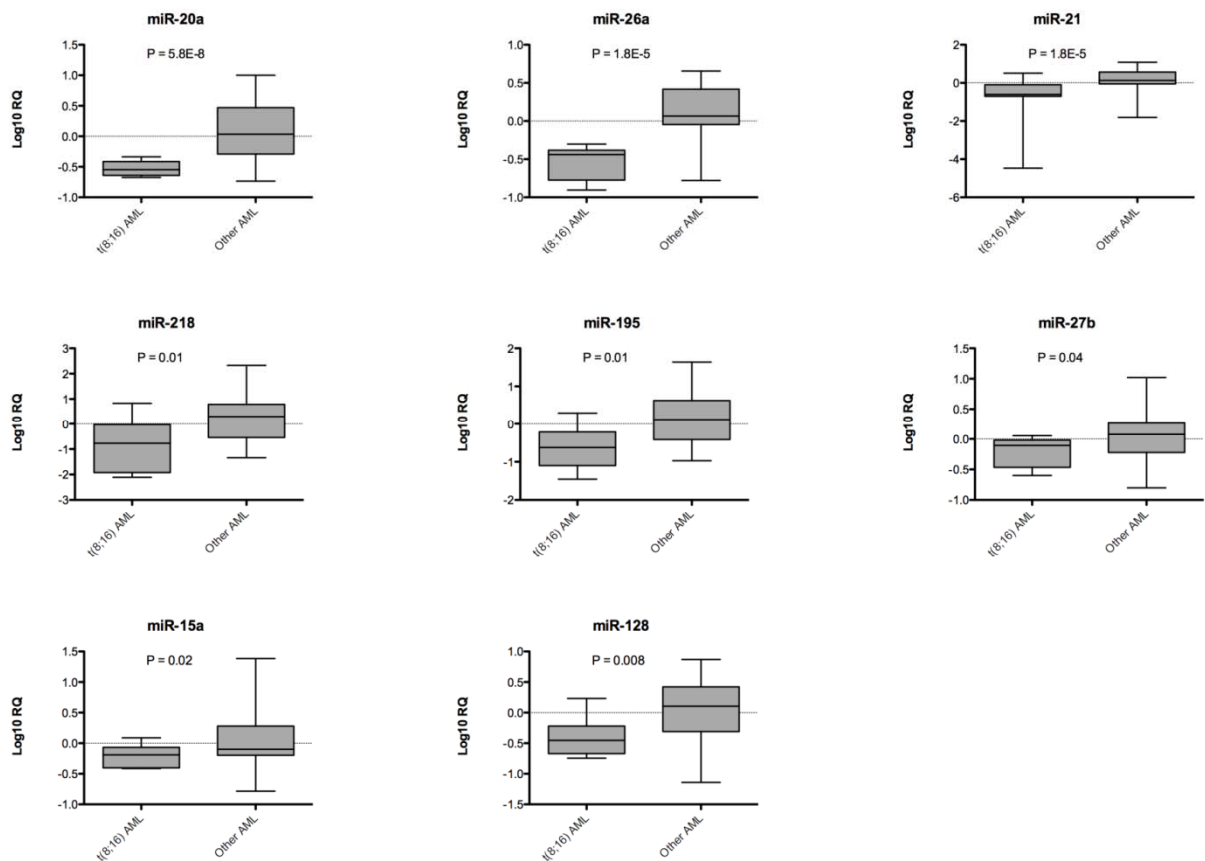
## **Reviewer no.2**

1. *t(8;16) AMLs represent only a small portion (n=4) of the 117 profiled AML cases. To strengthen the presented findings, more cases t(8;16) should be profiled. In addition, the presented findings such as the most differentially expressed miRNAs should be validated by a second method.*

As suggested by the reviewer, we have increased the number of patients with acute myeloid leukemia associated to translocation t(8;16) with three additional cases with available bone marrow DNA & RNA, for a total of seven, kindly provided by collaborators from three external institutions (Dr. Francesco Lo Coco and Tiziana Ottone, Hospital Tor Vergata, Rome; Dr. David Grimwade and Adam Ivey, Guy's Hospital, London; and Dr. Olga Salamero, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona). In these additional t(8;16) AML samples, we were able to analyze the miRNA profile, the mRNA expression levels of selected genes, and the methylation status of miRNA genes. The re-analysis of the miRNA profile, including these additional samples, confirmed the majority of miRNAs included in our previously described miRNA signature. Thus, hierarchical cluster analysis of miRNA profile showed that all seven t(8;16) samples clustered together, resting apart from a wide variety of AML biological subtypes across the AML spectrum. Figure 1 has been modified with an image of the new hierarchical cluster analysis after the inclusion of new samples. Supervised analysis confirmed that the distinctive t(8;16) miRNA signature is characterized by 94 miRNAs, most of which (n=90) showed a significantly down-regulated expression. The final list of miRNAs characterizing t(8;16) is provided in a new Table 2 of the revised manuscript.

Real time technique for the analysis of miRNAs is considered the gold-standard method for miRNA profiling, showing the highest dynamic range detection in comparison with array or sequencing based techniques (Baker M. Nature Methods 2010). Nonetheless, as suggested by this reviewer, we performed a validation experiment for some of the most characteristic miRNAs of the signature, including some of the most differentially expressed miRNAs (miR-20a, miR-26a, miR-21) and a group of miRNAs which target *RET* protooncogene, (miR-218, miR-195, miR-27b, miR-27a, miR-15b, miR-15a, miR-128). For this validation experiment, we used all seven t(8;16) AML patients and an additional 40 AML patients (the same set of patients used for gene expression analysis). The validation test was performed using miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR Primers (Exiqon, Denmark). This technique differs

from the TaqMan system used in the study (based on stem-loop RT PCR), since it is a qPCR system that combines a Universal RT reaction with LNA™-enhanced PCR primers, which results in unmatched sensitivity and specificity. This validation experiment confirmed the differential expression of all the three miRNAs most differentially expressed in t(8;16) AML (miR-20a,  $p = 1.8 \times 10^{-8}$ ; miR-26a,  $p = 1.8 \times 10^{-5}$ ; miR-21,  $p = 2 \times 10^{-3}$ ). Moreover, it also confirmed the significant downregulation of most of the RET-targeting miRNAs analyzed (miR-128,  $p = 0.008$ ; miR-218,  $p = 0.01$ ; miR-27b,  $p = 0.04$ ; miR-195,  $p = 0.01$ ; miR-15a,  $p = 0.02$ ). The downregulation of miR-27a and miR-15b was not confirmed. For this reason, these two miRNAs were excluded from the target validation experiment, as shown in a new Figure 3. The results of this validation experiment are summarized in Figure S2, shown below.



2. *Despite significant differences, the validation of STAT3, c-MYC and p53 suffers from the low t(8;16) sample numbers (n=4). It is hard to draw conclusions from these correlations.*

With the addition of three new t(8;16) AML samples, we were able to confirm a significantly different expression level of STAT3, but not of c-MYC and p53. For this reason, appropriate changes in the Results and Discussion sections have been introduced and the Figure 2 of the previous version of the manuscript has been modified and transferred to Supplementary Material as Figure S3.

3. *It is not clear if the results in Figure 3A are based on one t(8;16) sample and three technical replicates or three biological replicates. If it is based only on one sample, it would not be statistically relevant. The results presented in Figure 3B are based on 2 biological replicates, leaving only little room for statistical analysis. What is the conclusion of these results? The authors should compare their findings to other AMLs. The authors should discuss the presented results more specifically and in comparison to recently published epigenetic profiling approaches in AML.*

Effectively, the revised Figure 2B (previously Figure 3A) depicts the results of three independent technical replicates obtained from the only t(8;16) AML patient with available cryopreserved cells for this experiment. Unfortunately, we were not able to repeat the experiment in other patients due to the lack of cryopreserved cells at diagnosis, including the three new specimens obtained. Nonetheless, we believe that these results, which support the epigenetic regulation of the miRNA profile in t(8;16) AML, are of interest and should be included in the manuscript, despite the lack of biological replicates and statistical power. Following the reviewer's recommendations, we have clarified the source of the experiment in the manuscript, as follows:

Only one t(8;16) AML patient had available cryopreserved cells for treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A.

Following the reviewer's recommendation, we have performed the methylation analysis in a total of five t(8;16) AML patients and nine other AML patients with diverse

cytogenetic abnormalities (three from each of the cytogenetic prognostic categories) as depicted in the new figure 2C and 2D. We did not find significant differences in the methylation pattern in t(8;16) AML, compared to other AML subtypes, either with global methylation analysis (figure 2A) or on specific examination of promoter miRNA methylation status (figure 2C & 2D). As a consequence, we cannot explain the downregulation of these miRNAs in comparison with other AML subtypes due to this mechanism. However, as shown in figure 2B there is a higher miRNA re-expression after the addition of TSA, a histone deacetylase inhibitor, to the demethylating agent 5-AZA, in comparison with cells treated with only 5'-AZA-dc. This suggests that histone acetylation could play a key role in the regulation of miRNAs in t(8;16) AML. We have modified figure 2B and added the information on re-expression of miRNAs after treatment with 5'-AZA, as follows:

However, when we treated a t(8;16) AML sample for 72 hours with 5-AZA-dc, 14 miRNAs were re-expressed more than 2 fold change. Interestingly after treatment with 5-AZA-dc and TSA, 27 of 29 miRNAs were re-expressed more than 2 fold change after treatment (Figure 2B).

We have discussed these results in comparison with previously published data regarding microRNA methylation in AML, as follows:

This hypothesis is further supported by the fact that there were no differences in promoter methylation between t(8;16) AML and other cytogenetic subtypes. However, the individual analysis of hypermethylation levels showed that the miRNA methylation status of t(8;16) patients is closer to that of patients classified as the poor cytogenetic prognosis group. Despite the low number of patients analyzed, the differences observed in the different cytogenetics subgroups warrant further study. Previous studies analyzing gene methylation in AML showed different clusters of patients according to methylation patterns and showed that aberrant methylation could be related to patient prognosis (45-47). Moreover, the observation that treatment with 5-AZA plus TSA produced a greater re-expression of miRNAs than treatment with 5-AZA alone suggests that not only is methylation involved in the downregulation of these miRNAs but that acetylation could also play an important role.

4. *The authors imply that RET is a common and thus an important target for t(8;16) AML associated miRNAs. How many algorithms were used to predict the binding sites? As it is only a prediction, I would move Figure 4A into supplementary data. The results would be even more convincing if a miRNA, which does not affect RET translation would be included as a negative control and RET translation validated by Western Blot. Furthermore, no statistics or biological replicates are indicated in Figure 4C.*

The prediction of the miRNA binding site in *RET* gene was performed using two different algorithms, TargetScan and Pictar. As suggested by the reviewer, we have moved Figure 4A representing these binding sites to the Supplementary Material (Figure S4). Moreover, the selection of *RET* gene as a target of the t(8;16) miRNA signature was not only based on prediction but also on the strong correlation observed between mRNA and miRNA expression signatures in the same t(8;16) AML patients. The method used to correlate mRNA & miRNA patterns is detailed in the manuscript, as follows:

In order to identify miRNA targets, we used the RmiR package (Bioconductor version 2.6; <http://www.bioconductor.org/Bioconductor>) to cross-correlate the miRNA expression data from the present study with our previous findings on the gene expression signature in the same patient samples, based on the predicted targets from TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) and Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) databases.

As suggested, we have included pre-miR-135a as a negative control in the Renilla/luciferase analysis. pre-miR-135a has no complementary sequences to the 3' UTR region of *RET* gene. The Renilla/luciferase translation was not modified by the addition of this pre-miRNA, supporting the specific modulation of *RET* by a set of distinctively expressed miRNAs in t(8;16) AML.

Moreover, in order to analyze changes of *RET* protein expression with the validated pre-miRNAs in the Renilla/luciferase assay, we analyzed the expression of *RET* by flow cytometry, which is comparable to Western Blot. For this experiment, we used two biological replicates corresponding to two different myeloid cell lines, TPH1 and HL60. These cell lines were selected due to their overexpression of *RET*, which allowed us to validate the effect of pre-miRNAs on this protein. Each graph of the new Figure 3B (previously Figure 4C) corresponds to a different cell line. We performed three



independent transfections for each pre-miRNA analyzed. Statistics have been added in Figure 3B (previously Figure 4C).

### 7.1.2. Segundas revisiones

Barcelona, 6th September, 2012

Prof. Nicole Muller-Berat Killmann

Editor-in-Chief

Leukemia

Re: Resubmission of manuscript no. ROSA12-LEU-0066R (*Acute myeloid leukemia with translocation (8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement harbors a distinctive microRNA signature targeting RET protooncogene*)

Dear Prof. Muller-Berat,

We thank you for your letter on 17th August 2012 with the reviewers' comments on our referenced manuscript. We greatly appreciate your decision to accept it after minor revision with possible re-evaluation.

Following the suggestions and comments of the second reviewer, we have added pre-miR135a as a negative control in Figure 3B, we have mentioned in the Discussion section the observed differences of RET expression between the two cell lines used in the experiment, and, finally, we have transferred the figure 2B of the previous version to Supplementary material.

Replies to reviewer and corresponding modifications in the new version of the manuscript are detailed in the enclosed documents.

We believe that with these modifications our manuscript is improved and we hope that it is now acceptable for publication in *Leukemia*.

Looking forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Jordi Esteve, MD  
Hematology Department  
Hospital Clínic  
Barcelona, Spain  
Phone: +34932275428

Fax: +34932275484

E-mail: [jesteve@clinic.ub.es](mailto:jesteve@clinic.ub.es)

## Replies to Reviewer

### **Reviewer #2 (Comments to the Author):**

1. *I would move Figure 2B to the supplementary figures as it is based on 3 technical replicates and only one biological sample. Furthermore, the error bars are quite high, despite the fact that this is based on technical replicates.*

As suggested by the reviewer, we have moved the Figure 2B to the supplementary material (new Figure S4).

2. *Figure 3B needs the same negative control as Figure 3A miR-135a.*

Following the reviewer's recommendation, we have included pre-miR-135a as a negative control in the measurement of RET expression by flow cytometry

after transfection with pre-miRNAs on both TPH-1 and HL-60 cell lines. As observed pre-miR-135a did not modify significantly RET expression level. These results have been added to the Figure 3B.

3. *Furthermore, the authors should mention in the discussion the differences of RET protein downregulation between TPH1 and HL60 cells, which is most likely due to the accessibility of the individual miRNA binding sites.*

Differences of RET protein downregulation between TPH1 and HL60 cell lines are now mentioned and briefly discussed in the new version manuscript (Discussion section), as follows:

Transfection with these miRNAs produced a significant downregulation of RET protein in both HL-60 (except miR-27b) and TPH1 (except miR-218 and miR-15a) cell lines. The differences of the specific miRNAs leading to RET downregulation observed between these two cell lines could be attributed to differences in baseline levels of RET protein and diversities in the accessibility to individual miRNA binding sites.

## 7.2.Revisiones artículo 2

### 7.2.1. Revisiones

Barcelona, 9th August, 2013

Prof. Nicole Muller-Berat Killmann  
Editor-in-Chief  
Leukemia

Author: Dr Esteve Resubmission of manuscript no JILL13-LEU-0760R  
Title: MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia

Dear Prof. Muller-Berat,

We thank you for your letter of 5th July 2013 with the reviewers' comments on our referenced manuscript. We greatly appreciate your decision to reevaluate our manuscript.

We have addressed all the issues raised by the reviewers and we have modified the manuscript accordingly. Replies to reviewers and corresponding modifications in the new version of the manuscript are detailed in the enclosed documents. In particular, we addressed comprehensively the major issues raised by each reviewer. First, we provided the results of the analysis on the prognostic value of microRNAs identified in this study after exclusion of patients from the exploratory cohort, confirming most of the results obtained with the entire cohort. Second, we included in the multivariate analysis as requested, the microRNA score and after adjustment for main clinical and biological values retained its independent prognostic value. Finally, since we have not access to an additional cohort of patients, in order to confirm the robustness of the miRNA score, we have performed a cross validation/resampling statistical method that showed high replicability.

We believe that with these modifications, our manuscript is significantly improved and we hope that it is now acceptable for publication in *Leukemia*.

Looking forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Jordi Esteve, MD

Hematology Department  
Hospital Clínic  
Barcelona  
Spain  
Phone: +34932275428  
Fax: +34932275484  
E-mail: [jesteve@clinic.ub.es](mailto:jesteve@clinic.ub.es)

## Replies to Reviewers

### **Reviewer no.1**

*1) The first microRNA profiling was performed on 85 intermediate risk patients. Ten outcome related microRNAs were then analyzed in the entire cohort (including the 85 patients). Four microRNAs remained prognostic. Do these four microRNA also retain their prognostic significance in the entire cohort without the initial 85 patients? Demonstrating the prognostic impact in this subgroup would validate the initial findings and would provide evidence, that the prognostic impact of the four microRNAs in the entire group is not "just" driven by a potentially huge prognostic impact of the microRNAs' expression in the smaller group of 85 initial patients.*

We agree with the reviewer that the eventual validation of the prognostic miRNAs in a completely independent cohort of patient would have been the ideal method to confirm the prognostic value of this group of miRNAs, although such a design was not easily feasible for us. We designed, instead, a double-step plan, with a first step consisting of a high-scale search of prognostic microRNAs selected from a comprehensive analysis of 670 miRNA expression level analysis in a subset of patients (n=85). After selection of the 10 miRNAs with a highest prognostic impact, we then evaluated their prognostic value determining their expression level using a different methodology, with individual Taqman assays, in the entire cohort of 238 patients harboring an intermediate-risk cytogenetics from the cooperative group CETLAM. We decided to include the initial group of 85 patients in this part of the research plan to avoid a major selection bias and a significant reduction size that precluded a meaningful analysis of the prognostic weight of these selected miRNAs. Therefore, we considered the

whole population of 238 patients as a unique group in which we assayed the prognostic relevance of the expression level measured with a different technique (Individual TaqMan assays) of a group of miRNAs identified in an initial screening.

Nonetheless, as suggested by this reviewer, we analyzed the prognostic impact of these 4 miRNAs in the subset of 156 patients resulting from the exclusion of 85 patients from the initial cohort. Remarkably, three of these miRNAs, namely miR-135a, miR-409-3p and miR-644, retained their prognostic impact or showed a statistical trend in this additional analysis. Thus, patients with a decreased expression of miR-135a and miR-409-3p showed a higher risk of relapse, both in the overall series ( $p=0.02$  and  $p=0.03$ , respectively) as well as in the subset of patients within unfavorable molecular subgroup ( $p=0.009$  and  $p=0.06$ , respectively). Concerning miR-644, a higher miRNA expression was associated with a trend to a poorer survival both in the entire cohort and the favorable genotype subgroup ( $p=0.08$ ). The lack of prognostic value of the remaining miRNA, miR-196b, might be due to the small size of the subgroup of patients with a distinctive prognosis. Thus, the significant cut-off of miR-196b with prognostic value was able to identify a minority of patients that consisted of approximately 10% of the whole population, with a better outcome. Therefore, the mere reduction of the sample size resulting from the exclusion of one third of total patient population might explain the observed loss of prognostic value of this miRNA in this subgroup analysis. Nonetheless, the marked effect of a decreased miR-196b observed in our previous analysis, based on individual TaqMan assays, prompted us to maintain it as a highly potentially useful marker to identify a subset of patients with a remarkably favorable outcome, as suggested in previous study.

*2) As stated on page 10 the expression levels of miR-644 associated with response to induction therapy. I assume response to induction therapy is defined as achievement of a complete remission? miR-644 seems to have a great impact on the response to induction therapy (OR= 5.64), did any of the*

*other investigated miRs associate with response to induction therapy / achievement of CR?*

*Additionally on page 11 it reads as if the presence of an NPM1 mutation would associate with a reduced chance (OR=0.3) of responding to induction therapy, is this true?*

The concept of response to induction therapy used in the manuscript refers to achievement of a complete remission (CR). In order to clarify this concept, we have modified the wording in the text.

Regarding the predictive value of miRNA levels for achievement of complete response (CR) following induction therapy, miR-644 was the only miRNA with prognostic value, with none of the other selected miRNAs showing an association with response to induction therapy. This observation has been now emphasized in the text. Moreover, the impact of *NPM1* mutation on the probability of achievement of CR has been now clarified in the text, specifying that it is the absence of an *NPM1* mutation (wild-type configuration) that was associated with a reduced chance of responding to induction therapy. Accordingly, the whole paragraph dealing with prognostic factors for CR achievement has been rephrased [pages 10 & 11: lines 236-243]:

“In addition, miR-644 was the only miRNA whose level measure was predictive of achievement of a complete remission, with patients with lower levels showing a higher response rate compared to patients with higher miR-644 levels (87.4% vs. 76.3%,  $p=0.008$ ). Analyzing variables associated to response by means of multivariate binary logistic regression, miR-644 expression confirmed its independent prognostic value (OR=5.64, 95% CI: 2.67-15.35,  $p=0.001$ ) together with *NPM1* wild-type configuration (OR=0.30, 95% CI: 0.10-0.86,  $p=0.031$ ) and lower WBC (OR=0.991, 95% CI: 0.984-0.99;  $p=0.006$ ).”

*3) To me it is not entirely clear what definition is used for the favorable vs unfavorable molecular subcategories. The European LeukemiaNet genetic classification is referenced, e.g on page 12, but it reads ambiguously (i.e. with regard to biallelic CEBPA mutations). I think it would help to clarify the definition. Using / Reporting the results with respect to the ELN classification*

*(in addition) of course helps to make the interesting results comparable to the present and future results of other groups.*

The two molecular categories defined in the paper, favorable and unfavorable molecular subcategories correspond to three of the genetic groups recognized in the ELN classification. Thus, our favorable molecular category, equivalent to ELN favorable genetic group, comprised both patients with biallelic *CEBPA* mutations and those harboring *NPM1* mutations without *FLT3*-ITD. On the hand, the unfavorable molecular subgroup of the manuscript contained all the remaining subsets of patients according to these molecular features, grouped in the Intermediate-I and Intermediate-II ELN groups. Thus, this category included all patients harboring *FLT3*-ITD regardless *NPM1* status, as well as those patients with a wild-type configuration of *NPM1* and *CEBPA* genes. Since our study was restricted to intermediate-risk cytogenetic aberrations as defined by the MRC group, we decided not to use the ELN genetic nomenclature, which includes other cytogenetic groups. Thus, the ELN favorable genetic group also comprises core-binding factor AML, not included in our study. Moreover, ELN recommendations on genetic groups distinguish patients Intermediate-I and Intermediate-II patients, with equivalent molecular features, on the basis of cytogenetics (normal karyotype patients in Intermediate-I group vs. other intermediate-risk cytogenetic aberrations in the Intermediate-II subset). In fact, the prognostic relevance of these two different intermediate categories is not observed in the analysis of many cooperative groups, reinforcing the prevalence of molecular features over cytogenetic abnormalities within the intermediate-risk cytogenetic category. Nonetheless, the equivalence between ELN genetic categories and the two molecular categories defined in the text has been now clarified in the text [page 12: lines 236-272]:

“The presence or absence of *FLT3*-ITD, *NPM1* and *CEBPA* mutations allow stratification of patients with IR-AML into distinct prognostic categories [319, 320]. Thus, patients with *NPM1* mutation without *FLT3*-ITD or biallelic *CEBPA* mutations, corresponding to the favorable genetic group of European LeukemiaNet (ELN), have a better outcome (favorable molecular subcategory), whereas those patients harboring *FLT3*-ITD and/or lacking



*NPM1* and *CEBPA* mutations, grouped in the Intermediate-I and Intermediate-II genetic groups of ELN, have a worse prognosis (unfavorable molecular subcategory). In order to elucidate the contribution of miRNAs expression on prognosis of IR-AML, we analyzed the specific impact of more relevant miRNAs in these two molecular subcategories of IR-AML.”

*4) Some of the patients received an allogeneic transplant and as stated on pages 13 and 14 patients with an intermediate or high miR-risk score benefited from the allogeneic procedure. These findings are interesting since they may provide a therapeutic strategy of choice for intermediate or high miR-risk score patients. However, was the benefit from the allogeneic procedure mainly driven by one or a combination of the four miRs?*

We analyzed the effect of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) individually for all of miRNAs identified whose expression level showed prognostic effect. Outcome of patients receiving alloHSCT was compared with other post-remission options using the analyses described in the manuscript. AlloHSCT resulted in a significantly reduced relapse risk for patients with a high-risk expression of microRNAs miR-135a ( $p=0.021$ ), and miR-196b ( $p=0.047$ ), and among patients within unfavorable molecular genotype (*FLT3*-ITD and/or concomitant wild-type *NPM1* and *CEBPA*) interestingly alloHSCT resulted in a significantly reduced relapse risk for patients with a high-risk expression of microRNAs miR-135a ( $p=0.004$ ), and miR-196b ( $p=0.007$ ) and miR-409-3p ( $p=0.06$ ). Allotransplant conferred a survival advantage or showed a trend for patients with high-risk expression of microRNAs miR-135a ( $p=0.014$ ) and miR-409-3p ( $p=0.16$ ). Remarkably, this improved outcome following alloHSCT was more evident in patients harboring an unfavorable molecular genotype (*FLT3*-ITD and/or concomitant wild-type *NPM1* and *CEBPA*), with a benefit in terms of OS for patient with high-risk expression level of miR-135a (0.007), and miR-409-3p (0.05).

On the contrary, alloHSCT did not seem to provide a significant benefit for patients with overexpression of miR-644. This might be explained, in part, by the preferential effect of this miRNA in the chance to achieve complete response, and not on a higher relapse risk, the phase of the disease in

which the effect of allogeneic procedure is probably maximized. Despite this observation, we believe that including in the score the four miRNAs that showed significant influence regarding any of the endpoints analyzed (i.e., the probability to achieve CR, survival, relapse risk) is justified and can be an useful tool to capture high risk features beyond gene mutations.

Nonetheless, the results of this analysis should be considered cautiously, since the number of patients per arm, especially concerning the alloHSCT arm, is too limited to extract firm conclusions.

*5) The discussion is well written and interesting to read. However, to help clinicians to appreciate the findings I think it would benefit from just a few more words regarding the potential applicability regarding the assessment of the individual miR expression status/ the proposed miR-risk score for risk stratification/ therapeutics / treatment choices in the clinic today and in the future.*

MicroRNA profiling might disclose more accurately some underlying mechanisms of response to therapy not captured by single gene mutations. Moreover, our current knowledge of gene mutation landscape of AML reveals a huge complexity with multiple interactions among genes with diverse prognostic impact, leading to a particular difficult prognostic assessment based on simplistic, limited panel of genes. Therefore, and following the reviewer's recommendation, the potential role of miRNA evaluation for a better prognostic assignment in AML has been emphasized in the Discussion [page 19, first paragraph].

“Given the independent prognostic value of miR-196b, miR-644, miR-135a, and miR-409-3p, we designed a miRNA risk score based on their expression levels and assessed its prognostic value in a cohort of patients  $\leq 60$  years. This four-miRNA risk score showed independent prognostic value after adjustment for other well-recognized molecular and clinical prognostic markers and allowed the stratification of IR-AML patients into three different prognostic categories. Moreover, the prognostic impact of the risk score was even more marked within the unfavorable molecular subcategory, where it was able to identify a small group of patients with very favorable outcome and a second group with a RR of over 70% and a dismal prognosis. Moreover, when we evaluated the effect of post-remission therapy

according to this miRNA risk score, we found that alloHSCT in CR1 seemed beneficial for patients in the intermediate- or high-risk miRNA group, with a significantly reduced RR, especially among patients in the unfavorable molecular subcategory. Of course, these findings need further validation in a larger series to validate the clinical usefulness of this score. Nonetheless, the expression of these four miRNAs or other miRNAs with a strong prognostic value may well refine the current molecular risk stratification of IR-AML, which is based on the analysis of mutations of a limited number of genes, as attempted in several molecular stratification systems such as the European LeukemiaNet proposal. Abnormal expression of certain miRNAs may reflect specific dysfunction of determined cell pathways with a profound impact on chemosensitivity, not captured by the analysis of individual gene mutations. Therefore, the information resulting from miRNA expression analysis might provide an additional tool to predict the potential benefit of alloHSCT in the intermediate-risk cytogenetic category of AML, which still constitutes the group with a higher degree of uncertainty on the appropriateness of this procedure.”

## **Reviewer no.2**

*1. Reference 20 seems not relevant to the paper, please change or delete*

As suggested by this reviewer, we have removed reference 20 (Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. Cell Cycle 2008 Jun 1; 7(11): 1545-1549) in the new version of the manuscript.

*2. Page 5, line 111, "CETLAM trials for younger patients" while the patients were treated with intensive regimens for "younger patients" the patient's age in the cohort range from 18-73, thus it is confusing using the term younger, it may give the impression that the cohort include only young AML patients (<60), please change to somewhat like aggressive induction regimens*

We agree with the reviewer that the term "younger", with the inclusion of patients with an age up to 73 years, was inappropriately used in the previous text. Accordingly, we have modified the previous version, for the sake of clarity, with the following sentence, which better reflects the inclusion criteria for these trials:

["All patients were treated in consecutive CETLAM trials from 1994 to 2009 based on intensive chemotherapy for fit patients"](#).

*3. Page 5, line 116. Spell ICE*

ICE is the acronym for the regimen idarubicin (12 mg/m<sup>2</sup> x days 1-3-5), cytarabine (100 mg/m<sup>2</sup> in continuous infusion x 7 days), and etoposide (100 mg/m<sup>2</sup> x days 1 to 5). This chemotherapy regimen has now been clarified in the manuscript.

*4. Page 9, Page 200. The patient's characteristics from this discovery cohort needs to be in the main manuscript and not in supplemental.*

Following the reviewer's suggestion, we have included the patient characteristics from the discovery cohort in Table 1, which now displays the characteristics of both series of patients, as shown below.

**Table 1.** Main clinical characteristics of patients from the discovery cohort (n=85) and the overall series (n=238) included in the study.

	<b>Discovery cohort</b> n=85	<b>Overall series</b> n=238
<b>Year of diagnosis</b> (range)	1994-2009	1994-2009
<b>Gender</b> n (%)		
Male	44 (52%)	121 (51%)
Female	41(48%)	117 (49%)
<b>Median age, years</b> (range)	52 (18-71)	52 (18-73)
<b>Leukocyte count at diagnosis, x10<sup>9</sup>/L</b>		
median (range)	47 (1-408)	28 (0.7-408)
<b>FAB subtype</b> (n)		
M0	2	13
M1	29	57
M2	10	40
M4	21	59
M5	23	57
M6	0	10
M7	0	2
<b>Cytogenetics</b> n (%)		
Normal karyotype	61 (72%)	173 (72%)
Other intermediate-risk	24 (28%)	65 (28%)
<b>Molecular features</b> n (%)		
<i>NPM1</i> mutation	43 (50%)	102 (43%)
<i>FLT3</i> -ITD	37 (43%)	82 (34%)
<i>CEBPA</i> biallelic mutation	7 (8%)	17 (10%)
<b>Therapeutic protocol (CETLAM group)</b>		
AML-94	9 (10%)	9 (4%)
AML-99	29 (34%)	29 (12%)
AML-2003	47(56%)	202 (84%)
<b>Outcome</b>		
Complete response to induction regimen	84%	81%
Overall survival (5-yr)	43±11%	44±8%
Risk of relapse (5-yr)	55±14%	42±7%

5. Page 9, line 209. *Supplementary Fig1 and 2 should be in the main manuscript.*

As suggested by the reviewer, we have now included Supplementary Figures 1 and 2, depicting survival and relapse risk according to significant miRNAs both in the whole discovery cohort as well as molecular subcategories, in the main manuscript as the new Figures 1 (AB, CD respectively).

6. Page 9, line 213, *The figure 1 should go with the supplemental data.*

Accordingly, we have moved the former Figure 1, describing the methodological process followed for identification of prognostic miRNAs, to the Supplemental Data, as the new Supplementary Figure 1.

7. *Follow up time for patient's cohorts are missing*

Median follow-up of overall series was 33 months (2-159) and 67 months (2-159) for the exploratory cohort. This information has been added in the current revised version of the manuscript as follows (Patients and Treatment section):

*(Material and Methods section, Patients and Treatment subheading, 1st paragraph):*

“The analysis included 238 patients from 16 centers of the CETLAM group with a median follow-up of 33 months (range: 2-159 months)”

*(Material and Methods section, miRNA quantification subheading)*

“... in tumor samples from 85 IR-AML patients from HCB, median follow up 67 months (range: 2-159 months)”

8. Page 10. Line 228. *It is not clear whether CEBPA status was included in the multivariate model as it should. It is not shown in table 2.*

CEBPA mutational status was not originally included in the multivariate model, although we agree that it should be included in the Cox regression analysis performed in the entire cohort. Therefore, we have recalculated the multivariate analysis including *CEBPA* status in the multivariate analysis. Interestingly, *CEBPA* mutational status did not show independent prognostic value whereas the same variables observed in the previous analysis (age, WBC count at diagnosis, *NPM1* mutation, *FLT3*-ITD, and expression level of miR196b and miR-644) maintained their prognostic impact in the multivariate model. This information has been included in the new version of the manuscript, in the Material and Methods section (Definitions of clinical end-points and statistical methods subheading, page 8), and revised Table 2, shown below.

Variables in the final model	p	OR	95%CI
<b>Multivariate analysis for OS in the overall series</b>			
<b>Age</b>	0.004	1.027	1.009-1.046
<b>WBC</b>	<0.001	1.007	1.003-1.010
<b><i>CEBPA</i> biallelic mutated</b>	0.519	0.71	0.251–2.008
<b><i>FLT3</i>-ITD</b>	0.002	2.167	1.329-3.536
<b><i>NPM1</i> mutated</b>	0.024	0.562	0.341-0.927
<b>miR-196b level (low vs. high)</b>	0.036	0.424	0.190-0.947
<b>miR-644 level (low vs. high)</b>	0.004	0.512	0.325-0.805

9. Page 10 *miR-196b* and *miR-644* prognostic value in overall survival: what is the frequency of allotransplant between the high and low miRNA levels groups? The data is needed and is important.

The frequency of allotransplant in first complete remission was 25% (7/28) and 23% (52/222) in patients with low and high expression level of miR-196b, respectively (p=0.8165). Moreover, this frequency was 21% (28/131) and 26% (31/118) in patients with low and high miR-644 levels (p=0.3749). Therefore, there was no significant difference in the proportion of allogeneic

HSCT performed in first CR according to levels of expression these two microRNAs. We have added this information to the text, as follows (*Results section, miR-196b and miR-644 have prognostic value in overall survival subheading, first paragraph*):

“No significant differences in allotransplant frequency according to levels of miRNA-644 and miR-196b expression were observed”

Variables in the final model	p	OR	95%CI
------------------------------	---	----	-------

10. Page 13. Outcome according the expression of four miRNA ...How good is the miRNA score with respect to known CG and molecular markers of AML? The authors need to perform multivariate analysis. More importantly and critical is the use of a third and large cohort of patients to validate these findings, otherwise it is too preliminary, weak and not convincing.

First, we performed a new multivariate analysis with the inclusion of our proposed miRNA score, together with all other clinical and biological variables with a significant prognostic value in the univariate analysis ( $p \leq 0.1$ ), i.e. age, leukocyte count at diagnosis, *NPM1*, *FLT3-ITD* and *CEBPA* mutational status. Regarding cytogenetics, and since this study was designed for patients with an intermediate-risk karyotype following MRD categorization, we compared the outcome between patients with a normal karyotype and other intermediate-risk cytogenetic abnormalities, without observing any relevant difference in any of the endpoints analyzed (achievement of complete response, OS, CIR) both in univariate and multivariate analysis. Interestingly, in the multivariate analysis including the mentioned variables, this 4-miRNA expression score emerged as a strong independent marker (OR: 2.1, 95% CI: 1.287-3.580;  $p=0.003$ ). Moreover, this miR-score also retained its prognostic value within unfavorable molecular subgroup. We summarize the results of multivariate analysis in the following table, which is also provided in the Supplementary material (Table 1). In addition, we have included this information in the text as follows:

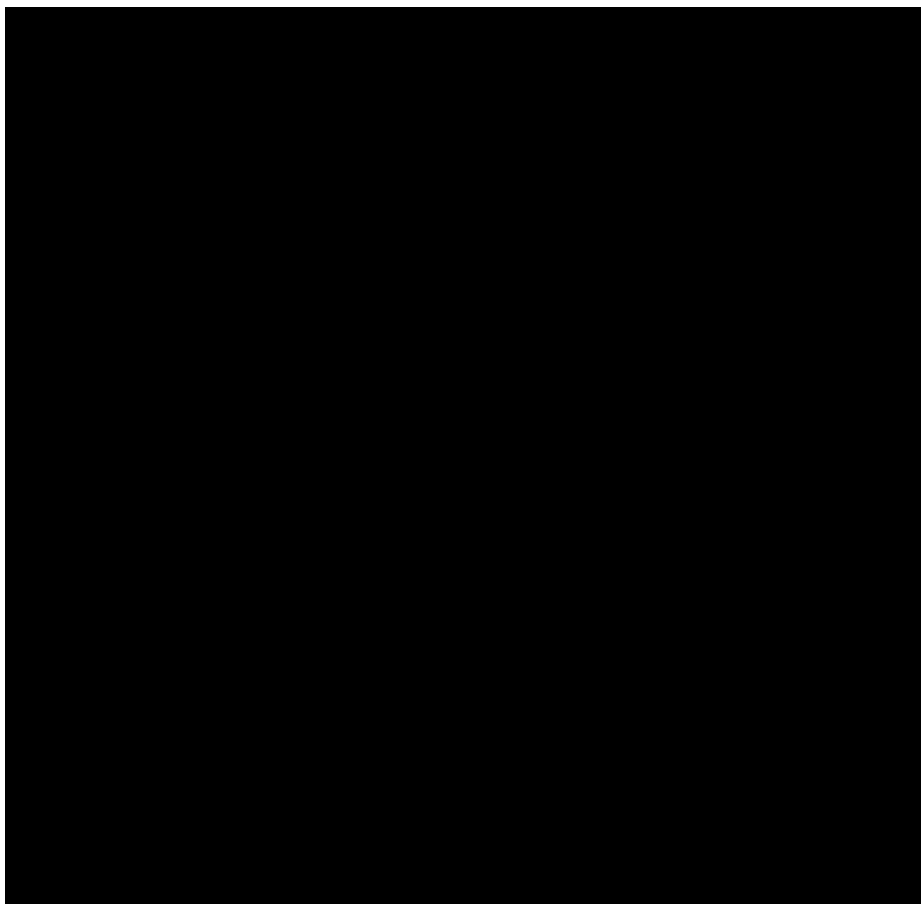


Multivariate analysis for OS in the overall series			
Age	0.002	1.030	1.011-1.050
WBC	0.002	1.005	1.002-1.009
<i>CEBPA biallelic mutated</i>	0.887	0.933	0.359–2.424
<i>FLT3-ITD</i>	0.001	2.345	1.432-3.839
<i>NPM1 mutated</i>	0.041	0.601	0.369-0.980
miRNA-risk score	0.002	2.107	1.317-3.372
Multivariate analysis for OS in the unfavorable molecular subcategory			
Age	0.000	1.036	1.019-1.053
WBC	0.086	1.002	1.000-1.005
<i>FLT3-ITD</i>	0.007	2.038	1.211-3.429
<i>NPM1 mutated</i>	0.060	0.598	0.350-1.021
miRNA-risk score	0.018	1.626	1.086-2.435

(Results section, Outcome according to the expression of four miRNA in combination and the effect of post-remission therapy subheading, first paragraph):

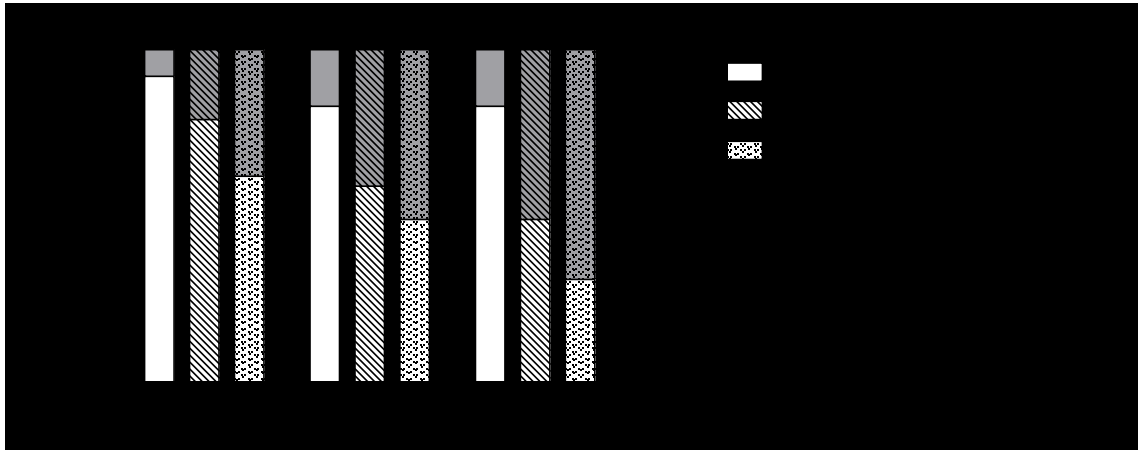
“The multivariate analysis for OS confirmed the miRNA risk score as an independent prognostic factor both within the overall series (OR: 2.147; 95%CI: 1.287-3.580; p=0.003) and within the unfavorable molecular subcategory (OR: 1.626; 95%CI: 1.086-2.435; p=0.018) after adjustment for other well-recognized molecular and clinical prognostic markers (Supplementary table 1)”

Second, we addressed the issue of validation of this miR-Score in an additional cohort of AML patients. Unfortunately, we did not have access an additional large series of samples from patients with similar characteristics and follow-up to perform an experimental validation. Thus, in order to provide an initial assessment of accuracy for the proposed miR-Score model in the absence of an independent large dataset, we have performed a cross-validation/resampling strategy. In detail, we have randomly distributed all the patients in 5 independent datasets and we have grouped the patients in each of the three risk groups according to the miR-score. The replicability of the results of survival curves among multiple samples is summarized in the figure below, with persistence of survival differences among the three prognostic groups defined by the miR-score without significant overlapping.



Moreover, we provide the predictive accuracy for the actual survival of the proposed miRNA-risk score in the following graph, in which the open bars

represent the percentage of survivors in each group (left Y-axis) whereas the filled bars represent the complementary percentage of mortality (right Y-axis). As can be observed, in each time point, there is a constant increase in the mortality rate according the miR-score category.



In summary, considering the convergent results of the three new different methods performed to analyze the potential value of this proposed 4-miRNA score (multivariate analysis, reproducibility of resampling strategy, and predictive accuracy of survival), we believe that this score shows enough robustness to be included in the present manuscript as a potential interesting tool. Nonetheless, we completely agree with the reviewer that these results are still too preliminary to establish firm recommendations and require further validation in independent large datasets of patients. Accordingly, we have modified the text as follows to emphasize the preliminary nature of this combined microRNA expression level score:

*(Discussion section, page 20):*

“Of course, these findings need further validation in a larger series of patients to validate the clinical usefulness of this score. Nonetheless, the expression of these four miRNAs or other miRNAs with a strong prognostic value might contribute to refine the current molecular risk stratification of IR-AML, which is based on the analysis of mutations of a limited number of genes, as attempted in several molecular stratification systems such as the European LeukemiaNet proposal”.

11. Page 16, Line 368. The data needs to be shown.

As suggested by the reviewer, this speculative comment on the potential value of miR-644 target genes to elucidate mechanisms of chemoresistance has been omitted from the new version of the manuscript.

12. Page 16, line 362, Please also add reference 8 here since this group also showed miR-196 was downregulated in CEBPA mutant AML.

As suggested, we have added this reference (Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Lowenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* 2008 May 15; **111**(10): 5078-5085) to page 16 line 362.

13. Page 17, Line 400-402. This statement is incorrect, Multivariate analysis are needed.

According with the reviewer, as detailed in the previous answer to question no. 10, we are providing a new multivariate analysis with the inclusion of the proposed miR-score together with other relevant clinical and biological variables including more relevant molecular features. This miR-score retained its independent prognostic significance. We have added this information to the text, in the Results sections, as follows:

“The multivariate analysis for OS confirmed the miRNA risk score as an independent prognostic factor both within the overall series (OR: 2.147; 95%CI: 1.287-3.580; p=0.003) and within the unfavorable molecular subcategory (OR: 1.626; 95%CI: 1.086-2.435; p=0.018) after adjustment for other well-recognized molecular and clinical prognostic markers (Supplementary table 1)”





## **8. Otros trabajos relacionados con la tesis, realizados durante este periodo sobre miRNAs y LMA**

### **8.1. Resumen del trabajo 3**

## ***BAALC*-Associated Mir-3151 Is An Independent Prognostic Factor In Younger Patients With Intermediate-Risk Cytogenetic Acute Myeloid Leukemia**

Marina Díaz-Beyá, MD<sup>\*</sup>,<sup>1</sup>, Alfons Navarro, PhD<sup>\*</sup>,<sup>2</sup>, Marta Pratcorona, MD<sup>\*</sup>,<sup>3</sup>, Salut Brunet, MD, PhD<sup>\*</sup>,<sup>4</sup>, Josep F Nomdedeu, MD<sup>\*</sup>,<sup>5</sup>, Josep-Maria Ribera, MD, PhD<sup>6</sup>, Mar Tormo, MD<sup>7</sup>, Rafael F. Duarte, MD, PhD<sup>8</sup>, Olga Salamero, MD<sup>\*</sup>,<sup>9</sup>, David Gallardo, MD, PhD<sup>\*</sup>,<sup>10</sup>, Lourdes Escoda<sup>\*</sup>,<sup>11</sup>, Meritxell Nomdedeu, MD, PhD<sup>\*</sup>,<sup>12</sup>, Ruth M Risueño, PhD<sup>\*</sup>,<sup>13</sup>, Montserrat Hoyos<sup>\*</sup>,<sup>14</sup>, Francisco Cervantes, MD, PhD<sup>15</sup>, Jorge Sierra, MD, PhD<sup>\*</sup>,<sup>16</sup>, Mariano Monzó, MD, PhD<sup>\*</sup>,<sup>2</sup>, and Jordi Esteve, MD, PhD<sup>\*</sup>,<sup>17</sup>

 Author Affiliations

### **Abstract**

**Introduction** Patients with intermediate-risk cytogenetic AML (IR-AML) have a heterogeneous prognosis, and are currently further stratified based on determined gene mutations. However, the optimal post-remission therapy, especially in younger patients, is unclear. Recently, miR-3151, a novel microRNA (miRNA) located in intron 1 of the *BAALC* gene, has been identified. High miR-3151 expression –either alone or in combination with high *BAALC* levels– independently correlates with poor prognosis in patients  $\geq 60$  years with normal cytogenetics AML (CN-AML) (Eisfeld AK, et al. Blood 2012). However, the prognostic value of miR-3151 in younger patients ( $\leq 60$  years) with IR-AML has not been examined. We hypothesized that miR-3151 expression could also be a prognostic marker in younger patients.

**Aim** To analyze whether miR-3151 expression – either alone or in combination with *BAALC*– improved prognostic assessment in younger patients (up to 60 years) with IR-AML and to characterize in this subset of patients the miRNA signature associated with high miR-3151 expression.

**Methods** Samples were available from two separate cohorts of patients with IR-AML who had received intensive therapy: a training set of 76 patients from a single institution and a validation set of 108 patients from several centers who had been treated within the CETLAM AML-2003 protocol. Information on *NPM1*, *FLT3*-ITD and *CEBPA* was available for both patient cohorts. The expression levels of 670 miRNAs had previously been analyzed in the 76 patients in the training set. In the present study, the expression of miR-3151 and *BAALC* was



analyzed using TaqMan® MicroRNA Assay and TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems), respectively. Expression levels of miR-3151 and *BAALC* –both alone and in combination – were correlated with patient outcome. Statistical analyses were performed with SPSS v.15.0.1, R software v.2.9.0 and TIGR *MultiExperimentView*v4.0.

**Results** In the training set, higher expression of miR-3151 (dichotomized by its median value of normalized expression) correlated with a shorter 5-year overall survival (OS) ( $32\pm 17\%$  vs.  $61\pm 17\%$ ,  $p=0.029$ ) and 5-year leukemia-free survival (LFS) ( $29\pm 17\%$  vs.  $58\pm 17\%$ ,  $p=0.036$ ) in patients  $\leq 60$  yrs. When the analysis was restricted to patients with CN-AML, miR-3151 expression retained its prognostic significance ( $p=0.016$ ). In addition, increased *BAALC* expression was associated with shorter OS ( $28\pm 20\%$  vs.  $58\pm 14\%$ ,  $p=0.054$ ) and LFS ( $17\pm 18\%$  vs.  $55\pm 14\%$ ,  $p=0.039$ ).

In the multivariate analysis for OS and LFS, including age, WBC, *NPM1*mut, *FLT3*-ITD, *BAALC* and miR-3151 expression levels as covariates, miR-3151 showed independent prognostic significance for OS ( $p=0.016$ ; HR=2.52, 95% CI: 1.2–5.4), and a statistical trend for LFS ( $p=0.09$ ).

Patients with low expression of both miR-3151 and *BAALC* had better prognosis (OS:  $66\pm 18\%$  vs.  $34\pm 16\%$ ,  $p=0.027$ ; LFS:  $67\pm 20\%$  vs.  $27\pm 16\%$ ,  $p=0.009$ ). Interestingly, the combination of both miR-3151 and *BAALC* retained a significant prognostic value for LFS within the favorable molecular subgroup/ELN favorable subgroup (patients harboring *NPM1*mut without *FLT3*-ITD or biallelic *CEBPA*mut; LFS:  $44\pm 30\%$  vs. 100%,  $p=0.017$ ) and showed a trend in the unfavorable molecular subgroup/ELN Intermediate I&II subgroups (patients lacking both *NPM1* and *CEBPA* mutations and/or harboring *FLT3*-ITD; OS:  $p=0.064$  and LFS:  $p=0.072$ ).

In the validation set, miR-3151 overexpression confirmed its prognostic impact in patients in the univariate analysis for OS ( $45\pm 12\%$  vs.  $26\pm 19\%$ ,  $p=0.039$ ) and LFS ( $51\pm 14\%$  vs.  $30\pm 24\%$ ,  $p=0.034$ ) and in the multivariate analysis for OS (OS:  $p=0.038$ ; HR 1.88, IC 95%: 1.06–3.34) and LFS ( $p=0.014$ ; HR 2.411 (1.198–4.855)).

Finally, a supervised analysis revealed that samples exhibiting high levels of miR-3151 expression had a distinctive miRNA signature including miR-509, miR-135a, miR-100\*, miR-186\*, let-7a\* and miR-501.

**Conclusion** miR-3151 is an independent prognostic marker in patients with IR-AML. The study of miR-3151 refines the molecular prognostic stratification of these patients and hence could be of help to guide therapy.

**Acknowledgements** Marina Díaz-Beyá is supported by Fundación Española de Hematología y Hemoterapia. This research is supported by Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia and by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS-PI080158.

**Disclosures:** No relevant conflicts of interest to declare.

## 8.2. Resumen del trabajo 4



Home | About 'Blood' | Authors | Subscriptions | Permissions | Advertising | Public Access | Contact Us

Institution: CRAI UNIVERSITAT DE BARCELONA | [Sign In via User Name/Password](#)

SEARCH:  [GO](#) [Blood \(ASH Annual Meeting Abstracts\) 2012 120: Abstract 1375](#)  
© 2012 American Society of Hematology

[Advanced](#)

[Current Issue](#)

[First Edition](#)

[e-Letters](#)

[Blood Collections](#)

[Archives](#)

[Submit to Blood](#)

[Search Blood](#)

[Blood Journal App](#)

[ASH®](#)

[Meeting Abstracts](#)

[E-Mail Alerts](#)

**Poster Sessions**

611. *Leukemias - Biology, Cytogenetics and Molecular Markers in Diagnosis and Prognosis: Poster I*

### Overall Hydroxymethylation Levels As an Independent Prognostic Marker in Intermediate-Cytogenetic Risk Acute Myeloid Leukemia

Marina Díaz-Beyá, MD<sup>\*1</sup>, Alfons Navarro, PhD<sup>\*2</sup>, Rut Tejero<sup>\*2</sup>, Marta Pratcorona, MD<sup>\*3</sup>, Tania Díaz, PhD<sup>\*2</sup>, Mariano Monzó, MD, PhD<sup>\*2</sup> and Jordi Esteve, MD, PhD<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Hematology and Oncology, Department of Hematology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain.  
<sup>2</sup> Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.  
<sup>3</sup> Hematology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

**Abstract 1375**

**Introduction:** Acute myeloid leukemia (AML) is a highly heterogeneous disease, with diverse genetic and epigenetic variables determining sensitivity to current standard therapy. A disruption of the normal DNA methylation pattern, which can result in altered gene and microRNA (miRNAs) expression, has been observed in different AML subtypes. Hydroxymethylation of 5-methylcytosine (5-mC) has recently been described as an intermediate key step in the process of DNA demethylation. Nonetheless, the correlation of DNA methylation and hydroxymethylation levels with clinical and biological characteristics and clinical outcome in AML is mostly unknown.

**Aim:** To investigate the prognostic impact of overall methylation and hydroxymethylation levels in patients with intermediate-cytogenetic risk AML (IR-AML) and to identify miRNAs correlated with methylation and hydroxymethylation in these patients.

**Patients and Methods:** We have analyzed 86 IR-AML patients (median age, 53 [range, 17–74]; 52% males) who received intensive therapy from 1994 to 2009 in a single institution. The level of overall methylation and hydroxymethylation in total DNA was estimated after determining the percentage of 5-mC and hydroxymethylcytosine (5-hmC), using anti-5-mC and anti-5-hmC monoclonal antibodies (MethylFlash Methylated or Hydroxymethylated DNA Quantification Kit, Epigentek). The expression of 670 mature miRNAs was analyzed using TaqMan Human MicroRNA Arrays (Applied Biosystems). The statistical analysis was performed with SPSS version 15.0.1 and R software version 2.9.0. MaxStat package of R was used to determine the optimal cutoffs.

**Results:** The univariate analysis for overall methylation showed that patients with lower levels of methylation (cutoff < percentile 75) had shorter overall survival (OS) than those with higher 5-mC levels (5-year OS: 30±6% vs 52±11%; p=0.03) and a trend for shorter leukemia-free survival (LFS)(p=0.06). Overall methylation levels did not show any correlation with clinical features at diagnosis or with gene mutations, including *DNMT3A*. Concerning hydroxymethylation, patients with lower 5-hmC levels had a worse prognosis than those with higher 5-hmC levels, with a lower complete response rate (79% vs. 96%; p=0.04), shorter OS (5-yr OS: 21± 6% vs. 55± 6%; p=0.008), and shorter LFS (5-yr LFS: 24±8% vs. 52 ±10%; p=0.03). Interestingly, when analyzed as a continuous variable, 5-hmC levels retained their prognostic value as a marker of response rate (T-test, p=0.007), OS (Cox, p=0.015), and LFS (Cox, p=0.041). Moreover, 5-hmC levels were inversely correlated with FLT3-ITD (p=0.001) and the FLT3-ITD/FLT3wild-type ratio (Pearson correlation:-0.6; p=0.01). The multivariate analyses, including the main clinical and biological variables, identified older age, wild-type *NPM1*, FLT3-ITD, and lower 5-hmC levels (HR=3.072; 95% CI: 1.096–3.917; p=0.025) as independent prognostic markers of shorter OS and wild-type *NPM1*, FLT3-ITD, and lower 5-hmC levels (HR=2.002, 95% CI: 1.032–3.881, p=0.040) as independent prognostic markers of shorter LFS. Of note, lower 5-hmC levels retained their value as a marker of worse prognosis in the subgroup of IR-AML patients with unfavorable molecular markers (wild-type *NPM1* and *CEBPA* and/or FLT3-ITD; p=

**This Article**

**Services**

- ▶ [Email this article to a friend](#)
- ▶ [Download to citation manager](#)

**Citing Articles**

- ▶ [Citing Articles via Google Scholar](#)

**Google Scholar**

- ▶ [Articles by Díaz-Beyá, M.](#)
- ▶ [Articles by Esteve, J.](#)
- ▶ [Search for Related Content](#)

**PubMed**

- ▶ [Articles by Díaz-Beyá, M.](#)
- ▶ [Articles by Esteve, J.](#)

**Social Bookmarking**

[What's this?](#)

0.037).

Finally, we have identified a 3-miRNA signature (miR-378\*, p=0.02; miR-493, p=0.02; and miR-181, p=0.02) associated with global methylation levels, and a 12-miRNA signature associated with hydroxymethylation, including miR-183\* (p=0.001), miR-125a-3p (p= 0.01), miR-586 (p=0.02), and miR-513-3p (p=0.02).

**Conclusions:** Hydroxymethylation levels appear as an independent prognostic factor in IR-AML and maintain their prognostic value in the subset of patients with unfavorable molecular markers. Moreover, methylation and hydroxymethylation are associated with specific miRNA profiles. Further studies are warranted to confirm the clinical impact of these findings and to clarify the underlying molecular mechanisms.

**Disclosures:** No relevant conflicts of interest to declare.

#### **Footnotes**

\* Asterisk with author names denotes non-ASH members.

### 8.3. Resumen del trabajo 5:

#### A specific miRNA signature characterizes acute myeloid leukemia with traslocation t(6;9) (p23;q34)/ DEK-NIP214

17<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association

analysis, old age (HR 1.021, 95% CI 1.008–1.034,  $p=0.001$ ) and *RUNX1* mutation (HR 2.712, 95% CI 1.241–5.930,  $p=0.012$ ) remained the adverse factor for inferior survival. **Conclusions.** The present study showed a high frequency of class IV mutations (*IDH1/2*, *ASXL1* and *DNMT3A*, single or in combination) in AML-M0 in addition to *FLT3* and *RUNX1* mutations. Most patients harbored multiple mutations. *RUNX1* mutation was associated with a poor outcome. Supported by grants NSC100-2314-B-182-023-MY3, NHRI-EX96-9434SI and MMH-E-99009.

0044

**KPT-SINE (SELECTIVE INHIBITORS OF CRM1 MEDIATED NUCLEAR EXPORT) EXHIBIT STRIKING ANTI-LEUKEMIC ACTIVITY AGAINST AML AND T-ALL CELLS WHILE SPARING NORMAL HEMATOPOIETIC CELLS**  
J Etchin<sup>1</sup>, A Kentsis<sup>1</sup>, T Sanda<sup>1</sup>, A Kung<sup>1</sup>, R Stone<sup>1</sup>, D McCauley<sup>2</sup>, M Kauffman<sup>2</sup>, S Shacham<sup>2</sup>, A Look<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dana-Farber Cancer Institute, Boston, United States of America  
<sup>2</sup>Karyopharm Therapeutics, Natick, United States of America

**Background.** CRM1 is the major nuclear exporter that mediates transport of a variety of molecules, including proteins involved in tumor suppressor and cellular proliferation pathways. CRM1 is upregulated in a range of solid and hematologic malignancies and its overexpression is correlated with poor prognosis and with resistance to chemotherapy. The crystal structure of CRM1, in complex with its export cargo, Snurportin 1, has been recently resolved. The molecular understanding of the CRM1-cargo binding interface has led to the development of novel small molecule inhibitors of CRM1-cargo interaction, termed KPT-Selective Inhibitors of Nuclear Export (SINE). **Aims.** KPT-SINE are potent CRM1 inhibitors that irreversibly inactivate the CRM1-directed protein export by covalent modification of the essential CRM1-cargo binding residue Cys528. The inhibition of the CRM1 nuclear export has been shown to lead to selective apoptosis in cancer cells when compared to normal hematopoietic cells and normal cells. Here, we assess the efficacy of the KPT-SINE in human AML, T-ALL, and normal hematopoietic cells. **Methods.** The viability of a panel of human AML and T-ALL cell lines upon treatment by the KPT-SINE was assessed. Dose-response measurements were done using serial dilutions of KPT-SINE from 1  $\mu$ M to 0.3 nM and luminescent cell viability assay. Apoptosis was measured using Annexin V staining and TUNEL assays. **Results.** KPT-SINE induces rapid apoptosis in 12 AML and 14 T-ALL cell lines with IC50s of 15-170 nM. In the KPT-SINE-sensitive cell lines, BCL2 overexpression suppresses KPT-SINE-induced apoptosis, indicating its intrinsic pathway mediation. Importantly, oral administration of KPT-SINE compounds, either KPT-251 at 75 mg/kg or KPT-330 at 15 or 25 mg/kg, induced remarkable growth suppression in MV4-11 human AML cells engrafted into immunodeficient NSG mice with minimal toxicity to normal mouse hematopoietic cells after 35 days of treatment. Bone marrow biopsies of KPT-treated mice were remarkable in that they showed normal hematopoietic cell morphology and cellularity after 35 days of treatment. Significant survival benefit was observed in mice treated with either KPT-251 or KPT-330, compared to vehicle-treated mice. Studies to address the potency of the KPT-251 and KPT-330 on MOLT-4 human T-ALL cells *in vivo* are ongoing. **Conclusions.** These studies emphasize the clinical promise of the KPT-SINE as a novel and selective drug candidate for the treatment of AML and T-ALL.

0045

**VECTORIZED ANTICANCER DRUG F14512, USED ALONE OR IN COMBINATION WITH ARAC, DEMONSTRATES POTENT ANTI-LEUKEMIC ACTIVITY IN AML *in vivo* MODELS DERIVED FROM PATIENTS**

M Annereau, A Pillon, L Creancier, I Vandenberghe, B Gomes, V Brel, C Ricome, C Bailly, A Kruczynski, N Guilbaud  
Centre de Recherche et de Développement Pierre Fabre, Toulouse, France

**Background.** Drugs specifically vectorized to cancer cells should offer a reinforced activity, tackle tumor cells while preserving normal cells, resulting in an improved therapeutic index. In this context, the selective targeting of tumor cells with polyamine-containing drugs has been considered and the most promising compound in this category is arguably the spermine-podophyllotoxin conjugate F14512. F14512, that contains a spermine chain in place of the C4 glycosidic moiety of etoposide, displays an enhanced anti-proliferative activity on a large panel of tumor cell lines (10 fold) as compared to etoposide and exploits the polyamines transport system (PTS) to accumulate into cells. In a previous study, we established a clear correlation between the expression of the PTS system in 13 leukemia cell lines and their sensitivity to the cytotoxic action of F14512. This antitumor activity has encouraged the set up of a phase 1 clinical study with F14512 in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Aim.**

Although standard cytotoxic chemotherapy induced complete remissions in AML patients, relapse rates are still very high, resulting in a poor outcome in most cases. **Methods.** We evaluated the antitumor activity of F14512 alone, and in combination with the reference drug AraC, against novel *in vivo* AML models, collected from 3 different patients, and established onto NSG mice (LAM-2, LAM-7 and LAM-18). **Results.** These 3 AML samples exhibited a normal karyotype, with FLT3-ITD, NPM1 and DNMT3A mutations which proved their stability over serial transplantations *in vivo*. After multiple i.v. administrations of F14512, 3 times a week for 3 weeks, an extensive reduction of AML cell number (98-99%) was observed in LAM-2 and LAM-7 -bearing mice. This antileukemic activity was recorded on the basis of flow cytometry, q-PCR and histology assessments. Mechanisms of F14512-induced cell death are currently investigated, and preliminary data suggest that senescence is involved. We also demonstrated *in vitro* and *in vivo* synergistic effects of F14512 in combination with AraC, one of the frontline chemotherapeutic agents for AML. The antileukemic effects of F14512 on LAM-18 bearing mice were marginal with an inhibition of AML cell growth of 42%. **Summary and Conclusions.** Collectively, these results demonstrate that F14512 exhibits a marked *in vivo* antileukemic activity in these AML models derived from patients, supporting its clinical development, which is currently in progress.

0046

**A SPECIFIC MICRORNA SIGNATURE CHARACTERIZES ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH TRANSLOCATION T(6;9) (P23;Q34)/DEK-NUP214**

M Diaz-Beyá<sup>1</sup>, A Navarro<sup>2</sup>, M Pratorcorona<sup>1</sup>, R Tejero<sup>2</sup>, L Magnano<sup>1</sup>, M Monzo<sup>2</sup>, J Esteve<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Clinic Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, University, Barcelona, Spain

**Background.** Acute myeloid leukemia (AML) with translocation t(6;9)(p23;q34) is a rare (1%) high-risk AML subtype characterized by the fusion of nuclear phosphoprotein DEK in chromosome 6 with the nucleoporin encoding gene *NUP214* (*CAN*) in chromosome 9. This fusion gene in der(6) chromosome induces transformation by altering growth characteristics, nucleo-cytoplasmic transport, and protein synthesis of hematopoietic stem cells. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play an important regulatory role in many biological processes. Nonetheless, to date, little is known on the role of miRNAs in t(6;9) (p23;q34) DEK-NUP214 AML subtype [(6;9) AML]. **Aims.** The main objective of this study was to examine if t(6;9) AML harbors a miRNA signature associated with DEK/CAN fusion gene assembly. **Methods.** We have analyzed the miRNA profile of 117 AML patients with 10 different AML subtypes, including eight cases of t(6;9) AML, and three CD34+ bone marrow specimens from healthy donors. The expression of 670 mature miRNAs was assessed using TaqMan Human MicroRNA Arrays v2.0 (Applied Biosystems) in an ABI 7900 HT sequence detection system. Statistical analyses were performed with TIGR MultiExperiment Viewer and R software. To identify molecular pathways potentially altered by the expression of multiple miRNAs we used Diana-mir-Path, which performs an enrichment analysis of multiple miRNA target genes, comparing each set of miRNA targets to all known KEGG pathways. **Results.** Supervised analysis by means of t-test based on multiplex permutations and SAM analysis revealed a distinctive miRNA signature in t(6;9) AML patients. When the miRNA expression in t(6;9) AML was compared with miRNA expression in all other AML subtypes and also specifically with other high-risk AML subtypes, we found that a miRNA signature specifically associated with t(6;9) AML. This specific signature is composed of 30 differentially expressed miRNAs, 28 of which are upregulated in comparison with other leukemia subtypes. Some of these miRNAs have been previously described as players in several cancers (let-7a and let-7e, miR-143, miR-145, miR-451, miR-330-5p, miR-194, miR-99, miR-132, miR-199, miR-494 or miR-98), and others have been related to acute leukemia (miR-223, miR-451, miR-181a\*). In addition, several HOX-related miRNAs were upregulated (miR-10a, miR-10a\* and miR-10b). Interestingly, three miRNAs of the signature are located in or near the genomic region of NUP214 (9q34): miR-181a\* (9q33), let-7a (9q34) and miR-199b-5p (9q34). The Diana-mir-Path analysis found that some of the miRNAs in our signature may regulate genes involved in the KIT, MAPK/AKT2, and RUNX1 signaling pathways, both of which are deregulated in AML. **Conclusions.** We have identified for the first time a specific miRNA signature related to t(6;9) AML, with an overall upregulated profile. Some of the miRNAs in the signature may impact the leukemogenic process by altering essential pathways involved in cell differentiation and proliferation. Our findings thus contribute some insight into the biological profile of t(6;9) AML. Nonetheless, further investigation is warranted to determine the mechanisms leading to this miRNA signature and to identify the specific targets of the miRNAs.

## 9. Otros trabajos publicados durante este periodo

1. Carreras E, **Díaz-Beyá M**, Rosiñol L, Martínez C, Fernández-Avilés F, Rovira M. *The incidence of veno-occlusive disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has diminished and the outcome improved over the last decade.* Biol Blood Marrow Transplant. 2011 Nov;17(11):1713-20.
2. **Marina Díaz-Beyá**, María Rozman, Marta Pratcorona, Montserrat Torreadell, Mireia Camós, Josep Lluís Aguilar, Jordi Esteve. *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(26):6147-8.
3. **Marina Díaz Beyá**, Arturo Pereira and Anna Merino. *Erythrophagocytosis in cold agglutinin disease.* Transfusion. 2010; 50:2310-2310. Transfusion medicine illustrated
4. Alfons Navarro, Carmen Muñoz, Anna Gaya, **Marina Díaz-Beyá**, Bernat Gel, Rut Tejero, Tania Díaz, Antonio Martinez, Mariano Monzo. *"MiR-SNPs as Markers of Toxicity and Clinical Outcome in Hodgkin Lymphoma Patients"*. PLoS One. 2013 May 21;8(5):e64716.
5. Navarro A, **Díaz-Beyá M**, Monzó M . MIR135A1 (microRNA 135a-1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. February 2014 .  
<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MIR135A1ID50328ch3p21.html>

6. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, Escoda L, Guàrdia R, Queipo de Llano MP, Salamero O, Bargay J, Pedro C, Martí JM, Torrebaddell M, **Díaz-Beyá M**, Camós M, Colomer D, Hoyos M, Sierra J, Esteve J *“Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy”* . Blood. 2013 Apr 4;121(14):2734-8.
7. Costa D, Vidal A, Carrió A, Muñoz C, Arias A, Gómez C, Berneaga D, Colomer D, Rozman M, Pratcorona M, Torrebaddell M, **Díaz-Beyá M**, Esteve J, Campo E. *“Refining the Diagnosis and Prognostic Categorization of Acute Myeloid Leukemia Patients with an Integrated Use of Cytogenetic and Molecular Studies”*. Acta Haematol. 2013;129(2):65-71.
8. Martínez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, Arellano-Rodrigo E, Calvo X, **Díaz-Beya M**, Cervantes F. *Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients*. Leuk Res. 2011 Sep;35(9):1276-8.
9. Nomdedeu M, Maffioli M, Calvo X, Martínez-Trillos A, Baumann T, **Díaz-Beyá M**, Aguilar JL, Rozman M, Costa D, Esteve J, Cervantes F, Colomer D, Nomdedeu B. *Efficacy of lenalidomide in a patient with myelodysplastic syndrome with isolated del(5q) and JAK2V617F mutation*. Leuk Res. 2011 sep;35(9):1276-8.
10. María Rozman, José-Tomás Navarro, Leonor Arenillas, Anna Aventín, Teresa Giménez, Esther Alonso, Granada Perea, Mireia Camós, Mayda Navarrete, Esperanza Tuset, Lourdes Florensa, Fuensanta Millá, Josep Nomdedéu, Esmeralda de la Banda, **Marina Díaz-Beyá**, Marta Pratcorona, Salut Brunet, Jorge Sierra<sup>4,11</sup>, and Jordi Esteve<sup>2,11</sup>, on behalf of Grup Català de Citologia Hematològica and Spanish CETLAM Group (Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas)  
*Multilineage Dysplasia is Associated with a Poorer Prognosis in Patients with de novo Acute Myeloid Leukemia with Intermediate-Risk Cytogenetics and Wild-Type NPM1.*



## 10. Donde han sido presentados estos y otros trabajos realizados durante este periodo

### Comunicaciones orales de primera autora en congresos internacionales

1. AUTORES/AS: **MARINA DIAZ-BEYÁ**, Afons Navarro, Tania Díaz, Bernat Gel, Mireia Camós, Marta Pratcorona, Montserrat Torreadell, María Rozman, Margherita Maffioli, Mariano Monzó, and Jordi Esteve.

TÍTULO: “A Distinctive MicroRNA Signature Characterizes Acute Myeloid Leukemia with Translocation (8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP Rearrangement”

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral. **Premiado** con Travel award por la American Society of Hematology

CONGRESO: 52th American Congress of Hematology (ASH) PUBLICACIÓN: Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2010; 116: 230.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Orlando (EEUU) AÑO: 2010

2. AUTORES/AS: **M. DIAZ-BEYA**, A. Navarro, T. Diaz, M. Pratcorona, M. Rozman, M. Monzó, J. Esteve

TÍTULO: “MicroRNAs in Intermediate Risk Cytogenetic Acute Myeloid Leukemia Add Relevant Prognostic Information to Molecular Categorization”

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral. **Premiado** con Travel award por la American Society of Hematology

CONGRESO: 53th American Congress of Hematology (ASH)

PUBLICACIÓN: Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; 118: 235.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: San Diego (EEUU) AÑO: 2010



## **Comunicaciones orales de primera autora congresos nacionales**

AUTORES/AS: **M. Díaz-Beyá**, A. Navarro, M. Pratcorona, S. Brunet, J. Nomdedéu, J.M. Ribera, M. Tormo, R. Duarte, O. Salamero, D. Gallardo, L. Escoda, M. Nomdedeu, R. M. Risueño, F. Cervantes, J. Sierra, M. Monzó, J. Esteve.

TÍTULO: La sobreexpresión del microRNA (miRNA) asociado a BAALC miR-3151 es un factor de mal pronóstico independiente en la leucemia mieloide aguda de riesgo citogenético intermedio (LMA-RI)

TIPO DE PARTICIPACIÓN. Comunicación oral. **Premiado** con el premio de la sociedad catalana de hematología y hemoterapia a la mejor comunicación presentada en la LV Reunión de la SEHH-XXIX Congreso de la SETH

PUBLICACIÓN: Hematologica 2013

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Sevilla

AÑO: 2013

AUTORES/AS: **M. DÍAZ-BEYÁ**, Alfons Navarro, Rut Tejero, Tania Díaz, Marta Pratcorona, Meritxell Nomdedeu, Ruth Muñoz Risueño, María Rozman, Mariano Monzó<sup>2</sup>, Jordi Esteve<sup>1</sup>

TÍTULO: La leucemia mieloide aguda con t(6;9)(p23;q34) tiene una firma específica de microRNAs

TIPO DE PARTICIPACIÓN. Comunicación oral

PUBLICACIÓN: Hematologica 2012

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Zaragoza

AÑO: 2012

3. AUTORES/AS: **M. DÍAZ-BEYÁ**, A. Navarro, T. Diaz, M. Pratcorona, M. Rozman, M. Monzó, J. Esteve

TÍTULO: “La expresión de microRNA puede proporcionar información pronóstica relevante a la estratificación molecular de la leucemia mieloide aguda de riesgo citogenético intermedio”

TIPO DE PARTICIPACIÓN. **Sesión plenaria**. Comunicación oral. **Premiada** por la fundación española de hematología y hemoterapia con Premio Accesit a la segunda mejor comunicación presentada durante la LIII Reunión Nacional De la SEHH y XXVII Congreso Nacional de la SETH.

**Premiada** por la Sociedad Catalana de Hematología a la mejor comunicación presentada en congreso LIII Reunión Nacional De la SEHH y XXVII Congreso Nacional de la SETH

CONGRESO: LIII Reunión Nacional De la SEHH y XXVII Congreso Nacional de la SETH

PUBLICACIÓN: Hematologica 2011

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Zaragoza AÑO: 2011

4. AUTORES/AS: **MARINA DÍAZ BEYÁ**, Alfons Navarro, María Rozman, Marta Pratcorona, Josep Lluís Aguilar, Tania Díaz, Xavier Calvo, Natalia Tovar, Jordi Esteve.

TÍTULO: Valor pronóstico y patrón de microRNA asociado a la displasia multilínea en la Leucemia Aguda Mieloblástica de riesgo citogenético intermedios

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral. Premiada con Accésit de la Sociedad Catalana de Hematología y Hemoterapia a la mejor comunicación oral presentada a la XXIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.

CONGRESO: XXVI Reunión Nacional de la AEHH

PUBLICACIÓN: Hematologica, 2010

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Las Palmas

Año: 2010

5. AUTORES/AS: **M. DÍAZ-BEYÁ**, G. Gutiérrez-García, R. Vallansot, P. Abrisqueta, G. Ghita, y A. López-Guillermo

TÍTULO: Recaída en el sistema nervioso central (SNC) en pacientes con linfoma difuso de células grandes B (LDCGB)

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral. **Premiada** con Premio de la Sociedad Catalana de Hematología y Hemoterapia a la mejor comunicación oral presentada a la XXIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia en la categoría de residente

CONGRESO: XXVI Reunión Nacional de la AEHH

PUBLICACIÓN: Hematologica, 2008

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Murcia Año: 2008

### **Pósters de primera autora en congresos internacionales**

6. AUTORES/AS: **M Díaz-Beyá**, A. Navarro, M. Pratcorona, M. Nomdedeu, R. M. Risueño, M. Monzo, J. Esteve

TÍTULO: High Levels Of *HOTAIRM1*, A Long Intergenic Non-Coding Rna Related To *Hox* Genes, Is Associated With Poor Prognosis And A Distinctive MicroRNA Signature In Intermediate-Risk Acute Myeloid Leukemia

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. . **Premiada** con Travel Award por la European Society of Hematology

CONGRESO: 19th European Congress of Hematology 2014

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Milán, IT

Año: 2014

7. AUTORES/AS: **Marina Díaz-Beyá**, A. Navarro, M. Pratcorona, S. Brunet, J. Nomdedéu, J.M. Ribera, M. Tormo, R. Duarte, O. Salamero, D. Gallardo, L. Escoda, M. Nomdedeu, R. M. Risueño, F. Cervantes, J. Sierra, M. Monzó, J. Esteve.

TÍTULO: BAALC-associated microRNA miR-3151 is an Independent Prognostic Factor in Younger Patients with Intermediate-Risk Cytogenetic Acute Myeloid Leukemia

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: 54th American Congress of Hematology (ASH)

PUBLICACIÓN: Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2013;

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Nueva Orleans

AÑO: 2013

8. AUTORES/AS: **Marina Díaz-Beyá**, Alfons Navarro, Rut Tejero<sup>2</sup>, Marta Pratcorona, Tania Díaz, Mariano Monzó, Jordi Esteve

TÍTULO: Overall Hydroxymethylation Levels As an Independent Prognostic Marker in Intermediate-Cytogenetic Risk Acute Myeloid Leukemia

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. **Premiada** con Travel Award por la European Society of Hematology

CONGRESO: 53th American Congress of Hematology (ASH)

PUBLICACIÓN: Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2012; 120: 1375.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Atlanta

AÑO: 2012

9. AUTORES/AS: **M. DÍAZ-BEYÁ**, A. Navarro, Pratcorona, R. Tejero, L. Magnano, M. Monzó, J. Esteve

TÍTULO: "A specific miRNA signature characterizes acute myeloid leukemia with translocation (6;9)(p23;q34)/DEK-NUP 214 "

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. **Premiada** con Travel Award por la European Society of Hematology

CONGRESO: 17th European Congress of Hematology 2012

PUBLICACIÓN: Haematologica, 2012

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Amsterdam

AÑO: 2012

10. AUTORES/AS: **MARINA DÍAZ-BEYÁ**, Alfons Navarro, Tania Díaz, Gerardo Ferrer, Rut Tejero, Mireia Camós, Montserrat Torrebadell, Marta Pratcorona, Maria Rozman, Mariano Monzó and Jordi Esteve.

TÍTULO: “The Distinctive MicroRNA Signature of Acute Myeloid Leukemia with Translocation t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP Is Responsible for RET Overexpression and Is Regulated by Epigenetic Mechanisms”

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster. Premiada con Travel Award por la American Society of Hematology

CONGRESO: 53th American Congress of Hematology (ASH)

PUBLICACIÓN: Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; 118: 2434.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: San Diego

AÑO: 2011

11. AUTORES/AS: **MARINA DÍAZ BEYÁ**, Laura Rosiñol, Montserrat Rovira, Carmen Martínez, Francesc Fernandez-Avilés y Enric Carreras

TÍTULO: The incidence and morbi-mortality of veno-occlusive syndrome after allogeneic HSCT have decreased in the last decade. Experience of a single centre

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster.

CONGRESO: 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation

PUBLICACIÓN: Bone marrow transplantation Volume: 43 Pages: S165-S166

Published: MAR 2009

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Göteborg (Suecia)

AÑO: 2009

## Otros

### 12. Symposium

Autores :Jordi Esteve Reyner, Marta Pratcorona, **Marina Díaz Beyá**

Título: Aspectos clínicos, pronósticos y terapéuticos de las neoplasias mieloides relacionadas con la terapia

Tipo de participación: Ponencia invitado symposium

Congreso: LIII Reunión Nacional De la SEHH y XXVII Congreso Nacional de la SETH

Lugar de celebración: Zaragoza Año: 2011

13. Alfons Navarro, Tania Díaz, **Marina Díaz Beyá**, Antonio Martinez, Gerardo Ferrer, Kate E Hodgson, Victor Ciria, Anna Gaya, and Mariano Monzó

“Epigenetic Regulation of MicroRNA Expression In Hodgkin Lymphoma”

Póster en el American Congress of Hematology (ASH) 2010

14. Alfons Navarro, Anna Gaya, Anna Cordeiro, Blanca Gonzalez-Farre, **Marina Díaz-Beyá**, Dolors Fuster, Carmen Martínez, Jordi Esteve, Antonio Martínez, Mariano Monzo.

“Prognostic Significance of a 4-microRNA Signature Targeting JAK2 in Classical Hodgkin Lymphoma”.

Exposición oral en el American Congress of Hematology (ASH) 2013

15. Alfons Navarro, **Marina Díaz-Beyá**, Tania Díaz, Rut Tejero, Victor Ciria, Marta Pratcorona, Maruja Rozman, Mariano Monzo, Jordi Esteve.

“Regulación del protooncogén RET en la Leucemia mieloide aguda (LMA) con t(8;16) por miR-218, miR-128, miR-424 y miR-27b” Póster LIII Reunión Nacional De la SEHH y XXVII Congreso Nacional de la SETH por la

comunicación Octubre 2011

16. Alfons Navarro, Carmen Muñoz, Anna Gaya, Antonio Martinez, **Marina Díaz Beyá**, Rut Tejero, Tania Díaz, Gerardo Ferrer, Alvaro Urbano-Ispizua, and Mariano Monzó “Mir-SNP Haplotype in the MicroRNA Maturation Pathway As a Marker of Clinical Outcome in Hodgkin Lymphoma (HL)” Póster en el American Congress of Hematology (ASH) 2011

17. Autores: Calvo X, Nomdedeu M, Costa D, Navarro A, Pereira A, Muñoz C, Cobo F, Rovira J, **Díaz-Beyá M**, Esteve J, Nomdedeu B. Aceptado como comunicación para European Congress of Hematology 2012

Título: High levels of global DNA methylation are independent adverse prognostic factor in a series of 90

patients with de novo myelodysplastic syndrome (MDS)

Nombre del congreso: European Congress of Hematology

Tipo de participación: Ponencia

Ciudad de realización: Amsterdam,

Fecha de realización: 2012

Entidad organizadora: European Hematology Association

18. Jose Tomas Navarro, Maria Rozman, Leonor Arenillas, Ana Aventin, Teresa Gimenez, Esther Alonso, Granada Perea, Mireia Camós, , Mayda Navarrete, Esperanza Tuset, , Lourdes Florensa, Fuensanta Millá, , Josep F Nomdedeu, Esmeralda de la Banda, **Marina Díaz-Beyá**, Salut Brunet, Jorge Sierra, and Jordi Esteve. “ Multilineage Dysplasia Confers Poor Prognosis to Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia with Intermediate-Risk Cytogenetics and Wild-Type NPM1” Aceptado como póster en American Congress of Hematology. Atlanta 2012.

19. Alfons Navarro, Gerardo Ferrer, **Marina Díaz-Beyá**, Carmen Muñoz, Rut Tejero, Tania Díaz, Mariano Monzó, and Emili Montserrat “Global Methylation Provides Independent Prognostic Information in Chronic Lymphocytic Leukemia and Is Associated with a MicroRNA Signature”  
Aceptado como póster en American Congress of Hematology. Atlanta 2012.

20. G. Gutiérrez-García, R. Vallansot, P. Abrisqueta, M. Pratcorona, O. Salamero, **M. Díaz-Beyà**, A. Martínez-Pozo, F. Bosch, E. Giné, N. Villamor, D. Colomer, M. Camós, L. Colomo, E. Campo, E. Montserrat, A. López-Guillermo. Aumento de toxicidad hematológica tras la adición de rituximab al régimen FCM (fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona) en pacientes jóvenes (< 65 años) con linfoma folicular no tratados previamente. XLIX Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia, Pamplona 2007.

21. Pratcorona M, Torrebadell M, Camós M, Rozman M, **Díaz-Beyá M**, Carrió A, Valera A, Campo E, Montserrat E, Esteve J. Las mutaciones de NPM1 (NPMmut) y el estudio cuantitativo de la duplicación interna en tándem de FLT3 (FLT3-ITD) definen grupos de pacientes con distinto pronóstico en la leucemia mieloblástica aguda de riesgo citogenético intermedio. XXIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia, Murcia, 2008.

22. Camós M, Torrebadell M, Kalko S, Pratcorona M, Rozman M, **Díaz Beyá M**, Jares P, Brunet S, Nomdedéu J, Carrió A, Valera A, Campo E, Montserrat E, Esteve J. Los estudios de expresión génica contribuyen al pronóstico de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda de riesgo citogenético intermedio sometidos a un trasplante autólogo de progenitores



hematopoyéticos (autoTPH). XXIV Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia, Murcia, 2008.

23. Gonzalo Gutiérrez-García, Luis Colomo, Neus Villamor, Leonor Arenillas, Antonio Martínez, Mireia Camós, **Marina Díaz Beyá**, Carlos Fernández de Larrea, Xavier Calvo, Eva Giné, Francesc Bosch, Elias Campo, Emili Montserrat and Armando López-Guillermo. No Benefit from Rituximab Containing Regimens in Patients with Primary Extranodal Diffuse Large B-Cell Lymphoma. 50th American Society of Hematology Annual Meeting, 2008

24. Marta Pratcorona, Montserrat Torrebadell, Mireia Camós, María Rozman, **Marina Díaz-Beyá**, Ana Carrió, Alejandra Valera, Elías Campo, Emilio Montserrat, Jordi Esteve. NPM1 mutations and the quantitative study of FLT3-ITD define subgroups of patients with different prognosis in acute myeloid leukemia with intermediate-risk cytogenetics. Workshop European School of Hematology - European Hematology Association. Mandelieu (Francia), 3-5 de octubre 2008

25. M. Camos, S.G. Kalko, M. Torrebadell, M. Pratcorona, M. Rozman, **M. Díaz-Beyá**, D. Costa, A. Carrió, E. Campo, E. Montserrat, J. Esteve. Gene expression profile might predict prognosis in patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia lacking NPM1 and FLT3 mutations. 14th Congress of the European Hematology Association (2009). Berlín 2009

26. Marta Pratcorona, Montserrat Torrebadell, Mireia Camós, Neus Villamor, MaríaRozman, Ana Carrió, Dolors Costa, **Marina Díaz-Beyá**, Emili Montserra, Jordi Esteve. Identification of CEBPA mutations might contribute to a better prognostic assessment in patients with intermediate-risk cytogenetics AML.

51st ASH Annual Meeting, New Orleans, 2009

27. A. Navarro, T. Díaz. **M. Díaz**, G. Ferrer, K. Hodgson, B. Gel, A. Martínez,  
V. Ciria, A. Gaya, M. Monzó. Regulación epigenética de la expresión de miRNA  
en el linfoma de Hodgkin. Reunión Nacional de la AEHH. Las Palmas, Octubre 2010.

## **Financiación:**

Estos estudios se han financiado en parte gracias a:

Beca de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia beca de investigación FEHH 2012

Contrato Rio Hortega CM13/00205

FIS PI08/0158

PI13/00999

RD12/0036/0010