

FACTORES PRONÓSTICOS EN LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA: UTILIDAD DE LOS ESTUDIOS
INMUNOFENOTÍPICOS Y MOLECULARES

Granada Perea Durán
Tesis doctoral
Barcelona, junio 2011

TESIS DOCTORAL

FACTORES PRONÓSTICOS EN LEUCEMIA MIELOIDE
AGUDA: UTILIDAD DE LOS ESTUDIOS
INMUNOFENOTÍPICOS Y MOLECULARES

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la
Universitat Autònoma de Barcelona

Directores: Dr. Josep F. Nomdedéu Guinot y Dr. Jordi Sierra Gil

Granada Perea Durán

DEPARTAMENT DE MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

2011

En memoria de mi madre

A mi padre y a mi hermana

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quisiera dar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta han participado, no sólo en la elaboración de esta tesis, si no en mi formación profesional y personal.

En primer lugar, a mis directores de tesis. Al *Dr. Josep F. Nomdedéu*, por la confianza que siempre ha tenido en mí, por haber guiado mi aprendizaje en el laboratorio, tanto a nivel asistencial como en el campo de la investigación, porque me ha aconsejado y escuchado, a veces como maestro, a veces como amigo. Su insistencia y su entusiasmo han hecho posible esta tesis. Al *Dr. Jordi Sierra*, por fomentar una formación integral en el servicio de Hematología, en la que asistencia e investigación forman parte del día a día.

A la *Dra. Salut Brunet*, por su dedicación al estudio de la leucemia aguda y al cuidado de los enfermos, por su sentido común. Gracias por tus consejos y tu apoyo. A la *Dra. Luz Muñoz*, por todo lo que he aprendido con ella, por su ayuda, por haberme facilitado las cosas para poder finalizar este proyecto. Es un placer trabajar contigo. A la *Dra. Elena Rámila*, compañera y amiga de residencia, su apoyo y su amistad fueron muy importantes para mí durante aquellos años. Hoy, en el Parc Taulí, lo siguen siendo.

A todas las personas con las que compartí horas de trabajo durante mi etapa en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. A los *Dres. Ramón Ayats, Anna Aventín y Angel Remacha*, porque de todos ellos aprendí mucho durante los años que compartimos microscopio. A *Adriana Lasa, Camino Estivill, Josep Ubeda, Maite Carricondo, M^a José Carnicer*, por solucionar siempre mis dudas con agrado, por su colaboración en todo lo que he necesitado. Al personal del laboratorio de hematimetría y citología, *Neus, Maite, Ester, Carmen, Mercè, Piazuolo*, con ellos di mis primeros pasos en el laboratorio. A *Laura*, por el tiempo que dedicó a escucharme en mis tiempos difíciles, por su amistad.

A mis compañeros de la Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell y en especial del laboratorio UDIAT, por la buena acogida que me dieron. A la *Dra. Montserrat Torra* por abrirme las puertas del laboratorio, por comprender la importancia de este proyecto y facilitar que lo finalizara. A los técnicos y enfermeros del laboratorio de hematología, *Quima, Maribel, Quim, Carme, Silvia, Teresa*, que no han permitido que se me olvidara

que tenía una tesis pendiente de acabar. A la *Dra. Inma Roig*, por sus esfuerzos por mejorar y potenciar la hematología en el Hospital de Sabadell. A mis compañeros hematólogos, *Marta Gómez, Sonia Piernas, J. Alfons Soler y Montse Melo*, porque es muy fácil trabajar entre amigos.

A *Neus Baena*, porque sus consejos han sido de enorme utilidad en estos últimos meses, por toda la ayuda prestada con tanta amabilidad. Gracias Neus.

A *Mari Carmen Barrio*, por su revisión del texto. Nunca te debes haber aburrido tanto. Gracias.

Al *grupo CETLAM*, por su dedicación a la leucemia mieloide aguda, por el esfuerzo de sus miembros en el envío de muestras y en la actualización de datos para la realización de estudios que permitan avanzar en el conocimiento de esta enfermedad y mejorar la supervivencia de los enfermos.

A la *Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH)* por su apoyo económico.

A los pacientes y sus familiares, su lucha contra la enfermedad es la motivación de nuestro trabajo.

A mis familiares y amigos, los de siempre y los nuevos, que a lo largo de estos años se han ido interesando por el desarrollo de esta tesis, porque siempre me han animado a seguir.

A mi marido Félix y a mis hijos, Arnau y Marta, por estar siempre a mi lado.



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

AKT: serine/threonine protein-kinase Akt

ALK: anaplastic lymphoma kinase

ALT: alternative lengthening of telomeres

AML-1: acute myeloid leukemia 1

AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1 / RUNX1-MTG8): transcrito de fusión resultante de la t(8;21)(q22;q22)

ARNm: ARN mensajero

ATRA: all-transretinoic acid (ácido todo-transretinoico)

BAALC: brain and acute leukemia, cytoplasmic

BCR-ABL: breakpoint cluster region – Abelson. Transcrito de fusión resultante de la t(9;22)(q34;q11)

CALGB: Cancer and Leukemia Group B

CBF: core binding factor

CBFB-MYH11: transcrito de fusión resultante de la inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)

CBL: Cas-Br-M ecotropic retroviral transforming sequence

CBP: CREB (cyclic-AMP response element binding) binding protein

CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein A

CEBPE: CCAAT/enhancer binding protein E

CD: cluster of differentiation (grupo de diferenciación)

CDK: ciclinas dependientes de quinasas

CETLAM: grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias

CF: citometría de flujo

HCG: hibridación genómica comparada

CID: coagulación intravascular diseminada

col.: colaboradores

CSF1: colony stimulating factor 1

CT: ciclo umbral (término utilizado en PCR cuantitativa)

DIT: duplicación interna en tándem (FLT3)

DNMT3A: DNA methyltransferase 3A

EFS: supervivencia libre de evento (fallo de inducción/recaída o muerte por cualquier causa desde inicio del tratamiento)

EGIL: European Group for Immunophenotyping of Leukemia

EPO: eritropoyetina

ERG: ETS-related genes

ERK: extracellular signal-related kinases

ERM: enfermedad residual mínima

ETS: erythroblastosis virus E26 transforming sequence (familia factores de transcripción)

EVI-1: ecotropic viral integration site 1

FAB: French-American British group

FLT3: fms-related tyrosine kinase 3

FLT3-ITD: FLT3 internal tandem duplication (duplicación interna en tándem del gen FLT3)

FLT3-TKD: FLT3 tirosin kinase domain mutations (mutaciones del dominio tirosín-quinasa del gen FLT3)

FPD/AML: familial platelet disorder with tendency to develop myeloid neoplasias

Frameshift: mutaciones con desplazamiento del patrón de lectura

FSC: forward scatter component (dispersión frontal de luz)

G-CSF (CSF3): colony stimulating factor 3 (granulocyte) (factor estimulante del crecimiento de colonias granulocíticas)

GF11: growth-factor independent 1 (factor de transcripción)

GIMEMA: Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell' Adulto

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (factor estimulante del crecimiento de colonias granulocíticas-monocíticas)

GO: gentuzumab ogamicina

HABD: RUXN1 high-affinity binding domain

HEMGN: hemogen

HIF: hipoxia induced factor (factor inducido por la hypoxia)

hnRNPE2: heterogeneous nuclear ribonucleoproteins 2

HRR: homologous recombination repair (sistema de reparación del ADN)

HSC: hematologic stem cell (*stem cell*/hematológica)

IDH1/IDH2: isocitrato deshidrogenasa 1 y 2

IAR: incidencia acumulada de recaída

IL: interleuquina

Imprinted genes: genes imprintados, con impronta genética. Genes cuya expresión viene determinada por el origen parental.

In-frame: mutaciones que conservan el patrón de lectura

IRF8 (ICSBP): interferon regulatory factor 8 (interferon consensus sequence binding protein) (factor de transcripción)

JAK2: janus tyrosine kinase 2

JNK: c-Jun NH2-terminal kinase

LDH: lactato deshidrogenada

LLA: leucemia linfoide aguda

LMA: leucemia mieloide aguda

LMA-t: leucemia mieloide aguda secundaria a tratamiento quimio-radioterápico previo

LMC: leucemia mieloide crónica

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

LOH: loss of heterozigosity (pérdida de heterozigosidad)

LPA: leucemia promielocítica aguda

LYN: quinasa de la familia Src

M/L: cociente células progenitoras (CD34+) mieloide/linfoide

MLL: myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia gene

MLL-PTD: MLL partial tandem duplication (duplicación parcial en tándem del gen MLL)

MMR-DNA: DNA mismatch repair pathway (mecanismo de reparación del ADN)

MN1: gen del meningioma tipo 1

MPO: mieloperoxidasa

MRC: UK Medical Research Council

MRD: multidrug resistant

MRT: mortalidad relacionada con el trasplante

MSI: microsatellite instability (inestabilidad de microsatélites)

N-CAM: neural cell adhesion molecule (molécula de adhesión de la célula neuronal)

Nested PCR: PCR anidada

NF1: neurofibromina 1 o proteína asociada con la neurofibromatosis tipo 1

NFkB: NF kappa B

NG2: proteoglicano condroitín-sulfato

NK: natural killer

NMPC: neoplasia mieloproliferativa crónica

NPM1 (B23, numatrina, NO38): nucleofosmina tipo 1

OMS: Organización Mundial de la Salud

One-step PCR: PCR simple

Out-of-frame: mutaciones fuera del patrón de lectura normal (ver frameshift)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEM: progenitores eritroide/megacariocíticos

PETHEMA: Programa para el Estudio y Tratamiento de las Hemopatías Malignas

PGM: progenitores granulo-monocíticos

PI3-quinasa: fosfatidil-inositol 3 quinasa

PMC: progenitor mieloide común

PML-RARA: promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor, alpha. Tránsito de fusión resultante de la t(15;17)(q22;q12-21)

PMP: progenitor multipotencial

POLB: polymerase (DNA directed) beta

RAR/RARA: receptor ácido retinoico / receptor ácido retinoico alfa

Rb: gen del retinoblastoma

RC: remisión completa

ROC: receiver operating characteristic (curvas de operación característica del receptor).

Método estadístico

RPN1: riboforina

RR: riesgo de recaída

RTK: receptor tirosín-quinasa

RUNX1 (AML1 o CBFA2): runt-related transcription factor 1

RUNX2: runt-related transcription factor 2

SCF: stem cell factor

SCF-R: receptor stem cell factor

SCL: stem cell leukemia factor

SG: supervivencia global (tiempo desde el diagnóstico hasta fecha de muerte por cualquier causa)

SLE: supervivencia libre de enfermedad (tiempo desde fecha de la primera remisión completa hasta fecha de muerte por cualquier causa o recaída)

SLR: supervivencia libre de recaída (tiempo desde fecha de la primera remisión completa hasta fecha de recaída o de la muerte en remisión completa o último seguimiento en remisión completa)

SMD: síndrome mielodisplásico

SNP: single nucleotide polymorphism

SSC: side scatter component (dispersión lateral de la luz)

STAT: signal transducer and activator of transcription

Stem cell: célula madre totipotencial

TCR: receptor célula T

TdT: terminal deoxinucleotidil transferasa

TEL: translocation ETS leukemia gene: ETV6

TERT: telomere-specific reverse transcriptase

TET2: ten-eleven-translocation 2

TKD: dominio tirosín-quinasa

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

UPD: uniparental disomy (disomía uniparental)

VEGF: vascular and endothelial growth factor (factor de crecimiento del endotelio vascular)

VEGFR: receptor del VEGF

WT1: gen del tumor de Wilms

ÍNDICE

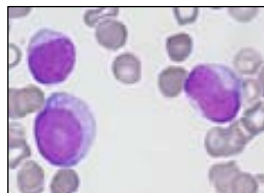
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	
1.1.1. Concepto y estado actual del tema	3
1.1.2. Epidemiología y etiología	4
1.1.2.1 Leucemias mieloides agudas familiares	5
1.1.3. Fisiopatología: mielopoyesis normal y mielopoyesis leucémica.	
1.1.3.1. Mielopoyesis normal: diferenciación antigénica y maduración mieloide	8
1.1.3.2. Mielopoyesis normal: regulación de la transcripción	11
1.1.3.3. Patología molecular de la leucemia mieloide aguda	14
1.1.3.4. Inestabilidad de microsatélites e inestabilidad genómica	24
1.1.3.5. Leucemogénesis: patogénesis secuencial	29
1.1.4. Cuadro clínico	31
1.1.5. Diagnóstico y clasificación de la leucemia mieloide aguda	31
1.1.6. Tratamiento de la leucemia mieloide aguda	35
1.2. FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	38
1.3. CITOMETRÍA DE FLUJO: APORTACIÓN AL DIAGNÓSTICO, SEGUIMIENTO Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	40
1.3.1. Generalidades del citómetro de flujo	41
1.3.2. Aplicación de la citometría de flujo en el estudio de la leucemia mieloide aguda	41

1.3.2.1. Utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico de la leucemia mieloide aguda	41
1.3.2.2. La citometría de flujo en el seguimiento de los pacientes en remisión completa: estudio de la enfermedad residual mínima	43
1.3.3. Valor pronóstico de los perfiles inmunofenotípicos detectados mediante citometría de flujo	48
1.3.3.1. Significado pronóstico de los marcadores mieloides	49
1.3.3.2. Significado pronóstico de los marcadores de inmadurez	51
1.3.3.3. Significado pronóstico de los marcadores de línea linfóide	54
1.3.3.4. Otros marcadores con significado pronóstico en la leucemia mieloide aguda	58
1.3.4. Valor pronóstico de la enfermedad residual mínima detectada mediante citometría de flujo en el seguimiento de los pacientes en remisión completa	60
1.4. CITOGENÉTICA: UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	65
1.4.1. LMA con afectación del <i>complejo core binding factor</i> (CBF)	68
1.4.1.1. Alteraciones cromosómicas secundarias	69
1.4.1.2. Mutaciones genéticas recurrentes	70
1.4.2. Leucemia promielocítica aguda: t(15;17)(q22;q21)/(PML-RARA)	74
1.4.3. LMA con alteraciones del cromosoma 11q23	76
1.4.4. LMA con t(6;9)/p23;q34)/(DEK-NUP214)	77
1.4.5. LMA con inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2)/ (RPN1 ₁ -EVI ₁)	77
1.4.6. LMA con cariotipo complejo	78
1.4.7. LMA con citogenética normal	79

1.4.7.1. Mutaciones genéticas recurrentes con impacto pronóstico en LMA con citogenética normal	
1.4.7.1.1. Mutaciones del gen FLT3	80
1.4.7.1.2. Mutaciones en el gen NPM1	87
1.4.7.1.3. Mutaciones en el gen CEBPA	91
1.4.7.1.4. Duplicación parcial en tándem del gen MLL	94
1.4.7.1.5. Mutaciones de RAS	96
1.4.7.1.6. Mutaciones en el gen WT1	96
1.4.7.1.7. Mutaciones en el gen AML1	98
1.4.7.2. Impacto pronóstico de la sobreexpresión de genes en la LMA con citogenética normal.	
1.4.7.2.1. Sobreexpresión del gen BAALC	99
1.4.7.2.2. Sobreexpresión de ERG	100
1.4.7.2.3. Sobreexpresión del gen MN1	101
1.4.7.3. Otras alteraciones genéticas con significado pronóstico en las LMA con citogenética normal	102
1.5. MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS AL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	
1.5.1. Técnicas para el diagnóstico molecular y seguimiento de la LMA	106
1.5.2. Aportaciones de las nuevas tecnologías de análisis genómico al estudio de la LMA	109
1.5.3. Estudio de la enfermedad residual mínima mediante PCR en pacientes con LMA y de su significado pronóstico en los pacientes en remisión completa citológica	110

1.5.3.1. Seguimiento de la ERM mediante técnicas de PCR en LMA con t(8;21)/AML1-ETO	113
1.5.3.2. Seguimiento de la ERM mediante técnicas de PCR en LMA con inv(16)/t(16;16)/CBFB-MYH11	116
1.5.3.3. Seguimiento de la ERM mediante técnicas de PCR cuantitativa en LMA con mutaciones del gen NPM1	121
1.5.3.4. Significado pronóstico de la expresión de WT1 en el seguimiento de los pacientes con LMA	122
2. JUSTIFICACIÓN	125
3. OBJETIVOS	129
4. RESULTADOS	133
4.1. Trabajo sobre inestabilidad genética en LMA	137
Publicación: Microsatellite instability is not an uncommon finding in adult de novo acute myeloid leukemia.	
4.2. Trabajo sobre enfermedad residual mínima en LMA con t(8;21)/inv(16)	139
Publicación: Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)].	
4.3. ANEXO	141
4.3.1. Trabajo sobre caracterización inmunofenotípica de las LMA al diagnóstico	143
Publicación: Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adults de novo acute myeloid leukemia patients	

5. DISCUSIÓN	145
6. CONCLUSIONES	167
7. BIBLIOGRAFÍA	173



1- INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

1.1.1. CONCEPTO Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una proliferación neoplásica de células inmaduras de estirpe mieloide que se produce por una alteración en la regulación del crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas. Esta alteración provoca la acumulación de precursores inmaduros mieloides con capacidad de replicación, pero que han perdido su capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras. Por consiguiente, la médula ósea es ocupada por células tumorales que impiden una hematopoyesis normal y da lugar a la aparición de una insuficiencia medular.

Hasta los años 70 el diagnóstico de esta enfermedad se basaba únicamente en el examen histológico y citológico de la médula ósea y la sangre periférica. La probabilidad de supervivencia a los 5 años en este período era menor al 15%. Durante las décadas de los 80 y 90 se produjo un avance muy importante en el diagnóstico de la leucemia aguda con la introducción de las técnicas inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares. Este mayor refinamiento diagnóstico permitió un mejor conocimiento de la fisiopatología de la LMA que derivó en una clasificación de las LMA que valora tanto los aspectos morfológicos, como los fenotípicos, citogenéticos y moleculares (Jaffe ES, 2001). Esta nueva clasificación que integra los aspectos biológicos más significativos junto con la definición de nuevos factores pronósticos han permitido el desarrollo de protocolos terapéuticos ajustados al riesgo del paciente. Aproximadamente el 60-80% de los adultos con LMA consigue remisión completa (RC), pero sólo el 30-40% de estos pacientes está vivo y libre de enfermedad a los 5 años. Estos datos indican que, a pesar del avance conseguido en los últimos años en el diagnóstico y tratamiento de la LMA, es necesario continuar

estudiando la fisiopatología de esta enfermedad tan heterogénea e investigando factores pronósticos que permitan individualizar los tratamientos y desarrollar nuevos fármacos.

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

La LMA tiene en los países occidentales una incidencia de 2,2 nuevos casos por 100.000 habitantes y año. Para una población como la española, ello supone aproximadamente entre 900 y 1000 nuevos casos anuales (Sanz MA, 2001; Sanz MA, 2003). La incidencia de LMA se incrementa de forma progresiva con la edad, siendo más evidente a partir de la quinta o sexta décadas de la vida. La LMA causa el 1,2% de la mortalidad por cáncer.

La asociación de la LMA con una serie de enfermedades que presentan anomalías cromosómicas o de conocido origen hereditario, sugiere la implicación genética en la leucemogénesis. Entre los diferentes tipos de cáncer, la leucemia es la neoplasia que con más frecuencia se asocia a las radiaciones ionizantes, siendo la estirpe mieloide la más frecuentemente afectada. Además de un componente de susceptibilidad individual, el riesgo de desarrollar una leucemia aguda tras radiaciones está en relación directa con la dosis, el tiempo de exposición y la superficie corporal expuesta. Este riesgo persiste durante muchos años.

Ciertos agentes químicos se asocian con la génesis de algunos casos de LMA. Entre éstos destaca la exposición prolongada al benceno. Datos provenientes de numerosos estudios han revelado que trabajadores en contacto con este compuesto (industria del calzado o el petróleo) presentan un mayor riesgo de desarrollar LMA. Asimismo, se ha observado un incremento del riesgo de desarrollar una leucemia secundaria en pacientes tratados con quimioterapia por diferentes tipos de cáncer, hematopoyéticos o no, debido a un aumento de la supervivencia de estos pacientes. Entre los fármacos administrados a los pacientes con neoplasias destacan, por su asociación con un mayor riesgo de leucemia secundaria, los agentes alquilantes (ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo o tiotepa),

procarbazona, nitrosureas, antibióticos antitumorales (antraciclinas) y epidofilotoxinas. Las leucemias que aparecen en asociación con estos fármacos suelen ir precedidas de un período de pancitopenia o displasia y se asocian con un mal pronóstico.

En modelos experimentales y animales se ha demostrado la implicación de los virus en la leucemogénesis, en concreto del virus de Epstein-Barr (VEB), del virus linfotrópico de células T humano tipo I (HTLV-I) y del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En la actualidad no hay evidencia de la intervención de estos virus u otros en el desarrollo de LMA en humanos.

La ausencia de mecanismos de vigilancia inmunológica también puede estar implicada en la leucemogénesis. Los pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas (neoplasias, trasplante de órganos, etc.) tienen una incidencia de linfomas y leucemias mayor a la esperada.

Con todo, la LMA es una enfermedad de etiología desconocida y sólo en una pequeña proporción de pacientes es posible identificar algún factor etiológico. Probablemente, la conjunción de factores genéticos y ambientales determinen el riesgo a desarrollar una leucemia.

1.1.2.1. LMA familiares

La gran mayoría de LMA se presenta como casos esporádicos. Las LMA/SMD familiares son muy raras. Típicamente son LMA que se presentan en edades más tempranas que los casos esporádicos y se pueden reconocer por la existencia de una historia inusual de uno o más familiares de primer grado con diagnóstico de SMD/LMA. La mayoría de familias descritas en la literatura presentan un patrón de herencia autosómica dominante consistente en mutaciones únicas en un gen (Horwitz M, *Leukemia* 1997; Owen C, *Br J Haematol* 2008). Hasta el momento se han identificado mutaciones en dos genes, RUNX1 (AML1) y CEBPA. Estas mutaciones no inducen la leucemogénesis por sí mismas. El

estudio de estas familias aporta una información valiosa acerca de la adición de eventos genéticos secundarios responsables del desarrollo de la LMA.

La enfermedad plaquetaria familiar con tendencia a desarrollar neoplasias mieloides (familial platelet disorder with tendency to develop myeloid neoplasias, FPD/AML) es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por anomalías en el número y en la función de las plaquetas y con tendencia a desarrollar SMD/LMA. En estos pacientes se han detectado mutaciones germinales heterocigotas en el gen RUNX1 (Song WJ, Nature Genetics 1999). La incidencia media de SMD/LMA en estas familias es del 35% (oscila entre un 20-60%) (Figura 1). Son LMA que no se asocian a ningún subtipo concreto de la clasificación FAB ni a anomalías citogenéticas (Owen C, Br J Haematol 2008).

Las mutaciones de CEBPA también se han descrito en casos de leucemia familiar con un patrón de herencia autosómico dominante. La primera familia fue descrita en 2004

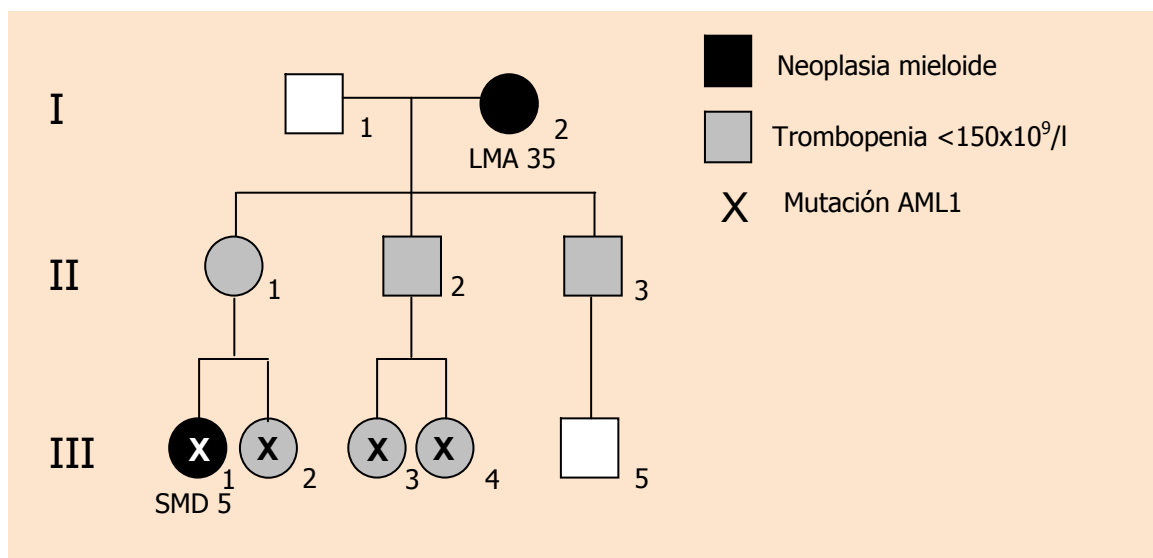


Figura 1. Familia con historia de enfermedad plaquetaria familiar asociada a neoplasias mieloides con mutación de AML1. LMA: leucemia mieloide aguda. SMD: síndrome mielodisplásico. Número junto diagnóstico: edad de presentación de la neoplasia mieloide.

(Smith ML, N Eng J Med 2004). La frecuencia de LMA con mutaciones esporádicas de CEPBA es de 5-14%. Son leucemias con mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y

supervivencia global (SG). Se ha observado que el 11% de todos los pacientes con LMA con mutaciones esporádicas de CEBPA tiene mutaciones germinales de este gen. Por tanto, la incidencia aproximada de estas mutaciones germinales es de un 1% de todas la LMA (Pabst T, J Clin Oncol 2008). La lesión molecular característica en estas familias es una mutación N-terminal *out-of-frame* que da lugar a una terminación precoz de la proteína normal y a una producción preferencial de la isoforma dominante negativa de 30 kDa. Es importante remarcar que en estas familias se asocian con frecuencia mutaciones adicionales C-terminales *in-frame* de CEBPA en el otro alelo en el momento del diagnóstico. Esto indica que la mutación N-terminal de CEBPA predispone a la generación de mutaciones somáticas como evento secundario que inducirían la LMA tras un período de latencia determinado (Pabst T, J Clin Oncol 2008; Owen C, Br J Haematol 2008).

Y por último, también se han reportado casos de SMD/LMA familiares asociadas a monosomía del cromosoma 7 (Owen C, Br J Haematol 2008). Son familias sin evidencia de síndromes congénitos. La monosomía 7 no es una mutación germinal, sino un evento secundario en la leucemogénesis. Se postula que estas familias deben ser portadoras de mutaciones genéticas que predisponen al desarrollo de otras anomalías secundarias, como la monosomía 7 (Minelli A, Cancer Gen Cytogen 2001).

En los pacientes con neutropenia congénita severa se ha detectado una mayor predisposición a desarrollar SMD/LMA en aquellos casos con mutaciones adquiridas en el gen que codifica el receptor de G-CSF (CSF3R). Estas mutaciones, que se han detectado en un 20-30% de los casos, dan lugar a un receptor hiperfuncionante que actúa de una forma dominante negativa para aumentar la proliferación a expensas de una inhibición de la maduración (Ward AC, Curr Opin Hematol 2009).

1.1.3. FISIOPATOLOGÍA: MIELOPOYESIS NORMAL Y MIELOPOYESIS LEUCÉMICA

1.1.3.1 MIELOPOYESIS NORMAL: DIFERENCIACIÓN ANTIGÉNICA Y MADURACIÓN MIELOIDE

Los precursores hematopoyéticos más inmaduros o células *stem* totipotenciales tienen la capacidad de auto-regeneración, proliferación y diferenciación en las distintas líneas celulares. Son células con capacidad de división simétrica (generación de dos *stem cells* idénticas al progenitor) y asimétrica (generación de una célula *stem cell* idéntica al progenitor y una célula progenitora con menor capacidad de replicación pero con habilidad de expansión clonal y diferenciación para mantener la circulación de células maduras en sangre periférica) (Bonnet D, Nature Medicine 1997). Estas células se caracterizan por la ausencia de marcadores de línea (Lin-) y por expresar CD34⁺/CD38^{-/+débil}. Además, pueden expresar otros marcadores de inmadurez como CD90 o CD117 (KIT). Por el contrario, a diferencia de la *stem cell* leucémica, no expresa CD123. Durante el proceso de diferenciación, los progenitores hematopoyéticos se comprometen en ciertas líneas celulares, con la aparición de marcadores específicos (Lin+), y pérdida de la capacidad de auto-regeneración. Cuando la *stem cell* pasa a progenitor comprometido (progenitor multipotencial, PMP) pierde la capacidad de autorreplicación pero mantiene la capacidad de diferenciación en todas las líneas celulares hematopoyéticas. Este progenitor se irá comprometiendo en una línea celular específica: progenitor linfoide común (PLC) ó progenitor mieloide común (PMC). El PMC dará lugar a progenitores más específicos como son los progenitores granulocíticos/monocíticos (PGM) y los progenitores eritroides/megacariocíticos (PEM). Todos estos procesos están regulados por factores de transcripción y citoquinas (Zon LI, Nature 2008). Hay un equilibrio entre la autorreplicación y la diferenciación. Si este equilibrio se pierde por una alteración en la

regulación de autorreplicación se bloquea la diferenciación. La aparición de una leucemia puede ser consecuencia de una alteración en alguno de estos procesos (Figura 2).

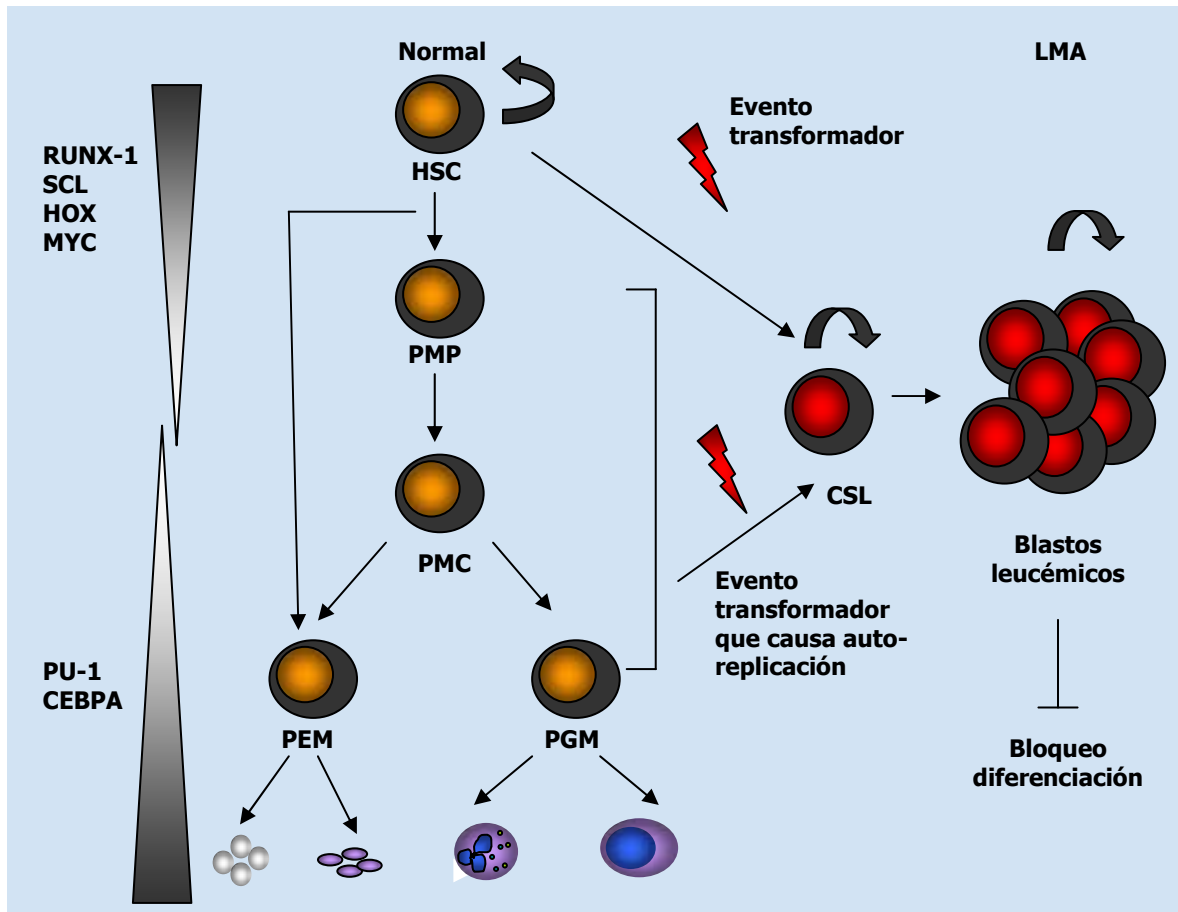


Figura 2. Transformación de progenitores hematopoyéticos normales en *stem cells* leucémicas. En la izquierda de la imagen se muestra la ontogenia mieloide normal con los factores de transcripción críticos en el control del programa transcripcional. En la derecha de la imagen se especula con que los eventos transformadores pueden tener lugar a nivel de la *stem cell* totipotencial o de un progenitor ya comprometido y generar una célula progenitora leucémica que evolucionará a LMA. HSC: *stem cell* hematopoyética normal; PMP: progenitor multipotencial; PMC: progenitor mieloide común; PGM: progenitores granulocíticos-granulocíticos / monocíticos; PEM: progenitores eritroides/megacariocíticos; CSL: *stem cell* leucémica. Figura adaptada de Gudgin E. in Hematology Education, the education program for the annual congress of the European Hematology Association 2009.

La línea granulopoyética representa aproximadamente el 60% de la celularidad global de la médula ósea y se caracteriza por la presencia de mieloperoxidasa (MPO) desde los

estadios más iniciales de la diferenciación. Desde el punto de vista fenotípico los primeros precursores mieloides (estadio I) se caracterizan por coexpresar los antígenos CD34, CD38, HLA-DR y CD33 y, a diferencia de los precursores linfoides, presentan un patrón de FSC y SSC mucho más heterogéneo. Los precursores mieloides y los monocíticos son indistinguibles antigénicamente en este estadio. En su progresión al estadio II las células mieloides pierden CD34 y HLA-DR, ganan CD15 y aumentan su SSC sin presentar todavía CD11b. Este estadio corresponde al promielocito. Posteriormente, la célula mioleide adquiere una expresión moderada de CD11b, disminuye su expresión de CD33, pierde el antígeno CD13 y disminuye su SSC (estadio III). En su proceso de diferenciación la célula mioleide vuelve a ganar CD13 mientras que disminuye CD33 y aparece el antígeno CD16 (estadio IV). El estadio más maduro en la diferenciación granulocítica corresponde al del neutrófilo maduro que se encuentra en sangre periférica (estadio V). Estas células expresan CD16, CD13, CD10 y CD45 (Figura 3) (Terstappen LW, Leukemia 1990).

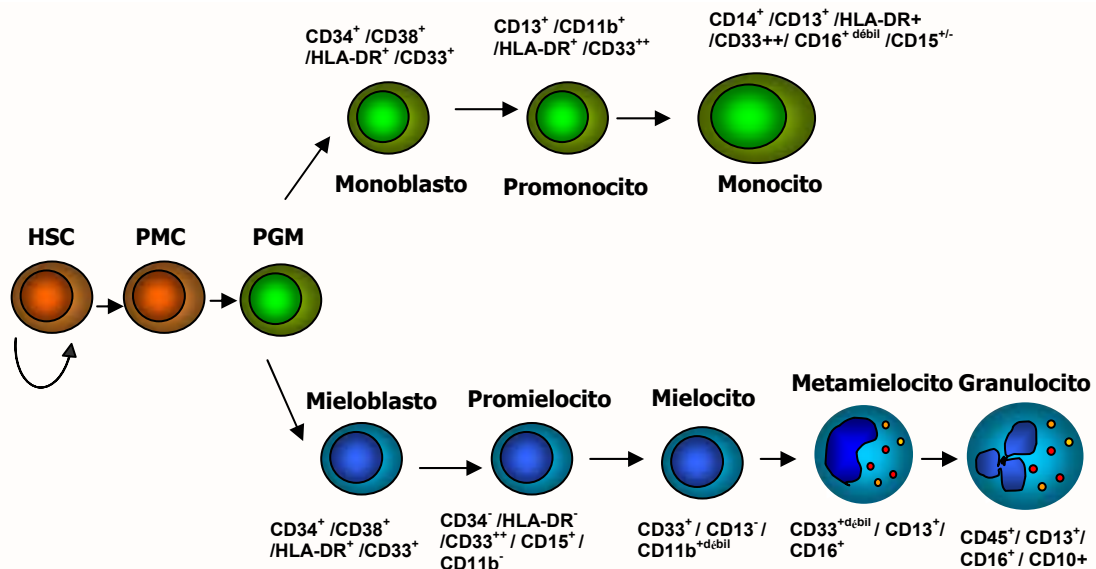


Figura 3. Expresión antigénica de las células mieloides y monocíticas en los diferentes estadios madurativos. HSC: *stem cell* hematopoyética; PMC: progenitor mioleide común; PGM: progenitores granulocíticos/monocíticos.

En cuanto a la línea monocítica, desde un punto de vista fenotípico/antigénico, el precursor es indistinguible del precursor mieloide o mieloblasto (CD34+HLA-DR+CD38+CD33+). A diferencia de lo que ocurre en otras líneas hematopoyéticas, los conocimientos fenotípicos sobre la diferenciación monocítica siguen siendo todavía relativamente escasos. Se ha sugerido que la adquisición de positividad intensa para CD33 en las células CD34+ indicaría diferenciación hacia la línea monocítica. Asimismo, durante su diferenciación inicial la célula monocítica ganaría intensidad de CD33 antes de empezar a perder CD34, al contrario que ocurriría en la célula mieloide (Macedo A, Sangre 1994). La célula monocítica, a diferencia de la mieloide, expresa HLA-DR durante toda su diferenciación. En el estadio II la célula monocítica se caracteriza por un aumento importante en la expresión de CD11b, CD13 y CD33. En el estadio III la célula monocítica gana el antígeno CD14, que va aumentando de intensidad a medida que el monocito madura, al igual que el CD45. Los antígenos CD15 y CD16 también se expresan en el monocito maduro, pero más débilmente que en la línea mieloide (Figura 3). Paralelamente a la adquisición de estos antígenos durante el proceso de diferenciación, las células de la línea monocítica incrementan su SSC y disminuyen su FSC hasta adoptar en sangre un patrón de FSC/SSC intermedio respecto a linfocitos y neutrófilos. La intensidad de expresión de CD33 y CD13 se mantiene fuerte durante toda la diferenciación monocítica. Comparado con los neutrófilos, en los monocitos maduros la expresión de CD13 es más heterogénea y la de CD33, más homogénea (Terstappen LW, Leukemia 1990).

1.1.3.2. MIELOPOYESIS NORMAL: REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

Del mismo modo que en la diferenciación y maduración celular, existe una jerarquía en el orden de actuación de los factores de transcripción que controlan la mielopoyesis. La hematopoyesis se inicia con la generación de *stem cells* hematopoyéticas a partir del

mesodermo. RUNX1 (AML1) y SCL (TAL1) son los factores de transcripción críticos en este proceso (Rosenbauer F, Nature Reviews 2007). Los genes Homeobox (Hox), MYC, la vía de señalización WNT/Beta catenina, NOTCH y Bmi-1 tienen un importante papel en la autorreplicación de la *stem cell* y en el inicio de la diferenciación mieloide (Ravandi F, Clin Cancer Res 2006, Gudgin E, Hematology Education, the education program for the annual congress of the European Hematology Association 2009).

Las fases iniciales de la diferenciación mieloide están reguladas por dos genes principales PU.1 y GATA-1. PU.1 dirige la *stem cell* hematopoyética hacia el progenitor linfoide-mieloide e interacciona con GATA-1 para inhibir el compromiso de la *stem cell* hacia el progenitor eritroide/megacariocítico (Zhu J, Oncogene 2002; Friedman AD, Oncogene 2007). PU.1 se expresa en diferentes niveles de la diferenciación hematopoyética. Se detecta en la *stem cell*, en los progenitores mieloides y linfoides comunes y en las células mieloides y linfoides B maduras. PU-1 tiene un papel crucial para determinar el destino celular tanto en los progenitores mieloides como en los linfoides. En la línea mieloide, los niveles altos de PU.1 se asocian con la producción de macrófagos y los niveles bajos, con la producción de granulocitos. En un siguiente paso, la producción de progenitores granulocíticos/monocíticos (PGM), el factor de transcripción más importante es CEBPA. CEBPA se expresa en la *stem cell* hematopoyética, en los progenitores mieloides y en los granulocitos, pero no en los macrófagos. CEBPA también regula las propiedades de autorreplicación de la *stem cell*. Y por último en la diferenciación hacia granulocito o hacia monocito/macrófago intervienen PU.1 e IRF8 (Friedman A, Oncogene 2002). En la línea mieloide, IRF8 (ICSBP) se expresa en progenitores y en macrófagos, pero no en granulocitos. IRF8 tiene un papel fundamental en los estadios finales de la diferenciación monocítica. C-Jun también coopera con PU.1 en la diferenciación monocítica (Rosmarin AG, Experimental Hematology 2005). La fase terminal de diferenciación neutrofílica está regulada especialmente por CEBPE y GFI1 (Figura 4).

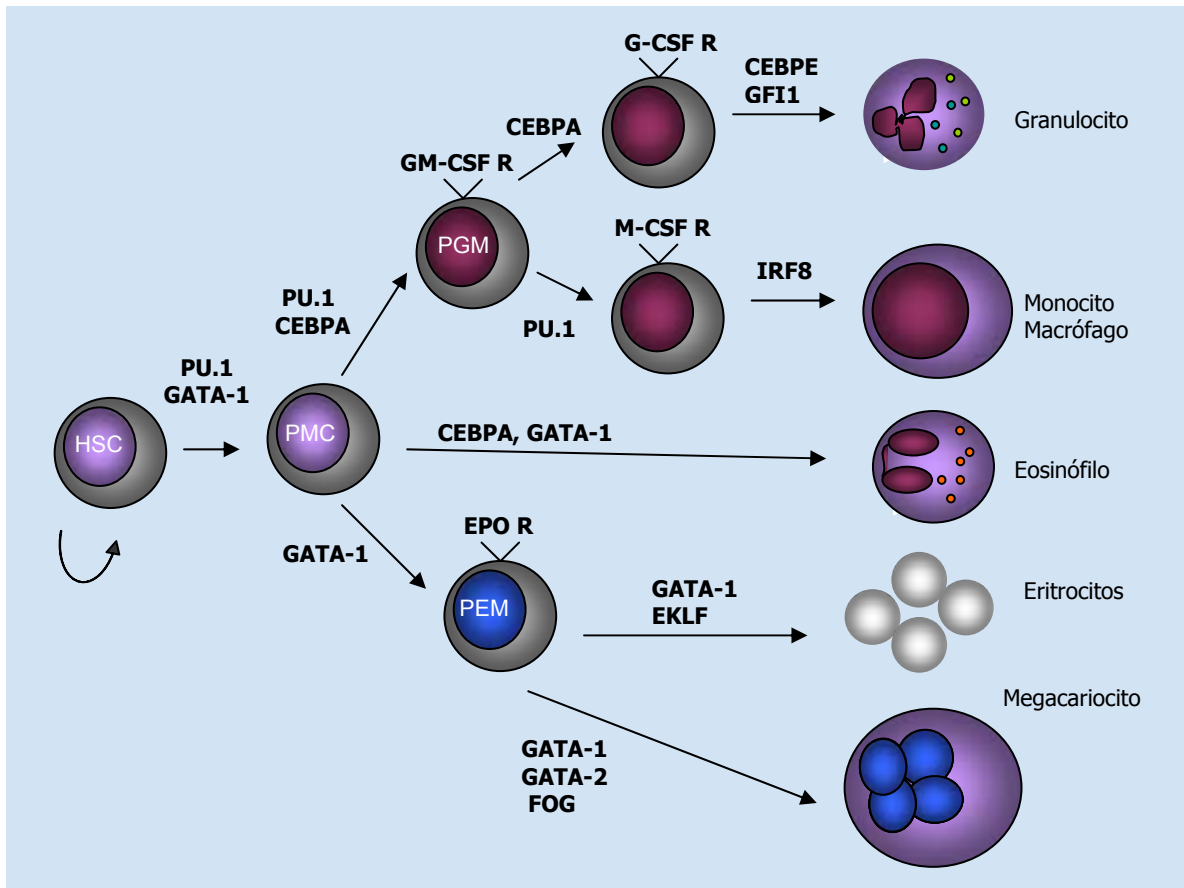


Figura 4. Factores de transcripción críticos en la diferenciación mieloide normal.

PU.1 dirige la *stem cell* hematopoyética (HSC) hacia el progenitor mieloide común (PMC) e interacciona con GATA-1 para inhibir el compromiso de la *stem cell* hacia el progenitor eritroide/megacariocítico (PEM). CEBPA tiene un papel indispensable en la transición del PMC a progenitores granulocíticos/monocíticos (PGM). De forma similar, CEBPE y GFI1 son cruciales en los estadios finales de la maduración neutrofílica. La producción de macrófagos depende de PU.1 e IRF8. PU.1 es esencial en los estadios intermedios mientras que IRF8 desempeña su papel en los estadios finales de la diferenciación monocítica.

La acción de los factores de transcripción sobre los progenitores hematopoyéticos está modulada por citoquinas. Las citoquinas, muchas de ellas factores de crecimiento, actúan en general mediante la unión a sus receptores celulares. Esta unión provocará una serie de eventos intracelulares que finalmente afectarán a la síntesis de ADN produciendo una activación o inhibición de la proliferación y diferenciación celular, o bien regulando la viabilidad celular a través de la inducción o bloqueo de la apoptosis. Existe una larga lista

de citoquinas que modulan la hematopoyesis. Unas tienen acción en estadios más iniciales como SCF o FLT3, otras estimulan colonias formadoras de líneas celulares específicas como la eritropoyetina o trombopoyetina y otras estimulan el crecimiento de varias líneas celulares como GM-CSF, o las interleuquinas (IL-3, IL-4, IL.6, etc) (Zhu J, Oncogene 2002; Zon LI, Nature 2008).

1.1.3.3. PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

El fenotipo tumoral observado en la leucemia aguda es consecuencia de las alteraciones en la fisiología normal de los progenitores hematopoyéticos. Los procesos críticos que se encuentran lesionados son (Licht JD, Hematology Am Soc Hematol Educ Book 2005):

1. Proliferación inapropiada en ausencia de las señales de crecimiento normales (autosuficiencia de las señales de crecimiento)
2. Bloqueo de la diferenciación
3. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis)
4. Capacidad replicativa ilimitada
5. Alteración en el control de la progresión del ciclo celular
6. Inestabilidad genómica y diseminación multiorgánica de las células leucémicas

1. Proliferación inapropiada: autosuficiencia de las señales de crecimiento

La activación de proteínas tirosín-quinasa intracelulares y de sus receptores estimula la fosforilación de proteínas y provoca diferentes eventos a nivel intracelular que darán lugar a la actividad transcripcional en el núcleo y a la estimulación del ciclo celular. En las células normales la proliferación celular está regulada por factores de crecimiento y señales de adhesión, pero estos mecanismos pueden estar activados de manera autónoma en las células leucémicas. Esta proliferación anormal a menudo es el resultado de mutaciones que afectan a las vías de señalización de la proliferación. Al igual que

ocurre con la tirosín-quinasa BCR-ABL en la leucemia mieloide crónica (LMC), se ha observado la implicación de quinasas activadas en la patogénesis de la LMA. Las mutaciones en los receptores tirosín-quinasa (RTK) se han documentado en aproximadamente el 50% de los pacientes con LMA. FLT3 es una tirosín-quinasa que se expresa en casi todos los pacientes con LMA y que se encuentra activada de forma constitutiva por una duplicación interna en tándem del dominio yuxtamembrana (FLT3-ITD) o por mutaciones dentro del *loop* de activación de la quinasa en aproximadamente el 30% de las LMA (Kottaridis PD, Blood 2001). Se ha observado que estas mutaciones tienen un importante valor pronóstico (Gale RE, Blood 2008; Schlenk RF, N Eng J Med 2008).

La tirosín-quinasa KIT se expresa en el 60-80% de los pacientes con LMA. Se han descrito mutaciones activantes en la mastocitosis y en algunos casos de LMA, sobre todo en las que se asocian a citogenética de buen pronóstico, t(8,21) e inv(16) (Paschka P, J Clin Oncol 2006; Cairoli R, Blood 2006). La quinasa JAK2 está activada por la mutación puntual V617F en la gran mayoría de pacientes con policitemia vera y en un porcentaje significativo de pacientes con trombocitosis esencial (Kaushansky K, Blood 2005). Ambas son enfermedades que pueden desarrollar una LMA.

Las tirosín-quinatas activadas pueden transmitir señales de proliferación por afectación de la familia RAS, y por mutaciones en genes codificantes de estas proteínas que pueden simular los efectos de mutaciones en el RTK. NRAS se encuentra mutado y constitutivamente activado en el 10-20% de las LMA, KRAS en el 5-15% de los pacientes, mientras que HRAS raramente está mutado (Valk PJ, N Eng J Med 2004). Las LMA que tienen mutaciones de RAS no tienen fusión de quinasas ni mutaciones activantes de las mismas, lo que sugiere que RAS y las moléculas tirosín-quinatas son equivalentes desde el punto de vista biológico en esta enfermedad. En general, las vías de RTK están activadas por mutaciones que provocan un aumento de función. La excepción es la

pérdida de expresión de la proteína supresora tumoral neurofibromina (NF1), la cual inactiva RAS por estimulación de su actividad GTPasa intrínseca. La pérdida de expresión de NF1 es poco frecuente en las LMA *de novo* (Licht JD, Hematology Am Soc Hematol Educ Book 2005).

2. Bloqueo de la diferenciación

• Factores de transcripción

Los factores de transcripción, imprescindibles para la diferenciación hematopoyética, se encuentran a menudo alterados en la LMA como consecuencia de translocaciones cromosómicas y de mutaciones puntuales. Los factores afectados por reordenamientos cromosómicos incluyen el complejo *core binding factor* (CBF), el receptor del ácido retinoico (RAR), la proteína MLL y las proteínas HOX. Las mutaciones puntuales en los factores de transcripción, incluyendo CEBPA y PU.1, también conllevan pérdida de la diferenciación normal en la LMA. Los factores de transcripción quiméricos normalmente actúan como formas dominantes negativas de los factores originales.

Complejo CBF: el complejo CBF es un heterodímero constituido por RUNX1 (AML1, CBFA) y la proteína CBFβ que activa diferentes genes críticos para el desarrollo mieloide normal (Figura 5). In vitro, AML1 regula la expresión de receptores de factores de crecimiento, citoquinas y enzimas implicadas en la hematopoyesis (Zhang DE, Mol Cell Biol 1996). Las principales translocaciones que afectan a este complejo son la t(8;21) y la inversión del cromosoma 16, que dan lugar a los transcritos de fusión AML1-ETO (RUNX1-MTG8 / RUNX1-RUNX1T1) y CBFβ-MYH11, respectivamente. También se han detectado mutaciones puntuales en AML1 en LMA familiares y esporádicas. Estos hallazgos sugieren que la pérdida de la función de RUNX1/AML1 provoca una alteración de la diferenciación y, por tanto, favorece el desarrollo de una leucemia.

AML1-ETO: La proteína de fusión AML1-ETO inhibe de forma dominante la actividad transcripcional de AML1. AML1-ETO suprime genes que generalmente están activados por RUNX1/AML1 como c-FMS, p14 ARF o CEBPA, otro factor de transcripción imprescindible en la diferenciación granulocítica (Pabst T, Nat Med 2001). Esta supresión la realiza a través del reclutamiento de complejos correpresores (revisado en Licht JD, Hematology Am Soc Hematol Educ Book 2005).

La caracterización de AML1-ETO en diferentes líneas celulares demuestra que tiene un efecto positivo y otro negativo en la leucemogénesis. Su influencia positiva viene determinada por su habilidad de bloquear la diferenciación y expandir las *stems cells* hematopoyéticas, mientras que su efecto negativo es promover la parada del crecimiento y la apoptosis (Peterson LF, Blood 2007). Por este motivo, se considera que el evento adicional para promover la leucemogénesis asociada a AML1-ETO sea la presencia de mutaciones que neutralicen su efecto negativo sobre la proliferación y la apoptosis. Investigaciones realizadas en este ámbito demostraron que AML1-ETO induce un aumento de la expresión de p21^{waf1}, una proteína que bloquea el ciclo celular dependiente de quinasas. Si se provoca una pérdida de expresión de p21^{waf1} se induce la leucemogénesis al inhibir el efecto negativo de AML1-ETO sobre el crecimiento celular (Peterson LF, Blood 2007). Otro mecanismo descrito en estas leucemias es que AML1-ETO, a diferencia de AML1, se une de forma preferente a secuencias de ADN con el sitio consenso de AML1 duplicado. Esta regulación selectiva podría ser un mecanismo que altere la expresión génica y promueva la leucemogénesis (Okumura AJ, Blood 2008).

CBFB-MYH11: la proteína quimérica CBFB-MYH11 actúa suprimiendo de forma dominante la función de RUNX1, lo que da lugar a una alteración de la hematopoyesis normal y predispone al desarrollo de una leucemia, aunque al igual que en el caso de AML1-ETO se requiere de alteraciones genéticas adicionales para la leucemogénesis

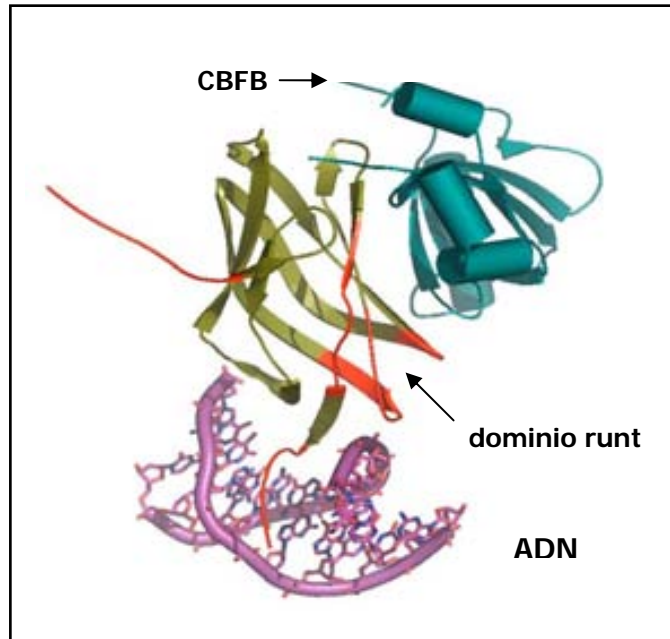


Figura 5. Complejo CBF. RUNX1 / CBF. Tubos color verde representan CBF. Flechas color verde dominio runt de RUNX1 (Figura adaptada de Gunther S, Byosystems 2006).

(Castilla LH, Nat Genet 1999). Existen diez tipos diferentes de fusiones CBF-MYH11 debido principalmente a la variación en el punto de ruptura localizado en el gen MYH11 (van Dongen JJ, Leukemia 1999). Todos menos uno, el tipo I, contienen un sitio de unión de alta afinidad para RUNX1, el HABD (RUNX1 high-affinity binding domain). El HABD se considera que es uno de los dominios más importantes para la supresión dominante de RUNX1, ya que hace posible la unión completa de CBF con RUNX1 en el caso de CBF-MYH11. Sin embargo, existen datos que sugieren que esta supresión de RUNX1 quizá no es tan crítica para la leucemogénesis. El transcrito de fusión tipo I carece del HABD y es capaz de desarrollar una leucemia rápidamente en modelos murinos, a pesar de que sólo existe una inhibición parcial de RUNX1. En estos casos se han observado otros mecanismos que pueden acelerar el desarrollo de la leucemia en ratones, como son el aumento de expresión de MN1 y la alteración de la fosforilación de RUNX1. Por tanto,

CBFB-MYH11 debe contribuir a la leucemogénesis por otros mecanismos además de la supresión de RUNX1 (Kamikubo Y, Cancer Cell 2010) como, por ejemplo, a través de la implicación de RUNX2 (Kuo YH, Blood 2009).

Leucemia promielocítica aguda (LPA): este tipo de leucemia es un claro ejemplo del bloqueo de la diferenciación en la LMA. Siempre está asociada con el reordenamiento del receptor alfa del ácido retinoico (RARA). En la mayoría de los casos de LPA se detecta la t(15;17), la cual genera la proteína de fusión PML-RARA.

RARA actúa a nivel molecular como regulador de la diferenciación mieloide. En la LPA, las células están bloqueadas en el estadio de promielocito, pero tienen capacidad de replicación. A niveles fisiológicos de ácido retinoico las proteínas de fusión que afectan a RARA provocan una activación aberrante de complejos de supresión y de histonas deacetilasas en los promotores de genes de respuesta, esto conlleva el bloqueo de la diferenciación característico de la LPA. EL ATRA y el arsénico son los tratamientos principales en LPA. A niveles terapéuticos de ácido retinoico/ATRA se produce un desplazamiento de los complejos correpresores y una alteración en el perfil de metilación que promueve la activación de la transcripción e induce la diferenciación (Grimwade D; Leukemia 2002).

- **Reordenamientos de MLL**

Los reordenamientos de MLL son otro paradigma de la alteración de la expresión génica en la LMA. MLL es una proteína activadora que puede asociarse con secuencias específicas de ADN, sobre todo con promotores del gen Hox. El reordenamiento de MLL estimula la activación de complejos MLL que inducirán la expresión de los genes Hox. La expresión de Hox se asocia con un incremento en la autorreplicación de las células hematopoyéticas. Además, los reordenamientos de MLL impiden la acetilación y la

activación de p53, un hecho que puede afectar al ciclo celular, la apoptosis y la estabilidad genómica (revisado en Licht JD, Hematology Am Soc Hematol Educ Book 2005).

3. Evasión de la apoptosis

El crecimiento de una población celular leucémica no sólo es consecuencia de su proliferación, sino también de la disminución en la muerte celular. La apoptosis es la muerte celular programada y cumple la función de controlar el tamaño de una población concreta. Las células leucémicas poseen una capacidad de resistencia intrínseca a los estímulos que desencadenan el programa celular de apoptosis.

La activación de proteínas tirosín-quinasa tiene un efecto doble: por un lado promueve la proliferación celular y, por otro, facilita la supervivencia celular mediante la activación del fosfatidilinositol 3 quinasa (PI 3-quinasa). Los fosfolípidos producidos por la PI 3-quinasa activan la quinasa AKT serina/treonina la cual fosforila BAD y libera la molécula anti-apoptótica BCL-2. En algunos casos de LMA se observa una alteración en la relación entre los niveles de moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas en las células leucémicas.

La proteína p53 está implicada en la regulación de la apoptosis y el ciclo celular. Mutaciones en p53 se asocian con peor respuesta a la quimioterapia en pacientes con LMA. La función de esta proteína está a menudo comprometida en LMA debido a que moléculas reguladoras de p53 están implicadas en la leucemogénesis. Por ejemplo, la proteína de fusión AML1-ETO suprime la expresión de p14^{ARF} y promueve la desestabilización de p53. Mediante un mecanismo alternativo, la fusión MOZ-TIF2 en LMA se une a CBP e indirectamente atenúa la actividad transcripcional de p53 (Kindle KB, Mol Cell Biol 2005).

4. Capacidad replicativa ilimitada

Las células leucémicas pierden la capacidad limitada de replicación. A diferencia de las células progenitoras normales que están comprometidas a una línea hematopoyética, las células leucémicas mantienen la capacidad de replicación a pesar de estar comprometidas a una línea celular específica. Algunas mutaciones recurrentes en la LMA confieren la propiedad de autorreplicación a las células CD34+, como es el caso de la FLT3-ITD o las mutaciones de NPM1 (Chung KY, Blood 2005; Alcalay M, Blood 2005).

El envejecimiento celular se ha asociado también con un acortamiento progresivo de la porción distal de los cromosomas, los telómeros. Los telómeros son esenciales para la estabilidad genómica ya que protegen a los cromosomas de recombinaciones y fusiones y reconocen las lesiones del ADN. Una característica común a muchos tipos de tumores es el mantenimiento de la longitud de los telómeros debido a sobreexpresión de telomerasa, o por activación de un mecanismo conocido como ALT (alternative lengthening of telomeres) que proporciona tramos de ADN por recombinación con otros fragmentos cromosómicos (Cesare AJ, Nat Rev Genet 2010). Por cualquiera de los dos mecanismos la longitud del telómero se mantiene en los límites "juveniles" impidiendo la muerte celular.

Por otro lado, el acortamiento acelerado de los telómeros es un rasgo característico de la disqueratosis congénita y también se observa en la anemia aplásica adquirida debido a mutaciones en los genes del complejo telomerasa. Ambas enfermedades tienen un elevado riesgo de desarrollar neoplasias mieloides, especialmente SMD y LMA. Recientemente, se han detectado mutaciones en el gen TERT (telomere-specific reverse transcriptase) en pacientes con LMA. Estas mutaciones provocan una disminución en la actividad de la telomerasa y, por un mecanismo que promueve la inestabilidad genómica, predispone al desarrollo de LMA. Las mutaciones en el gen TERT se han asociado a nivel citogenético con la trisomía 8 y la inversión del cromosoma 16 (Calado RT, Proc Natl Acad Sci USA 2009).

5. Pérdida de control del ciclo celular

La alteración de la regulación del control del ciclo celular, especialmente en el punto G1, es uno de los mecanismos asociados a la carcinogénesis. La progresión a cada una de las fases del ciclo está controlada por señales intracelulares. La progresión de la fase G1 a la fase S está regulada por ciclinas y ciclinas dependientes de quinasas (CDK). El principal sustrato de estas moléculas es el gen del retinoblastoma (Rb). La fosforilación de Rb por parte de estos complejos ciclinas/CDK permite la progresión del ciclo celular mediante la liberación de proteínas de la familia E2F. La supresión de esta maquinaria tiene lugar mediante los inhibidores de las CDK (CKI) como son p16INK4, p21Waf1/cip1 y p27Kip1 (Braithwaite AW, Cell Death Differ). p53 está implicada en el control del ciclo celular a nivel de G1 porque regula estas moléculas inhibidoras.

La regulación del ciclo celular puede alterarse por diferentes mecanismos en la LMA. La activación constitutiva de la vía de señalización RAS/MAP quinasa provoca la activación de factores de transcripción que inducen la expresión de ciclinas. La pérdida de actividad de p53 debida a mutaciones o por alteración en su función puede conllevar a una pérdida del control del ciclo celular en el punto G1 (Kurki S, Cancer Cell 2004). Lo mismo sucede con las mutaciones y deleciones en el gen Rb que son frecuentes en LMA y en otros tipos de tumores. Los genes de moléculas inhibidoras de CDK como p15INK4a/ARF y p16INK4b pueden ser metiladas y silenciadas en la LMA (Toyota M, Blood 2001). El agente demetilante azacitidina puede reactivar estos genes, tal y como se ha observado en pacientes con SMD tratados con agentes demetilantes (La Starza R, Genes Chromosomes Cancer 2003).

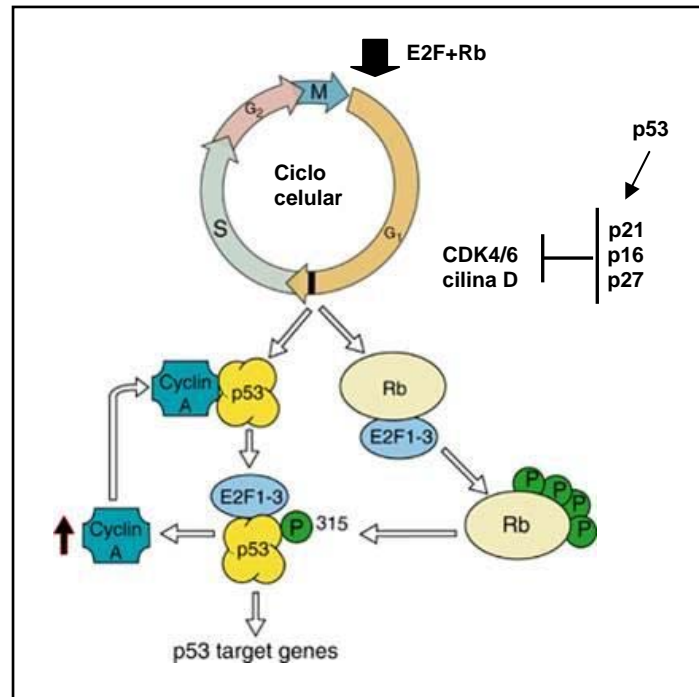


Figura 6. Control del ciclo celular a nivel p53 por miembros de la familia E2F.

La fosforilación de p53 por quinasas asociadas al ciclo celular provoca la unión de E2F1-3 con p53 desplazando su interacción con la ciclina A e induce que p53 active su transcripción. Cuando los niveles de ciclina A y otras quinasas aumentan, la unión de E2F1-3 se altera y provoca una reducción de la actividad de p53 (Figura adaptada de Braithwaite AW, Cell Death Differ 2006).

6. Diseminación de las células leucémicas

El mecanismo por el que las células leucémicas abandonan la médula ósea e invaden otros tejidos es poco conocido.

El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y su receptor (VEGFR) se han implicado en el desarrollo tumoral y en la aparición de metástasis en neoplasias sólidas debido a su actividad promotora de la angiogénesis. Los blastos leucémicos expresan diferentes factores proangiogénicos como son el VEGF y angiopoyetinas. VEGF, el factor angiogénico más importante en la LMA, actúa como un factor de crecimiento autocrino y paracrino en algunos casos de LMA que expresan el receptor VEGF-R2 (revisado en Ayala F, Leukemia 2009). Diferentes estudios clínicos sugieren el valor pronóstico de los niveles de VEGF en la LMA así como la posible participación de las moléculas proangiogénicas en

los mecanismos de resistencia a los tratamientos (Kim DH, Br J Haematol 2008; Ayala F, Leukemia 2009). Estos hallazgos tienen una importancia no sólo biológica, sino que también representan una potencial diana terapéutica que está siendo investigada (Barbarroja N, Exp Hematol 2009).

1.1.3.4. INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES (MSI) E INESTABILIDAD GENÓMICA

La inestabilidad genómica es uno de los mecanismos patogénicos relacionados con el desarrollo de neoplasias. Un tipo de inestabilidad genética es la inestabilidad cromosómica que da lugar a alteraciones en el número de cromosomas. Este es un hallazgo común en la LMA y tiene un importante papel pronóstico (Loeb LA, PNAS 2003, Grimwade D, Blood 1998).

Las alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN son otra causa común de inestabilidad genética. Los déficits en el funcionamiento del sistema MMR-DNA (mismatch repair pathway) dan lugar a una elevada tasa de mutaciones espontáneas, sobre todo en secuencias de ADN constituidas por repeticiones en tándem de oligonucleotidos (microsatélites), lo que da lugar a un fenómeno denominado inestabilidad de microsatélites (MSI) (Figura 7). Este fenómeno está muy implicado en la patogénesis de los tumores sólidos, sobre todo en cáncer de colon, gástrico y de endometrio (Perucho M, Oncogene 2003). Los tumores con MSI acumulan cientos de miles de mutaciones somáticas clonales. Muchas de estas mutaciones son irrelevantes porque afectan a regiones no codificantes del ADN, pero otras pueden afectar a regiones que codifican genes importantes. Este mecanismo, menos descrito en la LMA, se ha observado sobre todo en LMA secundarias a tratamiento quimio/radioterápico previo y en LMA en pacientes de edad avanzada (Das-Gupta EP, Br J Haematol 2001). Los transcritos de fusión observados con frecuencia en la LMA también suprimen genes relacionados con la reparación del ADN provocando una inestabilidad genómica. Entre ellos se encuentran

genes implicados en la BER (base excision repair) como ADPRTL2, FEN1, OGG1, MPG, LIG3, POLB, POLD2 y POLD3. Deleciones en la línea germinal de estos genes en modelos murinos han revelado que su ausencia es incompatible con la vida o provoca un aumento de sensibilidad a mutágenos y/o una acumulación de lesiones en el ADN. Todos estos genes están inhibidos por las proteínas de fusión observadas en la LMA excepto POLB. La sobreexpresión de POLB se asocia a un incremento de mutagénesis espontánea (Alcalay M, J Clin Invest 2003).

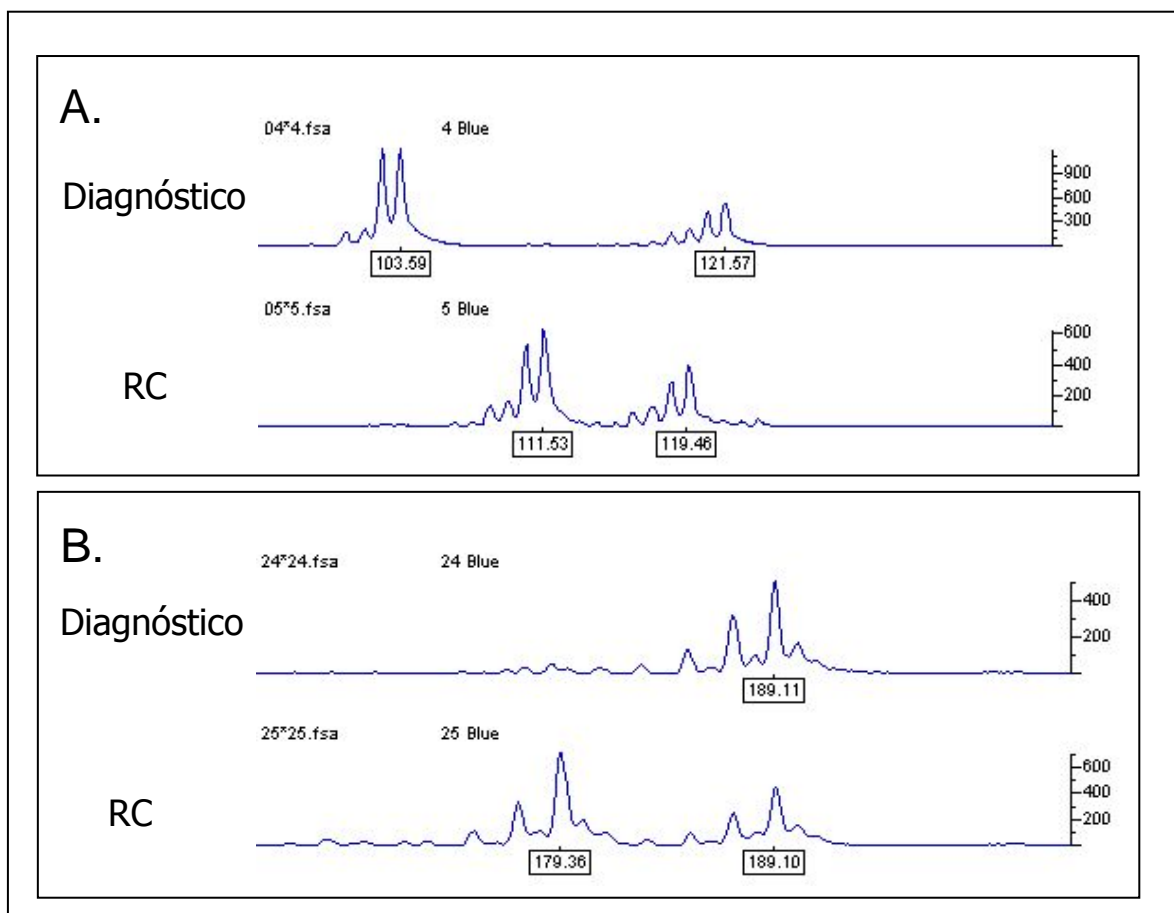


Figura 7. Inestabilidad de microsatélites en pacientes con LMA *de novo*. A. Análisis de MSI en muestras de un paciente con LMA *de novo* en las que se observa diferente longitud entre los amplímeros obtenidos al diagnóstico y en la remisión. B. Paciente con LMA *de novo* en el que se observa una pérdida alélica en la muestra del diagnóstico. MSI: inestabilidad de microsatélites; RC: remisión completa.

La hipoxia local es otro de los mecanismos relacionado con la inestabilidad genética. La proliferación celular incontrolada típica de las células tumorales comporta una situación competitiva de nutrientes que puede conllevar hipoxia (Richards B, Science 1997; Parsons R, Science 1995). La limitación al crecimiento del tumor da lugar a una respuesta adaptativa en términos de hipermutabilidad. Esta hipermutabilidad permite al tumor sortear los diferentes obstáculos, como son la restricción de nutrientes o la situación de hipoxia, y le proporciona una ventaja adaptativa. El factor inducido por la hipoxia (HIF) es la primera respuesta celular a la hipoxia (Figura 8). La isoforma HIF-2 α promueve señales autocrinas de crecimiento y de progresión del ciclo celular vía el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de mecanismos dependientes de c-Myc (Franovic A, Proc Natl Acad Sci USA 2007; Gordan JD, Cancer Cell 2007). HIF podría ser uno de los genes que contribuyen a dar una ventaja a las células tumorales. Su inhibición evita la tumorigénesis, por tanto, este mecanismo podría neutralizar la capacidad de crecimiento autónomo de los tumores y podría tener interés desde un punto de vista terapéutico (Franovic A, Proc Natl Acad Sci USA 2009).

La pérdida de heterocigosidad (LOH) da lugar a la pérdida de uno de los dos alelos en un locus concreto y esto puede ser un signo indirecto de la presencia de un gen supresor de tumores (Gorletta TA, Genes Chromosomes Cancer 2005). Las LOH pueden ser intersticiales, debidas a pequeñas deleciones de ADN, o terminales implicando a largas regiones teloméricas. La LOH terminal tiene lugar sin pérdida de material genético debido a que la pérdida de una región del cromosoma queda sustituida porque se produce una duplicación en la región correspondiente del cromosoma homólogo. Este fenómeno conocido como disomía uniparental (UPD) adquirida puede producirse por una falta de disyunción del cromosoma o por una recombinación homóloga durante la mitosis (Gorletta TA, Genes Chromosomes Cancer 2005) (Figura 9). Se han identificado UPD adquiridas en un 12-20% de LMA con citogenética normal y en un 17% de las LMA en

general (Gorletta TA, Genes Chromosomes Cancer 2005; Raghavan M, Cancer Res 2005, Serrano E, Leuk Lymph 2008; Bullinger L, Leukemia 2010). Las UPDs contribuyen a la leucemogénesis causando homocigosidad de mutaciones génicas o por duplicación de un segmento de cromosoma que incluya *imprinted genes* (Figura 9).

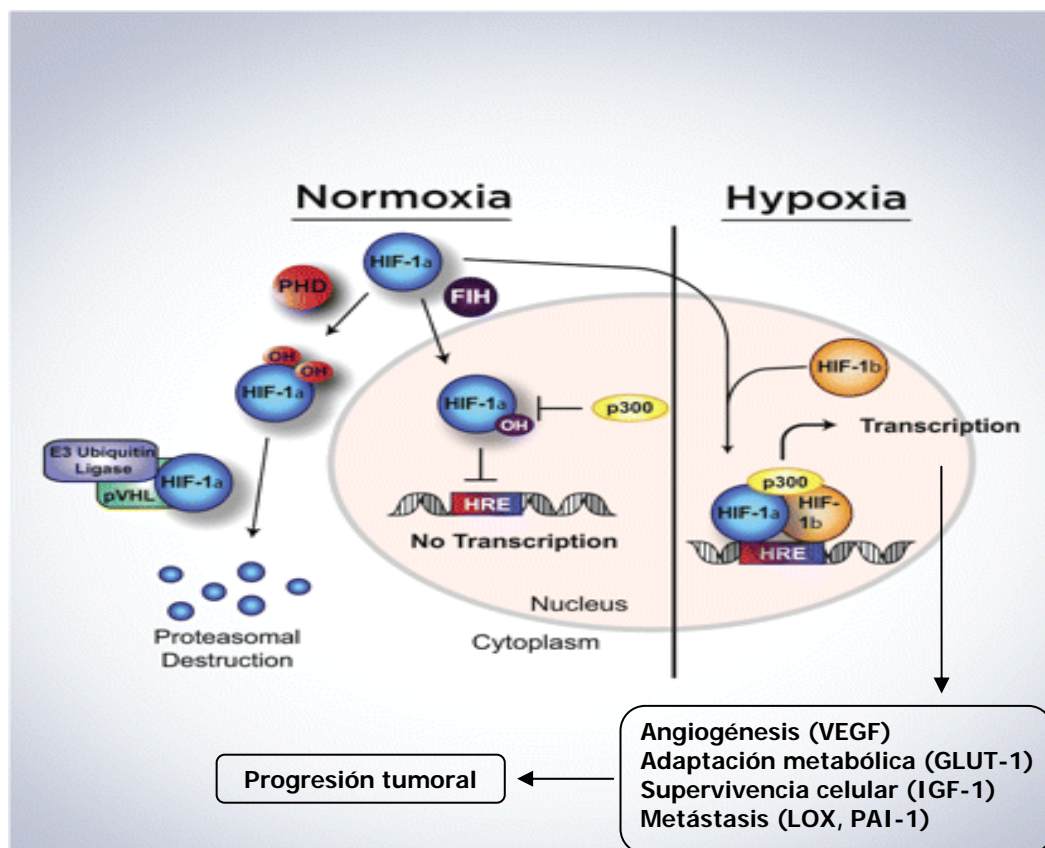


Figura 8. HIF α y tumorigénesis. En condiciones de normoxia, la subunidad α del factor inducible por la hipoxia, HIF- α , se degrada por un mecanismo dependiente de oxígeno. La hidroxilación de dos prolinas de HIF- α y de un residuo de asparraginas reducen su actividad transcripcional. En condiciones de hipoxia no se produce la hidroxilación de la subunidad α , lo que permite que el complejo de transcripción HIF activo forme elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) y se active la transcripción de genes implicados en la angiogénesis, el metabolismo, la supervivencia celular y la aparición de metástasis. PDH: prolil hidroxilasa; FIH: factor inhibidor de HIF.

Las UPDs en los cromosomas 11p, 13q y 19q se asocian con mutaciones homocigotas de WT1, FLT3-ITD y de CEBPA respectivamente, lo que indica que existe un patrón de cooperación entre las UPDs y las mutaciones (Gupta M, Genes Chromosomes Cancer

2008; Fitzgibbon J, Cancer Res 2005). Estas UPS no se distribuyen de forma aleatoria sino que los cromosomas afectados en orden de frecuencia son: 13q, 11p, 6p, 1p, 2p, 11q y 19q, y afectan preferentemente a genes que confieren una ventaja proliferativa a la clona leucémica.

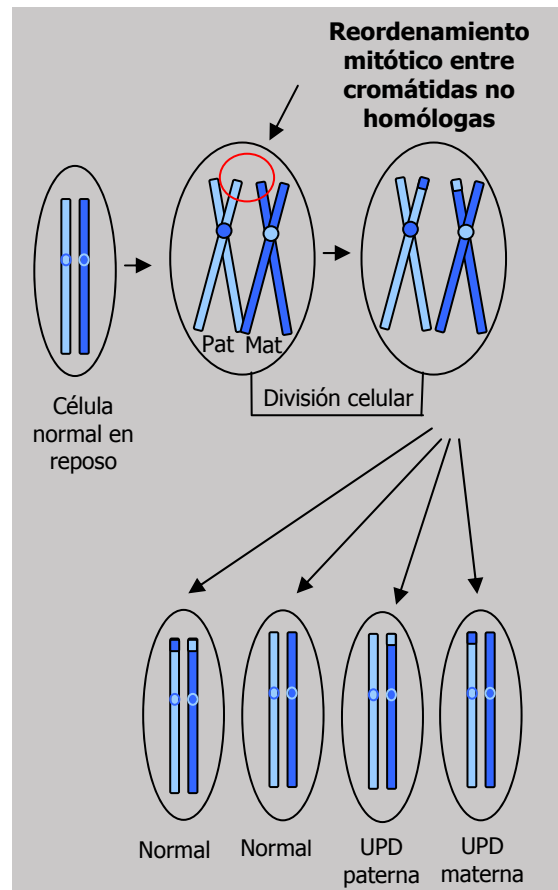


Figura 9. Disomía uniparental. En condiciones normales, el gen bialélico se expresa en ambas copias parentales. Los *imprinted genes* son heterocigotos, pero se expresa específicamente en el alelo materno y está silenciado en el paterno o viceversa. En los casos de UPD hay dos copias del alelo de uno de los progenitores y como consecuencia hay una sobreexpresión del gen y una ausencia de expresión del ARN del otro progenitor. UPD: disomía uniparental.

1.1.3.5. LEUCEMOGÉNESIS: PATOGÉNESIS SECUENCIAL

A diferencia de la LMC, hay abundantes evidencias de que son necesarias mutaciones en 2 ó más genes para causar una LMA (Kelly LM, Annu Rev Genomics Hum Genet 2002; Speck NA, Nat Rev Cancer 2002). La mayoría de los oncogenes de fusión resultantes de una translocación balanceada, como es PML-RARA o AML1-ETO, no son suficientes por sí mismos de inducir una LMA en modelos murinos.

Los oncogenes de fusión más comunes afectan a genes que codifican factores de transcripción. Estas proteínas de fusión inhiben la diferenciación de las células mieloides, a menudo interfiriendo con la función del factor de transcripción, como es el caso del complejo CBF (AML1-ETO, CBFβ-MYH11), PML-RARA y las anomalías de MLL. Por otro lado, existen otros oncogenes que tienen menos habilidad de inhibir la diferenciación, pero que provocan una alteración en la regulación del ciclo celular, en la proliferación y/o inhibición de la apoptosis. Las mutaciones en tirosín-quinasas como FLT3 o KIT o mutaciones de N-RAS o K-RAS son ejemplos de este tipo de oncogenes. Estos dos tipos de oncogenes, denominados como de clase II (cuando bloquean la diferenciación) y de clase I (cuando inducen proliferación), cooperan dando lugar al desarrollo de una LMA en modelos animales (Kelly LM, Annu Rev Genomics Hum Genet 2002). Este modelo sugiere que para el desarrollo de la LMA se requiere un oncogen de cada clase.

Por tanto, para comprender la base genética de las LMA y el impacto pronóstico de las diferentes alteraciones moleculares, es necesario analizar las diferentes anomalías genéticas de forma conjunta (Renneville A, Leukemia 2008). Se ha descrito que el 62% de las mutaciones presentes en la LMA están solapadas con otras mutaciones (Ishikawa Y, Eur J Haematol 2009) (Figura 10). Las mutaciones de AML1, FLT3-TKD, FLT3-ITD, N-RAS y NPM1 son las que con mayor frecuencia se solapan con otras mutaciones. Por el contrario, PML-RARA y AML1-ETO se asocian con otras mutaciones de forma menos habitual. La asociación observada con mayor frecuencia es la de las mutaciones de

FLT3/NPM1, seguida por FLT3/MLL-PTD, FLT3/CEBPA, FLT3/PML-RARA, KIT/AML1-ETO y mutación de p53/MLL-PTD. No se han identificado mutaciones de FLT3 y KIT en un mismo paciente. Tampoco se ha detectado asociación de PML-RARA, AML1-ETO, CBFβ-MYH11 y anomalías de MLL con mutaciones de CEBPA ni de AML1. Habitualmente suele existir la combinación de una mutación de clase I con una mutación de clase II. Se ha descrito la asociación entre mutaciones de una misma clase (generalmente suelen ser N-RAS, p53, MLL-PTD y NPM1). En estos casos se suelen identificar más de 2 mutaciones y generalmente suele coexistir una mutación de clase I y una de clase II (Ishikawa Y, Eur J Haematol 2009).

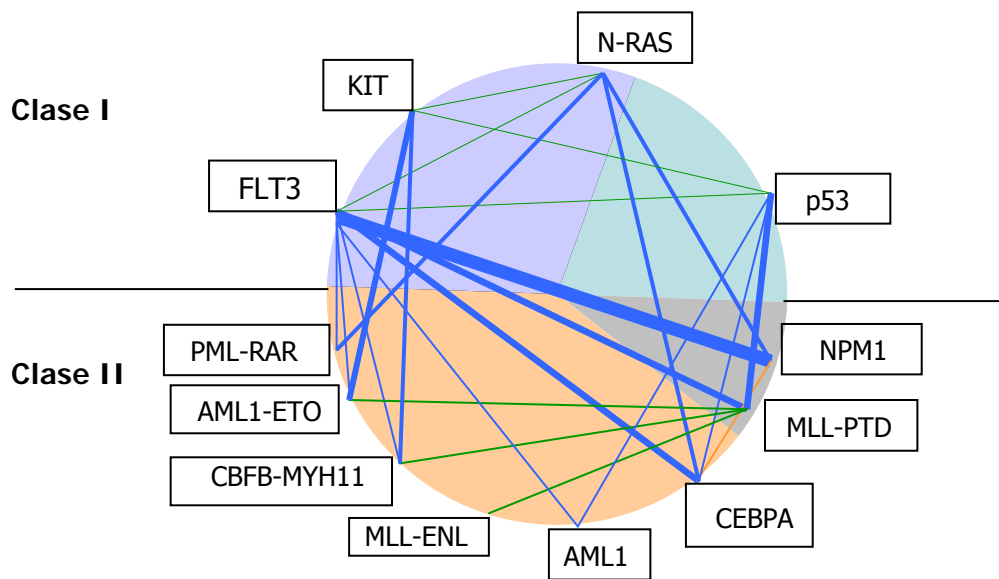


Figura 10. Modelo cooperativo de leucemogénesis. Patrón de asociación de las diferentes mutaciones. Las líneas verdes indican asociación entre mutaciones de una misma clase. El grosor de las líneas representa la prevalencia de la combinación de mutaciones (adaptada de Ishikawa Y, Eur J Haematol 2009).

1.1.4 CUADRO CLÍNICO

Los síntomas y signos que presentan los enfermos con LMA reflejan el fracaso de la hematopoyesis normal y la infiltración de los tejidos por la celularidad leucémica (Sanz MA, 2001). La mayoría de los pacientes presenta afectación del estado general. Entre el 30 y el 80% de los enfermos presenta fiebre antes o en el momento del diagnóstico y el 40% refiere manifestaciones hemorrágicas en piel y/o mucosas debido al descenso de la cifra de plaquetas o a la existencia de coagulación intravascular diseminada (CID), frecuente en la LPA. La infiltración leucémica en diferentes tejidos es responsable de algunos síntomas y signos como la hepatomegalia y/o esplenomegalia presente en una tercera parte de los pacientes. Aproximadamente en el 25% de los enfermos existen adenopatías, hipertrofia gingival o infiltración amigdalara. Estos últimos hallazgos y la presencia de infiltración cutánea (leucémides) son más frecuentes en los casos con componente monocítico. La invasión leucémica de las meninges se observa sobre todo en las LMA mielomonocítica y monocítica con hiperleucocitosis (superior a $100 \times 10^9/L$), en particular en los niños. En las formas muy leucocitósicas también es posible comprobar trastornos neurológicos, como consecuencia de la oclusión de la microcirculación cerebral por agregados de células leucémicas. Este fenómeno de "leucostasis" origina isquemia y facilita las hemorragias en el sistema nervioso central. Por último, pueden detectarse tumoraciones constituidas por blastos, que se denominan cloromas o sarcomas granulocíticos (5% de los casos). Alrededor del 30-40% de los enfermos con LMA presentan una infección en el momento del diagnóstico.

1.1.5 DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

El diagnóstico de la LMA se basa en los criterios de la nueva clasificación de la OMS que tiene en cuenta datos citológicos, citoquímicos, inmunofenotípicos y genéticos (Tabla 1). El diagnóstico inicial se realizará mediante el examen morfológico de la sangre periférica y

la médula ósea que permitirá la identificación de los blastos mieloides (Figura 11). Los criterios citológicos y citoquímicos que se utilizan para distinguir los distintos tipos de LMA los enunció el grupo cooperativo FAB en el año 1985 (Bennet JM, Ann Intern Med 1985) y, después de varias revisiones, han sido incorporados en las recientes clasificaciones de la OMS (Jaffe ES, 2001, Swerdlow SH, 2008). El porcentaje de blastos requerido para el diagnóstico de LMA ha de ser igual o superior al 20% de la celularidad de la médula ósea, excepto en el caso de las leucemias con translocaciones específicas, en las que se acepta una proporción inferior, y en la leucemia eritroide aguda que se define por la presencia de más de un 50% de precursores eritroides en la médula ósea asociada a más de un 20% de mieloblastos entre las células no eritroides.

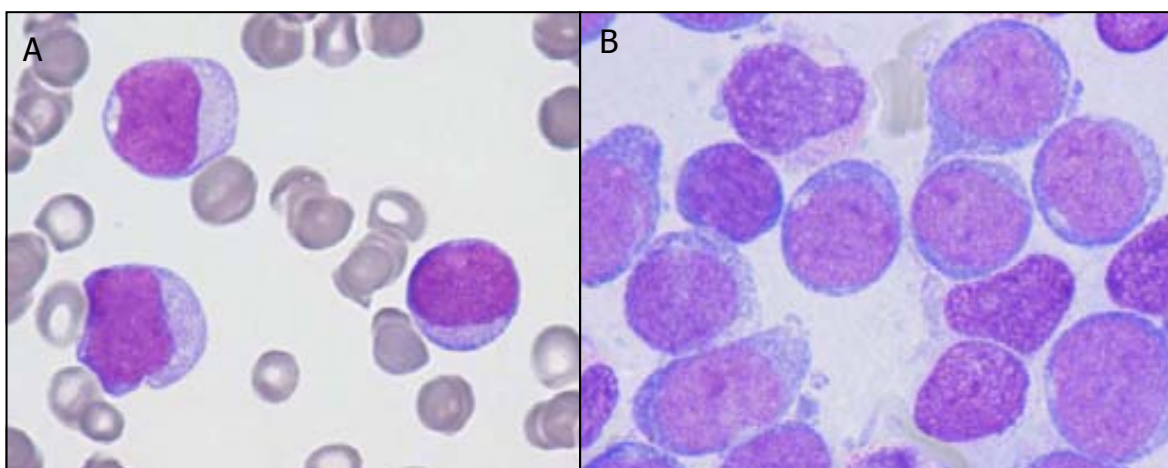


Figura 11. Imagen de blastos mieloides en sangre periférica (A) y de blastos mieloides en médula ósea (B). Són células con ratio núcleo-citoplasma elevada, núcleo redondeado de cromatina fina con pequeños nucleolos. El citoplasma es moderadamente basófilo, y en este caso no se observa granulación (Tinción May-Grümwald-Giemsa).

El estudio inmunofenotípico permite clasificar el tipo de leucemia aguda según la estirpe celular en mieloides y linfoides. Existen una serie de marcadores útiles para la asignación de línea entre los que destacan los de citoplasma CD79a, CD3 y MPO que son altamente específicos de línea linfoide B, linfoide T y mioide, respectivamente. Estos marcadores intracitoplasmáticos junto con otros de superficie permiten la aplicación de un panel útil

para la subclasificación de las leucemias agudas (Béné MC, Leukemia 1995) y para la detección de aberraciones fenotípicas que serán útiles en el seguimiento de la enfermedad residual mínima (ERM).

Tabla 1. Clasificación de la OMS de las leucemias mieloides agudas y neoplasias mieloides (2008)

LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes

LMA con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1Ta
 LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
 LPA 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)/t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
 LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
 Entidad provisional: LMA con NPM mutado
 Entidad provisional: LMA con CEBPA mutado

LMA con mielodisplasia

Neoplasias mieloides relacionadas con tratamiento quimioterápico previo

LMA sin otras especificaciones

LMA mínimamente diferenciada
 LMA sin maduración
 LMA con maduración
 LMA mielomonocítica
 LMA monocítica
 LMA eritroide
 Leucemia eritroide pura
 Eritroleucemia (mieloide/eritroide)
 LMA megacariocítica
 LMA basofílica
 Panmielosis aguda con mielofibrosis

Sarcoma mieloide

Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down

Mielopoyesis anormal transitoria
 Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down

Neoplasia de células dendríticas plasmocitoide blástico

El estudio citogenético de los blastos, además de completar la caracterización de la leucemia, se considera que es uno de los factores pronósticos más importantes en la LMA (Grimwade D, Blood 1998). Los estudios moleculares mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa reversa o el método de Southern Blot permiten detectar también alteraciones con significado pronóstico, como son los reordenamientos de genes, como, por ejemplo, el del gen MLL o la FLT3-ITD.

• ***Datos de laboratorio***

El 80% de los pacientes presenta anemia y el 60% leucocitosis. Las formas hiperleucocitósicas (con más de $100 \times 10^9/l$ leucocitos) representan entre el 5-25% del total de casos. En aproximadamente un 10% de los pacientes no se observan blastos en sangre periférica (leucemias aleucémicas). La cifra de plaquetas es normal en la quinta parte de los enfermos e inferior a $10 \times 10^9/L$ en el 20%. En los casos con CID se aprecia un descenso de la tasa de protrombina, una disminución de fibrinógeno sérico y positividad de los productos de degradación del fibrinógeno (dímeros D) (Sanz MA, 2001).

Las alteraciones bioquímicas son poco específicas siendo frecuente la elevación de la LDH como consecuencia del incremento del recambio celular. La nefropatía urémica es frecuente si no se adoptan las medidas preventivas adecuadas. En las LMA con componente monocítico se puede observar lesión tubular causada por la eliminación renal de grandes cantidades de lisozima.

El aspirado medular es hipercelular en el 80% de los casos. En ocasiones no se obtiene grumo medular debido a que la médula está empaquetada o a que existe fibrosis (habitual en la panmielosis aguda con mielofibrosis o en la leucemia aguda megacarioblástica).

1.1.6 TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Los grupos que tratan pacientes con LMA siguen diferentes protocolos terapéuticos asistenciales que, aunque pueden diferir en algunos puntos, siguen unas líneas generales comunes. El primer objetivo del tratamiento de la LMA es la obtención de la RC, es decir, la desaparición de toda evidencia clínica-citológica de la enfermedad. Una vez obtenida la RC se aplican tratamientos destinados a evitar las recaídas leucémicas. Estos tratamientos incluyen la administración de quimioterapia o la práctica de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

En el tratamiento de la LMA se debe diferenciar a los pacientes según la edad, superior o inferior a 60 años, y también se debe individualizar el tratamiento en función de factores pronósticos como son la citogenética y las alteraciones moleculares. El esquema terapéutico utilizado en las LPA incluye ATRA, y por ser diferente al tratamiento utilizado en el resto de las LMA, se ha excluido del esquema de tratamiento general que sigue a continuación.

- **Tratamiento de inducción**

Según las últimas recomendaciones publicadas (Döhner H, Blood 2010) en los pacientes menores de 60 años la combinación de tres días de antraciclina y 7 días de citarabina sigue siendo el estándar del tratamiento de inducción. Con este régimen se alcanzan tasas de RC del 60-80% en pacientes jóvenes. Otro tipo de tratamientos no han demostrado ser mejores.

Los pacientes mayores de 60 años presentan una mayor mortalidad precoz relacionada con el tratamiento y una mayor tasa de refractariedad. En los pacientes menores de 75 años se puede realizar un tratamiento de inducción similar al de los pacientes jóvenes, ajustando las dosis si se considera necesario. Las tasas de RC en este grupo de pacientes

son aproximadamente del 50% y la mortalidad durante la inducción, del 15% (Estey E, J Clin Oncol 2007).

- **Tratamiento post-remisión**

En los pacientes menores de 60 años que alcanzan RC existen diferentes estrategias terapéuticas post-remisión que incluyen:

- Citarabina a altas dosis: el estudio realizado por el CALGB, demostró que 4 ciclos de citarabina a dosis altas (3g/m²/12 horas) eran superiores a las dosis intermedias (400 mg/m²) o a las dosis estándares (100 mg/m²) (Mayers RJ, N Eng J Med 1994). Los pacientes que se benefician de este tratamiento son lo que padecen una LMA con t(8;21)/inv(16) o pacientes con citogenética normal sin mutaciones de FLT3 y con mutación de NPM1 o CEBPA (Döhner H, Blood 2010).

- TPH autólogo: se considera una opción terapéutica en pacientes con citogenética de buen pronóstico o pronóstico intermedio, pero no en pacientes con citogenética de mal pronóstico. La evolución tras trasplante autólogo es similar a la observada con el uso de quimioterapia post-remisión y no se ha observado que mejore la supervivencia. El trasplante autólogo puede ofrecer algunas ventajas en algunos subtipos de LMA, como las asociadas a citogenética normal y MLL-PTD (Whitman SP, Blood 2007).

- TPH alogénico: es la estrategia terapéutica asociada a menor riesgo de recaída. El beneficio del trasplante alogénico es atribuible en parte a la quimioterapia de acondicionamiento y en parte al potente efecto injerto contra leucemia. Sus beneficios se ven limitados por la elevada mortalidad relacionada con el procedimiento. En un metaanálisis de los protocolos clínicos que asignaban de forma prospectiva trasplante alogénico versus otras terapias de consolidación alternativa en primera RC en base a la intención de tratamiento donante vs no donante, se observó que el trasplante alogénico ofrecía un beneficio significativo en términos de SG en pacientes con LMA de riesgo

intermedio y alto (Cornelissen JJ, Blood 2007; Koreth J, JAMA 2009). Actualmente se considera que el trasplante alogénico es el tratamiento de elección en pacientes con citogenética de mal pronóstico en primera RC. Asimismo, los pacientes con citogenética normal con alteraciones moleculares de mal pronóstico, como la FLT3-ITD, también se pueden beneficiar de esta alternativa terapéutica (Döhner H, Blood 2010).

En cuanto al tratamiento post-remisión en pacientes mayores no existen unas recomendaciones claras. Esto es debido en parte, a que de la pequeña proporción de pacientes mayores en RC que llegan a randomizarse, la mayoría tienen alteraciones citogenéticas favorables o de riesgo intermedio y suelen ser pacientes sin comorbilidades. En general, se considera que en pacientes sin alteraciones citogenéticas de mal pronóstico, con estado general conservado y sin comorbilidades significativas, la inducción estándar seguida de varios ciclos de tratamiento con dosis moderadas de una antraciclina y citarabina puede ser una opción terapéutica adecuada (Juliussen G, Blood 2009).

En trasplante alogénico no mieloablativo o de intensidad reducida ha permitido disminuir la MRT en pacientes mayores y ha mejorado la probabilidad de supervivencia. Ésta es una opción terapéutica en algunos pacientes mayores de 60 años, siempre que se realicen dentro de protocolos clínicos (Döhner H, Blood 2010).

1.2 FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La identificación de diferentes factores de riesgo en la LMA ha permitido ajustar e individualizar la intensidad de los tratamientos, lo cual se ha traducido en un aumento de la SG de los enfermos. Los principales factores pronósticos pueden dividirse entre los relacionados con características del paciente y los relacionados con características biológicas de la leucemia (Tabla 2). En la actualidad la citogenética en el momento del diagnóstico de la LMA constituye el factor pronóstico más importante para predecir la evolución clínica de los pacientes. En los últimos años la identificación de diferentes alteraciones moleculares están permitiendo refinar el pronóstico de determinados grupos de LMA. Los datos inmunofenotípicos obtenidos por citometría de flujo también son de utilidad pronóstica, especialmente durante el seguimiento de los pacientes mediante la determinación de la ERM.

Los principales factores clínicos que influyen en el tratamiento de la LMA son la edad, la cifra de leucocitos al diagnóstico y el que se trate de una leucemia aguda *de novo* o secundaria. La edad superior a 60-65 años es un factor independiente de mal pronóstico (Döhner H, Blood 2010). Los pacientes jóvenes tienen más probabilidades de alcanzar la RC que los de edad avanzada, sobre todo porque la mortalidad en inducción y durante el tratamiento post-remisión es menor. Además, la edad avanzada se asocia de forma más frecuente a cariotipos complejos y a mayor resistencia a la quimioterapia. Los enfermos con leucemia aguda secundaria a tratamiento quimio-radioterápico previo o tras mielodisplasia presentan con frecuencia leucemia resistente y los períodos de citopenia post-tratamiento son prolongados, lo que favorece las complicaciones infecciosas graves. El mal pronóstico de las LMA secundarias viene dado en muchos casos por su asociación a citogenéticas de mal pronóstico, en particular anomalías de los cromosomas 5 y 7 en pacientes previamente tratados con alquilantes, y deleciones del brazo largo del cromosoma 11 en pacientes tratados con inhibidores de la topoisomerasa II.

Tabla 2. Factores pronósticos en la leucemia mieloide aguda

Favorable	Desfavorable
<p><i>Factores clínicos</i> LMA <i>de novo</i> Niños y adultos jóvenes Cifra de leucocitos normal</p> <p><i>Clasificación FAB</i> LMA promielocítica, LMA con eosinofilia</p> <p><i>Citogenética</i> t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16) (incluso con alteraciones adicionales)</p> <p><i>Molecular</i> Mutaciones NPM1 Mutaciones CEBPA</p> <p><i>Respuesta al tratamiento</i> RC tras un ciclo de QT</p> <p>≤20% blastos en MO tras 1 ciclo de QT</p> <p>RC inmunofenotípica tras QT</p>	<p><i>Factores clínicos</i> LMA secundaria Adultos de edad avanzada (>60 años) Leucocitosis intensa (>50-100x10⁹/L)</p> <p><i>Clasificación FAB</i> LMA indiferenciada, monocítica, eritroide, megacarioblástica</p> <p><i>Citogenética</i> Alt 3q, -5 o 5q-, -7, alt 11q23[#], alt múltiples*</p> <p><i>Molecular</i> Mutaciones FLT3 (FLT3-ITD) Reordenamientos MLL</p> <p><i>Respuesta al tratamiento</i> RC con ≥2 ciclos de QT</p> <p>>20% blastos en MO tras 1 ciclo de QT</p> <p>Persistencia de ERM por inmunofenotipo tras la inducción y/o consolidación</p>

Abreviaturas: alt, alteraciones; ERM, enfermedad residual mínima; MO, médula ósea; QT, quimioterapia; RC, remisión completa; [#]la t(9;11) que afecta al 11q23 tiene pronóstico intermedio; *≥4 alteraciones (según la última actualización del grupo MRC (Grimwade D, Blood 2010))

Los subtipos morfológicos M6 y M7 también se consideran de peor pronóstico probablemente por su asociación más frecuente a citogenéticas desfavorables.

Una cifra de leucocitos elevada se asocia a menor frecuencia de RC y sobre todo a recaídas de la enfermedad. En el caso de las LMA de buen pronóstico, especialmente en las asociadas a la t(8;21) se ha descrito la utilidad del índice leucocitario. El índice leucocitario es el producto de la cifra de leucocitos en sangre periférica por la ratio de blastos en médula ósea (índice leucocitario = cifra leucocitos sangre periférica x [%

blastos médula ósea/100]). Un índice leucocitario superior a 20 identifica a pacientes con peor pronóstico (menor duración de la RC, menor SLE y menor SG) (Nguyen S, Blood 2002).

La facilidad en la obtención de la RC es también un factor pronóstico relevante. Estudios de diferentes grupos evidenciaron que el precisar 2 ó más ciclos de tratamiento de inducción se asociaba a una elevada frecuencia de recidivas. El grupo MRC observó que los enfermos que después del primer ciclo tenían más de un 20% de blastos en médula ósea presentaban una mayor tasa de recaídas leucémicas (Wheatley K, Br J Haematol 1999).

Una variable que recientemente se ha relacionado con la evolución de la LMA es el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad y el inicio del tratamiento. Una demora en el inicio de tratamiento, sobre todo a partir de los 5 días, en pacientes con LMA y edad <60 años se asocia con una menor probabilidad de alcanzar RC y menor SG. El pronóstico de los pacientes >60 años no se vio alterado por esta variable (Sekeres MA, Blood 2009).

1.3. CITOMETRÍA DE FLUJO: APORTACIÓN AL DIAGNÓSTICO, SEGUIMIENTO Y AL PRONÓSTICO DE LA LMA

Los avances que se han producido en los últimos años en el conocimiento de la etiopatogenia y fisiopatología de la LMA han sido posible en parte al desarrollo concomitante de nuevos métodos de análisis celular. Entre estos métodos destaca la citometría de flujo por la relevancia que esta técnica ha adquirido, tanto en el área de investigación como en la del diagnóstico clínico. La citometría de flujo permite analizar de forma simultánea diversas características celulares, lo que proporciona información de un gran número de parámetros de cada una de las células.

El análisis inmunofenotípico es actualmente un complemento imprescindible de la morfología y la citoquímica, y junto con la citogenética y la biología molecular constituye una de las técnicas de elección para la correcta caracterización de las leucemias agudas.

1.3.1 GENERALIDADES DEL CITÓMETRO DE FLUJO

La citometría de flujo representa un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión. El principio en el que se basa es hacer pasar dichas partículas alineadas y de una en una por un haz luminoso. La interacción de las células o las partículas con el rayo genera señales que son recogidas por los detectores adecuados. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en las células. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que procesa el ordenador para poder ser analizadas posteriormente.

1.3.2. APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La citometría de flujo permite, mediante las combinaciones de diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos celulares, identificar poblaciones celulares específicas. En el ámbito clínico, esta aplicación ha contribuido de manera importante al diagnóstico y clasificación fenotípica de la leucemia, ha aportado información pronóstica y más recientemente se ha empezado a utilizar en el seguimiento de los enfermos en RC.

1.3.2.1. UTILIDAD DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA LMA

Desde el punto de vista del diagnóstico el análisis del inmunofenotipo leucémico es útil para confirmar la estirpe mieloide de la proliferación, para distinguir los casos de LMA con

diferenciación mínima de las leucemias agudas linfoides, y para diagnosticar la leucemia megacarioblástica aguda. El estudio de los marcadores inmunológicos también permite diferenciar la LMA de las leucemias bifenotípicas o de fenotipo mixto, cuyos blastos coexpresan marcadores mieloides y linfoides.

El European Group for Immunophenotyping of Leukemia (EGIL) formuló las directrices para una correcta evaluación inmunofenotípica de las leucemias agudas (Béné MC, Leukemia 1995). Se deben analizar antígenos de citoplasma y nucleares, incluidos CD3, CD79a, mieloperoxidasa y TdT. Han de incluirse en los paneles utilizados reactivos que reconozcan antígenos asociados a línea mieloide, eritroide y megacariocítica, así como marcadores no específicos de línea asociados a inmadurez. El European Leukemia Net ha realizado recientemente una revisión de las recomendaciones para la correcta caracterización inmunofenotípica de las LMA y las leucemias agudas de fenotipo mixto (Tabla 3) (Döhner H, Blood 2010).

Tabla 3. Panel de antígenos de superficie y citoplasma recomendado para el diagnóstico de LMA y LAFM (Döhner H, Blood 2010)

Expresión de antígenos	
Diagnóstico de LMA Marcadores de inmadurez Marcadores granulocíticos Marcadores monocíticos Marcadores megacariocíticos Marcadores eritroides	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, MPO Esterasas no específicas (ENE), CD11c, CD14, CD64, lisozima, CD4, CD11b, CD36, NG2 CD41, CD61, CD42 CD235a (glicoforina A)
Diagnóstico LAFM Línea mieloide Línea B Línea T	MPO o evidencia de diferenciación monocítica (al menos dos de los siguientes: ENE, CD11c, CD14, CD64, lisozima) CD19 (fuerte) más expresión de 1 de los siguientes marcadores: CD79a, CD22c, CD10, o CD19 (débil) con al menos 2 de los siguientes: CD79a, CD22c, CD10 CD3c o CD3 de superficie

LMA: leucemia mieloide aguda; LAFM: leucemia aguda de fenotipo mixto

1.3.2.2. LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN REMISIÓN COMPLETA: ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA

Un paciente con leucemia aguda tiene al diagnóstico aproximadamente 10^{12} células malignas (Ryan DH, Kluwer Academic 1988). Se considera que el enfermo está en RC cuando morfológicamente se detectan menos de un 5% de blastos en médula ósea (Cheson J, J Clin Oncol 2003; Döhner H, Blood 2010). Sin embargo, muchos de estos pacientes considerados en RC mediante los métodos convencionales recaen. Detectar el nivel de células leucémicas que persiste en un enfermo en RC y su valor pronóstico ha sido el objeto de múltiples estudios. El objetivo del estudio de la ERM es conocer la cantidad total de células leucémicas que permanecen en el enfermo en RC para identificar a aquellos con alta probabilidad de recaer y por tanto subsidiarios de intensificar el tratamiento.

Las células leucémicas pueden distinguirse de los progenitores hematopoyéticos normales en base a sus características morfológicas y histoquímicas, por la presencia de alteraciones genéticas y por su inmunofenotipo.

La citometría de flujo, junto con las técnicas moleculares, es actualmente uno de los métodos más utilizados en el estudio de ERM en los pacientes con leucemia aguda. La citometría de flujo es un método rápido y sensible (10^{-3} - 10^{-5}) a la vez que de fácil aplicación, lo que hace que sea ampliamente utilizado para la investigación de células leucémicas residuales. Respecto a otras técnicas moleculares como la PCR, la reproducibilidad de la citometría de flujo en el seguimiento de la ERM es menor. Numerosos estudios han demostrado la utilidad de esta técnica en la detección de ERM y por tanto en la predicción de recaídas en enfermos con leucemia aguda.

Existen tres criterios fundamentales en el estudio de la ERM mediante citometría de flujo que son:

1. La detección de fenotipos aberrantes existentes al diagnóstico

2. La detección de fenotipos ectópicos
3. La alteración del cociente mieloide/linfoide de las células CD34+.

1. Detección de fenotipos aberrantes

Para poder estudiar la ERM mediante citometría de flujo es imprescindible la existencia en el momento del diagnóstico de fenotipos aberrantes en las células leucémicas que se puedan seguir durante la remisión. Según diferentes estudios, se considera que el 80% de las LLA de fenotipo B y el 75% de las LMA presentan al menos un fenotipo aberrante al diagnóstico (Campana D, Cytometry 1999). Algunos autores utilizando múltiples combinaciones de 5 anticuerpos monoclonales han llegado a identificar hasta un 94% de fenotipos aberrantes al diagnóstico (Al-Mawali A, Am J Clin Pathol 2008). Una de las principales dificultades de esta metodología es la correcta distinción entre células leucémicas y progenitores hematopoyéticos normales. Los estudios paralelos realizados con médulas óseas normales y de pacientes con leucemia aguda han permitido identificar la existencia de múltiples fenotipos aberrantes (fenotipos leucémicos o "asociados a leucemia") que se detectan únicamente en las células blásticas o bien están escasamente representados en la diferenciación hematopoyética normal (Lucio P, Leukemia 1999; Macedo A, Leukemia 1995). Basándose en estos estudios se consideran cuatro tipos de fenotipos aberrantes:

- A. Infidelidad en la expresión de antígenos de línea: expresión en las células leucémicas de antígenos que en la médula ósea normal están presentes en células de otra estirpe, ej: expresión de antígenos linfoides en los mieloblastos de una LMA. Greaves y col. han sugerido que la infidelidad de línea sería debida a la conservación anómala en las células leucémicas de la promiscuidad genética propia de los progenitores totipotenciales (Greaves MF, Blood 1986). En la LMA la coexpresión de antígenos linfoides (CD2, CD7, CD19, entre los más frecuentes) en

los blastos mieloides es aproximadamente del 30% (San Miguel J, Blood 1997; Macedo A, Ann Hematol 1995) (Figura 12).

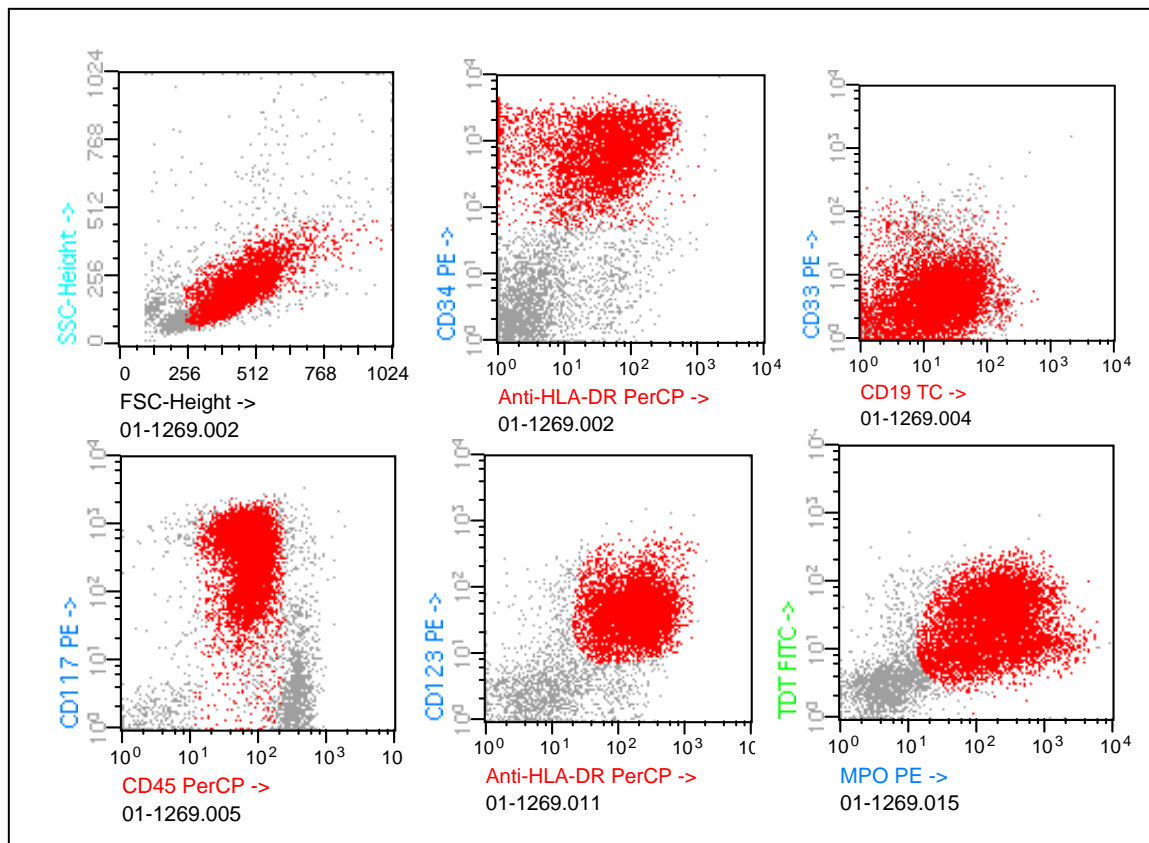


Figura 12. Estudio inmunofenotípico al diagnóstico de un paciente con una LMA con t(8;21). Destaca la sobreexpresión de CD34 y CD117 junto a una pérdida de expresión de CD33. También se observa una expresión aberrante de CD19 y TdT en la población blástica.

B. Asincronismo madurativo: es la expresión en una célula leucémica de dos antígenos que en la diferenciación hematopoyética normal pertenecen a dos etapas diferentes. Un ejemplo es la coexpresión del antígeno CD34 (inmadurez) junto con antígenos propios de un monocito maduro como el CD64 o el CD14 (Macedo A, Ann Hematol 1995) (Figura 13). El asincronismo madurativo es el fenotipo aberrante detectado con mayor frecuencia en las LMA, oscilando entre el 75 y el 85% (Macedo A, Ann Hematol 1995; San Miguel JF, Blood 1997). La alta incidencia de asincronismo madurativo que presentan las leucemias agudas es una

demostración de que uno de los eventos más importantes en la leucemogénesis es la alteración en la diferenciación normal de los progenitores hematopoyéticos.

- C. Alteración en la intensidad de la expresión de antígenos: detección de antígenos en las células leucémicas que se expresan también en las células normales pero con una intensidad diferente. Algunos ejemplos son el aumento de expresión del CD34 en casos de LLA y LMA (Macedo A, Ann Hematol 1995) o la pérdida de expresión de CD13 o de CD33 (Figuras 12, 13).

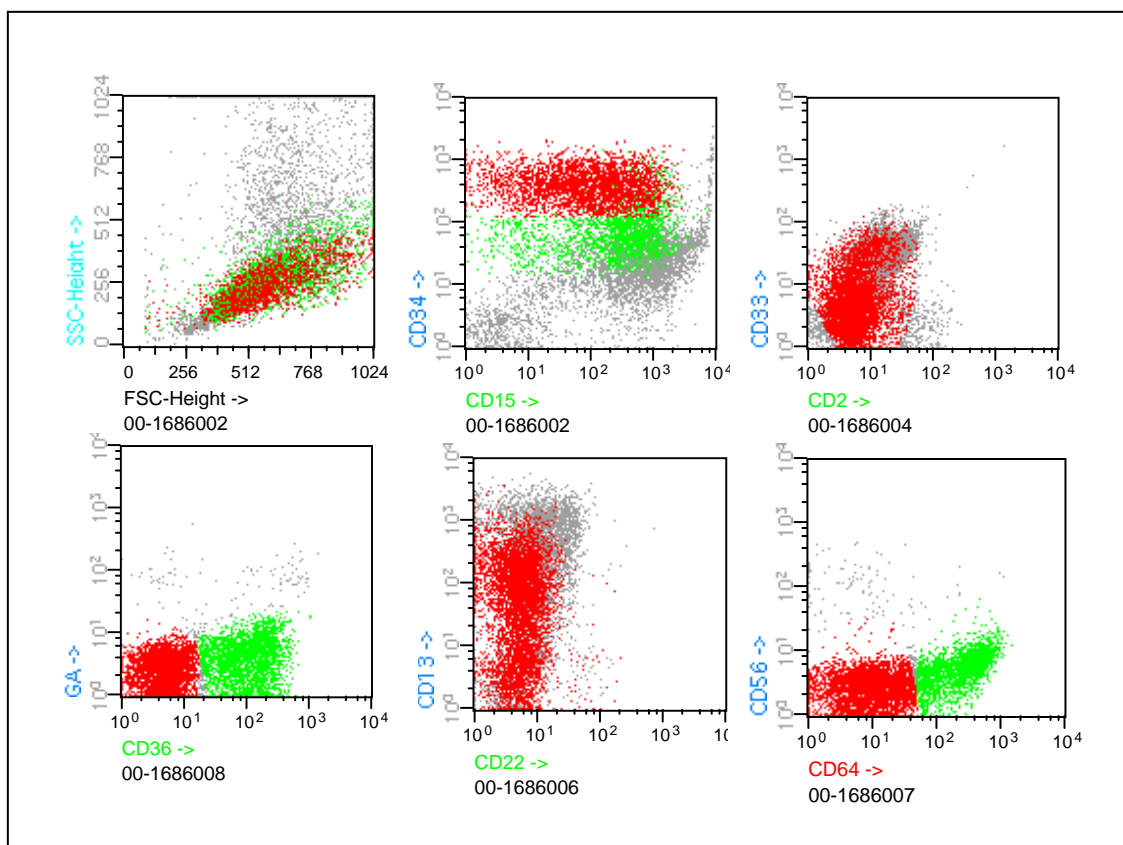


Figura 13. Estudio inmunofenotípico al diagnóstico de un paciente con una LMA asociada a la inv(16). Se observa una población leucémica heterogénea. Existe una población más inmadura (población roja) y otra más madura con diferenciación monocítica (población verde) que coexpresa el marcador de inmadurez CD34 (asincronismo madurativo). También se detecta la pérdida de expresión del marcador mielóide CD33.

D. Patrón aberrante de dispersión de la luz: consiste en que la célula leucémica presenta un patrón de FSC y SSC que no es el habitual. Generalmente se asocia a expresión antigénica también aberrante. Algunos ejemplos son la expresión de CD13 o CD33 con menor FSC/SSC en la LMA (San Miguel, JF, Blood 1997).

Para identificar correctamente la población blástica una de las estrategias recomendadas es utilizar en un primer paso la expresión de CD45/SSC de los blastos. En un segundo paso utilizar la expresión de CD34 y/o CD117. Siempre que sea posible, se debería utilizar CD45/CD117/CD34 en combinación con diferentes marcadores linfoides y mieloides para aumentar la sensibilidad de detección de fenotipos aberrantes. Los marcadores más útiles en el seguimiento de ERM son aquellos que con menor frecuencia se detectan en la médula ósea normal. Se ha descrito que CD2, CD56, CD7, CD11b y CD19 son los marcadores con mayor potencial para el seguimiento de la ERM (Al-Mawali A, Am J Clin Pathol 2009).

Se ha objetivado que en la mayoría de LLA el fenotipo es estable en la recaída, mientras que en la LMA el fenotipo inicial y el observado en la recaída son con frecuencia diferentes. Baer y col. analizaron las pérdidas o ganancias de poblaciones leucémicas (cambios de población) o cambios de expresión antigénica en las células blásticas (cambios antigénicos) en muestras de pacientes con LMA en recaída. Se objetivó un cambio inmunofenotípico en el 91% de los casos. Los cambios de población se observaron en el 31% de los pacientes y los cambios antigénicos en el 82%. En la recaída se observa una mayor expresión de CD2, CD34 y CD7 y menor expresión de CD14 (Baer MR, Blood 2001). A pesar de estos cambios, la utilización de un amplio panel de combinaciones antigénicas al diagnóstico permitirá identificar las células leucémicas en la recaída. Esta alta frecuencia de cambios inmunofenotípicos en la LMA contrasta con los hallazgos encontrados en la LLA. Los cambios inmunofenotípicos son menos frecuentes y

generalmente consisten en variaciones menores de la expresión antigénica (Czuczman MS, Blood 1999).

2. Fenotipos ectópicos

Consiste en la presencia de células, aunque sea en un número pequeño, con un fenotipo normal pero que están restringidas específicamente a otra localización. Por ejemplo, la detección de células TdT positivas en líquido cefalorraquídeo de pacientes con LLA (Campana D, Blood 1995).

3. Alteración del cociente mieloide/linfoide de las células CD34+

Martínez y col. analizaron la composición normal del compartimento más inmaduro de la médula ósea en pacientes con LMA en RC. La detección de una desviación en la vía de maduración normal refleja la presencia de una hematopoyesis anormal que podría dar lugar a una recaída. La recaída en los pacientes con LMA se ve precedida comúnmente por anomalías en el patrón de crecimiento de las colonias GM-CSF. En la médula ósea normal el cociente de células CD34+ mieloide/linfoide (M/L) es habitualmente inferior a 10. Según este estudio la persistencia de un cociente M/L >10 podría asociarse con una peor evolución de la enfermedad (Martínez A, Cytometry 1999).

1.3.3. VALOR PRONÓSTICO DE LOS PERFILES INMUNOFENOTÍPICOS DETECTADOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

El valor diagnóstico de la caracterización inmunofenotípica en la LMA está claramente consolidado; sin embargo, el valor pronóstico del inmunofenotipo en la LMA del adulto todavía está sujeto a discusión, sin que hasta ahora exista una resolución definitiva. Muchos de los estudios que han encontrado una asociación positiva entre la expresión de un determinado marcador y el pronóstico han sido realizados con grupos pequeños de

pacientes en una única institución, y sólo unos pocos de estos resultados se han reproducido en series largas y multiinstitucionales. Además, la comparación de resultados es difícil debido a las diferencias metodológicas en la detección de la expresión antigénica y por las diferencias entre las poblaciones estudiadas y los esquemas de tratamiento utilizados. La mayoría de anticuerpos que de manera rutinaria se utilizan en pacientes con LMA han sido asociados con el pronóstico.

1.3.3.1. SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES MIELOIDES

Entre los antígenos mieloides que se han relacionado con el pronóstico de la LMA, destacan el CD13, CD15 y el CD14 (Tabla 4). CD13 se expresa en la mayoría de las células blásticas de la LMA (85%). El porcentaje de expresión de CD13 es un factor predictivo para alcanzar RC (Schwarzinger I, J Clin Oncol 1990, Campana D, Cytometry 1999; San Miguel JF, Leukemia 1989; Griffin JD, Blood 1986). Más recientemente Repp R y col. describieron la asociación entre la expresión de CD13 y una menor SG (Repp R, Cytometry 2003). CD14 se expresa especialmente en las células blásticas de LMA con diferenciación monocítica y su expresión se ha correlacionado con una menor probabilidad de RC (Bradstock K, Blood 1994) y una menor supervivencia (Solary E, Leukemia 1992). Por el contrario, la expresión de CD15 se ha asociado a mayor tasa de RC (Schwarzinger I, J Clin Oncol 1990, Campos L, Br J Haematol 1989; Tien HF, Cancer Gen Cytogen 1995), y a una mayor supervivencia (Derolf AR, Leuk Lymph 2008).

Otro marcador con impacto negativo sobre el pronóstico de la LMA es el CD11b. Es un antígeno expresado sobre todo en leucemias con diferenciación monocítica y que se ha asociado con menor tasa de RC tras quimioterapia de inducción (Tien HF, Cancer Genet Cytogen 1995; Paietta E, Br J Haematol 1998) y con una menor SG (Bradstock K, Blood 1994). Más recientemente se ha asociado la expresión de CD11b con la presencia de citogenética de mal pronóstico y con LMA secundarias (Graf M, Am J Hematol 2006).

Tabla 4. Significado pronóstico de los marcadores mieloides en la LMA

Antígeno	Características	Expresión normal	Referencia	Pronóstico
CD13	Metaloproteasa de membrana que degrada péptidos reguladores	Progenitores granulopoyéticos y monocíticos / células maduras de ambas series	Legrand y col. Griffin y col. Schwarzinger y col. Repp y col.	Ninguno <RC <RC <RC / <SG
CD14	Receptor de endotoxinas	Monocitos/ macrófagos Débil en granulocitos	Bradstock y col. Solary y col. San Miguel y col. Schwarzinger y col. Griffin y col.	<RC < supervivencia Peor evolución Ninguno Ninguno
CD15	Glicoproteína de membrana. Ligando de las selectinas P y E	Línea monocítica / Débil línea granulocítica	Tien y col. Campos y col. Schwarzinger y col.	>RC >RC >RC
CD11b	Molécula de adhesión B ₂ integrina	Monocitos/ macrófagos Células NK Débil en granulócitos	Tien y col. Bradstock y col. Tucker y col. Paietta y col.	<RC <SG <supervivencia >RC

RC: remisión completa; SG: supervivencia global

CD33 es un marcador mieloides expresado en la mayoría de LMA (97%) que no se ha relacionado con el pronóstico de la enfermedad en ninguno de los estudios realizados, al menos como marcador único. Pero en combinación con la expresión de CD15 y, de acuerdo con el patrón de maduración normal de las células mieloides, se han identificado 5 grupos inmunológicos con una SLE y una SG significativamente diferentes (Derolf AR, Leuk Lymph 2008). Estos patrones reflejan la biología de las células leucémicas y es más útil que la expresión de cada antígeno por separado.

Este no es el único ejemplo de combinaciones antigénicas y de construcción de scores pronósticos. Casasnovas y col. realizaron una clasificación de la LMA basada en siete antígenos. En este estudio la SG fue menor para los pacientes que expresaban

marcadores panmieloides (CD33, CD13) y CD7 (Casasnovas RO, Leukemia 2003). Otra propuesta de score es de Legrand y col., los cuales no demostraron valor pronóstico de ningún antígeno por separado, pero observaron que la coexpresión de marcadores mieloides (MPO, CD13, CD33, CD65 y CD117) se asociaba a una mejor evolución de la enfermedad (Legrand O, Blood 2000). Este fenotipo panmieloide fue analizado posteriormente por otro grupo que describió su asociación con edad más joven, con menor cifra de leucocitos y LDH al diagnóstico, y con citogenéticas de buen pronóstico (Mason KD, Blood Rev 2006).

Dentro de los marcadores de línea mieloide, hay que destacar la importancia de CD33 desde un punto de vista terapéutico. Gemtuzumab ozogamicina (GO) es un conjugado de una anticuerpo anti-CD33 y una toxina con actividad antineoplásica (calicamicina). GO se une a las células leucémicas que expresan CD33. Tras la unión, la toxina es internalizada en la célula y provoca la muerte celular (Sievers EL, J Clin Oncol 2001). Se han realizado múltiples ensayos clínicos en diferentes grupos de pacientes con resultados satisfactorios (Larson RA, Cancer 2005, Löwenberg B, Blood 2010).

1.3.3.2. SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES DE INMADUREZ

Los marcadores de inmadurez que más ampliamente se han estudiado en cuanto a su significado pronóstico son CD34 y HLA-DR. La expresión de CD34 se observa en poco más de la mitad de las LMA y se ha relacionado con una menor tasa de RC en más de un estudio (Tabla 5). Chang y col. describieron que la positividad de CD34 era predictiva de una menor respuesta a la quimioterapia. Sin embargo, cuando HLA-DR se incluía en el análisis estadístico, la expresión de CD34 perdía su significación y el fenotipo CD34+/HLA-DR+ adquiría un mayor significado pronóstico (Chang H, Leuk Res 2004). El significado pronóstico desfavorable de la coexpresión de CD34 y HLA-DR se ha confirmado recientemente (Webber BA, Int J Clin Exp Pathol 2008).

En el caso de estos antígenos, su negatividad también ha sido motivo de diferentes estudios. La falta de expresión de estos marcadores se ha asociado a subtipos concretos de LMA (Tabla 6). El patrón fenotípico de la LPA se caracteriza por la falta de expresión de estos dos marcadores junto con la positividad de CD13 (heterogéneo) y CD33 (homogéneo) (Orfao A, Haematologica 1999). Aún así existen hasta un 20-30% de LPA que expresan CD34. Estas LPA CD34+ se asocian con mayor frecuencia a morfología variante, a la isoforma corta del transcrito (bcr3) y a la coexpresión de CD2 (Albano F, Haematologica 2006).

Dentro del grupo de LMA HLA-DR negativas, además de la LPA, se incluyen las LMA asociadas a determinadas alteraciones moleculares como son la FLT3-ITD y sobre todo a las mutaciones de NPM1. En estos casos también es frecuente la negatividad de CD34. No se han descrito casos HLA-DR negativos en las LMA asociadas a t(8;21) ni inv(16)/t(16;16) (Tabla 6) (Muñoz L, Haematologica 2003; Mori Y, Eur J Haematol 2007; Oelschlaegel U, Cytometry 2009).

Tabla 5. Significado pronóstico de los marcadores de inmadurez en la LMA

Antígeno	Expresión normal	Referencia	Pronóstico	Comentario
CD34	Progenitores hematopoyéticos mieloides y linfoides	Chang y col. Solary y col. Geller y col. Bradstock y col. Repp y col.	<RC <RC <RC Ninguno <RC	Uni-/multivariado
HLA-DR	Células presentadoras de antígeno: linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células T activadas	Callea y col. Chang y col. Tien y col. Bradstock y col. Webber y col.	<RC <RC <RC Ninguna >RR	Incluye LPA Sólo si coexpresión CD34+ Población china Multivariado Sólo si coexpresión CD34+

RC: remisión completa; RR; riesgo de recaída

CD117 es un receptor tirosín-quinasa (KIT) que actúa como receptor para el factor de crecimiento SCF (SCF-R). La expresión de CD117 es frecuente en la LMA pero no existen estudios consistentes que relacionen CD117 con el pronóstico de este tipo de leucemia.

- **CD123**

CD123 es el receptor de la cadena alfa de la IL-3. Es un marcador de célula progenitora leucémica en la LMA (Jordan CT, Leukemia 2000). Se trata de una glicoproteína reguladora con acción sobre la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las células progenitoras hacia las diferentes líneas hematológicas. Se ha descrito expresión de CD123 en el 93% de las LMA, incluidos todos los subtipos morfológicos de la FAB, excepto el subtipo M7. Se expresa en toda la población blástica con un patrón homogéneo. También se observa expresión de CD123 en las LLA-B pero no en las LLA de línea T. La relevancia de este marcador es que dada la elevada frecuencia de expresión de CD123 en los blastos mieloides, a diferencia de los precursores mieloides normales, puede ser utilizado en el seguimiento de la ERM en las leucemias agudas (Muñoz L, Haematologica 2001).

Además, en la actualidad se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas que tienen como diana a CD123. Hasta ahora se han descrito diferentes formatos de moléculas recombinantes inductoras de la muerte celular, incluyendo fusiones de IL-3 con versiones truncadas de la toxina diftérica y de la exotoxina A de *Pseudomonas* (Frankel AE, Protein Engineering 2000; Du X, J Immunother 2007). Se están investigando nuevas proteínas recombinantes con actividad biológica que provoquen la lisis de las células de la LMA a través de CD123 (Stein C, Br J Haematol 2010). Otra estrategia terapéutica es la utilización de alquifosfocolinas. Las alquifosfocolinas se unen a la membrana celular y afectan diferentes vías de señales de transducción consiguiendo una acción antitumoral. La erucilfosfocolina, a través de un mecanismo dependiente de JNK y proteínas

fosfatasa 2A (PP2A), induce de forma significativa la apoptosis en el compartimento de células leucémicas más inmaduras (CD34⁺/CD38^{+/-}CD123⁺) (Martelli AM, Leukemia 2010).

1.3.3.3. SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES DE LÍNEA LINFOIDE

La expresión de antígenos linfoides en los mieloblastos de pacientes con LMA ha sido motivo de diferentes investigaciones. En algunos estudios esta expresión aberrante se ha asociado a un pronóstico desfavorable (Cross AH, Blood 1988) y en otros se han asociado a una evolución más favorable (Ball ED, Blood 1991). En parte esta mejor evolución se puede explicar a la mayor expresión de antígenos linfoides en LMA asociadas a citogenética de buen pronóstico, como es el CD2 en LPA y LMA con inv(16)/t(16/16) y la expresión de CD19 en LMA con t(8;21) (Tabla 7) (Ferrara F, Br J Haematol 1998; Hrušák O, Leukemia 2002).

- **CD2**

CD2 es una glicoproteína que media en la adhesión celular y juega un papel importante en la activación de señales fundamentales en el desarrollo de la célula T. Se ha descrito la expresión de CD2 en un 6-21% de LMA.

La expresión de CD2 se ha observado en un 23-38% de LPA (Guglielmi C, Br J Haematol 1998; Lin P, Am J Clin Pathol 2004; Albano F, Haematologica 2006). Aunque en algún estudio se ha relacionado con una menor duración de la RC (Lin P, Am J Clin Pathol 2004) en otros no parece influir en el pronóstico (Albano F, Haematologica 2006) (Tabla 6). Lo que sí parece confirmarse es que la expresión de CD2 se asocia a la morfología M3 variante, con la expresión de CD34, a una mayor cifra de leucocitos al diagnóstico y a la forma corta del transcrito PML-RARA (bcr3) (Claxton DF, Blood 1992; Biondi A, Leukemia 1995; Lin P, Am J Clin Pathol 2004; Albano F, Haematologica 2006).

Tabla 6. Correlación entre perfiles inmunofenotípicos y alteraciones moleculares

Alteración citogenética / molecular	Fenotipo	Referencias
t(15;17)/PML-RARA	CD34-/HLA-DR-/CD13+ homogéneo/CD33+ heterogéneo CD15+ (expresión variable) CD2+ (23-38%) / CD56+ (15-22%)	Orfao y col. Haematologica 1999 Albano y col. Haematologica 2006 Di Bona y col. Haematologica 2002
t(8;21)/AML1-ETO	CD34+/CD15+/MPO+/ CD13++/CD33+ CD19+ (50-80%) / CD56+ (60%)	Hrušák y col. Leukemia 2002 Baer y col. Blood 1997 Ferrara y col. Br J Haematol 1998
inv(16)/t(16;16)/CBFB-MYH11	Población inmadura: CD34+/CD117+ junto con población madura granulocítica: CD65+/CD15+ y monocítica: CD14+/CD11b+, CD36+/CD64+ CD2+ (40%) en población madura e inmadura	Hrušák y col. Leukemia 2002 Adriaansen y col. Blood 1993 Xu y col. Leukemia 2006
Reordenamientos MLL	Diferenciación monocítica: CD4+/CD14+/CD11b+ Coexpresión CD36/CD64 t(9;11): NG2/ HLA-DR+/CD33+/CD65+/CD4-	Hrušák y col. Leukemia 2002 Muñoz y col. Leukemia 2003 Xu y col. Leukemia 2006
FLT3-ITD	CD34-/HLA-DR+ (11%: CD34-/HLA-DR-) CD36+/CD64+/CD11b+/ CD13+/CD33+/CD15+ CD7+ (73% en algunas series)	Muñoz y col. Haematologica 2003 Syampurnawati y col. Leuk Res 2007 Rausei-Mills y col. Am J Clin Pathol 2008
NPM1	CD34-/HLA-DR-/CD133-/MPO++/CD33++ Expresión infrecuente de otros antígenos mielomonocíticos CD64 + débil/ CD117+ débil CD38+ /CD56+ (50%) Expresión débil de CD11b/CD9	Syampurnawati y col. Leuk Res 2008 Kern y col. Leukemia 2009 Nomdedéu y col. Leuk Res 2011
CEBPA	CD34+/HLA-DR+/CD7+/CD15+ (73%) CD33+/CD13+/CD14-	Lin y col. Clin Cancer Res 2005
Inv(3)/t(3;3)/RPN1-EVI1	CD34+/HLA-DR+/CD117+/CD33+/CD13+ (80%) CD11c+/CD7+/CD56+ (35-50%) CD2+ (14%) / CD61 (5%) Monosomía 7: MPO+/CD7+/CD56-	Medeiros y col. Leuk Res 2010

Asimismo también se ha descrito la asociación entre las LMA con inv(16) y la expresión de CD2. Se ha sugerido que la alta expresión de CD2 en estas leucemias estimulan la proliferación de las células leucémicas (Adriaansen HJ, Blood 1993). La expresión de CD2 en este tipo de leucemias no conlleva un pronóstico diferente.

Por el contrario, en las LMA no M3 que no presentan la inv(16) la expresión de CD2 se asocia a una menor tasa de RC (Bradstock K, Blood 1994). Se ha observado que estas LMA suelen corresponder a leucemias más inmaduras y más indiferenciadas (Adriaansen HJ, Blood 1993).

Tabla 7. Significado pronóstico de la expresión de antígenos linfoides en la LMA

Antígeno	Expresión normal	Expresión LMA	Referencia	Pronóstico
CD2	Timocitos, células T maduras y en células NK	6-21% (frecuente en LPA y LMA con inv(16))	Guglielmi y col. Bradstock y col. Legrand y col. Lin y col.	>RC / >SLE (LPA) <RC Ninguno <RC (LPA)
CD7	Timocitos, células T, células NK Pequeño grupo de monocitos/macrófagos	30%	Kita y col. Venditti y col. Casasnovas y col. Legrand y col. Chang y col.	<RC / <SG <RC / <SG <RC / <SG Ninguno Ninguno

RC: remisión completa; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global

- **CD7**

CD7 es una glicoproteína de superficie celular cuya expresión es frecuente en las células blásticas de leucemias agudas linfoblástica de línea T, mientras que en la LMA sólo se encuentra expresado en una minoría de casos (30%) (Legrand O, Blood 2000; Chang H, Leuk Res 2004; Satoh C, Leuk Res 2009).

Diferentes grupos han propuesto que las LMA CD7+ corresponderían a una entidad clínica diferente. Suelen ser LMA con morfología mieloide más indiferenciada (M1 FAB) en las que normalmente los reordenamientos de los receptores B y T suelen ser negativos. Esto, junto con la frecuente coexpresión de los marcadores de inmadurez CD34, TdT y HLA-DR, sugiere que estas LMA derivan de un progenitor mieloide en las fases iniciales de la maduración (Eto T, Br J Haematol 1992; Tien H, Br J Haematol 1996).

La expresión de CD7 se ha relacionado con las LMA secundarias y SMD, que generalmente se asocian a alteraciones cromosómicas de mal pronóstico (Ogata K, Blood 2002). La coexpresión de CD7+/TdT+ se ha observado en LMA con alteraciones de los cromosomas 5 y/o 7 y con un fenotipo de resistencia múltiple a fármacos (Venditti A, Leukemia 1998). En un estudio realizado con líneas celulares se observó que la población CD34+/CD7+ presentaba una mayor actividad proliferativa, un ciclo celular más activo, y menos apoptosis. Estos hallazgos explican en parte la agresividad de los SMD y LMA secundarias CD7+ (Sato C, Leuk Res 2009).

Se ha descrito la asociación entre la expresión aberrante de CD7 y determinadas anomalías moleculares frecuentes en pacientes con LMA y citogenética normal, como son la FLT3-ITD (Rausei-Mills V, Am J Clin Pathol 2008; Chauhan PS, Med Oncol 2010) y las mutaciones de CEBPA (Tabla 6). En la FLT3-ITD se ha reportado positividad para CD7 hasta en un 73% de los casos (Rausei-Mills V, Am J Clin Pathol 2008). La mayoría de los pacientes con mutaciones de CEBPA presentan un inmunofenotipo caracterizado por la expresión aberrante de CD7 (73% de los casos) junto con la coexpresión de CD15, CD34 y HLA-DR (Lin LI, Clin Cancer Res 2005; Wouters BJ, Blood 2007). Existe una relación inversa entre la pérdida de función de CEBPA y la expresión de CD7. En un estudio reciente se ha demostrado que la regulación de la expresión de CD7 depende de un mecanismo epigenético tanto en las células linfoides T como en las células de la LMA. Se

ha sugerido que las mutaciones de CEBPA, por algún mecanismo aún no conocido, podrían alterar esta regulación de CD7 (Röhrs S, J Hematol Oncol 2010).

1.3.3.4. OTROS MARCADORES CON SIGNIFICADO PRONÓSTICO EN LA LMA

- **TdT**

La TdT interacciona con el núcleo de los progenitores linfoides B y T normales y con sus equivalentes neoplásicos. La TdT es positiva en aproximadamente el 18% de los pacientes con LMA.

No existen hallazgos consistentes sobre la relación entre la positividad de TdT y el pronóstico (Casasnovas RO, Leukemia 1998; Legrand O, Blood 2000; Chang H, Leuk Res 2004) (Tabla 8). Venditti y col. demostraron que la expresión de TdT puede ser predictiva de mayor supervivencia y de mayor probabilidad de alcanzar RC y que la coexpresión de TdT y CD7 identificaba un subtipo de LMA con mal pronóstico (Venditti A, Leukemia 1998). También se ha descrito la asociación de TdT positiva y LMA con inv(16) (Adriaansen HJ, Blood 1993).

- **CD56**

El CD56 es una glicoproteína de la superficie celular, la cual ha sido identificada como una isoforma del N-CAM, molécula de adhesión de la célula neuronal. Normalmente se expresa en las células NK, en un subgrupo de células T CD4 positivas y de células T CD8+. Su expresión en los mieloblastos se observa en un 16-24% (Di Bona E, Haematologica 2002).

La asociación entre la expresión de CD56 y las LMA con citogenética favorable, como la t(8;21), ha sido descrita por varios autores (Yang DH, Am J Hematol 2007, Muñoz L, Haematologica 2001 (2), Baer MR, Blood 2007). Entre un 55 y un 65% de las LMA con t(8;21) presentan positividad de CD56 y esta positividad se ha correlacionado en algunos

estudios con una menor SLE, incluso tras trasplante alogénico (Yang DH, Am J Hematol 2007, Baer MR, Blood 1997). La expresión de CD56 en las LMA con t(15;17) se observa en un 15-22% de los casos (Ferrara F, J Clin Oncol 2000; Di Bona E, Haematologica 2002) y se ha asociado a una menor duración de la remisión (Ferrara F, J Clin Oncol 2000; Ito S, Leuk Lymph 2004, Di Bona E, Haematologica 2002), a una menor SG (Ferrara F, J Clin Oncol 2000) y a una mayor frecuencia de recaídas extramedulares (Ito S, Leuk Lymph 2004) (Tabla 8). En un estudio reciente en el que se incluyeron un gran número de pacientes con LPA tratados de forma homogénea con ATRA-idarrubicina, la expresión de CD56 fue un factor pronóstico independiente para predecir recaída (Montesinos P, Blood 2011).

Tabla 8. Otros marcadores con significado pronóstico en la LMA

Antígeno	Expresión LMA	Referencia	Pronóstico	Comentario
TdT	18%	Venditti y col.	<RC / <SG	Asociado con fenotipo MRD y citogenética de mal pronóstico
		Legrand y col. Chang y col.	Ninguno Ninguno	
CD56	16 - 24%	Raspadori y col.	<RC / <SG	Asociado a citogenética de mal pronóstico
		Chang y col. Legrand y col. Di Bona y col.	<SG Ninguno <SLE	
		Ito y col. Ferrara y col.	<RC / <SLE (LPA) >RR (LPA) <SG (LPA)	Univariado Sólo en LPA Univariado Uni-/multivariado
		Baer y col. Yang y col.	<SLE / <SG <SLE / <SG	M2 con t(8;21) t(8;21)

RC: remisión completa; SG: supervivencia global; SLE; supervivencia libre de enfermedad; RR: riesgo de recaída; MDR: multidrug resistant.

Existen limitadas evidencias que sugieren que CD56 se asocia con infiltración leucémica extramedular también en LMA no M3 (Iiluz Y, Leuk Res 1992). En series más grandes de pacientes no se ha confirmado que la expresión de CD56 se correlacione con el cariotipo, con el inmunofenotipo ni con la infiltración leucémica extramedular (Seymour JF, Leukemia 1994). No obstante, la positividad de CD56 es frecuente en los sarcomas granulocíticos, especialmente cuando los blastos medulares tienen diferenciación monocítica (Chang CC, Am J Clin Path 2000).

En el grupo de LMA que no se asocian a las anomalías citogenéticas de buen pronóstico, el valor pronóstico de CD56 es controvertido, debido en parte a la heterogeneidad de los tratamientos reportados en los diferentes estudios. Raspadori y col. demostraron una reducción en la tasa de RC y en la SG en los pacientes con LMA CD56+ así como una asociación con cariotipos de mal pronóstico (Raspadori D, Leukemia 2001). En otros estudios, se ha confirmado este peor pronóstico de CD56 (Chang H, Leuk Res 2004 (2)) mientras que en otros sólo se objetivó este peor pronóstico en el subgrupo de LPA (Di Bona E, Haematologica 2002).

1.3.4. VALOR PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA DETECTADA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES EN REMISIÓN COMPLETA

Las células leucémicas que persisten de forma indetectable por los métodos morfológicos convencionales tras el tratamiento quimioterápico son las responsables de la recaída en los pacientes con LMA. Existe menos información sobre ERM en LMA que en LLA, y aunque muchos de los estudios están basados en series pequeñas de pacientes, la presencia de ERM tras el tratamiento quimioterápico se ha asociado con un alto riesgo de recaída en la mayoría de estudios realizados. Los estudios reportados se basan en la identificación de los fenotipos aberrantes asociados a las células leucémicas al diagnóstico

para posteriormente realizar un análisis secuencial del número de células leucémicas que persisten durante el seguimiento (Figura 14). En los primeros estudios realizados se objetivó que la recaída fue precedida por un aumento gradual de las células con fenotipo aberrante (Adriaasen HJ, *Leukemia* 1993; Campana D, *Blood* 1990). En estudios posteriores se intentó definir un valor crítico de ERM que identificase grupos de pacientes con diferente evolución, así como en qué punto del seguimiento la determinación de la ERM era más predictiva de recaída (Tabla 9). Algunos autores destacan la importancia de medir la ERM al inicio del tratamiento (San Miguel JF, *Blood* 2001; Kern W, *Haematologica* 2004; Al-Mawali A, *Cytometry* 2009), mientras que otros describen que la determinación de ERM en un momento más tardío de la evolución fue más informativa en comparación con los iniciales (Venditti A, *Blood* 2000; Buccisano F, *Leukemia* 2006; Maurillo L, *J Clin Oncol* 2008). También se ha descrito que la detección de ERM puede influir en el pronóstico tanto en estadios iniciales como tardíos (San Miguel JF, *Blood* 1997; Kern W, *Blood* 2004; Feller N, *Leukemia* 2004; Sievers EL, *Blood* 2003). San Miguel y col. demostraron que los pacientes con $>0,5\%$ de células leucémicas residuales tras el tratamiento de inducción y con $>0,2\%$ al final del tratamiento de consolidación presentaban una menor SLR (San Miguel JF, *Blood* 1997). Puesto que la respuesta inicial al tratamiento quimioterápico es uno de los factores pronósticos más importantes en la LMA, este mismo grupo analizó la ERM en muestras de pacientes post-inducción y estratificó a los pacientes en 4 grupos con una probabilidad de recaída significativamente diferente en función del porcentaje de ERM detectada (San Miguel JF, *Blood* 2001). La rapidez del aclaramiento de las células leucémicas también se ha relacionado con el pronóstico. Kern W y col. analizaron la ERM el día 16 del tratamiento de inducción y observaron que el grado de reducción de células con fenotipo aberrante entre el día 16 y el día del diagnóstico (diferencia logarítmica) se asoció, en el estudio multivariado, con la tasa de RC, la EFS y la SLR (Kern W, *Haematologica* 2004; Kern W, *Blood* 2004). El

interés de identificar de forma precoz a los pacientes de alto riesgo es el poder ajustar la intensidad del tratamiento lo antes posible.

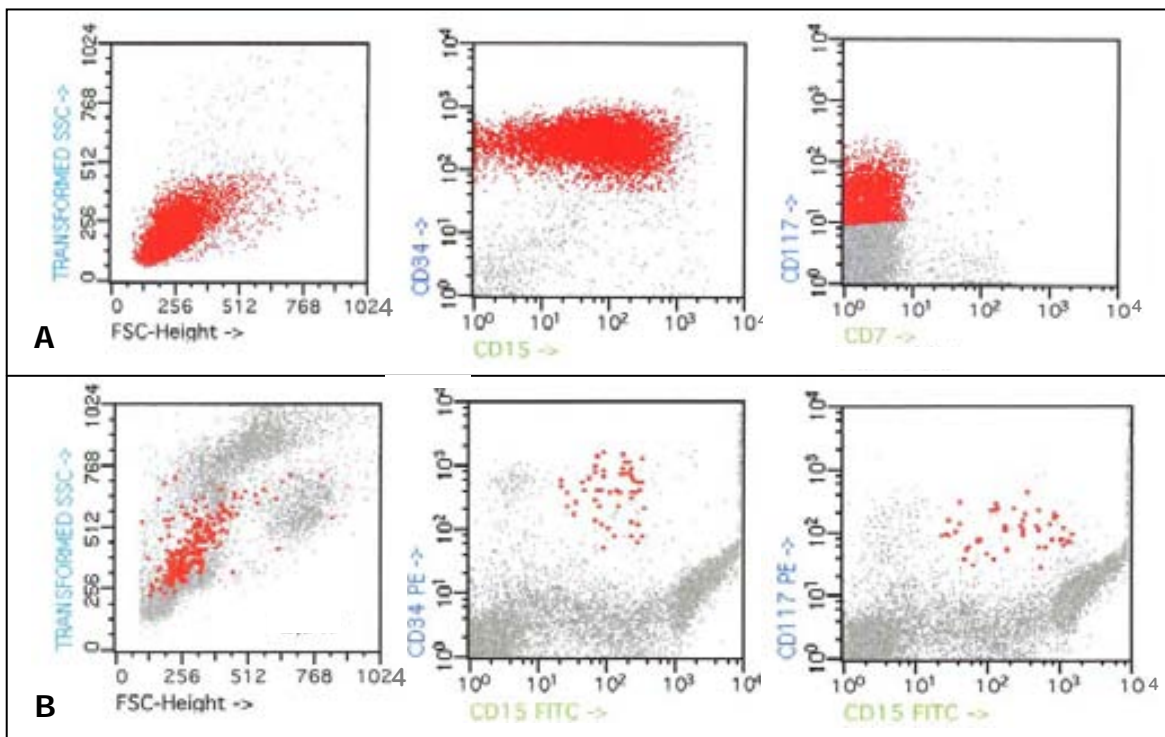


Figura 14. Seguimiento de la ERM mediante citometría de flujo en un paciente con LMA *de novo*. A. Diagnóstico: blastos con coexpresión aberrante de CD34 y CD15. B. Post-intensificación: persistencia de una población blástica que coexpresa CD34, CD15 y CD117 (0,2%).

Otros autores han descrito que es al final del tratamiento el momento en que la ERM predice de forma más adecuada el riesgo de recaída del paciente (Venditti A, Blood 2000; Buccisano F, Leukemia 2006). Estos autores observaron que algunos pacientes con ERM positiva tras la inducción, cambiaban de estatus al final de la consolidación y no se detectaba ERM. Lo más importante es que este hecho no tenía repercusión sobre la SLR de estos pacientes que se comportaban igual que aquéllos con ERM negativa en las dos determinaciones. Por este motivo consideran que es necesario completar el tratamiento quimioterápico de primera línea antes de clasificar a un paciente en un grupo de alto riesgo.

La identificación de ERM tras la consolidación también tiene valor pronóstico en la evolución post-trasplante. Los pacientes trasplantados con ERM negativa tras la consolidación tuvieron una mejor evolución que los pacientes con ERM positiva, independientemente del tipo de trasplante realizado. Además, el trasplante autólogo no mejoró el pronóstico de estos pacientes con ERM positiva, por lo que se considera que el trasplante alogénico es la opción terapéutica de elección en estos casos (Maurillo L, J Clin Oncol 2008; Laane E, Haematologica 2006).

En algunos estudios se ha analizado la utilización de sangre periférica para realizar el seguimiento de la ERM. Los resultados preliminares sugieren que existe una elevada concordancia con los resultados obtenidos en médula ósea y que aportan información pronóstica cuando la ERM persiste al final de la consolidación (Maurillo L, Haematologica 2007).

Como ya se ha mencionado, la estrategia de monitorizar la ERM basada en la detección de fenotipos aberrantes puede utilizarse en el 70-80% de los casos de LMA. En el resto de casos se pueden aplicar otro tipo de estudios, como sería la investigación de los progenitores mieloides y linfoides. Martínez y col. analizaron la distribución de las células progenitoras CD34+ mieloides y linfoides en el seguimiento de muestras de médula ósea de con LMA en RC. Pacientes con ratio CD34 M/L ≥ 10 al final de la presentaron una menor SG y una menor SLE (7 meses vs 30 meses, $p=0,0001$). Un 67% de las recaídas estuvieron precedidas por la reaparición de una ratio anormal. En las fases iniciales de la quimioterapia se observa con frecuencia un desequilibrio de la ratio de CD34 a favor de un mayor número de precursores mieloides pero este desequilibrio normalmente vuelve a la normalidad al final de la quimioterapia. La persistencia de este desequilibrio al final del tratamiento es lo que se asoció a menor SG y SLE (Martínez A, Cytometry 1999).

Tabla 9. Estudios que han analizado el significado pronóstico de la ERM en el seguimiento de la LMA utilizando citometría de flujo

Autor	Revista / Año	Nº casos	Monoclonales/ tubo	Control	Valor crítico (%)	Correlación con pronóstico (univariado)	Correlación con pronóstico (multivariado)
San Miguel	Blood 1997	53	3	I, C	I: 0,5 C: 0,2	I: SLR C: SLR, SG	I: SLR C: SLR
Venditti	Blood 2000	56	3	I,C	I: 0,045 C: 0,035	I: - C: SLR, SG	I: - C: SLR, SG
San Miguel	Blood 2001	126	3	I	BR: >0,01 RI: 0,1-0,01 AR: 1-0,1 MAR: >1	SLR, SG	SLR
Venditti	Leukemia 2003	31	3	Pre-Auto	0,035	RR	RR
Sievers	Blood 2003	252 (niños)	3	I, C	I: 0,5 C: 0,5	I: RR C: SG, RR	I: RR, SG C: RR, SG
Kern	Haematol. 2004	106	3	Día 16	Variable continua	RC, SLE, SLR, SG	RC, SLE, SLR
Kern	Blood 2004	62	3	I, C	Percentil 75 de la diferencia log.	I: SLR C: SLR, SG	I: SLR C: SLR
Feller	Leukemia 2004	75	4	1º, 2º, 3º	1º: ≥ 1 2º: 0,14 3º: 0,13	1º: RR, SG 2º: SLR, SG 3º: SLR, SG	No datos
Buccisano	Leukemia 2006	100	3	I, C	I: 0,035 C: 0,035	I: RR, SLR, SG C: RR, SLR, SG	I: - C: RR, SLR, SG
Al-Mawall	Cytometry 2009	54	5	I, C	I: 0,15 C: 0,15	I: SLR, SG C: SLR	I: RR, SLR, SG C: -

I: post-inducción; C: post-consolidación; BJ: bajo riesgo; RI: riesgo intermedio; AR: alto riesgo; MAR: muy alto riesgo; SLR: supervivencia libre de recaída; SG: supervivencia global; RR: riesgo de recaída; SLE: supervivencia libre de enfermedad.

1.4. CITOGENÉTICA: UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Actualmente las alteraciones citogenéticas detectadas en el momento del diagnóstico de la LMA constituyen el factor pronóstico más importante para predecir la evolución de la leucemia.

En las LMA *de novo*, utilizando los métodos de bandeado estándares, se detecta alguna anomalía citogenética en el 40-50% de los pacientes. A raíz de un importante estudio llevado a cabo por Grimwade y col. se propuso una clasificación que distribuía a los pacientes en un grupo de riesgo favorable, intermedio o de mal pronóstico en función de las alteraciones citogenéticas detectadas (Grimwade D, Blood 1998). Estos tres grupos citogenéticos presentaban diferencias significativas en cuanto a probabilidad de alcanzar RC, riesgo de recaída y SG. Aunque con algunas diferencias entre los distintos grupos internacionales de estudio y tratamiento de la LMA, los hallazgos citogenéticos detectados al diagnóstico son utilizados para ajustar la intensidad del tratamiento post-remisión de los pacientes (Tabla 10).

Todos los estudios importantes realizados en LMA están de acuerdo en que los pacientes con $t(15;17)(q22;q12-21)$ tienen un excelente pronóstico y aquellos que presentan una $t(8;21)(q22;q22)$ o una $inv(16)(p13q22/t(16;16)(p13;q22))$ tienen un relativo buen pronóstico, mientras que los pacientes con $inv(3)(q21q26/t(3;3)(q21;q26))$, -7 y cariotipos complejos, definido en algunos estudios por presentar 3 ó más anomalías y en otros 5 ó más anomalías, son considerados de mal pronóstico. El cariotipo complejo habitualmente no incluye pacientes con $t(8;21)$, $inv(16)/t(16;16)$, $t(15;17)$ o $t(9;11)(p22;q23)$ porque el pronóstico de estas anomalías no se ve afectado de manera desfavorable por la presencia de dos o más alteraciones cromosómicas adicionales. Por otro lado, la -5, $del(7q)$, -17/17p-, -18 o -20, que son anomalías de mal pronóstico, suelen formar parte de cariotipos complejos. Por el contrario, los casos poco frecuentes de $del(7q)$ en ausencia de –

5/del(5q), o anomalías en el 3q o del(5q) sin cariotipo complejo se clasifican dentro del grupo de riesgo intermedio.

Esta clasificación citogenética resumida en la tabla 10 se basó en estudios realizados predominantemente en pacientes con LMA menores de 56 ó 60 años. Dos estudios posteriores analizaron el significado pronóstico de la citogenética al diagnóstico en pacientes mayores, un grupo que generalmente presenta una peor evolución. Tanto el estudio del United Kingdom MRC (Grimwade D, Blood 2001) como el del CALGB (Faray SS, Blood 2006) confirmaron el valor de la citogenética pretratamiento como un factor pronóstico independiente en este grupo de pacientes. Aunque el significado pronóstico de algunas alteraciones citogenéticas puede ser diferente respecto al grupo de pacientes jóvenes.

Doce años después de la clasificación citogenética propuesta por Grimwade y col. dentro del MRC, este mismo grupo propone una actualización de la clasificación inicial. En estos años se han observado discrepancias entre los sistemas de clasificación citogenética utilizados por los diferentes grupos, sobre todo en cuanto al impacto pronóstico de las anomalías citogenéticas añadidas en los pacientes con citogenética de buen pronóstico, las anomalías que afectan al 11q23 (MLL) y al número de anomalías citogenéticas necesarias para definir un cariotipo complejo (Tabla 10). Otro objetivo de esta revisión ha sido definir de forma más precisa el significado pronóstico de algunas anomalías citogenéticas que estaban incluidas en el grupo de pronóstico intermedio, y que en la nueva clasificación han pasado a ser consideradas de mal pronóstico (Grimwade D, Blood 2010). Además, se define un nuevo grupo de mal pronóstico que es el cariotipo monosómico. Breems DA y col. describieron un grupo de pacientes con LMA y especial mal pronóstico, con una SG a los 4 años del 4%. Este grupo de pacientes se caracterizaba por presentar dos o más monosomías de cromosomas autosómicos o una monosomía autosómica junto al menos una anomalía citogenética estructural. Esta SG tan corta se

debe a que estos pacientes presentaban una baja tasa de RC (48%) y una alta frecuencia de recaídas (41%). El cariotipo monosómico discrimina los pacientes con mal pronóstico mejor que el cariotipo complejo, independientemente de que se defina como ≥ 3 o ≥ 5 anomalías (Breems DA, J Clin Oncol 2008).

Tabla 10. Clasificación citogenética utilizada por los diferentes grupos de estudio de LMA para definir el pronóstico de los pacientes al diagnóstico

PRONÓSTICO	ORIGINAL MRC	SWOG/ECOG	CALGB	GIMEMA/AML10	GERMAN AMLCG	HOVON/SAKK	MRC MODIFICADA
Favorable	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16) t(16;16)	t(15;17) t(8;21) [sin del(9q), complejo ≥ 3] inv(16)/t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/ t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/ t(16;16)	t(15;17) t(8;21) inv(16)/ t(16;16)	t(15;17) t(8;21) sola inv(16)/t(16;16) y ausencia de anomalías desfavorables	t(15;17) t(8;21) inv(16)/t(16;16)
Intermedio	Normal Otros no complejos	Normal, +6, +8, -Y, del(12p)	Normal Otros no complejos	Normal -Y	Normal Otros no complejos	Normal Otros no complejos	Normal Otros no complejos
Adverso	anom(3q) -5/del(5q) -7 Complejo ≥ 5 Excluidos aquellos con anomalías favorables	anom(3q), (9q), (11q), 21(q) anom(17p) -5/del(5q) -7/del(7q) t(6;9) t(9;22) complejo ≥ 3	inv(3)/t(3;3) -7 t(6;9) t(6;11) t(11;19) +8 complejo ≥ 3 Excluidos aquellos con anomalías favorables	Otras anomalías	inv(3)/t(3;3) -5/del(5q) -7/del(7q) anom(11q23) del(12p) anom(17p) complejo ≥ 3	anom(3q) -5/del(5q) -7/del(7q) anom(11q23) t(6;9) t(9;22) complejo ≥ 3	anom(3q) [excepto t(3;5)] inv(3)/t(3;3) add(5q)/del(5q)/ -5, -7/add(7q) t(6;11) t(11;19) t(9;22) anom(17p) con otros cambios complejo > 3 Excluidos aquellos con anomalías favorables

anom: anomalías.

1.4.1. LMA CON AFECTACIÓN DEL COMPLEJO *CORE BINDING FACTOR* (CBF)

Las LMA con afectación del complejo CBF son un subtipo de LMA *de novo* del adulto relativamente frecuentes. La t(8;21) se detecta en un 7% de los pacientes y la inv(16)/t(16;16) en un 5% de los casos (Grimwade D, Blood 2010). Ambos tipos de LMA suelen agruparse juntos en estudios clínicos basándose en su similar pronóstico favorable y en su similitud a nivel molecular, aunque existen diferencias entre ambos (Schlenk RF, J Clin Oncol 2004; Marcucci G, J Clin Oncol 2005; Appelbaum FR, Br J Haematol 2006). Los estudios de microarrays de expresión han revelado que existen importantes diferencias moleculares entre ambos tipos de LMA pudiendo diferenciar una de otra con una precisión del 95% en base a su patrón de expresión génica (Haferlach T, Blood 2005).

La inv(16)/t(16;16) se caracteriza por presentar morfología M4 con eosinofilia de la clasificación FAB en la mayoría de los casos. Suele tener una mayor cifra de leucocitos al diagnóstico, mayor porcentaje de blastos en médula ósea y mayor afectación extramedular (adenopatías, esplenomegalia, hipertrofia gingival y afectación de piel y mucosas) que los pacientes con t(8;21) (Schlenk RF, J Clin Oncol 2004; Marcucci G, J Clin Oncol 2005; Appelbaum FR, Br J Haematol 2006). Los pacientes con t(8;21) normalmente presentan morfología M2 de la clasificación FAB.

Ambos grupos son muy similares en cuanto a la alta probabilidad de alcanzar RC, en un rango entre 85-89%. Los análisis univariados no demuestran diferencias significativas en la SG ni en el riesgo de recaída entre ambos grupos. A pesar de ello sólo el 50-60% de los pacientes se curan utilizando los tratamiento actuales (Schlenk RF, J Clin Oncol 2004; Marcucci G, J Clin Oncol 2005; Appelbaum FR, Br J Haematol 2006). Por este motivo es necesario identificar, dentro de este grupo de pacientes, aquellos que podrían beneficiarse de tratamientos más intensivos o de nuevas estrategias terapéuticas (Mrózek K, Curr Opin Oncol 2008).

1.4.1.1. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS SECUNDARIAS

Aproximadamente dos terceras partes de los pacientes con $\text{inv}(16)/\text{t}(16;16)$ presentan este reordenamiento como única anomalía cromosómica, mientras que la $\text{t}(8;21)$ sin anomalías asociadas sólo se observa en el 30% de pacientes con esta translocación. El patrón de anomalías secundarias asociadas también es diferente, siendo la pérdida del cromosoma sexual y la $\text{del}(9q)$ las alteraciones asociadas con más frecuencia a la $\text{t}(8;21)$, mientras que las anomalías cromosómicas asociadas a la $\text{inv}(16)/\text{t}(16;16)$ son la +22, +8, $\text{del}(7q)$ y +21.

En el trabajo inicial de Grimwade D. y col. no se observó que las anomalías cromosómicas añadidas en los pacientes con $\text{inv}(16)/\text{t}(16;16)$ y $\text{t}(8;21)$ aportaran ninguna información pronóstica. Sin embargo, posteriormente algunos estudios describieron que los pacientes con $\text{inv}(16)/\text{t}(16;16)$ y +22 presentaban una menor incidencia acumulada de recaída (IAR) (Marcucci G, J Clin Oncol 2005) y una mayor SLR (Schlenk RF, J Clin Oncol 2004) que los pacientes con $\text{inv}(16)/\text{t}(16;16)$ sola. Y de igual manera, la pérdida del cromosoma sexual Y (-Y), la $\text{del}9(q)$ o la presencia de un cariotipo complejo en los pacientes con $\text{t}(8;21)$ se asociaría a una peor evolución de la enfermedad (Schlenk RF, J Clin Oncol 2004, Shoch C, Leukemia 2006; Appelbaum RF, Br J Haematol 2006). En la revisión actualizada de Grimwade D. y col. se confirma que las LMA con $\text{inv}(16)/\text{t}(16;16)$ y +22 se asocian a un particular buen pronóstico. En cuanto a las LMA con $\text{t}(8;21)$, a diferencia de los estudios anteriores, no se observa que las anomalías cromosómicas añadidas conlleven una peor evolución. Únicamente se observa que los pacientes con pérdida del cromosoma Y tienen tendencia a presentar una mayor SG (Grimwade D, Blood 2010).

1.4.1.2. MUTACIONES GENÉTICAS RECURRENTES

- **Mutaciones del gen KIT**

El gen KIT se localiza en el cromosoma 4 y codifica para un receptor tirosín-quinasa esencial para el desarrollo normal de la hematopoyesis (Lennartsson J, Stem Cells 2005). Los blastos de las LMA expresan KIT en un 60-80% de los casos y la incidencia de mutaciones de KIT en las leucemias con afectación del CBF oscila entre un 22% y un 46% (Paschka P, J Clin Oncol 2006; Cairoli R, Blood 2006). Se han descrito diferentes mutaciones activantes de KIT tanto en el dominio extracelular de la proteína (exon 8) como en el dominio intracelular (exon 11 y 17). Las mutaciones en el exon 8 se han detectado en el 25% de estas leucemias y provocan una dimerización y una activación espontánea del receptor, lo que da lugar a la activación de MAPK y PI3-quinasa en respuesta a la estimulación del SCF (Döhner H, Hematology Am Soc Hematol Educ Book 2007).

Mediante estudios de expresión génica, se ha observado que las LMA con mutación de KIT tienen un perfil de expresión diferente al de los pacientes sin mutaciones de KIT (Lück SC, Br J Haematol 2010). Los casos con mutación de KIT se caracterizan, sobre todo, por una desregulación de genes pertenecientes al complejo de señalización NFkB, lo que sugiere una alteración en el control de la apoptosis.

Diferentes estudios han evaluado el significado pronóstico de las mutaciones de KIT en este tipo de leucemias (Schnittger S, Blood 2006; Paschka P, J Clin Oncol 2006; Cairoli R, Blood 2006; Care RS, Br J Haematol 2003; Boissel N, Leukemia 2006; Nanri T, Leukemia 2005) (Tabla 11). En las LMA asociadas a t(8;21) las mutaciones de KIT, y en algunos estudios específicamente las mutaciones en el exon 8, se han asociado con una peor evolución de la enfermedad (Schnittger S, Blood 2006; Cairoli R, Leukemia 2006). En la inv(16)/t(16;16) un estudio del CALGB con una gran cohorte de pacientes mostró que las mutaciones de KIT se asociaron con una mayor IAR en relación principalmente con

mutaciones en el exon 17 (Paschka P, J Clin Oncol 2006). Care RS y col., por el contrario, relacionaron las mutaciones en el exon 8 con una mayor tasa de recaídas en estos pacientes (Care RS, Br J Haematol 2003). En otros estudios las mutaciones de KIT no se han asociado con el pronóstico de los pacientes con inv(16)/t(16;16) (Cairoli R, Blood 2006; Boissel N, Leukemia 2006)

En un estudio reciente realizado en pacientes pediátricos con LMA asociadas a t(8;21)/inv(16) se han detectado mutaciones de KIT en el 20% de los casos y no se ha observado que estas mutaciones afecten el pronóstico de estos pacientes, a diferencia de lo observado en adultos (Pollard JA, Blood 2010). Estos resultados están en concordancia con los descritos en otros estudios realizados en niños (Goemans BF, Leukemia 2005, Shih LY, Leukemia 2008). Sólo en una serie japonesa se ha observado que las mutaciones de KIT en niños tienen un significado pronóstico negativo (Shimada A, Blood 2006).

Independientemente de su significado pronóstico, las mutaciones de KIT podrían representar una diana potencial para terapias moleculares. Se han descrito algunas experiencias preliminares con imatinib, como terapia única o asociada a quimioterapia, y los resultados demuestran que es parcialmente efectivo en pacientes con mutaciones del exon 8 y en mutaciones del exon 17 que afectan al codon TKD⁸²² pero no en las mutaciones TKD⁸¹⁶ (Growney JD, Blood 2005; Nanri T, Leukemia 2005). La utilización de inhibidores tirosín-quinasa de segunda generación como dasatinib o nilotinib podrían mejorar estos resultados (Schittenhelm MM, Cancer Res 2006; Paschka P, Semin Oncol 2008). Por tanto, es necesario determinar el genotipo de KIT en cada paciente para seleccionar el inhibidor tirosín-quinasa apropiado. Además, existen resistencias al tratamiento como consecuencia de la adquisición de mutaciones secundarias de KIT.

En un estudio reciente se ha demostrado que los inhibidores del proteasoma, como bortezomib, tienen una intensa actividad antileucémica en modelos murinos con KIT

mutado ya que alteran el complejo Sp1/NFkB/HDAC/miR-29b, el cual juega un importante papel en la regulación de la transcripción génica de KIT (Liu S, Cancer Cell 2010).

Tabla 11. Significado pronóstico de las mutaciones de KIT en los pacientes con LMA con afectación de CBF

Estudio	Pacientes t(8;21) / inv(16)	Mutaciones KIT			Pronóstico			
		Totales	Exon 8	TKD	Otras	Supervivencia	Tipo mutación/ citogenética	P
Care y col.	110 (47/63)	26 (24%)	16	10	NR	SG a 2 años RR a 2 años	exon 8/inv(16) exon 8/inv(16)	0,67 0,01
Nanri y col.	37 (37/0)	14 (38%)	3	10	1	SLR a 6 años	Ras+/TKD+/t(8;21)	0,03
Schnittger y col.	173 79/97	10 (6%)	NR	10	NR	SG a 6 años	exon 8/t(8,21)	0,0006
Cairolí y col.	67 (42/25)	31 (46%)	8	20	3	SG a 6 años SG a 6 años	ambas/t(8;21) ambas/inv(16)	0,02 0,32
Boissel y col.	96 (50/46)	16 (17%)	12	4	NR	SG a 6 años SG a 6 años	ambas/t(8;21) ambas/inv(16)	0,03 0,75
Paschka y col.	110 (49/61)	29 (26%)	10	19	NR	IAR a 6 años IAR a 6 años	ambas/t(8;21) TKD/inv(16)	0,017 0,002
Goemans y col.*	27 (16/11)	27 (37%)	5	5	0	EFS a 5 años	ambas/CBF	0,64
Shimada y col.*	46 (46/0)	8 (17%)	0	8	0	SG a 4 años RR a 4 años	ambas/t(8;21) ambas/t(8;21)	0,001 <0,0001
Pollard y col.*	203 (113/90)	38 (19%)	20	17	NR	SG a 5 años RR a 5 años	ambas/CBF ambas/CBF	0,81 0,87

(*)Estudios en pacientes pediátricos. TKD: dominio tirosín-quinasa; NR: no realizado; SG: supervivencia global; RR: riesgo de recaída; SLR: supervivencia libre de recaída; EFS: supervivencia libre de evento; IAR: incidencia acumulada de recaída.

- **Mutaciones del gen FLT3**

La FLT3-ITD es relativamente infrecuente en los pacientes con LMA asociadas a alteración de CBF. Se ha detectado en el 2-9% de los pacientes con t(8;21) y en el 0-7% de los pacientes con inv(16) (Care RS, Br J Haematol 2003, Boissel N, Leukemia 2006, Kottaridis PD, Blood 2001; Schnittger S, Blood 2002, Thiede C, Blood 2002). La mutación puntual FLT3-TKD 835 es más frecuente en los pacientes con inv (16) (6-24%) mientras que es rara en los casos con t(8;21) (Boissel N, Leukemia 2006; Mead AJ, Blood 2007). Hasta el momento no se ha establecido el significado pronóstico de estas mutaciones en este subtipo de leucemias.

- **Mutaciones del gen RAS**

Las mutaciones activantes del protooncogen RAS se observan en un 10-15% de las LMA *de novo*. Estas mutaciones, y en especial las que afectan al codon 61 de N-RAS, son frecuentes en pacientes con LMA asociadas a inv(16)/t(16;16) ya que se detectan casi en un tercio de los casos. Por el contrario, es un hallazgo poco frecuente en las leucemias con t(8;21) (Boissel N, Leukemia 2006; Bowen DT, Blood 2005; Nanri T, Leukemia 2005). Las mutaciones de RAS no parecen tener un impacto pronóstico negativo en este tipo de leucemias, pero podrían tener interés desde un punto de vista terapéutico (Boissel N, Leukemia 2006; Bowen DT, Blood 2005; Nanri T, Leukemia 2005; Bacher U, Blood 2006).

- **Mutaciones de JAK2**

La mutación JAK2V617F típica de las neoplasias mieloproliferativas crónicas es infrecuente en las LMA con alteración de CBF, siendo identificada en el 6% de los casos con t(8;21) y en el 0-3,6% de los casos con inv(16). Es importante destacar que la SLE de estos pacientes con mutación de JAK2 fue significativamente menor que la de los pacientes que no presentaban esta mutación (Illmer T, Haematologica 2007).

- **Mutaciones de CBL**

Recientemente se han detectado mutaciones en el exon 8 del gen que codifica la ligasa E3 CBL en casos de LMA con inv(16) y t(8;21) (Abbas S, Haematologica 2008; Haferlach C, Leukemia 2010). El gen CBL mutado actúa como una proteína con efecto dominante negativo e inhibe la regulación de tirosín-quinasas como KIT y FLT3. Éste podría ser otro mecanismo alternativo de activación de tirosín-quinasas.

1.4.2. LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA: t(15;17)(q22;q21)/(PML-RARA)

La translocación t(15;17)(q22;q21) da lugar al gen de fusión PML-RARA y es específica de la LMA promielocítica o M3. Representa alrededor del 15% de los casos de LMA. El gen de fusión aberrante PML-RARA actúa como un inhibidor de las funciones de crecimiento y diferenciación normal de los genes PML y RARA (Chen Z, Genes Chromosomes Cancer 1996).

Generalmente la LMA M3 se presenta *de novo*. Citológicamente se caracteriza por la presencia de promielocitos atípicos con abundantes gránulos y bastones de Auer formando astillas. Existen variantes morfológicas, especialmente la M3 variante o microgranular. En el momento del diagnóstico son frecuentes las alteraciones de la coagulación y la leucopenia (en la forma típica de M3) o la leucocitosis (forma variante M3) y presenta un patrón inmunofenotípico característico, aunque no específico (Tabla 6).

Mediante técnicas de citogenética convencionales, la translocación típica t(15;17)(q22;q21) se observa en el 70% de los pacientes diagnosticados de LPA. La translocación t(15;17) puede acompañarse, en el 30-40% de los casos, de otras alteraciones citogenéticas, siendo la trisomía 8 la más frecuente, seguida del isocromosoma del brazo largo del derivativo 17, ider(17). Estas anomalías citogenéticas añadidas no aportan ningún significado pronóstico adverso en los pacientes con t(15;17) tratados con los protocolos estándares basados en ATRA y antraciclinas tal y como

demuestran los resultados de los estudios del European APL Group (De Botton S, Br J Haematol 2000), PETHEMA (Hernández JM, Haematologica 2001) y del MRC (Grimwade D, Blood 2010).

Existen algunos casos de LPA en los que se detectan alteraciones cromosómicas variantes como la t(11;17) o la t(5;17) en las que el locus $\text{rar}\alpha$ se empareja con otros genes como el PLZF (*promyelocitic leukemia zinc finger*) y el NPM (*nucleophosmin*), entre otros, dando como resultado los reordenamientos PLZF-RARA y NPM-RARA, respectivamente. Las LPA con fusión PLZF-RARA representan menos del 1% de los casos y son resistentes al tratamiento con ATRA, por lo que el pronóstico es más desfavorable (Melnick A, Blood 1999).

La FLT3-ITD se identifica en un 30-40% de LPA (Schnittger S, Blood 2002; Thiede C, Blood 2002). En la mayoría de LMA esta mutación se asocia con mal pronóstico. En el caso de la LPA, la FLT3-ITD se ha asociado a características clínicas adversas como mayor cifra de leucocitos al diagnóstico, morfología M3 variante, o isoforma bcr3 del transcrito de fusión, pero no con menor supervivencia (Callens C, Leukemia 2005; Kuchenbauer F, Br J Haematol 2005). Un estudio reciente demostró que una ratio alelo mutado/alelo germinal de la FLT3-ITD elevada ($>0,66$) y una mayor longitud de la secuencia insertada de la DIT se asocia con menor SLR en los pacientes con LPA (Chillón MC, Haematologica 2010). En este mismo estudio observaron que los pacientes con un número de copias normalizadas de PML-RARA baja ($<$ percentil 25) al diagnóstico presentaban un pronóstico adverso (menor SLR y menor SG) y además estos pacientes eran los que presentaban mayor incidencia de FLT3-ITD con una mayor ratio y una mayor longitud de la DIT. De acuerdo con estos resultados, dentro del grupo de alto riesgo de las LPA se podría identificar un subgrupo con especial mal pronóstico: cifra de leucocitos alta, DIT larga y niveles de transcrito bajos. En modelos experimentales con ratones, los niveles bajos de transcrito se han asociado con mayor eficiencia para desarrollar una leucemia (Westervelt

P, Blood 2003). Una mayor longitud de la secuencia insertada en la FLT3-ITD induce una activación constitutiva del dominio quinasa del receptor de FLT3 que provoca un aumento de la proliferación y de la supervivencia de las células progenitoras mieloides (Gilliland DG, Blood 2002).

1.4.3. LMA CON ALTERACIONES DEL CROMOSOMA 11q23

Alrededor del 5-10% de las LMA presentan deleciones o translocaciones con el gen MLL en la banda 11q23. Este subgrupo molecular está formado por un conjunto heterogéneo de anomalías citogenéticas. Entre las translocaciones más frecuentes en la LMA destacan la t(9;11)/MLLT3-MLL (representa un 50% de los casos) y la t(6;11)/MLLT4-MLL y, con menor frecuencia, la t(4;11)/MLLT2-MLL y la t(11;19)(q23;p13)/MLL-ELL y MLL-MLLT1. El inmunofenotipo de estas leucemias corresponde al de las leucemias agudas con participación monocítica. La expresión de NG2 (proteoglicano condroitín-sulfato) como marcador predictivo de reordenamiento de MLL es controvertido. Algunos autores describieron que la expresión de NG2 sólo predecía algunos reordenamientos, en concreto la t(4;11) y la t(9;11). Pero estos resultados no se han confirmado en otros estudios en los que se observó que la expresión de NG2 es independiente del tipo de leucemia, ya que éste es un marcador de célula progenitora inmadura (Bueno C, Leukemia 2008).

Las LMA con alteración de 11q23, en general, presentan una menor supervivencia, aunque el cromosoma implicado en la translocación con el 11q23 es de gran importancia de cara a establecer el pronóstico. Estudios con gran número de pacientes han demostrado el impacto pronóstico negativo de la t(6;11) y la t(4;11), mientras que la t(9;11) no parece asociarse con una evolución tan adversa de la leucemia (Di Martino J, Br J Haematol 1999; Rubnitz J, Leukemia 1996; Mrózek K, Blood 1997). De hecho, la última clasificación de las neoplasias mieloides agudas de la OMS (Swerdlow SH, OMS 2008) reconoce a la LMA con t(9;11)(p21~22;q23)/AF9-MLL como una enfermedad con

entidad propia, con un relativo buen pronóstico en las mayoría de estudios realizados (Shoch C, Blood 2003; Krauter J, J Clin Oncol 2009). Una evolución similar se observa en los pacientes con $t(11;19)(q23;p13)$; por este motivo, ambas anomalías citogenéticas se incluyen dentro del grupo de pronóstico intermedio, en lugar de en el de mal pronóstico, en la última revisión citogenética del MRC (Grimwade D, Blood 2010). Por el contrario, los casos con $t(6;11)$ y la $t(10;11)$ se asocian con una menor supervivencia, pues la probabilidad de SG a los 10 años es del 9% y 12% respectivamente. Estos resultados están en concordancia con otros estudios publicados previamente (Krauter J, J Clin Oncol 2009; Blum W, Cancer 2004; Dreyling MH, Blood 1998). El pronóstico favorable de la $t(9;11)$ no se ha confirmado en niños; sin embargo, se ha identificado otra translocación, la $t(1;11)(q21;q23)$, una anomalía asociada a una evolución más favorable de la enfermedad. La $t(6;11)$ y la $t(10;11)$ tienen un significado pronóstico negativo también en niños (Balgobind BV, Blood 2009).

1.4.4. LMA CON $t(6;9)(p23;q34)/(DEK-NUP214)$

La $t(6;9)(p23;q34)$ se detecta en el 0,5-1% de los pacientes adultos con LMA. En la nueva clasificación de la OMS se reconoce como una entidad con características clínico-biológicas bien definidas (Swerdlow SH, OMS 2008). Es una enfermedad que se asocia a mal pronóstico con una SG a los 10 años del 23% (Slovak ML, Leukemia 2006; Grimwade D, Blood 2010). Este mal pronóstico podría estar relacionado con su frecuente asociación, hasta en un 76% de los casos, a la FLT3-ITD (Thiede C, Blood 2002). Estos datos permiten sugerir la evaluación de los inhibidores de FLT3 en este subtipo de LMA.

1.4.5. LMA CON $inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2): RPN1_1-EVI_1$

La $inv(3)/t(3;3)$ se detecta en aproximadamente el 1-2% de todas las LMA y da lugar al gen de fusión $RPN1_1-EVI_1$ en el cromosoma 3 3q21. Este reordenamiento permite

incrementar la expresión del gen EVI1. Este subtipo de leucemias se asocia a un pronóstico infausto. En las LMA con inv(3)/t(3;3) se han detectado algunas aberraciones cromosómicas secundarias recurrentes, como la monosomía del 7 o deleciones del 5q, y aproximadamente en el 25% de los casos se han identificado mutaciones de NRAS. También se ha descrito alteración de la expresión de EVI1 en pacientes con LMA sin reordenamiento de 3q (7,8%) y esta sobreexpresión de EVI1 fue un factor pronóstico independiente asociada a menor supervivencia (Lugthart S, Blood 2008). En algunos de estos casos en los que no se detectaron anomalías de 3q mediante técnicas de citogenética convencional se identificaron puntos de ruptura crípticos de 3q26 mediante hibridación *in situ*.

1.4.6. LMA CON CARIOTIPO COMPLEJO

El cariotipo complejo se define habitualmente por la presencia de al menos 3 anomalías cromosómicas en ausencia de la t(8,21), inv(16)/t(16;16) y la t(15;17). Las LMA con cariotipo complejo representan el 10-12% de todas las LMA y su incidencia aumenta con la edad. En la LMA el cariotipo complejo se caracteriza por la rara frecuencia de reordenamientos cromosómicos balanceados y por la baja frecuencia de mutaciones de los genes NPM1, FLT3, CEBPA, RAS o KIT tan frecuentemente mutados en otros tipos de LMA, lo que sugiere la alteración de otras vías moleculares. En el cariotipo complejo predominan los desequilibrios cromosómicos, con más pérdidas cromosómicas que ganancias. En los últimos años, los estudios citogenéticos moleculares y las técnicas de arrays han contribuido a mejorar la caracterización de estos cambios genéticos (Rücker FG, J Clin Oncol 2006). Las deleciones descritas, en orden de frecuencia decreciente, son 5q, 17p, 7q, 18q, 16q, 17q, 12p, 20q, 18p, y 3p, y entre las ganancias destacan la del 8q, 11q, 21q, 22q, 1p, 9p, y 13q. El gen p53 es la diana de las pérdidas que ocurren en 17p. Las mutaciones de p53 se han identificado en 2/3 partes de las LMA con cariotipo

complejo, especialmente en los casos que muestran las deleciones de 5q, 7q y 17p y la monosomía del 3, mientras que son poco frecuentes en otros subgrupos citogenéticos (Haferlach C, *Leukemia* 2008; Bowen D, *Leukemia* 2009). Se ha demostrado que la presencia de mutaciones de p53 es un factor de muy mal pronóstico. La probabilidad de alcanzar RC en estos pacientes es de sólo el 28% (Bowen D, *Leucemia* 2009) por lo que podrían beneficiarse de estrategias terapéuticas alternativas dirigidas contra esta vía alterada de p53.

Mediante técnicas como la hibridación genómica comparada (HGC) basada en *arrays* se han detectado amplificaciones génicas recurrentes, que han permitido identificar genes que podrían estar potencialmente implicados en la patogénesis de las LMA con cariotipo complejo y en otras LMA, como los genes de la familia ETS (Rücker FG, *J Clin Oncol* 2006). Estos hallazgos sugieren que la activación de oncogenes sin ganancias genómicas son más comunes en este tipo de LMA de lo que inicialmente se creía (revisado en Döhner K, *Haematologica* 2008).

1.4.7. LMA CON CITOGÉNÉTICA NORMAL

Los pacientes con LMA y citogenética normal representan el grupo más numeroso dentro del grupo de pronóstico intermedio (Grimwade D, *Blood* 1998; Slovak ML, *Blood* 2000; Byrd JC, *Blood* 2002). En estos enfermos, puede reducirse el riesgo de recaída utilizando diferentes estrategias post-remisión que incluyen dosis altas o intermedias de citarabina o TPH, pero la respuesta no es igual en todos los pacientes. Esta variabilidad en la respuesta al tratamiento se debe a la heterogeneidad molecular de los pacientes con citogenética normal. Durante la última década múltiples estudios han demostrado que la presencia o ausencia de mutaciones específicas en determinados genes y/o cambios en la expresión génica pueden afectar el pronóstico de estos pacientes. Actualmente, las alteraciones moleculares con significación pronóstica más importante en los pacientes con

LMA y citogenética normal son la FLT3-ITD y las mutaciones de NPM1 o CEBPA (Tablas 12 y 13). La primera se correlaciona con un pronóstico adverso y las segundas con un pronóstico favorable. De hecho, en la nueva clasificación de las neoplasias mieloides agudas de la OMS, las LMA asociadas a mutaciones de NPM1 y a CEPBA se reconocen, aunque como entidades provisionales, como enfermedades con características clínico-biológicas diferentes (Swerdlow SH, OMS 2008). Pero existen descritas otras alteraciones moleculares que influyen en la evolución clínica de estos pacientes (Tabla 12) (Mrózek K, Blood 2007, Gregory TK, J Hematol Oncol 2009; Schlenk RF, N Engl J Med 2008; Döhner K, Haematologica 2008).

1.4.7.1. MUTACIONES GENÉTICAS RECURRENTES CON IMPACTO PRONÓSTICO EN LMA CON CITOGENÉTICA NORMAL

1.4.7.1.1. Mutaciones del gen FLT3 (FMS-related tirosin-quinase 3)

El gen FLT3 se localiza en el cromosoma 13q12 y codifica un receptor de membrana tirosín-quinasa de clase III caracterizado por 5 dominios extracelulares inmunoglobulina-*like*, un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana y un dominio intracelular que consiste en dos dominios proteín-quinasa (Figura 15). FLT3 se expresa en progenitores mieloides y linfoides y su expresión se pierde durante la diferenciación celular. FLT3 juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia de la célula madre pluripotencial y está sobreexpresado en los blastos de la LMA (Gilliland DG, Blood 2002). Se han identificado mutaciones de FLT3 en dos dominios funcionales: en el dominio yuxtamembrana en forma de duplicaciones internas en tándem (FLT3-ITD) y como mutaciones puntuales en el dominio de activación de quinasas (FLT3-TKD). La DIT es el tipo más común de mutación de FLT3, se observa en un 25-30% de las LMA del adulto y en un 12% de los niños con LMA (Meshinchi S, Blood 2001). La mayoría de los pacientes tienen un único tipo de mutación, pero algunos pacientes presentan ambas

Tabla 12. Significado pronóstico de las principales alteraciones moleculares detectadas en LMA con citogenética normal

Alteración molecular	Frecuencia (%)		Asociación a alteraciones citogenéticas	Asociación a otras alteraciones moleculares		Pronóstico	Comentarios
	LMA general	LMA-CN		Positiva	Negativa		
FLT3-ITD	20	28-34	CN t(15;17) t(6;9)	NPM1 PML-RARA	c-KIT RAS CEBPA	Menor SG y SLE Mayor RR	Peor si mutación homocigota; ratio alelo mutado/germinal importante pronóstica
FLT3-TKD	5-10	11-14	CN 14-24% inv(16)	NPM1 CBFB-MYH11		Todavía controvertido	Importante nivel de alelo mutado
NPM1	25-35	45-65	CN 30-40% del9q 15% trisomía 8	FLT3-ITD (40%) FLT3-TKD	CEBPA	Genotipo favorable: NPM1 mut/FLT3-: mayor SG y SLE	
CEBPA	4-9	10-18	CN 40% del9q	↑expresión BAALC	NPM1 FLT3-ITD	Mayor SG y SLE	Pronóstico favorable sólo si mutación bialélica
MLL-PTD	5-10	5-10	50% trisomía 11		CEBPA NPM1	Mayor RR	
N-RAS	10-15	9-14	40% CBF	CBF-MYH11	FLT3-ITD	No impacto pronóstico	Mayor sensibilidad citarabina
K-RAS	5	3	25% inv(3) 5-17% CBF		FLT3-ITD	No impacto pronóstico	Mayor sensibilidad citarabina
WT1	10	10	CN	CEBPA FLT3-ITD ↑expresión BAALC ↑expresión ERG		Controvertido	Asociación con FLT3-ITD peor pronóstico

CN: citogenética normal; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; RR: riesgo de recaída.
Tabla adaptada de Camós M. Programa Educativo. Haematología/edición española 2009.

(DIT+TKD). Además de estas mutaciones principales, se han reportado otros dos tipos de mutaciones puntuales en el gen FLT3: una localizada en el dominio yuxtamembrana cuya incidencia es del 2% en la LMA en general y que no está tan relacionada con el cariotipo normal (Stirewalt DL, Br J Haematol 2004; Reindl C, Blood 2006) y otra localizada, no en el *loop* de activación, sino en la porción N-terminal del dominio tirosín-quinasa (K663Q) (Schittenhelm MM, Leukemia 2006).

El primer trabajo que demostró que las FLT3-ITD eran unas alteraciones recurrentes en la LMA se publicó en 1996 (Nakao M, Leukemia 1996). Desde entonces se ha consolidado como una de las anomalías genéticas más prevalentes, siendo especialmente frecuente en pacientes con LMA *de novo* con t(15;17), en pacientes con citogenética normal y pacientes con t(6;9) (Kottaridis PD, Blood 2001). Entre un 30-35% de las LMA con citogenética normal presentan FLT3-ITD (Whitman SP, Cancer Res 2001; Fröhling S, Blood 2002; Kainz B, Hematol J 2002; Beran M, Leuk Res 2004; Bienz M, Clin Cancer Res 2005; Thiede C, Blood 2002).

La FLT3-ITD ocurre en los exones 14 y 15 (previamente denominados como 11 y 12) y la longitud de la región yuxtamembrana duplicada varía entre 3 y 400 nucleótidos. A pesar de esta heterogeneidad, y al hecho de que en algunos casos de FLT3-ITD se acompañan de inserciones de nucleótidos adicionales, los transcritos resultantes son siempre *in-frame* (Schnittger S, Blood 2002). Las mutaciones de FLT3 provocan una fosforilación constitutiva del receptor en ausencia de ligando, y esto conlleva la activación de vías de señalización como PI3/AKT, RAS/MAPK y JAK2/STAT5. Como resultado de esta activación se produce un aumento de la proliferación y supervivencia celular. También provocan un bloqueo de la diferenciación mieloide a través de la inhibición de CEBPA y PU.1 (Reindl C, Blood 2006; Meshinchi S, Clin Cancer Res 2009).

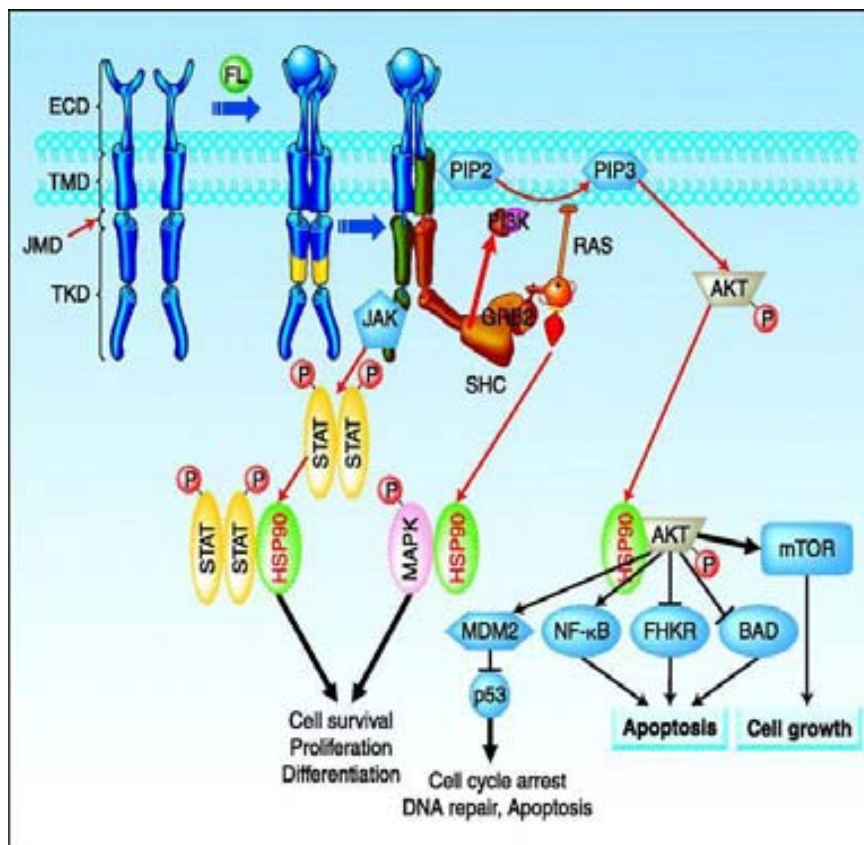


Figura 15. Vía de transducción de señales de FLT3. Cuando el ligando de FLT3 (FL) se une a su receptor provoca la dimerización y activación de la quinasa intracelular. Este receptor activará a su vez diferentes proteínas citoplasmáticas, incluyendo SHC y GRB2 para formar interacciones proteína-proteína, que darán lugar a la activación de mediadores intracelulares como AKT, MAPK, y STAT. Estos mediadores activados actúan sobre funciones celulares vitales que afectan al crecimiento y la diferenciación celular, la apoptosis, la reparación del ADN y la proliferación. Dominio extracelular (ECD), dominio transmembrana (TMD), dominio yuxtamembrana (JMD), dominio tirosín-quinasa (TKD) (Figura adaptada de Meshinchi S, Clin Cancer Res 2009).

Clínicamente, los pacientes con LMA y citogenética normal que son portadores de la FLT3-ITD se comportan de forma diferente que aquellos que no presentan esta mutación en cuanto a las características pretratamiento y a la respuesta al tratamiento y la evolución. Los pacientes con FLT3-ITD suelen presentar al diagnóstico un recuento de leucocitos superior y un mayor porcentaje de blastos en sangre y médula ósea, y más frecuentemente corresponden a LMA *de novo* (Whitman SP, Cancer Res 2001; Fröhling S, Blood 2002; Beran M, Leuk Res 2004; Thiede C, Blood 2002). Aunque la tasa de RC en los

pacientes con FLT3-ITD es a menudo inferior, ningún estudio ha observado diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes. Un hecho que sí queda firmemente demostrado es que tanto la duración de la remisión como la supervivencia son inferiores en estos pacientes (Gale RE, Blood 2008; Schlenk RF, N Eng J Med 2008). Numerosos estudios realizados únicamente en el subgrupo de pacientes con citogenética normal han demostrado que los pacientes que tienen al menos 1 alelo con la FLT3-ITD tienen una duración de la RC, de la SLE y de la SG significativamente menor que aquellos pacientes sin FLT3-ITD. Además, se demostró que la presencia de la FLT3-ITD era un factor pronóstico independiente para la SG, para la IAR y para la duración de la RC (Fröhling S, J Clin Oncol 2004; Bienz M, Cancer Res 2005; Baldus CD, J Clin Oncol 2006).

El pronóstico de la FLT3-ITD no depende solamente de la presencia o ausencia de la mutación, sino que puede variar en función del nivel de alelo mutado. En este sentido se ha descrito que los pacientes con FLT3-ITD y pérdida de expresión del alelo germinal presentan especial mal pronóstico (Gale RE, Blood 2008; Whitman SP, Cancer Res 2001).

La ausencia del alelo germinal se produce como resultado de una UPD adquirida que puede ser parcial o podría producirse una pérdida de todo el cromosoma 13 con el alelo FLT3 germinal con la posterior duplicación del cromosoma homólogo 13 que persiste con la FLT3-ITD (Fitzgibbon J, Cancer Res 2005; Griffiths M, Leukemia 2005). No obstante, en un estudio en el que se analizó la composición genética de muestras de pacientes con FLT3-ITD detectaron que la presencia de enfermedad bialélica no es frecuente a pesar de que el nivel relativo de la FLT3-ITD supere el 50%. La recombinación mitótica que da lugar a la enfermedad bialélica es normalmente un evento tardío en la leucemogénesis. Sus resultados demuestran además que la presencia heterocigota de la FLT3-ITD es suficiente para conferir un pronóstico adverso a la LMA (Green C, Br J Haematol 2008).

Por otro lado, la cuantificación del nivel relativo del alelo mutado permite definir distintos subgrupos pronósticos. Los pacientes con una baja ratio alélica de la mutación presentan

una supervivencia similar a la de los pacientes sin FLT3-ITD (Gale RE, Blood 2008). En otro estudio no limitado a LMA con cariotipo normal, se analizó el impacto pronóstico de la longitud de la FLT3-ITD y se detectó que los pacientes con un segmento duplicado de al menos 40 nucleótidos tenían una inferior SLR en comparación con los pacientes con duplicaciones menores y con aquellos sin FLT3-ITD (Stirewalt DL, Blood 2006). Pero este hallazgo no ha sido confirmado por otros autores (Gale RE, Blood 2008; Ponziani V, Leukemia 2006).

Los puntos de inserción de la DIT pueden tener también implicaciones pronósticas (Kayser S, Blood 2009). Los puntos de inserción de la DIT se sitúan en la mayoría de los casos (69%) en el dominio yuxtamembrana entre los aminoácidos 572 y 609, mientras que en el resto de casos se insertan en dirección 3' del dominio yuxtamembrana, sobre todo en el *beta1-sheet* del TKD1. En el análisis multivariado se objetivó que las DIT que se insertan en el *beta1-sheet* del TKD1 se asociaron con un pronóstico desfavorable en pacientes jóvenes con LMA y FLT3-ITD.

En cuanto a la actitud terapéutica en estos enfermos aún no está del todo resuelta. Está claro que la consolidación con quimioterapia no es una opción válida en estos pacientes, pero la opción del trasplante autólogo o alogénico también es controvertida. Algunos autores consideran que los pacientes con FLT3-ITD deben recibir como consolidación un trasplante autólogo o alogénico según si existe o no donante compatible en primera remisión, pues consideran que este tratamiento puede compensar el efecto negativo de la FLT3-ITD (Bornhäuser M, Blood 2007; Schlenk RF, N Engl J Med 2008). Mientras que otros autores consideran que si bien la presencia de la FLT3-ITD es un factor pronóstico adverso en LMA, éste no es motivo suficiente para indicar un trasplante en estos enfermos. Gale RE y col. publicaron una serie de pacientes con LMA en los que no detectaron diferencias significativas entre aquellos pacientes con FLT3-ITD y FLT3 germinal en función de la estrategia de consolidación utilizada (quimioterapia vs

trasplante autólogo vs trasplante alogénico) por lo que consideran que se necesitan estudios randomizados que ayuden a solucionar esta cuestión (Gale RE, Blood 2005).

El otro grupo de mutaciones importante que afectan al gen FLT3 son las mutaciones puntuales en el dominio tirosín-quinasa, FLT3-TKD. Se trata de mutaciones puntuales, pequeñas inserciones o deleciones, que afectan principalmente a los codones 835 y 836 y con menos frecuencia a N841 o Y842 (Yamamoto Y, Blood 2001). Estas mutaciones se han descrito en un 11-14% de pacientes con LMA y citogenética normal (Mrózek K, Blood 2007). El pronóstico de estas mutaciones es todavía controvertido (Mrózek K, Blood 2007; Bacher U, Blood 2008; Whitman SP, Blood 2008). Mientras en algunos estudios muestran un impacto pronóstico negativo, otros estudios sugieren un impacto positivo de este tipo de mutaciones en la supervivencia, aunque esta mayor supervivencia sólo se observó en los pacientes con alto nivel de mutación (>25%) (Mead AJ, Blood 2007).

Además de la importancia pronóstica de este tipo de mutaciones en los pacientes con LMA, FLT3-ITD es una potencial diana terapéutica. En la actualidad, se están utilizando diferentes inhibidores de FLT3 en ensayos clínicos. Los estudios iniciales muestran que, cuando se utilizan como terapia única, tienen una actividad limitada. Parece ser que los resultados son más prometedores cuando estos inhibidores se combinan con el tratamiento quimioterápico convencional (Döhner K, Haematologica 2008). En algunos pacientes se ha detectado resistencia a los inhibidores tirosín-quinasa dirigidos contra la FLT3-ITD debido a la ganancia de mutaciones puntuales en el gen FLT3, pero son necesarios más estudios para confirmar estos resultados (Heidel F, Blood 2006).

El estado mutacional de FLT3 puede variar durante la evolución del paciente: algunos casos no presentan la mutación original en la recidiva (4-27%) y otros la adquieren en ese momento (6%). Esta inestabilidad dificulta el uso de FLT3 como marcador de ERM y sugiere que se trata de un evento genético secundario que tiene lugar en una subclona de blastos y no en la *stem-cell* leucémica (Renneville A, Leukemia 2008).

1.4.7.1.2. Mutaciones del gen NPM1 (nucleofosmina)

El gen nucleofosmina (NPM1, B23, numatrina, NO38), localizado en el cromosoma 5q35, codifica una fosfoproteína que, dependiendo de su nivel de expresión, de su interacción con otras proteínas y de su localización, presenta funciones oncogénicas y antioncogénicas. NPM1 está implicada en la regulación del ciclo celular, en la respuesta al estrés celular y a estímulos oncogénicos, regula la vía del supresor tumoral arf-p53 a múltiples niveles y es necesaria para la estabilización y localización de p14-*arf* (Döhner K, *Haematologica* 2008; Renneville A, *Leukemia* 2008).

Las mutaciones en el exon 12 de NPM1 se han descrito en el 30% de las LMA en general y en el 50-60% de los pacientes con LMA y citogenética normal, convirtiéndose en la alteración genética más frecuente en este grupo citogenético (Falini B, *N Eng J Med* 2005; Döhner K, *Blood* 2005; Schnittger S, *Blood* 2005; Boissel N, *Blood* 2005; Thiede C, *Blood* 2006). La incidencia de estas mutaciones en los niños es de 2-6%, significativamente menor que en los adultos (Cazzaniga G, *Blood* 2005).

La presencia de las mutaciones de NPM1 se asocia con determinadas características pretratamiento como son el sexo femenino, recuentos más altos de leucocitos y de plaquetas y un porcentaje más elevado de blastos en médula ósea. Morfológicamente los blastos suelen presentar un núcleo hendido (*cuplike* o signo de la impronta del dedo) (Figura 16) (Chen W, *Blood* 2006) y desde un punto de vista fenotípico se asocia a una expresión débil o ausente de CD34 (Falini B, *N Eng J Med* 2005; Döhner K, *Haematologica* 2008; Schnittger S, *Blood* 2005; Thiede C, *Blood* 2006; Renneville A, *Leukemia* 2008).

Las mutaciones de NPM1 son mutuamente excluyentes de las translocaciones t(8;21), inv(16) y t(15;17), y tampoco son frecuentes en pacientes con cariotipo complejo o con otras anomalías citogenéticas (Thiede C, *Blood* 2006). Aproximadamente el 40% de los pacientes con mutaciones en NPM1 se asocian con FLT3-ITD, la cual, junto con las FLT3-TKD, es dos veces más común en los pacientes con NPM1 mutado que en los pacientes

con NPM1 germinal. Por el contrario, es poco frecuente su asociación con otras mutaciones (CEBPA, MLL-PTD, KIT, RAS) (Falini B, N Eng J Med 2005; Döhner K, Blood 2005; Schnittger S, Blood 2005; Thiede C, Blood 2006). Las LMA con citogenética normal y NPM1 mutado presentan un perfil de expresión génica caracterizado por alteración de la regulación de genes implicados en el mantenimiento de la *stem cell*, incluyendo la activación de genes HOX (HOXA, HOXB) y la supresión de los genes MN1, BAALC y ERG (Verhaak RG, Blood 2005; Alcalay M, Blood 2005; Becker H, J Clin Oncol 2010).

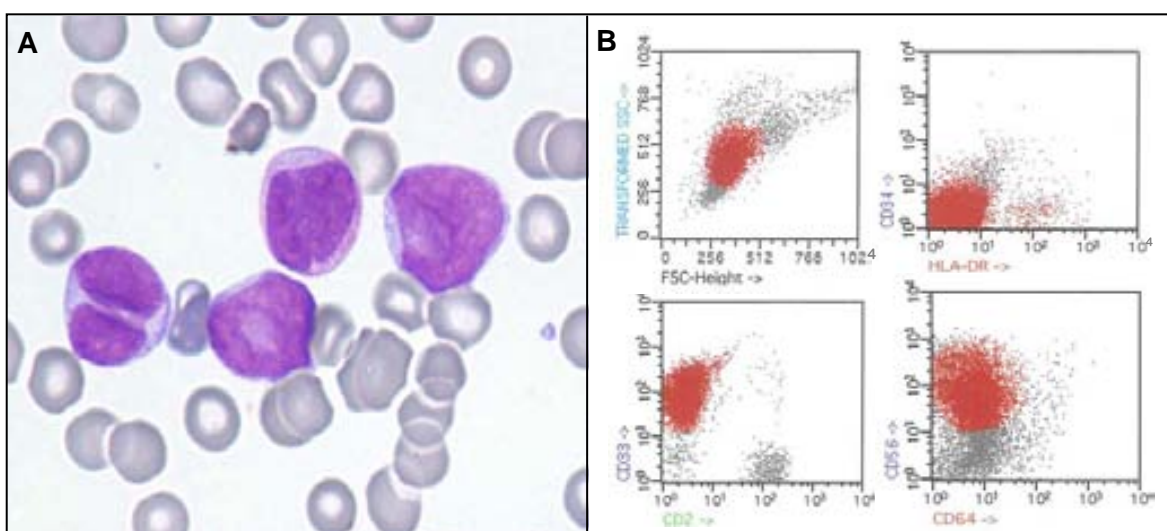


Figura 16. A. Morfología de las LMA con mutación de NPM1. Blastos de tamaño mediano con invaginaciones nucleares prominentes (*cuplike nuclele*); el citoplasma es escaso-moderado con escasos gránulos azurófilos (Imagen de sangre periférica teñida con May-Grünwald-Giemsa). **B. Perfil inmunofenotípico típico de las LMA con mutación de NPM1.** La población blástica es negativa para CD34 y HLA-DR. La expresión de marcadores mieloides como CD33 es intensa y con frecuencia coexpresa CD56.

Aunque se han descrito más de 40 mutaciones diferentes de NPM1, más del 95% de ellas consisten en la duplicación de 4 pares de bases en la posición 960 en el exon 12. La mutación A debida a la duplicación de TCTG representa el 70-80% mientras que las tipo B y D representan el 15-20% de casos. Todos los casos son heterocigotos para la mutación y mantienen el alelo germinal. A pesar de la heterogeneidad, todas las mutaciones causan alteración del patrón de lectura en la región que codifica la región C-terminal de la

proteína NPM1 (Renneville A, Leukemia 2008). Estas mutaciones provocan la pérdida de los residuos de triptófano 290 y 288 (o sólo el 290) que son críticos para la localización nucleolar de la proteína, lo que provoca la adquisición de una señal exportadora nuclear en la porción C-terminal de la nucleofosmina, causando esta localización citoplasmática aberrante y por tanto una alteración en sus funciones normales (Falini B, Blood 2006; Falini B, N Engl J Med 2005). La localización citoplasmática de la proteína NPM1 mutada probablemente es crítica en la leucemogénesis.

Las mutaciones de NPM1 predicen una evolución favorable en pacientes con LMA y citogenética normal en ausencia de la FLT3-ITD (Falini B, N Engl J Med 2005; Döhner K, Blood 2005; Schlenk RF, N Engl J Med 2008). Döhner K y col. observaron que los pacientes con mutación de NPM1 sin FLT3-ITD presentaban una probabilidad de supervivencia a los 5 años comparable a la de los pacientes con leucemias con afectación de CBF o la de los pacientes con citogenética normal y mutaciones de CEBPA. Por el contrario, no hubo efectos importantes de las mutaciones de NPM1 sobre el mal pronóstico de los pacientes con FLT3-ITD (Döhner K, Blood 2005).

Este pronóstico favorable de las mutaciones de NPM1 también se ha observado en los pacientes con edad igual o superior a 60 años con LMA *de novo* con citogenética normal y, es especialmente patente, en enfermos a partir de 70 años (Becker H, J Clin Oncol 2010).

A diferencia de la FLT3-ITD las mutaciones de NPM son relativamente estables durante la evolución de la enfermedad. Casi todos los pacientes con mutación de NPM1 al diagnóstico también la presentaron en la recaída y, por el contrario, ningún paciente la adquirió en ese momento. Esta estabilidad hace que las mutaciones de NPM1 puedan ser utilizadas en el seguimiento de la ERM.

Tabla 13. Propuesta de clasificación de las LMA en función de las anomalías citogenéticas y moleculares detectadas al diagnóstico en adultos jóvenes

Grupo pronóstico	Anomalía citogenética /molecular	Comentarios
Favorable	t(15;17)(q22;q12~21) / PML-RARA t(8;21)(q22;q22) / AML1-ETO inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)/CBFB-MYH11	Independientemente de anomalías citogenéticas adicionales
Intermedio	NPM1 mutado/FLT3-ITD ausente; WT1 germinal CEBPA mutado (bialélico, FLT3-ITD ausente)	
Adverso	Entidades no clasificadas como favorable o adversa	
Adverso	anomalías (3q) [excluida t(3;5)(q21~25;q31~35)] inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26) / expresión de EVI-1 add(5q), del(5q), -5 -7, add(7q)/ del(7q) t(6;11)(q27;q23), t(10;11)(p11~13;q23), t(9;22)(q34;q11), t(11q23) excluidas la t(9;11) (p21~22;q23) y la t(11;19)(q23;p13) -17 / anomalías(17p) Cariotipo complejo (>3 anomalías)	Excluidos casos con cariotipo favorable
	FLT3-ITD	En ausencia de cariotipo favorable Especialmente mal pronóstico si ratio de FLT3-ITD mutado muy elevada o si la FLT3- ITD se acompaña de mutación de WT1
	MLL-PTD	

Tabla adaptada de Grimwade D, Hematology Am Soc Hematol Educ Book 2009.

1.4.7.1.3. Mutaciones en el gen CEBPA (CCAAT/ enhancer-binding protein alfa)

Las mutaciones de CEBPA definen un subgrupo de LMA con citogenética normal con pronóstico favorable.

El gen CCAAT/enhancer-binding protein alfa (CEBPA) está localizado en el cromosoma 19q13.1 y codifica un factor de transcripción implicado en la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia la línea mieloide madura.

Los pacientes con LMA y mutaciones de CEBPA presentan un perfil de expresión génica característico, en el que se observa una sobreexpresión de genes implicados en la diferenciación eritroide, y de los genes que codifican las proteínas de la membrana eritrocitaria y de las cadenas de hemoglobina y, por el contrario, se observa una supresión de los genes implicados en la diferenciación mieloide como RUNX1, PU.1 e ID1 y de los genes de la familia homeobox. Genes implicados en las vías de proliferación de señales, como FLT3, LYN y miembros de la familia RAS o sus reguladores también están suprimidos en estos pacientes (Pabst T, Clin Cancer Res 2009).

La pérdida de función de CEBPA facilita la leucemogénesis por un bloqueo en la diferenciación granulocítica. Se ha descrito diferentes mecanismos de inactivación de CEBPA (Figura 17): 1) disminución de la expresión de CEBPA por la acción del transcrito de fusión AML1-ETO en las LMA con t(8;21) (Pabst T, Nat Med 2001). Además se han identificado casos de leucemias que silencian la expresión de CEBPA a través de la hipermetilación del promotor. Son leucemias que muestran un fenotipo mixto mieloide/linfoide T y mutaciones frecuentes de NOTCH (Wouters BJ, Blood 2007; Figueroa ME, Blood 2009), 2) supresión de la expresión de CEBPA mediante la inhibición de la traducción del ARNm de CEBPA por interacción con hnRNPE2, lo cual está provocado por BCR-ABL. Este mecanismo podría explicar la transición de fase crónica a crisis blástica en la LMC por bloqueo de la diferenciación mieloide (Perrotti D, Nat Genet 2002) y 3) otras

anomalías genéticas que afectan al gen CEBPA, especialmente mutaciones, como las reportadas en los pacientes con LMA (Leroy H, Leukemia 2005).

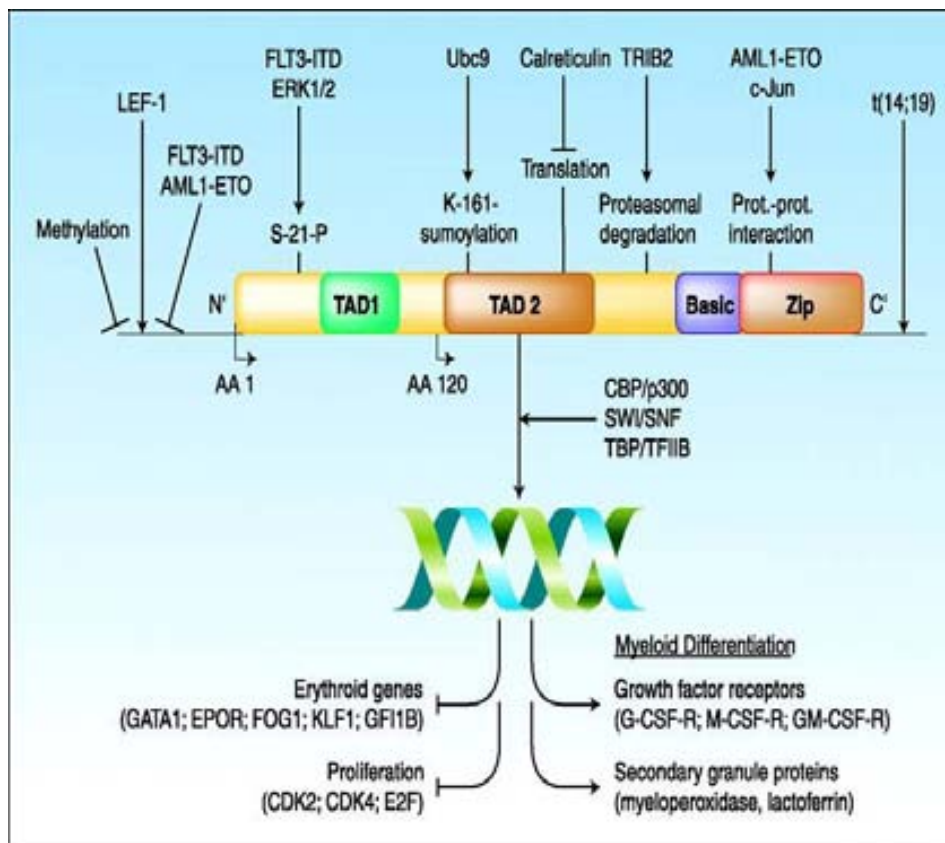


Figura 17. Dominios funcionales de CEBPA y mecanismos que provocan alteración de la regulación de CEBPA en la LMA. El ARNm traducido desde ATG en el aminoácido (AA) 1 codifica la proteína normal de 42-kDa CEBPA, mientras que la isoforma truncada de 30-kDa es traducida desde ATG en el AA120. El péptido iniciado en AA1 es truncado por mutaciones *frameshift* en la porción N-terminal mientras que las mutaciones *in-frame* de la porción C-terminal afectan a ambos péptidos (el de 42 y el de 30-kDa) (Pabst T, Clin Cancer Res 2009).

Las mutaciones de CEBPA pueden dividirse en dos grupos: 1) mutaciones en la porción C-terminal que causan una alteración de la dimerización y/o de la unión al ADN y 2) mutaciones en la porción N-terminal que causan un aumento de la traducción de una isoforma truncada de la proteína normal, de 30 kDa, con actividad inhibitoria sobre la proteína de 42 kDa (Figura 17). Algunos pacientes presentan una única mutación de

CEBPA, pero la mayoría presentan mutaciones bialélicas. El patrón más frecuente es la combinación de una mutación N-terminal junto con una mutación C-terminal localizada en diferentes alelos. Esto podría explicar por qué los pacientes con mutaciones de CEBPA no presentan otras anomalías genéticas adicionales, porque el segundo evento genómico en estos pacientes es la mutación adicional de CEBPA (Leroy H, *Leukemia* 2005; Pabts T, *Clin Cancer Res* 2009). Este hecho queda bien reflejado en los pacientes con LMA familiares y mutaciones de CEBPA.

Las mutaciones de CEBPA se han identificado en un 9% de todas las LMA y en un 15-20% de los pacientes con LMA y citogenética normal (Fröhling S, *J Clin Oncol* 2004; Bienz M, *Clin Cancer Res* 2005). Las mutaciones de CEBPA confieren un pronóstico favorable en los pacientes incluidos en el grupo citogenética de pronóstico intermedio y, tal y como se confirmó posteriormente, también en el grupo de pacientes con citogenética normal (Boissel N, *Blood* 2005; Fröhling S, *J Clin Oncol* 2004; Bienz M, *Clin Cancer Res* 2005).

Las LMA asociadas a mutaciones de CEBPA se caracterizan por presentar morfología M1 y M2 de la clasificación FAB y un fenotipo característico (CD7+, HLA-DR+, CD34+, CD15+) (Lin LI, *Clin Cancer Res* 2005; Marcucci G, *J Clin Oncol* 2008). Estas mutaciones de CEBPA no se han descrito en los pacientes con LMA y citogenética de buen pronóstico [inv(16), t(8;21), t(15;17)]. La asociación con mutaciones de FLT3 y NPM1 son poco frecuentes y no se ha encontrado asociación con la MLL-PTD (Fröhling S, *J Clin Oncol* 2004).

En la mayoría de los estudios realizados las mutaciones de CEBPA se relacionan con una mayor duración de la RC y a una supervivencia comparable a la de los pacientes con LMA de bajo riesgo (Preudhomme C, *Blood* 2002; Fröhling S, *J Clin Oncol* 2004; Pabst T, *Oncogen* 2007). Sin embargo, este impacto pronóstico favorable parece limitarse a los casos con dobles mutaciones de CEBPA y que no se asocian a otras alteraciones genéticas (FLT3-ITD, NPM1) (Pabst T, *Br J Cancer* 2009; Renneville A, *Blood* 2009; Wouters BJ, *Blood* 2009; Green C, *J Clin Oncol* 2010). Esta discrepancia en la evolución de los

pacientes con una o dos mutaciones podría explicarse porque la pérdida de función de CEBPA mediada por una mutación en un solo alelo no es suficiente para iniciar la LMA, por lo que requiere otros eventos mutacionales adicionales y de hecho, se ha descrito una mayor tendencia a presentar mutaciones de NPM1 y de FLT3-ITD en estos pacientes con mutaciones monoalélicas de CEBPA (Wouters BJ, Blood 2009). Recientemente se ha descrito que fenómenos epigenéticos, como la hipermetilación del promotor de CEBPA, pueden tener relevancia sobre el pronóstico en el grupo de pacientes con citogenética normal sin otras anomalías moleculares favorables asociadas (Lin TC, Leukemia 2011). CEBPA puede ser utilizado también como diana terapéutica. Los acercamientos más prometedores son los que promueven la activación de la diferenciación vía CEBPA mediante la utilización de pequeñas moléculas moduladoras de la expresión de este gen a nivel ARNm o proteico. Los inhibidores de la quinasa MAP/ERK o los inhibidores de FLT3 bloquean la fosforilación de CEBPA y esto se traduce en un incremento de la diferenciación granulocítica (Pabst T, Clin Cancer Res 2009).

1.4.7.1.4. Duplicación parcial en tándem del gen MLL (MLL-PTD)

La MLL-PTD fue la primera mutación que demostró afectar el pronóstico de pacientes con LMA y citogenética normal (Caligiuri MA, Cancer Res 1994). Se trata de pacientes en los que se detectan reordenamientos del gen MLL sin que se presenten alteraciones estructurales cromosómicas que afecten a la banda 11q23 ni al gen MLL, sino que presentan trisomía del cromosoma 11 o cariotipo normal. La MLL-PTD se detecta en aproximadamente un 5-11% de los pacientes con LMA y citogenética normal (Schnittger S, Leukemia 2000; Döhner K, J Clin Oncol 2002; Mrózek K, Blood 2007).

Los dos principales tipos de MLL-PTD dan lugar a una fusión *in-frame* de los exones 11 ó 12 por encima del exon 5 y una duplicación de la región N-terminal del MLL, dando lugar a una proteína más larga de lo normal. A diferencia de las proteínas de fusión quiméricas,

la MLL-PTD mantiene todos los dominios funcionales de la proteína MLL germinal, incluyendo el dominio SET C-terminal que confiere la actividad metiltransferasa. La presencia de la MLL-PTD conlleva el silenciamiento del alelo MLL germinal en las células leucémicas a través de diferentes mecanismos epigenéticos aberrantes (Whitman SP, Blood 2005; Whitman SP, Blood 2008 (2)).

Las características de este tipo de pacientes en el momento del diagnóstico no difieren de los pacientes con LMA con citogenética normal sin esta alteración molecular. Entre un 30% y un 40% de los pacientes con MLL-PTD presentan también una FLT3-ITD, mientras que es poco frecuente la coexistencia con mutaciones de CEBPA o NPM1 (Döhner K, Blood 2005; Fröhling S, J Clin Oncol 2004; Schnittger S, Blood 2005).

En cuanto a su impacto pronóstico, la MLL-PTD no afecta a la probabilidad de alcanzar la RC, ni a la SG, pero sí se asocia con una menor SLE y SLR (Döhner K, J Clin Oncol 2002; Schnittger S, Leukemia 2000, Muñoz L, Leukemia 2003). La duración de la RC también es significativamente más corta en estos pacientes, sobre todo si existen otros marcadores pronósticos negativos como la sobreexpresión de BAALC o la presencia de la FLT3-ITD (Whitman SP, Blood 2007)

Aunque no se han investigado fármacos con una acción específica sobre la MLL-PTD, se ha descrito que la combinación de decitabina, un inhibidor de la ADN-metiltransferasa, y depsipéptido, un inhibidor de las histona deacetilasas, pueden reactivar la transcripción del alelo MLL germinal en las células portadoras de la MLL-PTD (Whitman SP, Blood 2005). La inducción de la expresión del MLL germinal se asocia con un incremento de la muerte celular, lo que sugiere que estos tratamientos deberían ser investigados en estos pacientes.

1.4.7.1.5. Mutaciones de RAS

El oncogen RAS codifica una familia de proteínas de membrana que regulan la transducción de señales a través de la unión a diferentes receptores de membrana como KIT y FLT3. RAS juega un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular y en la apoptosis. Las mutaciones de N-RAS y K-RAS suelen ser mutaciones puntuales que casi siempre tienen lugar en los codones 12, 13 y 61, lo que da lugar a una activación constitutiva de la proteína RAS y de sus efectores como las quinasas MAPK/ERK, y esto provoca un aumento de la proliferación celular y una disminución de la apoptosis. Las mutaciones de N-RAS se han descrito en un 10-15% de los pacientes, siendo las mutaciones que afectan al codon 12 las más habituales. (Mrózek K, Blood 2007; Schlenk RF, N Engl J Med 2008).

Ninguno de los grandes estudios realizados han demostrado impacto pronóstico de las mutaciones de RAS, ni en los pacientes con citogenética normal ni en el grupo de citogenética de pronóstico intermedio en general (Illmer T, Clin Cancer Res 2005; Bowen D, Blood 2005; Bacher U, Blood 2006). Sin embargo, se ha observado que los pacientes con RAS mutado obtienen un mayor beneficio del tratamiento con altas dosis de citarabina, ya que el riesgo de recaída es menor en este grupo de enfermos (Illmer T, Clin Cancer Res 2005; Neubauer A, J Clin Oncol 2008).

Las mutaciones de RAS tienen interés desde un punto de vista terapéutico, ya que nuevos fármacos como los inhibidores de la farnesil-transferasa pueden inhibir la activación de RAS (Zhu X, J Hematol Oncol 2010).

1.4.7.1.6. Mutaciones en el gen del tumor de Wilms (WT1)

El gen del tumor de Wilms localizado en el cromosoma 11p13 es un importante regulador de la transcripción de genes implicados en el crecimiento y el metabolismo celular. Aunque inicialmente se consideró un gen supresor, también se ha demostrado que puede

actuar como un oncogen. La alteración de su función promueve la proliferación de los precursores hematopoyéticos y bloquea la diferenciación celular (King-Underwood L, Blood 1998). La expresión del gen WT1 se ha detectado en el 75-100% de las LMA y se ha utilizado como marcador de ERM en diferentes estudios. Las mutaciones de WT1 se han descrito en un 10-15% de las LMA con cariotipo normal, y habitualmente son inserciones o deleciones que afectan especialmente a los exones 7 y 9. El papel de WT1 en la leucemogénesis no es bien conocido. Se ha sugerido que las mutaciones de WT1 podrían alterar su habilidad para unirse a sus genes diana, incluyendo a los que codifican proteínas implicadas en la regulación de la hematopoyesis normal (RARA, CSF1), la apoptosis (BCL2, BCS2A1, BAK1), el ciclo celular (CCNE1, CDKN1A), la transcripción génica (MYC, PAX2, MYB, EGR1) y la proliferación celular (TGFB1, PDGFA) (Paschka P, J Clin Oncol 2008),

Las mutaciones de WT1 se asocian con frecuencia con otras alteraciones moleculares como la FLT3-ITD, las mutaciones de CEBPA y con una elevada expresión de ERG y BAALC. Por el contrario se observa una relación inversa con las mutaciones de NPM1 (Gaidzik VI, Blood 2009; Paschka P, J Clin Oncol 2008; Virappane P, J Clin Oncol 2008).

El significado pronóstico de las mutaciones de WT1 es controvertido. En algunos estudios se ha descrito una menor tasa de RC y una menor supervivencia en los pacientes con estas mutaciones (King-Underwood L, Blood 1998; Virappane P, J Clin Oncol 2008), mientras que en otros, este impacto pronóstico desfavorable, sobre todo sobre la supervivencia, sólo se observó cuando la mutación de WT1 se asociaba a la FLT3-ITD (Summers K, Leukemia 2007; Gaidzik VI, Blood 2009). Se ha sugerido que las diferentes dosis de citarabina utilizadas por los diferentes grupos en la consolidación podrían explicar estas discrepancias. Recientemente, Damm F y col. han observado que la presencia de un polimorfismo de WT1, en concreto del SNP rs16754, es un marcador de riesgo favorable en los pacientes con LMA y citogenética normal, y en especial en el subgrupo de

pacientes de alto riesgo en cuanto al estado mutacional de FLT3 y NPM1 (Damm F, J Clin Oncol 2010).

1.4.7.1.7. Mutaciones del gen AML1 (acute myeloid leukemia 1)/RUNX1

El gen AML1 (CBFA2 o RUNX1) se localiza en el cromosoma 21q22 y codifica para una de las dos subunidades que forman el complejo CBF. AML1 tiene un papel fundamental en la hematopoyesis, y la alteración de su función puede conllevar el desarrollo de una leucemia (Friedman AD, J Cell Physiol 2009).

AML1 es uno de los genes implicados con más frecuencia en la patogénesis de las leucemias, principalmente mediante translocaciones cromosómicas, mutaciones puntuales y amplificaciones. Las mutaciones puntuales de AML1 provocan una inactivación del gen y se han descrito tanto en LMA como en SMD. Y estas mutaciones puede ser germinales (LMA familiares asociadas a FPD/AML) o adquiridas (Renneville A, Leukemia 2008). La mayoría de los pacientes son heterocigotos para la mutación, pero también se han descrito homocigotos y dobles heterocigotos.

Las mutaciones adquiridas de AML1 se observan en un 6-10% de las LMA esporádicas con frecuencia similar en niños y en adultos, y son más frecuentes en SMD relacionados con tratamiento quimioterápico previo. Recientemente se ha descrito que las mutaciones de AML1 podrían estar implicadas en la transformación leucémica de las neoplasias mieloproliferativas (Ding Y, Blood 2009).

Las mutaciones de AML1 se observan con más frecuencia en hombres mayores de 60 años y predominan en las LMA M0 de la clasificación FAB (15-50%). Entre los grupos citogenéticos se observa una mayor incidencia de mutaciones de AML1 dentro de los grupos citogenéticos de riesgo intermedio (cariotipo normal 14%) y alto. Las mutaciones de AML1 se asocian a menudo a otras anomalías moleculares, en especial a la FLT3-ITD, MLL-PTD y FLT3-TKD. Pero también se han detectado mutaciones de p53 y N-RAS. La

combinación de mutaciones de AML1, FLT3-ITD y MLL-PTD en un mismo paciente no es un hallazgo infrecuente (10%) (Renneville A, Leukemia 2008, Tang JL, Blood 2009).

En cuanto al significado pronóstico de las mutaciones de AML1, a pesar de que aún no hay muchos estudios publicados, parece tener connotaciones pronósticas negativas tanto en las LMA en general como en el subgrupo de pacientes con citogenética normal (Tang JL, Blood 2009).

1.4.7.2. IMPACTO PRONÓSTICO DE LA SOBREENPRESIÓN DE GENES EN LA LMA CON CITOGÉNÉTICA NORMAL

1.4.7.2.1. Sobreexpresión del gen BAALC (brain and acute leukemia, cytoplasmic)

El gen BAALC, localizado en el cromosoma 8q22.3, codifica una proteína que no tiene homología con otras proteínas ni dominios funcionales conocidos. BAALC se expresa en las células CD34+ de la médula ósea, lo que sugiere que BAALC es un marcador de célula progenitora hematopoyética inmadura (Baldus CD, Exp Hematol 2003).

Las LMA que presentan sobreexpresión de BAALC suelen presentar morfología tipo M1 y M2 de la clasificación FAB y es frecuente la coexistencia de otras anomalías genéticas como FLT3-ITD, CEBPA, MLL-PTD y un incremento en la expresión de ERG (Langer C, Blood 2008; Metzeler KH, J Clin Oncol 2009).

En los pacientes con LMA y citogenética normal se ha demostrado que la sobreexpresión de BAALC se asocia a un peor pronóstico (Baldus Cd, Blood 2003; Bienz M, Clin Cancer Res 2005; Baldus CD, J Clin Oncol 2006). Pero ésta pierde su impacto pronóstico negativo cuando se asocia a otras anomalías moleculares recurrentes en la LMA como la FLT3-ITD o a la expresión elevada de ERG (Bienz M, Clin Cancer Res 2005; Langer C, Blood 2008). De forma que se ha sugerido que la sobreexpresión de BAALC puede ser un marcador de

mal pronóstico en los casos de LMA con citogenética normal sin FLT3-ITD ni mutaciones de CEBPA.

Las LMA con sobreexpresión de BAALC presentan un perfil de expresión génica caracterizado por un aumento de expresión de genes relacionados con la *stem cell* hematopoyética (CD133, CD34 y KIT), de genes como NM1, también asociado a una peor evolución de las LMA, y genes relacionados con mecanismos de resistencia a fármacos, como ABCB1 (MDR1) (Langer C, Blood 2008). Es posible que este fenotipo menos diferenciado y la sobreexpresión de genes asociados con la resistencia a fármacos contribuyan al peor pronóstico de estas leucemias.

1.4.7.2.2. Sobreexpresión de ERG (ETS-related gene)

El gen ERG, se localiza en el cromosoma 21q22 y forma parte de la familia de factores de transcripción ETS que están implicados en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Se ha objetivado sobreexpresión de ERG en LMA con cariotipos complejos que contienen amplificaciones crípticas del cromosoma 21 que no se detectan con el estudio cariotípico convencional. Pero también se ha descrito una expresión de ERG elevada sin amplificación genómica en pacientes con LMA con citogenética normal, lo que se ha sugerido como un posible factor pronóstico adverso en estos pacientes (Mrózek K, Blood 2007).

Las LMA con citogenética normal y sobreexpresión de ERG suelen presentar un mayor porcentaje de blastos al diagnóstico y una morfología mielóide inmadura o madura (M0-M2). Se ha descrito una mayor expresión de BAALC, de MN1 y una asociación con la FLT3-ITD (Marcucci G, J Clin Oncol 2007; Metzeler KH, J Clin Oncol 2009). Respecto al perfil de expresión génica de estas LMA, es interesante destacar la sobreexpresión del gen HEMGN que regula la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células

hematopoyéticas y cuya sobreexpresión se ha descrito en LMA refractarias (Marcucci G, J Clin Oncol 2007).

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

1.4.7.2.3. Sobreexpresión del gen MN1 (meningioma 1)

El gen MN1 se localiza en el cromosoma 22q12 y codifica una proteína que actúa como coactivadora de la transcripción del complejo receptor ácido retinoico/receptor retinoico X (RAR/RXR). Fue identificado por primera vez en el caso de un meningioma asociado a la t(4;11), y en neoplasias mieloides se describió inicialmente fusionado con el gen TEL en la t(12;22). Se ha descrito que los niveles elevados de MN1 se asocian con sobreexpresión de BAALC, y presentan una relación inversa con las mutaciones NPM1 (Heuser M, Blood 2006), aunque esto último no se ha confirmado en otro estudio posterior (Langer C, J Clin Oncol 2009).

Todavía no existen muchos datos sobre el significado pronóstico de MN1 en la LMA con citogenética normal. En dos de los trabajos publicados se investigó el valor pronóstico de MN1 en el contexto de otros marcadores moleculares y, en ambos, se objetivó que la sobreexpresión de MN1 fue un factor pronóstico independiente que se asoció a una

menor probabilidad de conseguir RC y a una menor supervivencia (Heuser M, Blood 2006; Langer C, J Clin Oncol 2009).

Los mecanismos por los que MN1 interviene en la leucemogénesis no son bien conocidos. En modelos murinos se ha objetivado que MN1 es un potente oncogen que puede desencadenar una leucemia por sí solo al promover la proliferación/autorreplicación y bloquear la diferenciación (Heuser M, Blood 2007).

En estudios de expresión génica y de microARN se demuestra que las LMA con sobreexpresión de MN1 tienen un perfil característico. Se observó que estas leucemias comparten características biológicas con las de los pacientes con sobreexpresión de BAALC, como sería el aumento de función de genes implicados en la quimiorresistencia, y con las LMA con NPM1 germinal como sería la disminución de la expresión de los genes HOX. Los microARN que se asocian con aumento de la expresión de MN1 son aquellos relacionados con un aumento de la actividad proangiogénica de VEGF y con los que regulan la diferenciación a monocito/macrófago. Por este motivo se sugiere que la expresión aberrante de MN1 podría contribuir a la leucemogénesis afectando los mecanismos que controlan la función y diferenciación de monocitos/macrofagos (Langer C, J Clin Oncol 2009).

1.4.7.3. OTRAS ALTERACIONES GENÉTICAS CON SIGNIFICADO PRONÓSTICO EN LAS LMA CON CITOGENÉTICA NORMAL

- **Sobreexpresión de EVI-1**

El protooncogen EVI-1 se localiza en el cromosoma 3q26. Está implicado en la patogénesis de las LMA y SMD que presentan reordenamientos que afectan a esta localización y se caracterizan por presentar mal pronóstico. EVI-1 se expresa en un 8-10% de LMA sin alteraciones de 3q26 (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S,

Blood 2003; Lugthart S, Blood 2008; Gröschel S, J Clin Oncol 2010). La sobreexpresión de EVI-1 en estas LMA se asocia a determinadas anomalías citogenéticas como son la monosomía del cromosoma 7 (sola o con otras anomalías citogenéticas diferentes a cariotipo complejo) y a alteraciones del cromosoma 11q23. Por el contrario, prácticamente no se observa expresión de EVI-1 en LMA con citogenéticas de buen pronóstico ni con mutaciones de NPM1 (Gröschel S, J Clin Oncol 2010).

La expresión de EVI-1 en estos pacientes representa un factor de mal pronóstico ya que se asocia a una menor tasa de RC, y a una menor SLR y EFS e incluso a menor SG en algunos estudios (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Blood 2003; Lugthart S, Blood 2008; Gröschel S, J Clin Oncol 2010). Este mal pronóstico se hace más evidente en el grupo citogenético de pronóstico intermedio incluyendo a los pacientes con citogenética normal. La expresión de EVI-1 se ha observado especialmente en el subgrupo de pacientes con citogenética normal y sin mutaciones de NPM1 ni CEBPA ni presencia de la FLT3-ITD (66% sobreexpresión de EVI-1) (Gröschel S, J Clin Oncol 2010).

- **Mutaciones en los genes IDH**

Recientemente se han identificado mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 que codifican para la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2. Estas mutaciones descritas inicialmente en pacientes con gliomas malignos, se han observado también en pacientes con LMA y especialmente en aquellos con cariotipo normal. Las mutaciones de IDH1 se detectan en un 11-14% de casos con citogenética normal y las de IDH2 en el 13-19% de los casos (Mardis ER, N Eng J Med 2009; Marcucci G, J Clin Oncol 2010; Thol F, Blood 2010). Las mutaciones de IDH1 e IDH2 son mutuamente excluyentes.

Las mutaciones de IDH1 se observan con frecuencia asociadas al genotipo NPM^{mut}/FLT3-ITD⁻, y son leucemias que presentan menor incidencia de mutaciones de WT1, CEBPA y FLT3-ITD (Marcucci G, J Clin Oncol 2010). Las mutaciones de IDH2 son más frecuentes

en pacientes de edad avanzada, sobre todo la mutación R172 (77% de los casos son pacientes >60 años). La mutación R172 no se asocia con ninguna de las mutaciones recurrentes observadas en la LMA con citogenética normal, lo que sugiere que se trata de un subtipo diferente de leucemia, tal y como reflejan los resultados de perfil genético y de microARN (Marcucci G, J Clin Oncol 2010). El significado pronóstico de estas mutaciones aún no está bien establecido, aunque podrían conferir peor pronóstico en algunos subgrupos de LMA y citogenética normal (Marcucci G, J Clin Oncol 2010; Wagner K, J Clin Oncol 2010).

- **Mutaciones en el gen DNMT3A**

El gen DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) codifica una ADN metiltransferasa, una enzima que cataliza la adición de grupos metilo a los residuos de citosina de dinucleótidos CpG. La alteración en la metilación de citosinas puede contribuir al desarrollo de tumores mediante la disminución de la expresión de genes supresores tumorales que se encuentran hipermetilados en las células neoplásicas. La inhibición de las ADN metiltransferasa es uno de los mecanismos de acción de fármacos como la 5-azacitidina o la decitabina.

Aunque existen todavía escasos datos en la literatura acerca de las mutaciones de DNMT3A, dos estudios publicados recientemente han revelado que las mutaciones de DNMT3A son una alteración recurrente en LMA *de novo* y que tienen un impacto pronóstico negativo (Ley TJ, N Engl J Med 2010; Yan XJ, Nat Genet 2011). Se han descrito diferentes tipos de mutaciones pero la más frecuente afecta al aminoácido R882, siendo la variante R882H la más habitual. Estas mutaciones se han detectado en un 20% de las LMA *de novo*, especialmente en LMA con citogenética de pronóstico intermedio (33,7%) y, dentro de este grupo, en pacientes con citogenética normal (36,7%); asimismo, existe una asociación con los subtipos M4 y M5 de la clasificación FAB. Por el

contrario, no se han detectado mutaciones de DNMT3A en las LMA con citogenética de buen pronóstico y es anecdótica su asociación con alteraciones cromosómicas del 11q23 (Ley TJ, N Engl J Med 2010; Yan XJ, Nat Genet 2011). Es importante destacar que las mutaciones de DNMT3A se asociaron con una menor SG y EFS independientemente de la edad y de la presencia de mutaciones de FLT3 y de NPM1, tanto en el grupo de pacientes de riesgo intermedio como en los pacientes con citogenética normal (Ley TJ, N Engl J Med 2010; Yan XJ, Nat Genet 2011). Según los autores, DNMT3A no causa inestabilidad genómica, ni altera el patrón de metilación global ni el de expresión génica de las LMA de forma significativa, pero probablemente es un gen relevante en la patogénesis de la LMA. Las mutaciones de DNMT3A se han estudiado también en otras neoplasias mieloides. Se han detectado en el 8% de los SMD *de novo* y en el 10% de las NMPC, especialmente en LMA secundarias a NMPC y en la mielofibrosis idiopática. En los pacientes con SMD estas mutaciones se han asociado de forma significativa con una menor SG y con una progresión más rápida a LMA (Walter MJ, Leukemia 2011). En las NMPC se sugiere que las mutaciones de DNMT3A podrían ser relevantes en la evolución clonal de las NMPC (Stegelmann F, Leukemia 2011).

- **Mutaciones de TET2**

Las mutaciones de TET2 (ten-eleven-translocation 2) se han descrito en diferentes neoplasia mieloides: SMD y LMA secundarias (23-26%), neoplasias mieloproliferativas crónicas (14%), LMMC (15-22%) y en un 12-17% de LMA *de novo* (Bacher U, Annal Hematol 2010; Nibourel O, Blood 2010; Abdel-Wahab O, Blood 2009). Los resultados preliminares indican que estas mutaciones predicen un pronóstico favorable en los SMD y desfavorable en las LMMC, pero en la LMA *de novo* aún no está bien establecido el significado pronóstico de las mutaciones de TET2.

1.5. MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS AL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

1.5.1. TÉCNICAS UTILIZADA EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y SEGUIMIENTO DE LA LMA

- **Técnica de PCR**

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar secuencias de interés a partir de pequeñas cantidades de ADN de muestras biológicas. Con este método se obtienen millones de copias de las originales. El método comienza con la hibridación de un oligonucleótido sintético de 10-20 bases (sonda) a una secuencia de ADN específica, denominadas *primers* o cebadores, que flanquea en los dos extremos la secuencia de interés. Todo ello es posible mediante una ADN polimerasa termoestable (Taq-polimerasa) que hace copias de la secuencia elegida (extensión).

La repetición cíclica de la hibridación-extensión, con un termociclador automático, permite una gran amplificación (hasta un millón de veces) del segmento de ADN en estudio.

En caso de estudiar ARN, se requiere un paso previo de conversión a ADN complementario (ADNc) por medio de una transcriptasa inversa, antes de aplicar la técnica estándar de PCR.

- **PCR cuantitativa en tiempo real**

El método de PCR cuantitativa más utilizado es el que emplea sondas TaqMan y que se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq-polimerasa y en la amplificación mediante PCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que se quiere amplificar. La sonda TaqMan tiene un fluorocromo y un amortiguador de fluoresceína. Además, esta sonda está fosforilada en 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR.

Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq-polimerasa degradará la sonda TaqMan, liberando el fluorocromo que emitirá una señal que es captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de PCR, por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción de PCR. Además, la Taq-polimerasa no digiere la sonda libre, sino la hibridada, por lo que la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado.

La medición de la señal de fluorescencia se realiza de forma continua, lo que proporciona una información dinámica en tiempo real del proceso. De esta forma puede establecerse el ciclo umbral (CT), es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a la vez se correlaciona directamente con la cantidad de ADNc de la secuencia diana. La cuantificación del número de copias en una muestra se realiza mediante la comparación de la CT de la muestra problema con la CT de una serie de diluciones de una muestra control positiva. La cuantificación de la muestra control positiva (generalmente un número conocido de copias de plásmido que contiene la secuencia diana) permite establecer una curva estándar que refleja el número de copias y el número de ciclo en que fue posible su detección de forma objetiva y reproducible (Figura 18).

Cuando se realiza la cuantificación de la muestra problema, el ciclo umbral de su detección se lleva a la curva estándar, lo que permite conocer el número de copias de la secuencia diana que tiene la muestra que se analiza. Además, para la cuantificación del ARN tumoral del que se parte, se deberá tener en cuenta la eficiencia de la reacción de transcripción inversa, ya que esto condiciona el número de copias de ADNc.

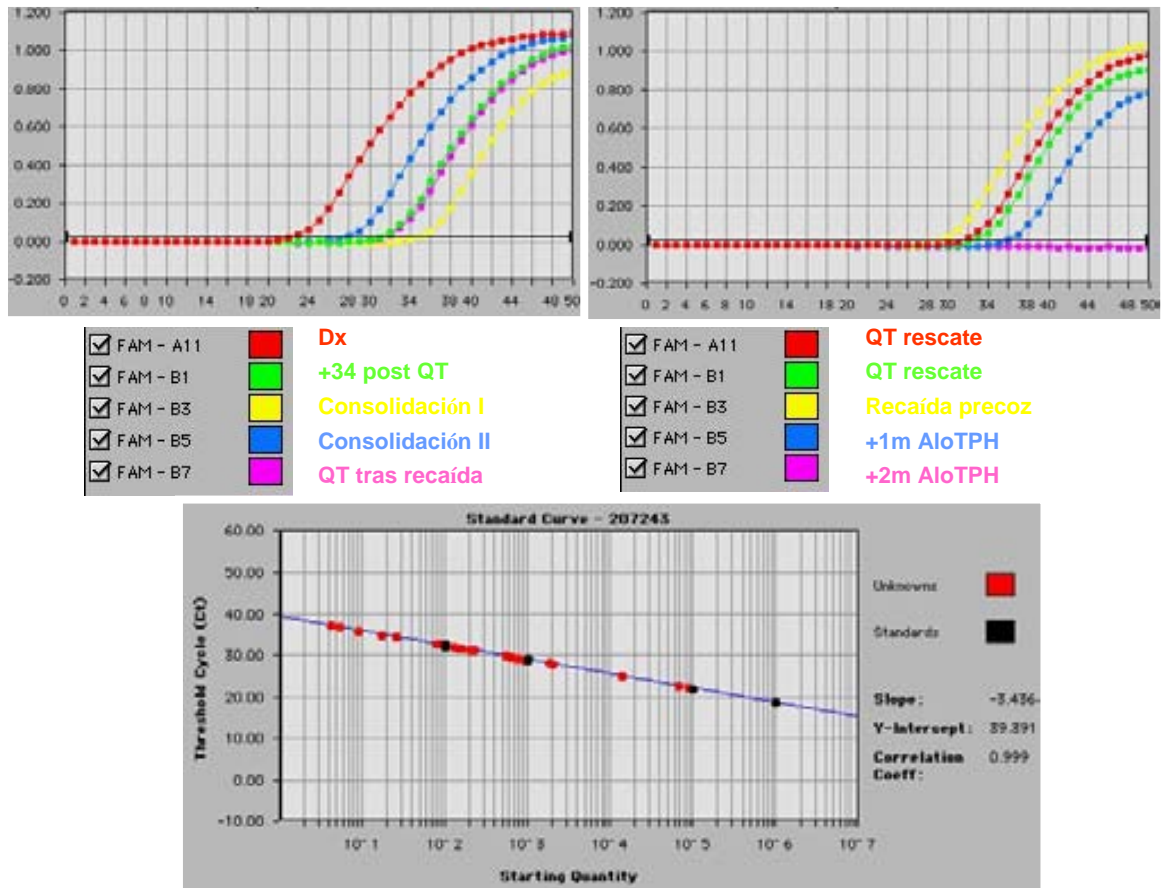


Figura 18. Diagnóstico y seguimiento de un paciente con LMA con inv(16) utilizando PCR cuantitativa. Cada una de las curvas corresponde a diferentes controles realizados durante el seguimiento del paciente. La cuantificación del transcrito quimérico se establece en relación a una curva estándar que refleja el número de copias. QT: quimioterapia; alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

La técnica de la PCR en tiempo real es una de las técnicas más utilizadas en el estudio de la ERM puesto que tiene una alta sensibilidad, del orden de 10^{-5} - 10^{-6} ; es decir, puede detectar una célula leucémica entre un millón de células normales. Una premisa imprescindible para la aplicación de la PCR en el estudio de la ERM es que la región de ADN que se va a amplificar sea un marcador específico de célula leucémica. Las dianas más utilizadas son los reordenamientos clonales de los genes de las Ig o del receptor de la célula T y las translocaciones cromosómicas presentes en algunas leucemias agudas, como son la t(9;22), la t(8;21), inv(16)/t(16;16) y la t(15;17). Esto hace que sea una

técnica con una alta especificidad, pero que no puede ser utilizada en casos en los que no hay ningún marcador molecular. En este sentido se ha trabajado mucho para estandarizar esta metodología para su utilización no sólo en el diagnóstico, sino también en el seguimiento de la ERM (van Dongen JJM, *Leukemia* 1999; Gabert J, *Leukemia* 2003).

1.5.2. APORTACIONES DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS DE ANÁLISIS GENÓMICO AL ESTUDIO DE LA LMA

En los últimos años la introducción de nuevas tecnologías de análisis global como los *microarrays* de ADN ha aportado nuevos conocimientos en el estudio de la LMA (revisado en Camós M, *Haematologica* (edición española) 2009). Este tipo de estudio molecular se basa en el hecho de que sólo una fracción de los genes codificados en el genoma de cada célula se expresan, es decir, se transcriben a un ARNm. La cantidad de ARN mensajero para cada gen depende del tipo celular y del estadio de diferenciación, de la actividad de las vías reguladoras intracelulares y de la influencia de los estímulos extracelulares.

Los estudios de expresión génica se han aplicado en la LMA con diferentes finalidades: predecir subtipos de LMA por sus características genéticas/moleculares o por su pronóstico, identificar nuevos subgrupos de LMA e identificar los genes o vías implicadas en la leucemogénesis en determinados tipos de LMA (Wouters BJ, *Blood* 2009 (2)). Mediante el estudio del perfil de expresión génica se pueden identificar de forma consistente los casos de LMA y citogenética favorable [t(15;17) y LMA con afectación del CBF] y las mutaciones de CEBPA bialélicas (Marcucci G, *J Clin Oncol* 2008; Verhaak RG, *Haematologica* 2009). Dentro de las LMA con afectación del CBF estos estudios han permitido identificar subgrupos con diferente evolución clínica, en los que se han podido identificar distintas vías patogénicas implicadas (Mrózek K, *Curr Opin Oncol* 2008).

Recientemente se han incorporado otras técnicas de análisis, como el estudio de niveles de microARN (miARN), *arrays* para análisis de cambios en el número de copias de ADN

(SNP-arrays, HGC-arrays), estudios epigenéticos y la secuenciación del ADN genómico. De forma similar al ARNm, se han identificado perfiles de miARN en algunos subtipos de LMA (Garzon R, Blood 2008, Marcucci G, N Eng J Med 2008). Diferentes estudios de SNP-arrays han demostrado un patrón de inestabilidad genómica y una presencia relativamente común de pérdida de heterocigosidad a través de un mecanismo de UPD en LMA (Wouters BJ, Blood 2009 (2))

1.5.3. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA MEDIANTE PCR EN PACIENTES CON LMA Y DE SU SIGNIFICADO PRONÓSTICO EN LOS PACIENTES EN REMISIÓN COMPLETA CITOLÓGICA

Los primeros estudios que realizaron un seguimiento de las LMA con marcadores moleculares utilizaron la técnica de PCR cualitativa pero, con la introducción de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, ésta se ha convertido en el método de elección para realizar el seguimiento de la ERM en estos pacientes. La PCR cuantitativa es 1 log menos sensible respecto la *nested* PCR, pero aporta toda una serie de ventajas.

Mediante esta técnica se pueden analizar diferentes aspectos de las LMA como son la ratio del transcrito al diagnóstico, la cinética de reducción de la clona leucémica y la detección precoz de la recaída.

Como dianas de la PCR se pueden utilizar: 1) transcritos de genes de fusión, 2) genes mutados cuantificables mediante la utilización de cebadores específicos para la mutación, 3) expresión aberrante de genes. Con excepción de la expresión aberrante de genes, la mayoría de dianas son muy específicas de las células leucémicas, por tanto su detección en la médula ósea o en la sangre de pacientes con LMA en remisión tras tratamiento intensivo se ha usado como marcador de ERM. La idea inicial es que aquellos pacientes en RC con ERM positiva inevitablemente recaerían como consecuencia de un fallo del

tratamiento para eliminar completamente la clona leucémica, mientras que aquellos pacientes sin ERM deberían permanecer en RC. Aunque esta estrategia se utiliza con éxito para predecir la evolución clínica de la LPA, su uso como marcador pronóstico en otros subtipos del LMA todavía es motivo de discusión. En algunos casos, la detección de ERM durante la RC no es indicativa de recaída inminente y por el contrario la presencia de una PCR negativa de forma persistente no siempre es sinónimo de una RC duradera. Estos datos apoyan la hipótesis de que diferentes tipos moleculares de LMA pueden tener diferencias biológicas y por tanto un comportamiento diferente. A la hora de interpretar un resultado obtenido mediante PCR también se tienen que tener en cuenta las condiciones de la técnica, ya que el uso de una PCR muy sensible (10^5 - 10^6) necesita muchas precauciones para evitar contaminación y dar lugar a resultados falsos positivos. Por el contrario, el uso de PCR con inferior sensibilidad puede no detectar pequeñas, pero potencialmente importantes, cantidades de tumor residual, dando lugar a falsos negativos.

Actualmente la monitorización de la ERM mediante técnicas de PCR es una herramienta imprescindible en el manejo clínico de la LPA (Sanz MA, Blood 2009). Con la utilización de técnicas de PCR cualitativa convencional de baja sensibilidad (1 célula entre 10^3 - 10^4 células) se observa una buena correlación entre el estatus de la ERM y la evolución de esta enfermedad (Lo Coco F, Blood 1999). En estos pacientes la negatividad persistente de la PCR durante el seguimiento se asocia a una larga supervivencia y una baja probabilidad de recaída; por el contrario, la persistencia de transcrito PML-RARA al final del tratamiento de consolidación (2-8% de los pacientes) ó la positividad de la PCR (dos PCR positivas consecutivas se considera recaída molecular) durante el seguimiento en pacientes que habían alcanzado la remisión molecular es altamente predictivo de recaída. Dado que la mayoría de las recaídas en pacientes con LPA tienen lugar dentro de los 3 primeros años desde el fin del tratamiento y, que la cinética de la recaída es rápida,

se recomienda realizar la monitorización de la ERM mediante PCR cada 3 meses durante 3 años, siendo la médula ósea la muestra preferida para la determinación frente a la sangre periférica por obtenerse una mayor sensibilidad (Sanz MA, Blood 2009).

En este tipo de leucemia, en la que la recaída franca se acompaña de un alto riesgo de muerte por hemorragia y en la que la probabilidad de supervivencia se ve claramente disminuida cuando el tratamiento de rescate se instaura en recaída hematológica, está justificado iniciar el tratamiento preventivo una vez se detecta la recaída molecular. Los estudios que han valorado esta estrategia han observado una clara ventaja en cuanto a supervivencia y tolerancia de los tratamientos, utilizando tanto regímenes que combinan ATRA con quimioterapia, como los que utilizan trióxido de arsénico (Esteve J, Leukemia 2007; Grimwade D, J Clin Oncol 2010).

A pesar de que la PCR cuantitativa ofrece ventajas respecto a la cualitativa y de que se han llevado a cabo diferentes estudios empleando esta técnica en LPA, no existe consenso de cual es el nivel de transcrito que discrimina entre pacientes de alto y bajo riesgo de recaída ni está definido el calendario óptimo de monitorización. En el estudio de Santamaria C y col. estratificaron a los pacientes en diferentes grupos de riesgo de recaída en función del número de copias del transcrito detectado durante el seguimiento (bajo riesgo: <1 copia, riesgo intermedio: 1-10 copias y alto riesgo: >10 copias). Los pacientes de alto riesgo presentaron una RFS entre el 0-14% (Santamaria C, Haematologica 2007).

1.5.3.1. SEGUIMIENTO DE LA ERM MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR EN LMA CON t(8;21)/AML1-ETO

- **Aportaciones de la PCR cualitativa**

En la década de los 90, se llevaron a cabo diferentes estudios piloto que utilizaban esta metodología para determinar si la detección de AML1-ETO en muestras de pacientes en remisión era indicativo de persistencia de la enfermedad y definía riesgo de recaída. Los resultados de los estudios iniciales, algunos de los cuales utilizaron PCR cualitativas muy sensibles ($1:10^{-5}$ - 10^{-6}), sugerían que la persistencia del gen AML1-ETO durante la remisión era compatible con una hematopoyesis normal y una RC persistente, incluso tras trasplante alogénico (Nucifora G, Blood 1993; Kusec R, Leukemia 1994; Saunders MJ, Leuk Res 1994; Jurlander J, Blood 1996) (Tabla 14). Esto va a favor del modelo cooperativo de mutaciones de la LMA, según el cual AML1-ETO no es por sí mismo leucemogénico y necesita un segundo evento genómico adicional para inducir una proliferación incontrolada de los blastos residuales (Miyamoto T, Proc Natl Acad Sci USA 2000). Estos datos contrastan con los de otros grupos que sugieren que la negatividad de la PCR se puede alcanzar tras tratamiento intensivo y que es predictiva de RC (Satake N, Br J Haematol 1995; Elmaagacli AH, Blood 1997; Preudhomme C, Leukemia 1996) (Tabla 14). Destaca el estudio realizado por Morschhauser y col. en el que se emplearon dos técnicas de PCR con diferente sensibilidad ($1:10^6$ y $1:10^5$) (Morchhauser F, J Clin Oncol 2000). Este estudio demostró: 1) que era posible conseguir la negativización de la PCR y que este hecho se asociaba con una RC más duradera, 2) que la utilización de la PCR podría ser útil para valorar la respuesta inicial al tratamiento y ajustar así la terapia de los pacientes en función del riesgo de recaída y 3) que la utilización de PCR con menor sensibilidad (*one-step* PCR) se correlacionaba mejor con la evolución clínica de la enfermedad. Esto último indica que cuando se utiliza una técnica con mayor sensibilidad la

utilidad clínica de la PCR es menor, tal y como se observó en los estudios realizados en la LPA (PML-RARA) (Lo Coco F, Blood 1999; Tobal K, Br J Haematol 1995). A pesar de estos resultados, algunos pacientes que negativizaron la PCR recayeron, lo que sugiere que un resultado negativo no significa erradicación completa de la clona leucémica o bien que la cantidad de población blástica residual no se puede detectar porque está por debajo del límite de detección de la técnica utilizada.

El análisis de los datos sugiere que es difícil establecer el criterio para predecir la evolución clínica de la LMA con t(8;21) sólo en base al resultado positivo o negativo de la PCR cualitativa.

- **Aportaciones de la PCR cuantitativa**

La utilización de la PCR cuantitativa es más útil que la cualitativa para estimar la masa de la población clonal residual en los pacientes con LMA. Los estudios realizados intentan establecer un valor crítico de PCR que permita predecir la curación o la recaída. El problema de estos estudios es que discrepan en la definición de este valor crítico y en el momento de la evolución en el que se han de aplicar. Uno de los primeros estudios publicados que utilizaba la PCR cuantitativa utilizaba una metodología muy compleja y difícil de aplicar en largas series de pacientes, pero los autores definieron un nivel crítico de transcrito que predecía mayor riesgo de recaída, tanto en sangre periférica como en médula ósea (Tobal K, Blood 2000). La introducción de un método automatizado (Real Time PCR, o Taqman PCR) ha simplificado la determinación cuantitativa de los transcritos mediante PCR. A partir de este momento diferentes estudios piloto se realizaron utilizando esta metodología. Todos estos estudios demostraron que 1) la expresión del transcrito quimérico varía de forma significativa entre diferentes pacientes al diagnóstico, 2) que tras la quimioterapia de inducción se observa una disminución del transcrito de alrededor de 2-4 log y 3) que los niveles de AML1-ETO incrementan

Tabla 14. Estudios que analizan la ERM utilizando PCR cualitativa en pacientes con LMA con t(8;21)

Referencias	Pacientes	Muestra	Método PCR	Sensibilidad	Comentarios
Nucifora 1993	6	MO / SP	<i>One-step</i>	NE	Resultados positivos no predicen recaída
Kusec 1994	5	MO / SP	<i>Nested</i>	1:10 ⁵	Resultados no concluyentes
Saunders 1994	7	MO / SP	<i>Nested</i>	1:10 ⁵	Resultados positivos no predicen recaída
Satake 1995	23	MO / SP	<i>Nested</i>	NE	Resultados negativos predicen RCC
Preudhomme 1996	11	MO	<i>Nested</i>	1:10 ⁵	Resultados negativos predicen RCC
Miyamoto 1996	22	MO / SP	<i>Nested</i>	1:10 ⁷	Resultados positivos no predicen recaída
Jurlander 1996	10	MO / SP	<i>Nested</i>	1:10 ⁶	Resultados positivos no predicen recaída
Morschhauser 2000	50	MO / SP	<i>One-step</i>	1:10 ⁵	Resultados positivos predicen recaída
			<i>Nested</i>	1:10 ⁶	Resultados negativos predicen RCC

MO: médula ósea; SP: sangre periférica; NE: no especificada; RCC: remisión completa duradera

cuantitativamente antes de la recaída y disminuyen nuevamente después de otra línea de quimioterapia o después de la infusión de linfocitos de donante. No ha sido posible establecer un valor crítico predictivo de recaída o RC estable debido, posiblemente, al escaso número de pacientes analizados. La cantidad de transcrito de fusión detectable al diagnóstico se ha asociado a una menor supervivencia sólo en algunos estudios (Schnittger S, Blood 2003; Yoo SJ, Haematologica 2005). Sin embargo, todos los estudios coinciden en subrayar la importancia de la disminución de la cantidad de transcrito inicial un mínimo de 2 log después del tratamiento de inducción, puesto que este hecho se asocia con una mayor duración de la RC (Leroy H, Leukemia 2005 (2); Krauter J, Clin Oncol 2003; Viehmann S, Leukemia 2003; Stentoft J, Leuk Res 2006; Weisser M, Leukemia 2007) (Tabla 15). Para que la RC se mantenga se necesita la negatividad persistente de la PCR, ya que un aumento de la cantidad de transcrito, aunque sea de forma puntual, se asocia con mayor riesgo de recaída (Krauter J, Clin Oncol 2003). Este hecho está en discordancia con los resultados de un estudio realizado en niños en el que mostraban que la detección de un pequeño porcentaje de copias durante el seguimiento (>10 copias) fue compatible con una RC duradera (Viehman S, Leukemia 2003). Por otro lado, la cinética de la recaída en este tipo de leucemias es muy rápida, ya que muchos de los pacientes que recayeron tenían un resultado previo de PCR negativo, por lo que se recomienda la monitorización cada 3 meses (Krauter J, Clin Oncol 2003).

1.5.3.2. SEGUIMIENTO DE LA ERM MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR EN LMA CON INV(16)/T(16;16)/CBFB-MYH11

- **Aportaciones de la PCR cualitativa**

En los primeros estudios realizados en los pacientes con LMA con CBFB-MYH11 se observó que la conversión de una PCR positiva a negativa era necesaria para permanecer

Tabla 15. Estudios que han analizado el significado pronóstico de la ERM mediante PCR cuantitativa en pacientes con LMA y t(8;21)

Autor	Revista / Año	Nº casos	Impacto ratio inicial	Control	Valor crítico (%)	Comentario	Comparación MO / SP
Schnittger	Blood 2003	106	SG, SLE	I1, I2, C	0,003%	C: SLE, SG Score que combina ratio al diagnóstico y ratio tras C	NA
Viehmann (niños)	Leukemia 2003	15	NA	C	NA	Descripción de la cinética durante el seguimiento	NA
Krauter	J Clin Oncol 2003	22			1%	I: RR	
Leroy	Leukemia 2005	21	SLR	I, C	I: 3 log C: 5 log	I: RR C: RR Verifica el score propuesto por Schnittger S.	Sensibilidad similar
Yoo	Haematolog 2005	21	SLE	RC, C o TPH	CR: 3 log	CR: SLR, SLE	Buena correlación
Stentoft	Leuk Res 2006	11	NA	I	I: 2 log	I: SLE	Alta correlación
Weisser	Leukemia 2007	45	NA	I, C	I: 0,003% C: 0,003%	I: IAR, SLE, SLR C: IAR, SLE, SG	NA

MO: médula ósea; SP: sangre periférica; NA: no analizado; I: post-inducción; I1: inducción 1; I2: inducción 2; C: post-consolidación; RC: remisión completa; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos; SLR: supervivencia libre de recaída; SLE: supervivencia libre de enfermedad; IAR: incidencia acumulada de recaída; RR: riesgo de recaída; SG: supervivencia global.

en RC (Costello R, Blood 1997). Pero la negativización de la PCR en este tipo de leucemias puede producirse de forma tardía, incluso hasta 24 meses después del diagnóstico (Martin G, Haematologica 2000) (Tabla 16). Este hecho pone de manifiesto el valor pronóstico incierto de un resultado de PCR positivo obtenido en algún momento de la remisión y se recomienda que siempre se confirme este resultado en otra muestra en un plazo corto de tiempo. Esta estrategia, que ya se utiliza con éxito en la monitorización molecular de la LPA (Sanz MA, Blood 2009), evita los problemas de los falsos positivos debidos a contaminación o malinterpretación de los resultados y permite identificar pacientes en los que está disminuyendo el transcrito y que están pasando de un estado positivo a negativo.

Aunque la negativización del PCR se considera que es un requisito muy importante para una evolución clínica favorable, los resultados negativos no garantizan siempre una RC duradera. En diferentes estudios se identifican casos de pacientes con PCR repetidamente negativas que recayeron (Martinelli G, Bone Marrow Transplant 1999; Laczika K, Leuk Lymphoma 2001). En estos casos no se puede descartar que estos resultados negativos fueran consecuencia de la limitación de la técnica. Por este motivo se recomienda seguir una serie de criterios a la hora de valorar una muestra en RC como negativa (Marcucci G, Blood 1997; Marcucci G, Eur J Haematol 2003).

La variabilidad en el tiempo que puede tardar en negativizar la PCR y el valor predictivo incierto de los valores negativos hacen que sea difícil utilizar la PCR cualitativa para predecir la evolución de estos pacientes únicamente en base a la presencia o ausencia del transcrito de fusión. Por este motivo, se han realizado estudios para valorar la utilidad de la PCR cuantitativa.

- **Aportaciones de la PCR cuantitativa**

Los primeros estudios que utilizaron técnicas de PCR cuantitativa observaron, igual que con la PCR cualitativa, que la disminución del número de copias de CFBF-MYH11 ocurría de una forma variable en el tiempo y que el grado de reducción en el nivel del transcrito predecía la evolución del paciente. En ninguno de estos estudios se consiguió identificar un valor crítico predictivo de recaída en los pacientes en RC (Laczika K, J Clin Oncol 1998; Evans PA, Leukemia 1997). En ambos estudios el número de pacientes era muy

Tabla 16. Estudios que analizan la ERM utilizando PCR cualitativa en pacientes con LMA con inv(16)/t(16;16)

Referencia	Pacientes	Muestra	Método PCR	Sensibilidad	Comentarios
Costello 1997	10	MO / SP	<i>One-step</i>	1:10 ⁴	Resultados positivos predicen recaída y los negativos RCC
Elmaagacli 1998	10	MO / SP	<i>Nested</i>	1:10 ⁴	Resultados positivos predicen recaída y los negativos RCC
Martinelli 1999	19	NE	<i>NE</i>	1:10 ⁵ -1:10 ⁶	Resultados negativos predicen RCC
Martin 2000	15	MO	<i>Nested</i>	1:10 ⁵	Resultados positivos predicen recaída y los negativos RCC
Laczika 2001	11	MO / SP	<i>Nested</i>	1:10 ⁵	Resultados positivos predicen recaída y los negativos no son concluyentes

MO: médula ósea; SP: sangre periférica; NE: no especificado; RCC: remisión completa duradera

pequeño, los tratamientos empleados eran diferentes y, la técnica de PCR cuantitativa utilizada tenía muchas limitaciones para ser usada de forma habitual.

Tabla 17. Estudios que han analizado el valor pronóstico de la ERM mediante PCR cuantitativa en pacientes con LMA e inv(16)/t(16;16)

Autor	Revista / Año	Nº casos	Impacto ratio inicial	Control	Valor crítico (%)	Comentario
Marcucci	Leukemia 2001	16	NA	C, fin QT	10 copias	Fin QT: RR
Guerrasio	Leukemia 2002	16	NS	I, C	I: 100 copias C: 10 copias	I: RR C: RR
Buonamici	Blood 2002	21	NA		<0,12% >0,25%	Valor que predice curación Valor que predice recaída
Schnittger	Blood 2003	122	SG, SLE	I1, I2, C	0,014%	C: SG, SLE
Krauter	J Clin Oncol 2003	15	NA		1%	RC: SLR
Martinelli	Leukemia 2003	19	NA		>12 >25	Curación Recaída Confirma resultados de Buonamici y col.
Stentoft	Leuk Res 2006	13	NA	I	I: 2 log	I: SLE

NA: no analizado; NS: no significativo; I: post-inducción; I1: inducción 1; I2: inducción 2; C: post-consolidación; fin QT: final del tratamiento quimioterápico planificado; SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SLR: supervivencia libre de recaída; RR: riesgo de recaída; RC: remisión completa.

Con la utilización de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real se consiguieron identificar niveles críticos de ERM que podían ser utilizados para predecir la evolución de los pacientes (Tabla 17) (Marcucci G, Leukemia 2001; Buonamici S, Blood 2002; Guerrasio A, Leukemia 2002, van der Reijden, BA, Br J Haematol 2002; Krauter J, J Clin Oncol 2003; Martinelli G, Leukemia 2003; Stentoft J, Leuk Res 2006). Marcucci y col. describieron que aquellos pacientes en RC que presentaban >10 copias del transcrito de fusión durante el seguimiento tenían una menor duración de la respuesta y un mayor riesgo de recaída que los pacientes con <10 copias. Este estudio demostró que es posible utilizar la PCR cuantitativa para establecer un nivel de ERM predictiva de recaída o de RC duradera. En estudios posteriores, se han confirmado estos resultados, aunque existen variaciones en los niveles de transcrito críticos que predicen recaída así como en el momento de la evolución en que estos niveles son más útiles clínicamente para evaluar al paciente (Tabla 17). Igual que sucede con las LMA con t(8;21), Schnittger S y col. correlacionaron la cantidad de transcrito detectada al diagnóstico con un peor pronóstico de la enfermedad pero, esta relación no ha sido confirmada o analizada en otros estudios (Schnittger S, Blood 2003).

1.5.3.3. SEGUIMIENTO DE LA ERM MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR CUANTITATIVA EN LMA CON MUTACIONES DEL GEN NPM1

La mutación de NPM1 se detecta en aproximadamente un tercio de los pacientes adultos con LMA, y especialmente en pacientes con cariotipo normal. Se ha demostrado, que, a diferencia de lo que sucede con la FLT3-ITD, las mutaciones de NPM1 y la dislocación citoplasmática de la nucleofosmina es muy estable en la recaída, lo que hace que NPM1 pueda ser utilizado como un potencial marcador de ERM en un número importante de pacientes (Falini B, Haematologica 2008; Chou WC, Leukemia 2007). No obstante, se han detectado casos de pacientes que han perdido la mutación de NPM1 en el momento de la

recaída, lo cual podría ser una limitación para el uso de NPM1 en el seguimiento de estos pacientes (Papadaki C, Br J Haematol 2009).

En diferentes estudios se ha demostrado la aplicabilidad de este marcador en el seguimiento de la ERM utilizando técnicas basadas en PCR (Gorello P, Leukemia 2006; Papadaki C, Br J Haematol 2009; Schnittger S, Blood 2009). Los resultados de estos estudios sugieren que la negativización de la PCR en estos pacientes se correlaciona con una RC duradera, y, por el contrario, la persistencia de niveles bajos de NPM1 mutado después del tratamiento o una positividad de la PCR durante el seguimiento se asocia a un mayor riesgo de recaída y una menor supervivencia (Papadaki C, Br J Haematol 2009; Chou WC, Leukemia 2007; Schnittger S, Blood 2009). Schnittger S y col. definieron unos niveles críticos de NPM1 mutado que permitían identificar pacientes con diferente pronóstico independientemente del estado mutacional de FLT3 (Schnittger S, Blood 2009).

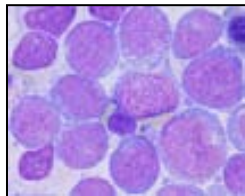
1.5.3.4. SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LA EXPRESIÓN DE WT1 EN EL SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES CON LMA

El gen WT1 se encuentra sobreexpresado en la mayoría de pacientes con LMA, por lo que se ha considerado que este gen podría ser una nueva diana terapéutica y un marcador de ERM universal.

Los resultados de los estudios iniciales que utilizaron métodos cualitativos o semicuantitativos fueron conflictivos, ya que aunque en algunos estudios demostraron que los niveles elevados de WT1 al diagnóstico se correlacionaban con un pronóstico desfavorable (Inoue K, Blood 1996; Bergmann L, Blood 1997), en otros no se confirmaron estos resultados (Gaiger A, Leukemia 1998).

Los estudios posteriores han utilizado métodos de PCR cuantitativa y, aunque con algunas diferencias, todos ellos sugieren que la cinética de reducción del transcrito WT1 tras

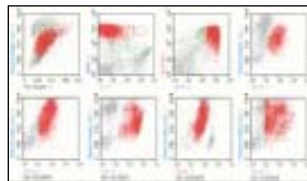
quimioterapia de inducción y la persistencia de valores elevados tras el tratamiento de consolidación son un factor pronóstico importante para predecir recaída (Garg M, Br J Haematol 2003; Lapillonne H, J Clin Oncol 2006; Østergaard M, Br J Haematol 2004; Nowakowska-Kopera A, Leuk Lymph 2009; Cilloni D, J Clin Oncol 2009). El seguimiento de la expresión de WT1 también ha demostrado utilidad para predecir recaídas tras trasplante alogénico (Ogawa H, Blood 2003). El European Leukemia Net ha realizado recientemente una revisión sistemática para estandarizar la técnica de PCR cuantitativa para el estudio de WT1 (Cilloni D, J Clin Oncol 2009). En este estudio se han establecido los niveles de expresión de WT1 en muestras normales para distinguir células leucémicas residuales de amplificación normal, se ha confirmado que la expresión de WT1 al diagnóstico en paciente con LMA es suficientemente alta como para permitir reducciones del número de copias del transcrito de al menos 2 log y que la recuperación hematológica post-quimioterapia no tiene impacto en los niveles de WT1. Todo ello confirma la aplicabilidad de este marcador en el seguimiento de las LMA. Además, se ha observado una buena correlación entre la expresión de WT1 y otros transcrito de fusión como AML1-ETO y CBFβ-MYH11 (Østergaard M, Br J Haematol 2004; Nowakowska-Kopera, A, Leuk Lymph 2009, Lasa A, Leuk Res 2009). La estandarización de la técnica de PCR para la determinación de WT1 es la base para realizar estudios prospectivos que permitan establecer la utilidad clínica de WT1 en el seguimiento de los pacientes con LMA y, en especial, en el grupo de enfermos con citogenética normal sin otros marcadores moleculares.



2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Desde los años 70 hasta el momento actual ha tenido lugar un importante avance en el conocimiento de la fisiopatología de la LMA y se han producido grandes cambios tanto a nivel diagnóstico como terapéutico. Todo ello ha contribuido a la identificación de múltiples factores pronósticos que han permitido individualizar la intensidad de los tratamientos en función del riesgo de cada paciente. A pesar de ello, sólo un 40-50% de los enfermos con LMA consigue sobrevivir más de 5 años libre de enfermedad. Este hecho nos impulsa y nos anima a seguir investigando una enfermedad tan heterogénea como es la LMA. La integración de los resultados citológicos, fenotípicos, citogenéticos y moleculares permite definir muy bien algunos subtipos de LMA atendiendo a sus características clínico-biológicas, como son las asociadas a citogenética de buen pronóstico. Sin embargo, el grupo más numeroso y heterogéneo de pacientes está constituido por LMA en las que no se detecta ninguna alteración citogenética. En los últimos años, gracias a la identificación de anomalías moleculares asociadas a LMA con cariotipo normal se han podido definir entidades con unas características distintivas que están permitiendo afinar mejor el pronóstico y adecuar el tratamiento de estos pacientes. A pesar de todo ello, es imprescindible continuar investigando la biología de la LMA para conseguir un mayor conocimiento de su fisiopatología y de los mecanismos que a nivel molecular expliquen el diferente comportamiento de cada leucemia. Es necesario integrar todos los conocimientos clínico-biológicos para individualizar el manejo de los pacientes y planificar esquemas terapéuticos que permitan mejorar la supervivencia.



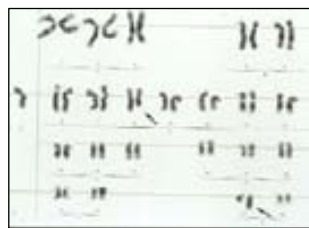
3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es la investigación de factores biológicos, al diagnóstico o durante el seguimiento, que permitan una mejor caracterización pronóstica de la LMA y sean útiles para tomar decisiones terapéuticas.

Los objetivos concretos de la tesis son:

- 1. Análisis de inestabilidad genética en LMA.** Analizar la presencia de inestabilidad de microsatélites en LMA *de novo*: frecuencia y tipos de inestabilidad. Investigar su relevancia biológica en LMA y correlacionar estos hallazgos con otros datos clínico-biológicos. Análisis de su significado pronóstico en pacientes con LMA.
- 2. Análisis de la enfermedad residual mínima mediante citometría de flujo y PCR cuantitativa en pacientes con citogenética de buen pronóstico [t(8;21) e inv(16)].** Analizar las características inmunofenotípicas y moleculares de este grupo de leucemias al diagnóstico. Evaluar la importancia del seguimiento de estos pacientes mediante citometría de flujo y PCR cuantitativa; determinar el impacto pronóstico de la detección de ERM mediante dichas técnicas y analizar la correlación entre ambas. Identificar el valor crítico para cada técnica que permita predecir las recaídas y por tanto, tomar decisiones terapéuticas anticipadas.
- 3. Estudiar el impacto pronóstico de la expresión de antígenos al diagnóstico en las células leucémicas, en pacientes con LMA *de novo* (Anexo).** Analizar las características inmunofenotípicas al diagnóstico mediante citometría de flujo en pacientes con LMA *de novo* tratados homogéneamente. Estudiar la relación entre la expresión de antígenos con las características clínicas, biológicas y el pronóstico de las LMA.



4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. TRABAJO SOBRE INESTABILIDAD GENÉTICA EN LMA

- **Manuscrito número 1.** Microsatellite instability is not an uncommon finding in adult de novo acute myeloid leukemia.

4.2. TRABAJO SOBRE ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN LMA CON t(8;21)/inv(16)

- **Manuscrito número 2.** Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)].

4.3. ANEXO

4.3.1. TRABAJO SOBRE CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS LMA AL DIAGNÓSTICO

- Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients.

4.1 TRABAJO SOBRE INESTABILIDAD GENÉTICA EN LMA

Manuscrito número 1

Microsatellite instability is not an uncommon finding in adult de novo acute myeloid leukemia.

Annals of Hematology 2005; 84: 368-375

La inestabilidad de microsatélites (MSI) es la consecuencia de lesiones genéticas en los sistemas de reparación del ADN. En este trabajo se ha analizado la MSI en 141 pacientes adultos diagnosticados de LMA *de novo* incluidos en el protocolo LMA-99 del grupo CETLAM. En 102 casos se analizaron en el momento del diagnóstico y en la remisión. Se utilizó un panel de 7 microsatélites: BAT25, BAT26, D13S1267, D13S174, DS2123, D5S346 y Mdf15. El ADN al diagnóstico se analizó con el marcador BAT26. La línea celular NALM6 se utilizó como control positivo en 39 casos sin muestra en el momento del diagnóstico. Mediante PCR se estudiaron las mutaciones *frameshift* en las secuencias repetitivas de las regiones codificantes de MSH3, MSH6, BAX, TGFBR1 e IGF1R. En todos los casos al diagnóstico se analizó la presencia de reordenamientos AML1-ETO, PML-RARA, CBF-MYH11, MLL y la FLT3-ITD. La expresión de los genes MLH1, MSH2 y MSH6, implicados en la reparación del ADN, se monitorizaron mediante PCR cuantitativa.

Las muestras se clasificaron como: alta-MSI si dos o más marcadores mostraban inestabilidad, MS estable cuando no se detectó inestabilidad y baja-MSI si sólo un marcador mostraba inestabilidad. Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

- Se detectó MSI en 20 casos (14,1%): 14 casos de alta-MSI y 6 de baja-MSI. Todos los casos de baja-MSI fueron diagnosticados usando marcadores diferentes a BAT26.
- Se observó una asociación entre la MSI y el reordenamiento del gen MLL. Seis pacientes con MSI+ presentaron reordenamiento del gen MLL (incluyendo tres casos

de MLL-PTD) ($p=0,002$). Otras anomalías genéticas que se asociaron con MSI+ fueron: 5 casos de FLT3-ITD, 1 AML1-ETO y 1 caso de CBFB-MYH11.

- No se detectó ninguna mutación en las secuencias repetitivas de los genes MSH3, MSH6, BAX, TGBRII ni IGFRII.
- El mecanismo básico subyacente de la MSI fue atribuible en el 25% de los casos a hipermetilación del promotor del gen MLH1.
- La presencia de MSI no conllevó un peor pronóstico. No se objetivaron diferencias en la supervivencia de los pacientes en función de la existencia o no de MSI.

Josep F. Nomdedéu · Granada Perea · Camino Estivill ·
Adriana Lasa · Maria J. Carnicer · Salut Brunet ·
Anna Aventín · Jorge Sierra

Microsatellite instability is not an uncommon finding in adult de novo acute myeloid leukemia

Received: 22 December 2004 / Accepted: 24 February 2005 / Published online: 24 March 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract To investigate the biologic relevance of microsatellite instability (MSI) in de novo acute myeloid leukemia (AML), 102 consecutive adult patients were analyzed by using a panel of seven microsatellites (BAT25, BAT26, D13S1267, D13S174, D2S123, D5S346 and Mdf15). Frame-shift mutations in the repetitive sequences in the coding region of *MSH3*, *MSH6*, *BAX*, *TGFBR2* and *IGFR2* were also investigated by using a fluorescent PCR-based assay. Methylation-specific PCR was used to determine the methylation status of *hMLH1* in MSI+ cases. *MSH3*, *MSH6* and *MLH1* expression was also analyzed in 68 cases by means of real-time quantitative PCR. MSI was detected in 20 cases: 14 cases had MSI-high (instability of at least two microsatellite markers) and 6 cases corresponded to MSI-low (a single polymorphic marker with instability). Six MSI+ cases showed an associated *MLL* rearrangement ($p=0.002$). No single case showed a mutation in the repetitive sequences of the *MSH3*, *MSH6*, *BAX*, *TGFBR2* and *IGFR2* genes. Most samples displayed low mRNA levels of the repair genes. *hMLH1* promoter was hypermethylated in five MSI+ cases. Overall survival analysis revealed no adverse effect of MSI positivity. These results suggest that MSI may be a common biologic finding in de novo AML.

Keywords Leukemia · Microsatellite instability · Cancer genetics

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous group of neoplastic disorders characterized by molecular lesions

in genes that participate in the normal myeloid-lineage development. Most of these genetic alterations correspond to chromosomal translocations generating chimeric protein products [1]. These abnormal proteins are necessary but insufficient for the development of the full leukemia phenotype [2]. One of these additional abnormalities is the duplication of the juxtamembrane domain of FLT3 (FLT3-ITD), present in 25–30% of adult de novo AML. FLT3-ITD is frequently encountered in monocytic leukemias with a normal karyotype and is associated with a poor outcome [3].

Genetic instability is one of the main pathogenic mechanisms underlying human neoplasia [4–7]. Solid tumors with microsatellite instability (MSI) accumulate hundreds of thousands of somatic clonal mutations, preferentially in simple repeats or microsatellites. Many of these mutations seem irrelevant as they affect non-coding DNA, whereas others may alter coding regions of important genes. The list of potentially affected genes is very long and it includes over 100 genes in colon cancer and approximately 50 in gastric and endometrial cancers—the three human cancers with the highest incidence of MSI [8]. The other type of genetic instability, chromosomal instability (CIN), leads to an abnormal chromosome number. It is a common finding in AML and plays an important role in prognosis [9, 10].

By means of a panel of fluorescent markers commonly used to investigate MSI in colon cancer [11, 12], we analyzed a consecutive series of patients with de novo AML in order to assess whether MSI is associated with a particular molecular subgroup and whether or not it has prognostic significance.

Materials and methods

Patients

One hundred and two consecutive adult patients with de novo AML sequentially enrolled in clinical protocols and referred to the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona between August 1998 and March 2002 were in-

J. F. Nomdedéu (✉) · G. Perea · C. Estivill · A. Lasa ·
M. J. Carnicer · S. Brunet · A. Aventín · J. Sierra
Department of Hematology,
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
Universitat Autònoma de Barcelona,
Barcelona, Spain
e-mail: jnomdedeu@hsp.santpau.es
Tel.: +34-93-2919000
Fax: +34-93-2919192

cluded in the study. Ages ranged from 16 to 60 years (mean, 48 years). In each case, morphologic, immunophenotypic, cytogenetic and molecular analyses (FLT3, MLL, AML1-ETO, CBFb-MYH11) were recorded. DNA from 102 cases (remission samples assessed by flow cytometry) was extracted using the salting out method. A panel of seven microsatellites was used (BAT25, BAT26, D13S1267, D13S174, D2S123, D5S346 and Mdf15) [11, 12]. DNA at diagnosis was exclusively analyzed in 39 additional cases without available remission samples using the BAT26 marker. The DNA from the NALM 6 cell line was used as a positive control. The diagnosis of AML and the assignment of FAB subtypes were based on standard morphological and cytochemical criteria. Cytogenetic G-banding analysis was performed with standard methods. The definition of a cytogenetic clone and the descriptions of karyotypes were in accordance with the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [13].

Treatment strategy

All patients were uniformly treated following the LAM-99 protocol consisting of one or two [if complete remission (CR) was not achieved with one chemotherapy course] cycles of induction therapy with IDICE (idarubicin, 500 mg/m², days 1, 3 and 5; etoposide, 100 mg/m², days 1, 2 and 3; and cytarabine, 500 mg/m² every 12 h, days 1, 3, 5 and 7). Patients who achieved a morphologic CR received one course of intensification treatment consisting of cytarabine (500 mg/m² every 12 h, days 1–6) and mitoxantrone (12 mg/m², days 4, 5 and 6). Patients in CR were then allocated to different risk groups according to the karyotype and the number of induction therapy courses required to achieve CR. The good prognosis group included patients with inv(16) or t(8;21). These patients were treated with high-dose cytarabine and were not considered for transplant in first CR. Patients included in the intermediate prognosis group were those with a normal karyotype (analyzed ≥ 20 metaphases) who only needed one induction therapy course to achieve CR. These patients received an autologous stem cell transplant. Finally, the bad prognosis group included those patients with cytogenetic abnormalities other than inv(16)/t(8;21) and/or patients with a normal karyotype that required two induction therapy cycles to achieve CR. These patients received an allogeneic stem cell transplant if HLA sibling donor was available or an autologous transplant in those cases without HLA sibling donor. The bad prognosis group also included patients without karyotype (not performed or no mitosis) or with fewer than 20 metaphases.

Molecular studies

DNA and RNA obtained from leukemic samples at diagnosis were assayed for AML1/ETO, PML/RAR α , CBF β /

MYH11 rearrangements, partial-tandem duplications (PTDs) of the *MLL* gene and FLT3-ITD by means of well-established protocols [14, 15].

Gene expression of *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* was monitored by quantitative real-time RT-PCR using the Assays on Demand on an ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and calculated with the $\Delta\Delta C_T$ method (PE Applied Biosystems User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 1997). PCR reactions were set up in MicroAmp optical 96-well reaction plates. After 2 min at 50°C, amplification was carried out by 40 cycles at 95°C for 15 s and at 65°C for 60 s in the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Each sample was analyzed in duplicate and normalized to the *Abl* levels, and a mix of three normal bone marrow samples was used as calibrator.

MSI analysis

For MSI analysis, a bone marrow sample at diagnosis and peripheral blood at remission DNA were extracted using the salting out method. Leukemic infiltration was above 65% in all samples obtained at diagnosis and assessed by flow cytometric methods. Using the same method, samples at remission showed fewer than 0.5% of cells with an abnormal immunophenotype.

A panel of seven microsatellites was used: D2S123, D5S346, D13S174, D13S1267, Mdf15(D17S250), Bat25 and Bat26. Fluorochromes and PCR conditions have been reported elsewhere [11, 12, 16]. The DNA from the NALM 6 cell line was used as a positive control.

A sample was classified as MSI-high (MSI-H) if two or more markers showed instability, as MS-stable (MSS) if no instability was noted, and as MSI-low (MSI-L) if a single marker revealed novel bands [11, 12, 16].

Detection of frame-shift mutations in repetitive sequences in the coding region of the genes *MSH3*, *MSH6*, *BAX*, *TGFBR2* and *IGFR2* was investigated using the primers and conditions reported elsewhere, with minor modifications, and using the GeneScan software [16].

Methylation-specific PCR at cytosines -229, -231 and -241 was used to investigate *MLH1* promoter hypermethylation, as has been previously described [17].

Statistical analyses

For descriptive statistics, median and range were calculated. Differences between categorical variables were evaluated with the chi-square test. Overall survival was measured from the date of entry into the treatment protocol until the date of death. Overall survival was plotted by the Kaplan–Meier method; differences between curves were analyzed by the log-rank test. A *p* value <0.05 was considered significant.

Fig. 1 MSI was present in de novo AML cases. Electropherograms obtained using microsatellite markers (*top and blue*, D13S174; *green and bottom*, D13S1267) disclosed length differences between amplimers obtained at diagnosis and at remission)

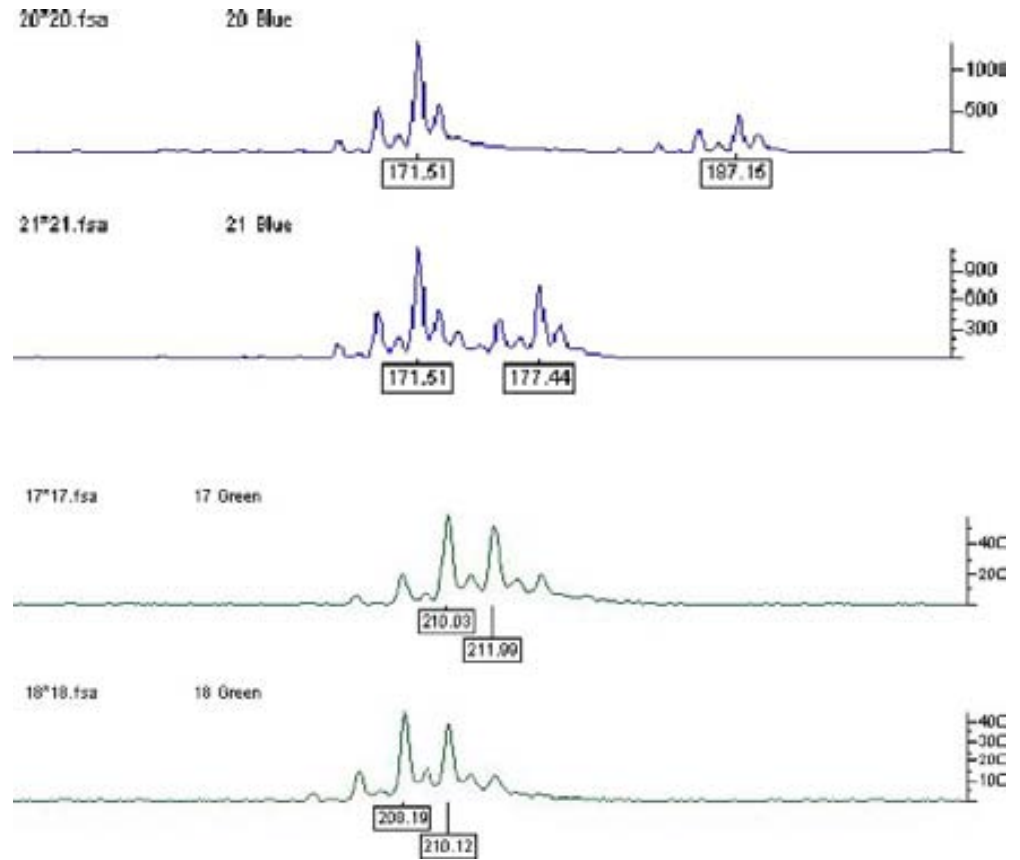
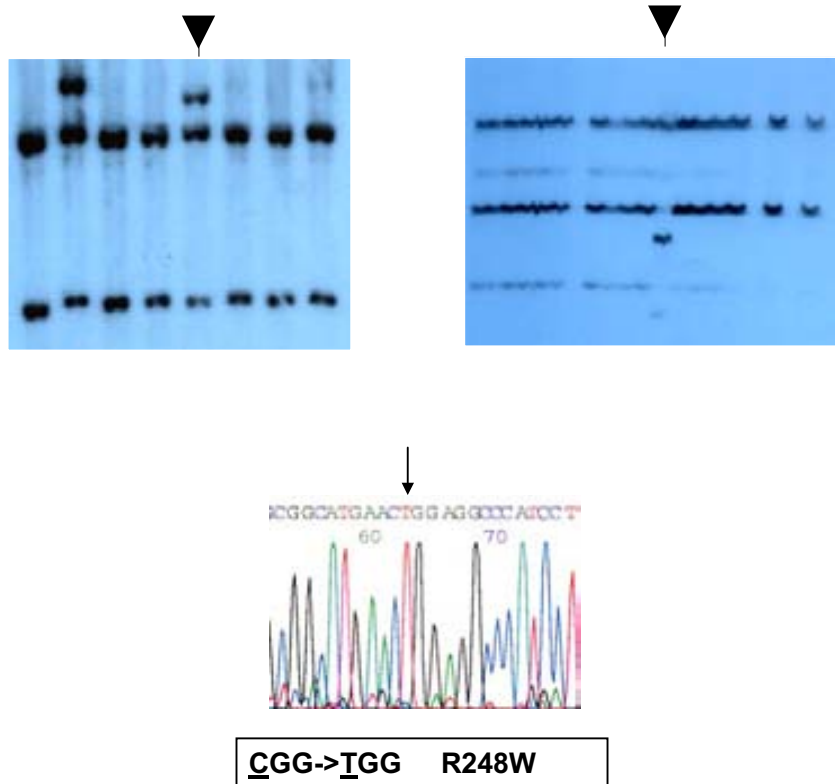


Table 1 Cytogenetic and molecular findings in AML patients with MSI

UPN	MSI	LOH	Cytogenetics	FLT3	MLL
1	D13S174,D2S123		46,XX,18p+	Wt	Rearranged
2	D2S123,D13S1267, BAT25		46,XX	Wt	Germ line
3	D2S123,D13S1267		46,XX	Wt	Germ line
4	D2S123,D13S1267		46,XX	Wt	Germ line
5	D13S174,D2S123		46,XY	Wt	Germ line
5	D13S174		Complex	Wt	Rearranged ^a
7	D13S174, D13S1267, D5S346	Mdf15	46,XY	ITD	Rearranged
8	D13S174,Mdf15, D13S1267,Bat25		46,XY,del(6)(q25)	Wt	Rearranged
9	Bat26,Bat25,D5S346		46,XY,del(19)(q23q24), del(20)(q13)	Wt	Germ line
10	Mdf15		47,XY,+8	ITD	Germ line
11	D13S1267, D2S123	Mdf15, D13S174 D2S123	46,XY	Wt	Rearranged
12	Mdf15		46,XY,t(8;21)(q22;q22)	Wt	Not done
13	D13S1267		46,XY	ITD	Germ line
14	Mdf15,D5S346,D2S123		46,XY,inv(16)(p13q22)	Wt	Germ line
15	D13S1267		46,XY	ITD	Germ line
16	D5S346,D13S174		46,X, i(X)p(10)	Wt	Germ line
17	Mdf15, Bat25, D13S1267, D5S346	D13S174	46,XY	ITD	Germ line
18	D13S1267, D5S346		46,XY	Wt	Germ line
19	D13S1267		46,XX	Wt	Germ line
20	D13S1267, D13S174		46,XY,del(9)(q22?q23)	wt	Rearranged

UPN unique patient number,
LOH loss of heterozygosity,
Wt wild type, ITD internal
tandem duplication
^aBglII-only pattern

Fig. 2 MSI was associated with *MLL* rearrangements. Southern blot analysis using the *B859* probe revealed a clonal rearrangement at *MLL* locus on *Bgl*III digests (top left, arrow-head). Mutational analysis using radioactive single strand chain polymorphism (SSCP) disclosed a mutation at residue 248 of *p53* (contact mutation). This patient had a complex karyotype and showed MSI at D13S174 marker (UPN5)



Results

Extensive microsatellite panels show MSI+ in AML patients

MSI was detected in 20 cases: 14 cases showed MSI-H and 6 cases corresponded to MSI-L (Fig. 1 and Table 1). All MSI-L cases were diagnosed using markers other than BAT26. When MSI status was compared with the cytogenetic and molecular findings, an association between MSI+ and *MLL* rearrangement was detected. Six MSI+ cases had an associated *MLL* rearrangement, including 3 cases with the self-fusion pattern. A *Bgl*III-only positive Southern blot was detected in one case of AML with a complex karyotype (Fig. 2). Further studies performed on this case (FISH and a panhandle PCR protocol) failed to detect a genomic rearrangement. This finding was in line with a cleavage pattern of the *MLL* locus. Found in approximately 5% of AML, this lesion reflects the ordered DNA breakage associated with the apoptotic process [18]. This case also harbored a *p53* mutation.

Six MSI+ cases showed an associated *MLL* rearrangement ($p=0.002$). Ages were similar in the MSI+ (41.25) and MSI- (42.69) groups.

Other genetic lesions associated with MSI were FLT3 internal tandem duplication (5 cases), AML1-ETO (n:1) and CBFb-MYH11 (n:1) rearrangements. In the entire series (141 patients), the genetic lesions were as follows: 18 cases *MLL*+, 37 FLT3-ITD, 14 t(8;21) and 12 inv(16). Sixty-four cases had a normal karyotype. No single case showed a

mutation in the repetitive sequences of the *MSH3*, *MSH6*, *BAX*, *TGFBR2* or *IGFR2* genes (supplemental Figs. 1 and 2). Three patients had also loss of heterozygosity (LOH; Table 1).

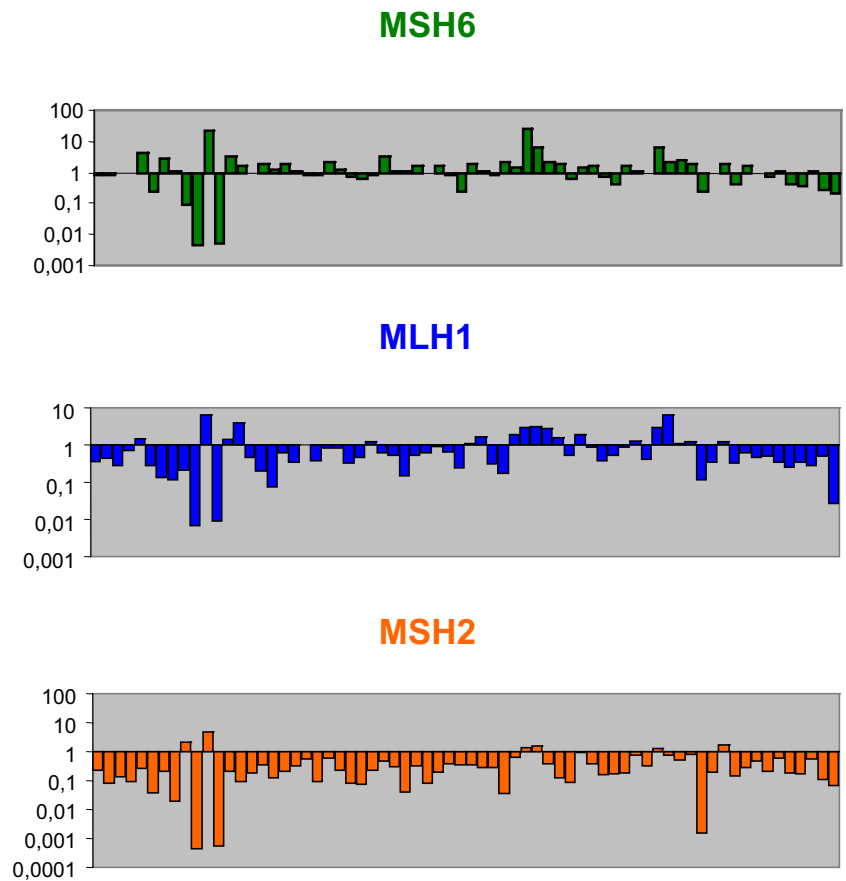
MSI+ was associated with *hMLH1* promoter hypermethylation

hMLH1 promoter was hypermethylated in 5 (25%) of 20 MSI+ cases. Four patients showed MSI-H and the remaining patient had MSI at the D13S1267 locus with an associated FLT3-ITD.

Table 2 RT-PCR results as relative expression levels

Relative expression level	<i>MLH1</i> , n (%)	<i>MSH2</i> , n (%)	<i>MSH6</i> , n (%)
Overexpression	7 (10.2)	2 (2.9)	12 (17.6)
2–10	7 (10.2)	2 (2.9)	10 (14.7)
11–100	0 (0)	0 (0)	2 (2.9)
Normal expression (1.99–0.31)	44 (64.7)	25 (36.7)	47 (69.1)
Underexpression	17 (25)	41 (60.2)	9 (13.2)
0.3–0.1	13 (19)	25 (36.7)	6 (8.8)
0.09–0.01	4 (6)	13 (19.1)	1 (1.4)
0.009–0.001	0 (0)	3 (4.4)	2 (2.9)

Fig. 3 RT-PCR assays showed decreased levels of repair genes in de novo AML. Representative amplification values revealed that most AML patients had decreased levels of *MSH6*, *MLH1* and *MSH2*



There was poor concordance between quantitative PCR assays of DNA repair genes and MSI status

Real-time PCR was performed to assess the mRNA levels of three genes that play a role in DNA repair: *MSH2*, *MSH6* and *MLH1* (Table 2 and Fig. 3). *MSH2* levels were low except in six cases. Three samples showed a marked down-regulation (less than ten times compared with the calibrator) of *MSH6* and two cases had overexpression ($\times 10$) of this same gene. Six cases were marked by *hMLH1* low expression, but none of these showed hypermethylation of the promoter. However, the five cases with this epigenetic lesion disclosed normal or very faint down-regulations of *hMLH1*. These findings suggest there is no close correlation between the expression levels and the promoter status. Another intriguing possibility is that the cases with the lowest expression were those with transient MSI and therefore prone to suffer genetic lesions.

MSI+ AML fit inside the standard prognosis group

Survival rates of patients with MSI+ and MSI- were compared. Overall survival was the same for both groups of patients and was equivalent to the entire series of AML patients analyzed (Fig. 4). When the single MSI+ patient with a complex karyotype was excluded, the survival rate was the same and markedly better than that of the patients

with a complex karyotype (Fig. 5). When the survival rates between MSI+ and MSI- were investigated in the group with a normal karyotype, a trend towards a favourable outcome for MSI+ patients was detected (not significant) (Fig. 6).

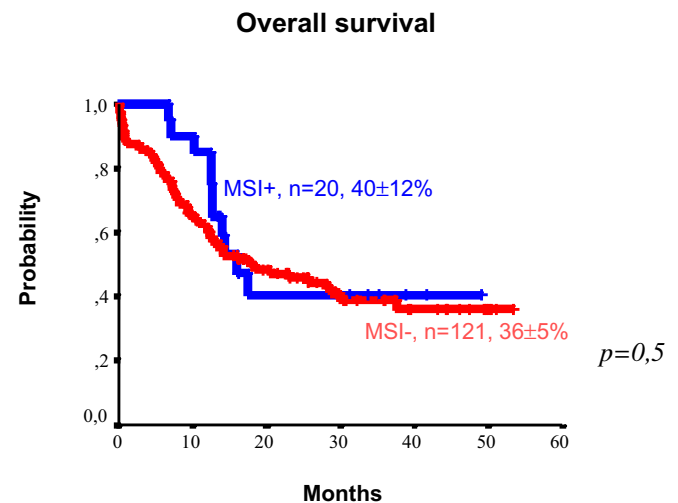


Fig. 4 Overall survival of MSI+ cases compared with MSI- patients

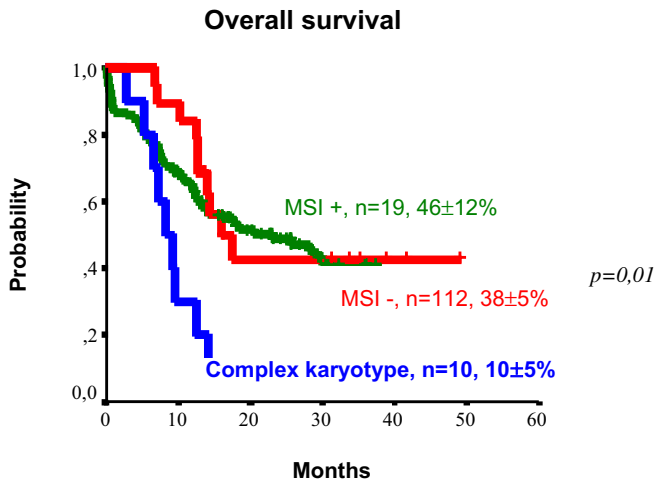


Fig. 5 CIN AML cases (complex karyotypes) showed a very poor outcome compared with MSI+ patients

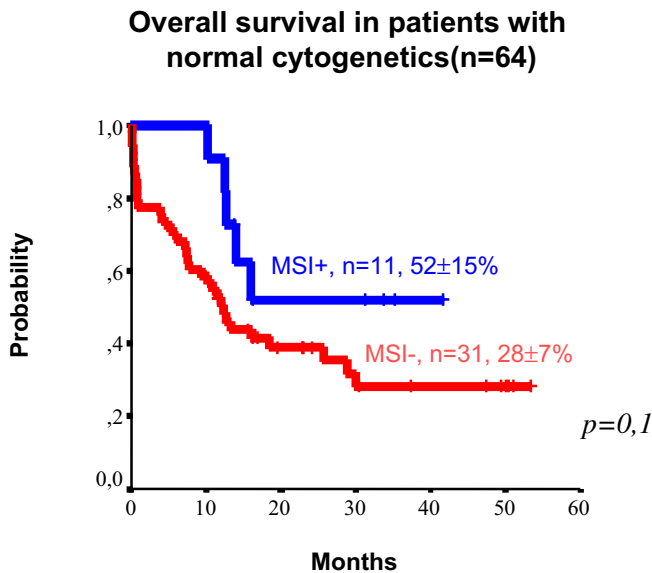


Fig. 6 Normal karyotype AML showing MSI+ showed comparable survival curves with MSI- patients

Discussion

Microsatellites are repetitive DNA sequences consisting of oligonucleotide units. They are widely distributed throughout the human genome. MSI+ tumors are common in the colon, stomach, endometrium, urinary tract and in anatomic sites associated with the familial syndrome Hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC). MSI occurring within the coding region (coding MSI) cause frame-shift mutations and loss of protein function. This coding MSI is believed to represent a key mechanism of tumorigenesis in MSI tumors. Genes that may have this kind of mutation include *TGFBR2*, *IGFR2*, *BAX*, *hMSH3*, *hMSH6*, *BRCA1*, *BRCA2*, *E2F4*, activin type II receptor, *SEC63*, *AIM2EBP1/PA2G4*, a gene encoding a subunit of the NADH-ubiquinone oxidoreductase complex and many more [8, 19]. Some probably play a role in normal myelopoiesis.

MSI appears to be particularly common in cases of AML in survivors of atomic bombs and in secondary AML [20–22]. Das-Gupta et al [23] reported that MSI was present in 13% of 71 AML cases and it was restricted to t-AML and elderly patients, probably reflecting an age-related phenomenon. Maeck et al. [24] found 2 of 26 patients with MSI in MDS. In a retrospective study using relatively small panels of microsatellites [25], no single case of de novo AML (28 patients) or relapsed AML (37 cases) showed MSI. Kodera et al. [26] reported the absence of MSI in myeloid cell lines. These data are in sharp contrast with our findings in a series of de novo AML patients in whom a frequency of 20% was detected. Tasaka et al. [27] suggested that MSI may appear in AML relapse and may be important during the progression of the disease. In lymphoid malignancies, MSI has been reported to be more common in cell lines than in freshly obtained samples [28]. Furthermore, MSI has been associated with the blastic transformation of Chronic myeloid leukemia (CML), alone or associated with LOH [29]. These data suggest that MSI may be a marker of advanced disease in leukemias. However, MSI may also be interpreted as an adaptive mechanism in response to the neoplastic transformation process, or as a sign of myeloid stem cell exhaustion [30]. In the present study, MSI was associated with distinct molecular lesions. This suggests it is a somewhat general phenomenon that is not dependent on a specific molecular pathway, even though it is more commonly associated with *MLL* rearrangements.

The basic mechanism underlying MSI is attributable to *hMLH1* in 25% of AML cases. Methylation of *HMLH1* has previously been reported in AML [23, 31–33]. The molecular basis of most AML (75%) with MSI is yet to be elucidated.

Tumor cell lines that are deficient in the *hMSH2* protein show little or no increase in mutation rate when the cells are maintained in culture allowing rapid growth. However, mutations accumulate at a high rate in these cells when they are maintained at high density under restrictive conditions [34, 35]. Limited tumor growth elicits an adaptive response in terms of hypermutability, which allows the tumor to surpass the many obstacles (e.g. nutrient restriction, inadequate blood supply). Massive bone marrow infiltration could determine a critical nutrient supply restriction and consequently determine the transient expression of a mutator phenotype, as has been demonstrated in cell line models. This would explain why most AML cases showed decreased levels of repair genes, probably a manifestation of the transient MSI phenotype.

MSI cells, especially those with homozygous *MSH2* mutations [36], may be more sensitive to the deleterious effects of DNA methylating agents and this may produce a hypermutability status [37, 38]. Low *MSH2* levels could determine a basic common genetic instability substrate in most AML cases. This is also of therapeutic concern because new therapeutic agents exploit the benefits of demethylating agents.

AML with MSI did not show a poor outcome. Nevertheless, MSI was also identified in one fatal case of core-binding factor (CBF) AML (UPN14, Table 1). It remains

to be investigated whether the poor prognosis of elderly patients with *inv(16)* is associated with increases in the percentage of MSI+ cases. If confirmed by other groups, these findings will not change stratification, although such cases may benefit from particular chemotherapeutic agents, as has been demonstrated for colon carcinoma [39].

Matched normal and tumoral tissue is employed for MSI studies. However, in the absence of normal tissue, BAT26, a noncoding, long mononucleotide tract, has been used for the diagnosis of MSI. With the BAT26 amplification pattern, the percentage of contaminating normal tissue can also be detected. Applied to 39 AML cases, this strategy failed to detect MSI+ cases, suggesting that this marker is unsuitable for MSI investigation in this context [40].

In the light of our findings, it can be concluded that MSI is not uncommon in *de novo* AML. Further studies are required to investigate the role of this pathogenic mechanism in the establishment and/or development of the leukemic clone.

Acknowledgements This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) grants (PI020509, GO3/008 and C03/010) and Fundació “La Caixa”.

References

- Speck NA, Gilliland DG (2002) Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2:502–513
- Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T et al (2001) AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10398–10403
- Gilliland DG, Griffin JD (2002) The roles of FLT3 in haematopoiesis and leukemia. *Blood* 100:1532–1542
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558–561
- Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M (1996) Frameshift mutator mutations. *Nature* 382:499–500
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275:967–969
- Suzuki K, Dai T, Suzuki I, Dai Y, Yamashita K, Perucho M (2002) Low mutation incidence in polymorphic noncoding short mononucleotide repeats in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *Cancer Res* 62:1961–1965
- Mori Y, Yin J, Rashid A et al (2001) Instability typing: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* 61:6046–6049
- Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:776–781
- Grimwade D, Walker H, Oliver F et al on behalf of the Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML. Analysis of 1612 patients entered into the MRC AML10 trial. *Blood* 92:2322–2333
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al (1998) A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5248–5257
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al (2004) Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96:261–268
- ISCN (1995) In: Mitelman F (ed) An international system for human cytogenetic nomenclature. Karger, Basel
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ et al (2003) Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe against cancer program. *Leukemia* 17:2318–2357
- Muñoz L, Nomdedéu JF, Villamor N et al (2003) Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 17:76–82
- Hartmann A, Zanardo L, Bocker-Edmonston T, Blaszyk H, Dietmaier W, Stoehr R et al (2002) Frequent microsatellite instability in sporadic tumors of the upper urinary tract. *Cancer Res* 62:6796–6802
- Esteller M, Catusas L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG (1999) HMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 155:1767–1772
- Macintyre E, Bourquelot P, Leboeuf D, Rimokh R, Archimbaud E, Smetsers T, Zittoun R (1997) MLL cleavage occurs in approximately 5% of *de novo* acute myeloid leukemia, including in patients analyzed before treatment induction. *Blood* 89:2224–2226
- Komatsu N, Takeuchi S, Ikezoe T et al (2000) Mutations of the E2F4 gene in hematological malignancies having microsatellite instability. *Blood* 95:1509–1510
- Nakanishi M, Tanaka K, Takahashi T, Kyo T, Dohy H, Fujiwara M, Kamada N (2001) Microsatellite instability in acute myelocytic leukaemia developed from A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 77:687–694
- Sheikhha MH, Tobal K, Liu Yin JA (2002) High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 117:359–365
- Olipitz W, Hopfinger G, Aguiar RCT, Gunsilius E, Girschikofsky M, Bodner C et al (2002) Defective DNA-mismatch repair: a potential mediator of leukemogenic susceptibility in therapy-related myelodysplasia and leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 34:243–248
- Das-Gupta EP, Seedhouse CH, Russell NH (2001) Microsatellite instability occurs in defined subsets of patients with acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* 114:307–312
- Maecck L, Haase D, Schoch C, Hiddemann W, Alves F (2000) Genetic instability in myelodysplastic syndrome: detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in bone marrow samples with karyotype alterations. *Br J Haematol* 109:842–846
- Rimsza LM, Kopecky KJ, Ruschulte J et al (2000) Microsatellite instability is not a defining feature of acute myeloid leukaemogenesis in adults: results of a retrospective study of 132 patients and review of the literature. *Leukemia* 14:1044–1051
- Kodera T, Kohno T, Takakura S, Morishita K, Hamaguchi H, Hayashi Y, Sasaki T, Yokota J (1999) Microsatellite instability in lymphoid leukemia and lymphoma cell lines but not in myeloid leukemia cell lines. *Genes Chromosom Cancer* 26:267–269
- Tasaka T, Lee S, Spira S, Takeuchi S, Nagai M, Takahara J, Koeffler HP (1997) Microsatellite instability during the progression of acute myelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 98:219–221
- Molenaar JJ, Gérard B, Chambon-Pautas C, Cavé H, Duval M, Vilmer E, Grandchamp B (1998) Microsatellite instability and frameshift mutations in BAX and transforming growth factor- β RII genes are very uncommon in acute lymphoblastic leukemia in vivo but not in cell lines. *Blood* 92:230–233

29. Wada C, Shionoya S, Fujinoo Y, Tokuhira H, Akahoshi T, Uchida T, Ohtani H (1994) Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 83:3449–3456
30. Reese JS, Liu L, Gerson SL (2003) Repopulating defect of mismatch repair-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* 102:1626–1633
31. Auner HW, Olipitz W, Hoeffler G, Bodner C, Konrad D, Crevenna R, Linkesch W, Sill H (1999) Mutational analysis of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 106:706–708
32. Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE, Martin EW, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A (2001) Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res* 61:6991–6995
33. Baranovskaya S, Soto JL, Perucho M, Malkhosyan SR (2001) Functional significance of concomitant inactivation of hMLH1 and hMSH6 in tumor cells of the microsatellite mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15107–15112
34. Richards B, Zhang H, Phear G, Meuth M (1997) Conditional mutator phenotypes in hMSH2-deficient tumor cell lines. *Science* 277:1523–1526
35. Parsons R, Li GM, Longley M, Modrich P, Liu B, Berk T, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B (1995) Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* 268:738–740
36. Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B (1997) DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2545–2550
37. Andrew SE, McKinnon M, Cheng BS, Francis A, Penney J, Reitmair AH, Mak TW, Jirik FR (1998) Tissues of MSH2 deficient mice demonstrate hypermutability on exposure to a DNA methylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1126–1130
38. Baross-Francis A, Andrew SE, Penney JE, Jirik FR (1998) Tumors of DNA mismatch repair-deficient hosts exhibit dramatic increases in genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8739–8743
39. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al (2003) Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349:247–257
40. Faulkner RD, Seedhouse CH, Das-Gupta EP, Russell NH (2004) BAT-25 and BAT-26, two mononucleotide microsatellites, are not sensitive markers of microsatellite instability in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 124:160–165

4.2. TRABAJO SOBRE ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN LMA CON t(8;21)/inv(16)

Manuscrito número 2.

Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)].

Leukemia 2006; 20: 87-94.

La t(8;21) y la inv(16)/t(16;16) son dos anomalías citogenéticas recurrentes observadas en la LMA que conllevan buen pronóstico. Pero a pesar de que se consiguen RC duraderas en la mayoría de los casos (60-70%), el porcentaje de pacientes que recae (20-30%) no es menospreciable todavía. El objetivo de este estudio fue analizar el valor pronóstico de la ERM analizada mediante CF y PCR cuantitativa en este grupo de pacientes. El análisis de la ERM se realizó en un grupo de 65 pacientes [30 pacientes con t(8;21) y 35 pacientes con inv(16)/t(16;16)]. En la mayoría de los casos la primera muestra de médula ósea que se estudió fue la del diagnóstico y posteriormente se estudiaron muestras post-inducción, post-intensificación y al final del tratamiento quimioterápico. El estudio de ERM mediante CF se realizó utilizando combinaciones fijas de anticuerpos monoclonales que incluían marcadores de inmadurez y marcadores mieloides expresados habitualmente en la mayoría de LMA. Los análisis de PCR cuantitativa se realizaron siguiendo el método desarrollado por el European Concerted Action of the Europe Against Cancer Program. Los resultados de este estudio se resumen a continuación:

- Los pacientes con un nivel de ERM >0,1% detectada por CF al final del tratamiento presentaron un riesgo de recaída significativamente mayor que el de los pacientes con ERM ≤0,1% (67% vs 21%, p=0,03). De la misma manera, la detección de una ERM >0,1% en cualquier momento del seguimiento desde el fin del tratamiento supuso un mayor riesgo de recaída, especialmente en los pacientes con inv(16).

- En cuanto al seguimiento de la ERM mediante PCR cuantitativa, se observó que la persistencia de más de 10 copias del transcrito quimérico al final del tratamiento quimioterápico se asoció con una mayor riesgo de recaída (75% vs 21%, $p=0,04$). Aquellos pacientes que a lo largo de todo el seguimiento se mantuvieron con un número de copias inferior a 10, presentaron un riesgo de recaída significativamente menor a aquéllos que en algún momento de su seguimiento tuvieron ≥ 10 copias. Este hallazgo fue especialmente relevante en los pacientes con inv(16) puesto que todos los pacientes con ≥ 10 copias al final del tratamiento o en algún control posterior recayeron.
- En 35 pacientes fue posible realizar el análisis de la ERM mediante las dos técnicas. CF y PCR cuantitativa. La concordancia entre ambos métodos fue del 67%.
- De acuerdo con nuestros resultados, el mejor momento para estratificar a este tipo de pacientes en función de la ERM sería al final del tratamiento quimioterápico, siendo los niveles que predicen recaída 0,1% para la CF y 10 copias para la PCR cuantitativa.



ORIGINAL ARTICLE

Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]

G Perea¹, A Lasa¹, A Aventín¹, A Domingo², N Villamor³, M Paz Queipo de Llano⁴, A Llorente⁵, J Juncà⁶, C Palacios⁷, C Fernández⁸, M Gallart⁹, L Font¹⁰, M Tormo¹¹, L Florensa¹², J Bargay¹³, JM Martí¹⁴, P Vivancos¹⁵, P Torres¹⁶, JJ Berlanga², I Badell¹⁷, S Brunet¹, J Sierra¹ and JF Nomdedéu¹, for the Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias (CETLAM). Spain

¹Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Hematology Department, Hospital de Bellvitge, Institut Català d'Oncologia, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ³Hematology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁴Hematology Department, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain; ⁵Hematology Department, Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain; ⁶Hematology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; ⁷Hematology Department, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain; ⁸Hematology Department, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain; ⁹Hematology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; ¹⁰Hematology Department, Hospital Verge de la Cinta, Tortosa, Tarragona, Spain; ¹¹Hematology Department, Hospital Clínic, Valencia, Spain; ¹²Hematology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ¹³Hematology Department, Hospital Son Llatzer, Mallorca, Spain; ¹⁴Hematology Department, Hospital Mútua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain; ¹⁵Hematology Department, Clínica Teknon, Barcelona, Spain; ¹⁶Hematology Department, Hospital Juan Canalejo, La Coruña, Spain and ¹⁷Pediatrics t., Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Most patients with acute myeloid leukemia (AML) and t(8;21) or inv(16) have a good prognosis with current anthracycline- and cytarabine-based protocols. Tandem analysis with flow cytometry (FC) and real-time RT-PCR (RQ-PCR) was applied to 55 patients, 28 harboring a t(8;21) and 27 an inv(16), including one case with a novel CBFbeta/MYH11 transcript. A total of 31% (n=17) of CR patients relapsed: seven with t(8;21) and 10 with inv(16). The mean amount of minimal residual disease (MRD) detected by FC in relapsed and nonrelapsed patients was markedly different: 0.3 vs 0.08% (P=0.002) at the end of treatment. The mean number of fusion transcript copies/ABLx10⁴ also differed between relapsed and non-relapsed patients: 2385 vs 122 (P=0.001) after induction, 56 vs 7.6 after intensification (P=0.0001) and 75 vs 3.3 (P=0.0001) at the end of chemotherapy. Relapses were more common in patients with FC MRD level >0.1% at the end of treatment than in patients with ≤0.1%: cumulative incidence of relapse (CIR) was 67 and 21% (P=0.03), respectively. Likewise, using RQ-PCR, a cutoff level of >10 copies at the end of treatment correlated with a high risk of relapse: CIR was 75% for patients with RQ-PCR >10 compared to 21% for patients with RQ-PCR levels ≤10 (P=0.04). Combined use of FC and RQ-PCR may improve MRD detection, and provide useful clinical information on relapse kinetics in AML patients.

Leukemia (2006) 20, 87–94. doi:10.1038/sj.leu.2404015; published online 10 November 2005

Keywords: leukemia; minimal residual disease; molecular methods; flow cytometry

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) with t(8;21) and inv(16) accounts for about 15% of adult AML. Based on results from large clinical studies, both leukemia types are included in the

same good prognosis category.¹ Most patients achieve a complete remission (CR) after standard induction chemotherapy, and long-term remission rates of 60–70% have been reported after consolidation therapies with cytarabine or autologous transplant. Despite these encouraging results, 20–30% of patients relapse. To identify this subgroup of patients, several risk factors have been introduced in recent years.^{2–5} CD56 expression for the t(8;21) patients, leukocyte counts or white blood cell index for both types of core binding factor (CBF) leukemias have been purported as suggestive of a poor outcome. Leukemic cells present in the bone marrow of patients with AML in the CR phase are thought to be responsible for the emergence of the relapses. Monitoring MRD by molecular or immunophenotypic methods seem to be of interest to define those patients with a high risk of relapse.^{6–18}

Molecular techniques based on the detection of gene-fusion products are restricted to AML with specific chromosomal rearrangements, whereas multiparametric flow cytometry (FC) may be applied to more than 80% of AML cases. Accordingly, MRD in AML with t(8;21) and inv(16) AML may be analyzed using both methods. In the present study, we found that MRD detection by FC and/or by real time RT-PCR (RQ-PCR) during the follow-up of these patients allowed us to identify patients with a high risk of relapse.

Methods

Patients

In all, 65 patients with core binding factor (CBF) leukemias, 30 t(8;21)(q22;q22) and 35 inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), were included in the study. In all cases, diagnosis was established by conventional cytogenetics and/or a qualitative PCR assay (AML1/ETO or CBFbeta/MYH11 detection).¹⁹ Patients' characteristics are reported in Table 1. Most patients (83%, n=54) were adults aged ≤60 years with *de novo* AML and enrolled in a CETLAM (Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias agudas y Mielodisplasias) LMA-99 protocol. The remaining patients were five adults with *de novo* AML enrolled in a previous protocol from the CETLAM

Correspondence: Dr JF Nomdedéu, Laboratori d'Hematologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Avda Sant Antoni M. Claret, 167, Barcelona 08025, Spain.

E-mail: jnomdedeu@hsp.santpau.es

Received 23 May 2005; revised 22 September 2005; accepted 27 September 2005; published online 10 November 2005

Table 1 Patients' characteristics according to the fusion transcript

	AML1/ETO (n = 30)	CBFbeta/MYH11 (n = 35)	P-value
Age, median (range) (years)	38 (14–63)	43 (3–75)	NS
> 50 years (%)	7 (23)	13 (37)	
Sex (male/female)	20/10	19/18	NS
WBC, median (range)	16 (2.5–86)	18 (2.3–150)	NS
≥20 × 10 ⁹ /l (%)	10 (33)	13 (37)	
% BM blast, median (range)	47 (20–95)	60 (20–97)	NS
FAB classification (%)			0.0001
M1	3 (10)	—	
M2	25 (83)	3 (9)	
M4/M5	2 (7)	12 (34)	
M4Eo	—	20 (57)	
M0/M6/M7	—	—	
FLT3 mutations (%)			
FLT3/ITD ⁺	1/19 (5)	1/25 (4)	NS
D835	0/21	5/25 (20)	0.05
MLL (%)			NS
Rearranged	—	—	
Wild type	17 (100)	23 (100)	
Outcome (%)			NS
Complete remission	28 (94)	27 (77)	
Failure	1 (3)	2 (6)	
Death	1 (3)	6 (17)	
Treatment protocol			
De novo AML LMA-99 ^a	25 (84)	29 (82)	
De novo AML	3 (10)	2 (6)	NS
LMA-94 ^a	1(3)	2 (6)	
Secondary AML	1 (3)	2 (6)	
Pediatric AML	—	—	

WBC: white blood count; BM: bone marrow; FLT3-ITD: FLT3 internal tandem duplication; AML: acute myeloid leukemia.

^aAML M3 excluded.

group (LMA-94),²⁰ three patients with a secondary AML, and three children (two cases with *de novo* AML and one case with a secondary AML). Immunophenotyping and PCR (qualitative and quantitative) analysis from bone marrow at diagnosis and in the follow-up phase were performed at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) lab in Barcelona. Conventional karyotype was established using standard methods. The definition of a cytogenetic clone and descriptions of karyotypes followed the International System of Human Cytogenetic Nomenclature.²¹ The FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD⁺), point mutations in the tyrosine kinase domain of FLT3 (D835), and MLL rearrangements were also centrally analyzed at the HSCSP in Barcelona following well-established protocols.^{22,23} The white blood cell count (WBC), FAB diagnosis, clinical and outcome data were collected for each patient.

Treatment strategy

Patients included in the LMA-99 protocol were uniformly treated in accordance with the following schedule: one or two (if CR was not achieved with one chemotherapy course) cycles of induction therapy with IDICE (idarubicin, 12 mg/m² days 1, 3 and 5; etoposide, 100 mg/m² days 1, 2 and 3 and cytarabine, 500 mg/m²/12 h days 1, 3, 5 and 7). Patients who achieved a morphologic CR received one course of intensification treatment consisting of cytarabine (500 mg/m²/12 h days 1–6) and

mitoxantrone (12 mg/m² days 4–6). Patients in CR were then allocated to different risk groups according to their karyotype and the number of induction therapy courses required to achieve CR. The good prognosis group included patients with inv(16) or t(8;21). These patients were treated with high-dose cytarabine (HDAC; 3 g/m²/12 h days 1, 3 and 5) and were not considered for transplant in first CR.

Patients enrolled in the LMA-94 protocol received one or two courses of induction therapy with ICE (idarubicin 10 mg/m² days 1, 3 and 5; cytarabine 100 mg/m² on continuous infusion days 1–7; etoposide 100 mg/m² days 1–3). Patients in CR received the same intensification treatment as that used in the LMA-99 protocol. Patients with inv(16)/t(8;21) were treated with HDAC.

Pediatric patients were treated according to SHOP-LANL-96 (n = 1) and SHOP-LANL-2001 (n = 2) protocols and all of them received an autologous stem cell transplant (auto-SCT) as intensification therapy.

Two out of three patients with secondary AML were treated according to the LMA-99 protocol and the remaining patient received an allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning as first treatment.

Immunophenotypic analysis at diagnosis

The immunophenotype was performed on erythrocyte-lysed whole bone marrow (BM) samples obtained at diagnosis in 57 patients, 26 t(8;21) and 31 inv(16). Antigenic expression of leukemic cells was systematically analyzed by multiparametric FC using triple stainings with the following fluorochrome-conjugated (fluorescein isothiocyanate, FITC; phycoerythrin, PE; peridinin-chlorophyll protein, PerCp or phycoerythrin-cyanine 5, PE/Cy 5) combinations of monoclonal antibodies: CD15/CD34/HLA-DR, CD10/CD20/CD19, CD2/CD33/CD19, CD22/CD13/CD3, CD7/CD117/CD45, CD66/CD56/CD64, CD36/GA/CD45, CD34/CD41/CD45, CD34/CD11b/CD45, CD4/CD123/HLA-DR, CD14/CD135/CD45, CD5/CD16/CD45, MPO/CD79a/CD3, TdT/MPO and lysozyme/lactoferrin/CD3. The acquisition and analyses were performed on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). At least 10 000 events/tube were measured. Analytical gates were established according to CD45 reactivity and to FSC/SSC patterns. The PAINT-A-GATE PRO[®] software program (BDIS) was employed for subsequent data analysis.

MRD analysis by flow cytometry

The MRD study was performed in BM samples from patients in CR at different time points during and after therapy.

The strategy for MRD detection was based on detection of cells expressing an aberrant phenotype: asynchronous antigen expression, antigen overexpression and abnormal light scatter pattern. Monoclonal antibody combinations used in all cases were: CD15/CD34/HLA-DR, CD34/CD33/CD19, CD15/CD117/CD45 and CD34/CD123/HLA-DR. These combinations included immature and myeloid markers commonly expressed in most AML cases.^{24,25} Table 2 summarizes the most frequent aberrant phenotypes identified at diagnosis. In inv(16) and t(8;21) AML, CD34 and CD123 positivity were found in all cases whereas CD117, CD33 and HLA-DR showed positivity in 92–96% of cases. These four combinations were also investigated in 14 BM samples obtained from healthy donors, and the percentage of the aberrant phenotypes was measured. Evaluation of cells displaying leukemia-associated phenotypes was performed using a two-step acquisition procedure according to previously defined methods.^{6,22} To assess the sensitivity of this

Table 2 Distribution of aberrant phenotypes at diagnosis

Aberrant phenotypes	No. of cases AML1/ETO (%) (n=26)	No. of cases CBFbeta/MYH11 (%) (n=31)
	<i>Crosslineage antigen expression</i>	
CD2	—	14 (45)
CD7	—	1(3)
<i>Antigen overexpression</i>		
CD34	26 (100)	—
CD33	5 (19)	6 (19)
CD13	—	11 (35)
<i>Antigen underexpression</i>		
CD33	2 (8)	2 (6)
CD13	1 (4)	—
<i>Asynchronous antigen expression</i>		
CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD15 ⁺	17 (65)	24 (77)
CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD56 ⁺	14 (54)	—
CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD36 ⁺	1 (4)	17 (55)
CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ⁻	—	3 (10)
CD34 ⁺ CD33 ⁺ CD13 ⁻	1 (4)	—
CD34 ⁺ CD13 ⁺ CD33 ⁻	2 (8)	2 (6)
CD34 ⁺ CD14 ⁺	1 (4)	5 (16)
CD34 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁻	—	3 (10)
<i>Aberrant light-scatter patterns</i>		
CD123 ⁺ low FSC/SSC	26 (100)	31 (100)

approach, we performed serial dilutional experiments of leukemic cells with normal BM cells. The detection limit ranged from one leukemic cell among 10 000 normal BM cells (10^{-4}) to one neoplastic cell among 100 000 normal cells (10^{-5}).⁶

Qualitative RT-PCR and RQ-PCR

Mononucleated BM cells from patients were isolated using Lymphoprep[®] (Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Total RNA was extracted with Trizol (Gibco BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and quantified by spectrophotometry, and input amount was optimized for retrotranscription. RT-PCR was performed on 1 μ g of total RNA according to Biomed I recommendations.¹⁹

Qualitative RT-PCR was routinely performed at diagnosis and during follow-up using the protocols designed by the European Biomed Group.¹⁹ The *ABL* housekeeping gene was amplified as an internal control to check the RNA quality of each sample.

Quantitative *CBFbeta/MYH11* (types A, D and E) and *AML1/ETO* transcript levels were determined by RQ-PCR at diagnosis and in the follow-up according to methods developed by the European Concerted Action of the Europe Against Cancer Program²⁶ using the ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The PCR reaction was carried out in a 25 μ l reaction with 5 μ l of cDNA, 12.5 μ l (2 \times) Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of primers and a 200 nM concentration of *CBFbeta/MYH11* and *ABL* probes. A 100 nM concentration was used for the *AML1/ETO* probe. The reaction conditions were 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min for annealing and extension. Both PCR reactions had a sensitivity of 10^{-5} . All RQ-PCR experiments were performed in duplicate. The determination was repeated in cases with an outlying value. Standard curves for *CBFbeta/MYH11*, *AML1/ETO* and *ABL* were obtained using a dilution series of plasmids (Ipsogen, Marseilles, France). Fusion transcript

values obtained were normalized with respect to the number of *ABL* transcripts and expressed as fusion-gene copy number per 10^4 copies of *ABL*.

The estimated cutoff C_t value of negativity was 40 for *AML1/ETO* and 39 for *CBFbeta/MYH11*. These values were employed to establish the MRD sensitivity. Sensitivity level for each time point (induction, intensification and at the end of treatment) was assessed according to the method proposed by Biomed: $\text{SENS} = -\log_{10}(\text{NCN}, \text{normalized copy number}) - \log_{10}(\text{CGCN}, \text{control gene copy number})$.²⁶

Statistical analyses

CR and relapse were defined according to the criteria of the National Cancer Institute-sponsored workshop on AML.²⁷ Overall survival (OS) was measured from the date of enrollment until date of death and leukemia-free survival (LFS) for patients who achieved CR was measured from the date of CR to relapse or death. OS and LFS were plotted by the Kaplan–Meier method; differences between curves were analyzed by the log-rank test. The probability of relapse was calculated using cumulative incidence estimates and taking into account the competing risk. Univariate analyses of disease relapse were performed with univariate Cox models. For descriptive statistics, median, range and mean, or percentage of cases were calculated. Antigenic expression variability (positive vs negative) and other categorical variables were evaluated with Fisher's exact test. The Mann–Whitney *U* test was employed to compare continuous variables. A *P*-value <0.05 was considered significant.

Results

Follow-up and survival

The median follow-up for alive patients was 34 months (range: 5–108). Results of induction therapy were as follows: CR was obtained in 55 patients (84%); resistant disease was observed in three patients (5%) and seven patients (11%) died due to complications related to induction treatment.

Seven of 30 t(8;21) patients and 14 of 35 inv(16) patients died, resulting in an estimated OS after 2 years of 72 and 64%, respectively.

Of the 28 t(8;21) and 27 inv(16) patients achieving CR after induction therapy, seven and 10 patients relapsed, whereas three inv(16) patients died in first CR from treatment-related complications. In all, 21 t(8;21) and 14 inv(16) patients remained in continuous CR. The estimated LFS at 2 years was 73 and 50% in the t(8;21) and inv(16) groups, respectively. These differences between the two groups of patients were not statistically different.

Of 55 patients achieving CR after induction therapy, 53 received intensification treatment; one t(8;21) patient did not receive this treatment due to relapse and the other had a secondary inv(16) AML and underwent an allograft as a first treatment. In all, 52 of the 53 patients that received intensification completed the assigned treatment: HDAC (*n*=45), allo-SCT (*n*=2) and auto-SCT (*n*=5).

Molecular analysis

Qualitative RT-PCR was performed at diagnosis in 55 patients as follows: 25 cases with *AML1/ETO* and 30 with *CBFbeta/MYH11* rearrangements. The transcript types identified in *CBFbeta/MYH11* patients were type A (*n*=26, 87%), type D (*n*=2, 7%), type E (*n*=1, 3%), and, in one case, a new in frame transcript

including a fragment of exon 5 and 7 of MYH11 (Figure 1). This new transcript (Z) seems to be the largest described until now.²⁸ RQ-PCR was performed at diagnosis in 50 patients: 22 t(8;21) and 28 inv(16). The *AML1/ETO/ABL* transcript copy number $\times 10^4$ mean was 43710 (range: 15700–135000) and the *CBFbeta/MYH11/ABL* transcript copy number $\times 10^4$ was 14050 (range: 1400–58862). The mean value of the transcript number at diagnosis was higher for t(8;21) patients than for patients with inv(16) ($P=0.006$). Interestingly, the patient with the lowest *CBFbeta/MYH11* transcript level corresponded to a previously reported masked inv(16).²⁹ No significant differences were observed in the level of fusion gene transcript expression at presentation between patients who relapsed and those who remained in CR.

MRD assessment by FC

MRD was monitored in CR patients by FC in 173 follow-up samples obtained at different treatment time points: 40 after induction therapy, 30 after intensification therapy, 30 at the end of assigned chemotherapy treatment and 73 in subsequent controls. The mean amount of MRD detected was 1.15% (median: 0.8%, range: 0–6%) after induction, 0.2% (median: 0.05%; range: 0–1.2%) after intensification and 0.1% (median: 0.01%; range: 0–1%) at the end of treatment. No significant differences were found between relapsed and nonrelapsed patients in the mean amount of MRD detected, neither after induction (1 vs 1.5%) nor after intensification (0.18 vs 0.23%). The mean amount of MRD detected at the end of treatment in patients who relapsed was higher than for patients in continuous CR: 0.3 vs 0.08%, respectively ($P=0.002$). The mean MRD level after induction therapy was higher for t(8;21) patients than for those with inv(16): 1 vs 0.57% ($P=0.002$).

A cutoff level $>1\%$ after induction therapy and $>0.1\%$ after intensification and at the end of treatment correlated with a higher number of relapses (Table 3). MRD at the end of treatment was especially relevant because the CIR was 67% for patients with a level >0.1 and 21% for patients with a level $\leq 0.1\%$ ($P=0.03$) (Figure 2).

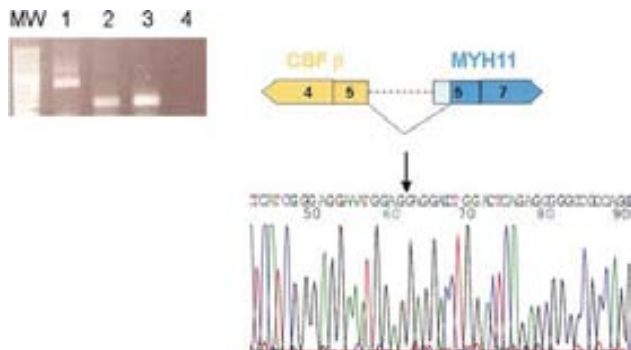


Figure 1 Z transcript: a new and large *CBFbeta/MYH11* transcript including a segment of exon 5 of *MYH11* gene detected in *de novo* AML. Quantitative PCR products obtained using the *CBFbeta/MYH11* type E primers were loaded on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (upper left). MW: molecular weight marker. Lane 1 disclosed an abnormal and larger fragment (265 bp) which was sequenced using forward and reverse primers. Lanes 2 and 3 corresponded to typical type E *CBFbeta/MYH11* transcripts (131 bp). Lane 4: negative control. Direct sequencing revealed a cryptic splice site on exon 5 of *MYH11* (right).

This was also true when t(8;21) and inv(16) patients were considered separately. The CIR according to MRD detected at the end of treatment for t(8;21) patients ($n=16$) was 67% when MRD was >0.1 and 15% when MRD was $\leq 0.1\%$ ($P=0.1$), and for inv(16) patients ($n=14$) it was 67 and 28% ($P=0.1$), respectively. The MRD level identified after intensification was important for outcome in inv(16) patients: the OS was 100% for patients with MRD $\leq 0.1\%$ ($n=11$) and 34% for patients with levels $>0.1\%$ ($n=7$) ($P=0.02$).

Patients with an MRD level $>0.1\%$ at any time between the completion of treatment and last follow-up had a higher risk of relapse than patients with MRD levels $\leq 0.1\%$; the CIR was 51 and 17%, respectively ($P=0.06$) (Table 3). This was especially important for inv(16) patients: 80% of patients with value $>0.1\%$ relapsed vs 15% of patients with levels $\leq 0.1\%$ ($P=0.02$).

Table 3 Cumulative incidence of relapse according to FC MRD identification in CR samples

Flow cytometry	MRD (%)	Relapse cumulative incidence at 2 years (%)	Relative risk (CI95%)	P-value
Induction, median (range)	0.8 (0–6)			
$\leq 1\%$	29 (72)	33	1.5 (0.5–4.5)	0.45
$> 1\%$	11 (28)	45		
Intensification, median (range)	0.1 (0–1.2)			
$\leq 0.1\%$	17 (57)	30	2.1 (0.6–6.9)	0.22
$> 0.1\%$	13 (43)	46		
End of treatment, median (range)	0.1 (0–1)	21	4.5 (1.2–17)	0.03
$\leq 0.1\%$	24 (80)	67		
$> 0.1\%$	6 (20)			
End of treatment+follow-up, median (range)	0 (0–1)			
$\leq 0.1\%$	24 (67)	17	3.4 (0.9–12)	0.06
$> 0.1\%$	12 (33)	51		

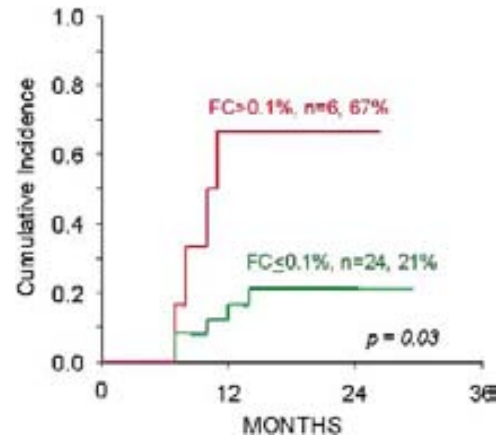


Figure 2 Prognostic value of a 0.1% cutoff value of MRD assessed by FC in AML with t(8;21) and inv(16). Cumulative incidence of relapse according to MRD detected by FC at the end of chemotherapy treatment.

MRD assessment by RQ-PCR

MRD was monitored in CR patients by RQ-PCR in 153 follow-up samples obtained at different treatment time points: 31 after induction therapy, 23 after intensification therapy, 23 at the end of assigned treatment and 76 in subsequent follow-up. The mean copy number of fusion transcripts detected after induction was 779 (median: 20; range: 0.001–20700), 26 after intensification (median: 3.2; range: 0.001–228) and 23 at the end of treatment (median: 3.3; range: 0.001–196). The mean copy number of fusion transcripts was higher in CR samples of patients who relapsed than in CR samples of patients remaining in continuous CR: 2385 for relapsed patients vs 122 for continuous CR patients ($P=0.001$) after induction; 56 vs 7.6 after intensification ($P=0.0001$), and 75 vs 3.3 at the end of treatment ($P=0.0001$).

After induction, five out of 12 (CIR 58%) patients with more than 100 fusion transcript copies relapsed whereas five out of 19 (CIR 35%) with fewer than 100 fusion gene copies relapsed ($P=NS$). After intensification, a threshold of 10 fusion gene copies was used and although patients with more than 10 copies relapsed more frequently than patients with fusion gene copies ≤ 10 , differences did not attain statistical significance (Table 4). Finally, at the end of treatment, three out of four patients with more than 10 fusion transcript copies relapsed, whereas only four out of 19 patients with ≤ 10 copies relapsed, resulting in an CIR of 75 and 21%, respectively ($P=0.04$) (Figure 3).

The persistence of more than 10 chimeric gene transcript copies at the end of treatment was associated with a high risk of relapse both in t(8;21) (CIR was 50% for patients with >10 copies and 14% for those with ≤ 10 copies; $P=0.2$) and in inv(16) (CIR was 100 and 26%, respectively; $P=0.06$) patients.

Analysis of follow-up samples obtained from the end of chemotherapy until the last control revealed that patients who had >10 copies at any time during the follow-up had a significantly higher risk of relapse than patients who always had levels ≤ 10 . The CIR at 2 years was 78% for patients with >10 copies and 13% for patients with ≤ 10 ($P=0.002$). This was relevant for inv(16) patients because all inv(16) patients with more than 10 copies at the end of treatment or in ensuing controls relapsed, whereas two of five t(8;21) patients with >10 ($Ct=35.4$) transcript copies analyzed following the BIOMED protocol were in CR after 1 and 4 years, respectively.

In tandem MRD analysis by FC and RQ-PCR

In 35 patients, 16 with t(8;21) and 19 with inv(16), MRD was assessed by FC and RQ-PCR at the same time point. A total of 74 samples were analyzed by both methods. The concordance rate was 67%: in 32 cases MRD was detected by both methods and in 18 samples MRD was ruled out by a negative result with the two tests. In five samples MRD was detected exclusively by FC and in 19 samples MRD relied exclusively on a positive RQ-PCR result (Table 5). MRD was identifiable in a larger number of samples with the combined use of both techniques. Only two of 13 patients with less than 0.1% of MRD detected by FC and less than 10 fusion gene copies detected by RQ-PCR at the end of treatment relapsed; one patient had a type D *CBFbeta/MYH11* transcript and the other presented a level >10 in the follow-up sample obtained 1 month later. The CIR at 2 years for patients with MRD $\leq 0.1\%$ by FC and <10 fusion gene copies at the end of treatment was 14 and 63% for patients with MRD $>0.1\%$ by FC and/or >10 by RQ-PCR ($P=0.03$).

Discussion

Leukemic cells which remain undetected after chemotherapeutic treatments are responsible for relapse in AML patients.

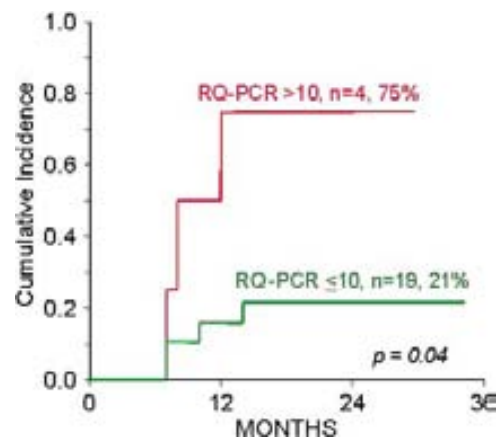


Figure 3 Prognostic value of a >10 copies cutoff value of MRD assessed by RQ-PCR in AML with t(8;21) and inv(16). Cumulative incidence of relapse according to MRD detected by RQ-PCR at the end of treatment.

Table 4 Cumulative incidence of relapse rate according to RQ-PCR MRD identification in CR samples

RQ-PCR	MRD (%)	Relapse cumulative incidence at 2 years (%)	Relative risk (CI95%)	P-value
<i>Induction, median (range)</i>	20 (0.001–20700)			
≤ 100	19 (61)	35	1.5 (0.4–5)	0.5
> 100	12 (39)	58		
<i>Intensification, median (range)</i>	3.2 (0.001–228)			
≤ 10	14 (61)	36	2.2 (0.6–7.3)	0.1
> 10	9 (39)	70		
<i>End of treatment, median (range)</i>	3.3 (0.001–196)			
≤ 10	19 (83)	21	4.9 (1–22)	0.04
> 10	4 (17)	75		
<i>End of treatment+follow-up, median (range)</i>	0.01 (0.001–109)			
≤ 10	24 (73)	13	8.9 (2.2–35)	0.002
> 10	9 (27)	78		

Table 5 Comparative results of MRD detected by FC and RQ-PCR in each time-point

	Induction (n = 31)		Intensification (n = 22)		End treatment (n = 21)		Total (n = 74)	
	FC+ (%)	FC- (%)	FC+ (%)	FC- (%)	FC+ (%)	FC- (%)	FC+ (%)	FC- (%)
RQ-PCR+ (%)	21 (68)	5 (16)	7 (32)	7 (32)	4 (19)	7 (33)	32 (43)	19 (26)
RQ-PCR- (%)	2 (6)	3 (10)	2 (9)	6 (27)	1 (5)	9 (43)	5 (7)	18 (24)
Concordance (%)	24 (77)		13 (59)		13 (62)		50 (67)	

FC: flow cytometry. Positive if present, negative if absent. FC sensitivity: 10^{-4} for each time point.
RQ-PCR: real-time RT-PCR. Positive if $C_t < 40$ for *AML1/ETO* patients and < 39 for *CBFbeta/MYH11* patients.
RQ-PCR sensitivity: induction $10^{-4.3}$ ($10^{-3.2}$ – $10^{-5.1}$), intensification $10^{-4.1}$ ($10^{-3.3}$ – 10^{-5}), end of treatment $10^{-4.3}$ ($10^{-3.4}$ – $10^{-4.9}$).

Multiparametric flow cytometry and molecular methods based on chimeric gene fusions are the preferred techniques in MRD studies.^{6,11,12,30–33} Both methods have their limitations. FC may be applied to most AML cases and has the capacity to assess the status of nonleukemic compartments in the sample. Nevertheless, it requires a relatively large panel of monoclonal antibodies to detect the most common immunophenotypic aberrations, and also a certain degree of expertise. Sensitivity (i.e. the ability to detect a neoplastic cell in a mixed population of normal cells) is lower than for RT-PCR and it may consequently fail to detect a small residual tumor burden, leading to false-negative results. RT-PCR interpretation is easier and can detect one leukemic cell in 10^5 – 10^6 normal cells. Real-time RT-PCR has been successfully applied to the follow-up of t(8;21) and inv(16) AML patients.^{11,12,30,33,34}

The presence of MRD has been associated with an increased risk of relapse in most clinical studies.^{6–18} In our series we demonstrated that both FC and RQ-PCR may provide complementary information in the MRD follow-up of t(8,21) and inv(16) AML patients. Previous studies using multiparametric FC have shown the prognostic value of MRD identification after AML treatment. FC has been proposed as a valuable tool to stratify the risk of relapse after induction and it has also been correlated with OS in some studies.^{6–10} Data obtained from patients with CBF leukemias suggest that MRD levels after induction therapy failed to detect patients at high risk of relapse. Our results support earlier findings from studies suggesting the amount of MRD detected by FC at the end of the planned treatment is associated with a high risk of relapse. The cutoff level of $>0.1\%$ at this time point has also been proposed by other authors.¹⁰

RQ-PCR can determine the amount of leukemic fusion transcripts arising from chromosome translocations. PCR evaluation of CR samples has been successful in other leukemia types. Molecular methods have been widely used to identify patients at risk in acute promyelocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia.^{34–37} RQ-PCR have not been routinely applied to detect *AML1/ETO* and *CBFbeta/MYH11* fusion genes in large clinical protocols. BIOMED standardization efforts represent a major advance in implementing these techniques in clinical studies.^{19,26} Using conventional nested RT-PCR assays, most authors have found *AML1/ETO* transcripts in patients in CR, even many years after therapy has ended.^{13,16,17,33} These results may be explained in the light of our findings; *AML1-ETO* long survivors may harbor a relatively high number of copies (>10 copies). In the case of inv(16), standard nested RT-PCR studies have produced conflicting results: about 20–30% of PCR-negative patients eventually relapsed and few long-term survivors achieved PCR negativity.^{11,12,30}

Threshold levels that identify patients with a high risk of relapse have been reported by different authors for inv(16) and

t(8;21) AML cases.^{11,12,30,38} We tried to define a threshold for each treatment point, but in early phases of CR we were unable to find differences between relapsed and nonrelapsed patients. In contrast, at the end of the planned treatment a cutoff of copy number >10 was found to be useful to discriminate between patients with high and low risk of relapse. These results are in agreement with previous data reported for inv(16) patients by other groups.^{11,12,30} The clinical relevance of this value is emphasized by the fact that only three patients with fewer than 10 copies have relapsed. We found that most inv(16) patients who remained in continuous CR achieved a PCR level of 1 copy. Most importantly, they maintained this level for a long time whereas most relapsed patients did not achieve the threshold of 1 copy (only two relapsed patients reached this level). In contrast, we observed levels >10 copies in the follow-up of t(8;21) patients in continuous CR.

We found a strong concordance between the two MRD methods. Discordant cases may be of special interest as is exemplified by the inv(16) patient with a new transcript reported herein. *CBFbeta/MYH11* rearrangements are heterogeneous and may escape conventional molecular methods. FC results are of special concern in this setting. The combination of two techniques and the future establishment of thresholds may facilitate the introduction of therapeutic changes based on MRD results.^{37,39} In our series, only two patients with values of less than 0.1% by FC and <10 copies at the end of treatment relapsed and both patients had an inv(16). Strict follow-up was available in one of these two cases. In this patient, relapse was preceded by an increase in the tumor burden detected by FC and RQ-PCR.

In accordance with our results, it seems appropriate to investigate the MRD status at the end of the chemotherapy treatment. Future prospective studies should solve this issue. In conclusion, MRD analysis represent a feasible strategy to stratify AML patients with favorable cytogenetics. Standardization and simplification of analytical methods will enhance their use in ongoing and future clinical trials.

Acknowledgements

This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Grants (GO3/008 and C03/010) and XT2004/00058 from Generalitat of Catalonia. GP is a recipient of a grant of the Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH).

References

- 1 Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G et al. The importance of diagnostic cytogenetics on

- outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; **92**: 2322–2333.
- 2 Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, Davey FR *et al*. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Blood* 1997; **90**: 1643–1648.
 - 3 Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pignoux A *et al*. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2002; **99**: 3517–3523.
 - 4 Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F *et al*. Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003; **102**: 462–469.
 - 5 Schlenk RF, Benner A, Krauter J, Büchner T, Sauerland C, Ehninger G *et al*. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 1–11.
 - 6 San Miguel JF, Martínez A, Macedo A, Vidriales MB, López-Berges C, González M *et al*. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997; **90**: 2465–2470.
 - 7 San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C *et al*. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001; **98**: 1746–1751.
 - 8 Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, Gerbing RB, Bernstein ID, Smith FO *et al*. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; **101**: 3398–3406.
 - 9 Kern W, Voskova D, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; **104**: 3078–3085.
 - 10 Feller N, van der Pol MA, van Stijn A, Weijers GWD, Westra AH, Evertse BW *et al*. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; **18**: 1380–1390.
 - 11 Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, Montefusco V, Visani G, Bonifazi F *et al*. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002; **99**: 443–449.
 - 12 Guerrasio A, Pilatrin C, De Micheli D, Cilloni D, Serra A, Gottardi E *et al*. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia* 2002; **16**: 1176–1181.
 - 13 Morschhauser F, Cayuela JM, Martini S, Baruchel A, Rousselot P, Sociè G *et al*. Evaluation of minimal residual disease using reverse-transcription polymerase chain reaction in t(8;21) acute myeloid leukemia: a multicenter study of 51 patients. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 778–794.
 - 14 Krauter J, Görlich K, Ottmann O, Lübbert M, Döhner H, Heit W *et al*. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 4413–4422.
 - 15 Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia: is molecular monitoring by RT-PCR useful clinically? *Eur J Haematol* 2003; **71**: 143–154.
 - 16 Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PAS *et al*. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 2000; **95**: 815–819.
 - 17 Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, Baer MR, Strout MP, Oberkircher AR *et al*. Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 1996; **88**: 2183–2191.
 - 18 Viehmann S, Teigler-Schlegel A, Bruch J, Langebrake C, Reinhardt D, Harbott J. Monitoring of minimal residual disease (MRD) by real-time quantitative reverse transcription PCR (RQ-RT-PCR) in childhood acute myeloid leukemia with AML1/ETO rearrangement. *Leukemia* 2003; **17**: 1130–1136.
 - 19 Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G *et al*. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; **13**: 1901–1928.
 - 20 Brunet S, Esteve J, Berlanga J, Ribera JM, Bueno J, Martí JM *et al*. Treatment of primary acute myeloid leukemia: results of a prospective multicenter trial including high-dose cytarabine or stem cell transplantation as post-remission strategy. *Haematologica* 2004; **89**: 940–949.
 - 21 ISCN. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Mitelman F (ed). Karger: Basel, 1995.
 - 22 Muñoz L, Nomdedéu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM *et al*. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 2003; **17**: 76–82.
 - 23 Muñoz L, Aventín A, Villamor N, Juncà J, Acebedo G, Domingo A *et al*. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Haematologica* 2003; **88**: 637–645.
 - 24 Macedo A, Orfao A, Gonzalez M, Vidriales MB, López-Berges MC, Martínez A *et al*. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia* 1995; **9**: 993–998.
 - 25 Macedo A, Orfao A, Martínez MB, Valverde B, López-Berges MC, San Miguel JF. Immunophenotype of c-kit cells in normal human bone marrow: implications for the detection of minimal residual disease in AML. *Br J Haematol* 1995; **89**: 338–341.
 - 26 Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N *et al*. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia- A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; **17**: 2318–2357.
 - 27 Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH *et al*. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukaemia. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 4642–4649.
 - 28 Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, Collins FS. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995; **85**: 2289–2302, Erratum in: *Blood* 1997; **89**: 1842.
 - 29 Aventín A, La Starza R, Nomdedéu J, Brunet S, Sierra J, Mecucci C. Typical CBFbeta/MYH11 fusion due to insertion of the 3'-MYH11 gene into 16q22 in acute monocytic leukemia with normal chromosomes 16 and trisomies 8 and 22. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; **123**: 137–139.
 - 30 Van der Reijden BA, Simons A, Luiten E, van der Poel SC, Hogenbirk PE, Tönnissen E *et al*. Minimal residual disease quantification in patients with acute myeloid leukemia and inv(16)/CBFB/MYH11 gene fusion. *Br J Haematol* 2002; **118**: 411–418.
 - 31 Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K *et al*. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 2001; **97**: 3574–3580.
 - 32 Campana D. Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003; **121**: 823–838.
 - 33 Marcucci G, Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia* 1998; **12**: 1482–1489.

- 34 Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA⁺, AML1-ETO⁺, or CBFB-MYH11⁺ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003; **102**: 2746–2755.
- 35 Diverio D, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F *et al*. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter 'AIDA' trial, GIMEMA.AIEOP Multicenter 'AIDA' Trial. *Blood* 1998; **92**: 784–789.
- 36 Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P. Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **26**: 355–365.
- 37 Neale GAM, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH *et al*. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; **18**: 934–938.
- 38 Leroy H, de Botton S, Grardel-Duflos N, Darre S, Leleu X, Roumier C *et al*. Prognosis value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). *Leukemia* 2005; **19**: 367–372.
- 39 Malec M, Van Der Velden VH, Bjorklund E, Wijkhuijs JM, Soderhall S, Mazur J *et al*. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia* 2004; **18**: 1630–1636.

4.3. ANEXOS

En el siguiente apartado se describen los resultados de un artículo publicado referente a la caracterización inmunofenotípica de las LMA al diagnóstico y al significado pronóstico de la expresión de algunos antígenos.

4.3.1. TRABAJO SOBRE CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS LMA AL DIAGNÓSTICO

Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients.

Leukemia Research 2005; 29: 1109-1116.

En 266 pacientes adultos (<60 años) diagnosticados de LMA *de novo* e incluidos en el protocolo LMA-99 se realizó un estudio de las características inmunofenotípicas de la población blástica al diagnóstico mediante CF y se evaluó la implicación pronóstica de la expresión de determinados marcadores inmunológicos en estos pacientes. El estudio inmunofenotípico se realizó en médula ósea utilizando un amplio panel de combinaciones triples de anticuerpos monoclonales. Los resultados de este estudio se describen a continuación:

- El fenotipo más común en los pacientes con LMA *de novo* del adulto fue: CD34+, HLA-DR+, CD13+, CD33+, CD117+, CD123+ y MPO+.
- El antígeno CD2 fue positivo en 21 casos (8%) y se asoció a la presencia de una inv(16) en 8 casos (38%). Se objetivó que la SG de los pacientes CD2+ fue inferior que la de los pacientes con CD2 negativo y esto fue a expensas de una baja probabilidad de alcanzar RC en los pacientes CD2+/inv(16)-: sólo 1 de los 13 pacientes alcanzó la RC. La buena evolución de los pacientes con inv(16) no se vio afectada por la positividad del CD2.
- El antígeno CD36 se expresó en 98 pacientes con LMA (37%). La positividad de este marcador se asoció con mayor leucocitosis al diagnóstico, con subtipos de la FAB M4-M5 y a la presencia de una +8 (7 de los 8 pacientes con +8 presentaron positividad

del CD36). Cabe destacar que los pacientes con CD36+ presentaron una menor SG y SLE y un mayor riesgo de recaída.

- En los análisis multivariados, la expresión de CD2 se asoció con una menor probabilidad de alcanzar RC, junto con la positividad de CD7 y la citogenética al diagnóstico. La expresión de CD36 y la citogenética al diagnóstico se correlacionaron con una menor SG y SLE.
- La expresión de CD2 y CD36 al diagnóstico podrían proporcionar información pronóstica relevante en los pacientes adultos con LMA *de novo*.

Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients

G. Perea, A. Domingo, N. Villamor, C. Palacios, J. Juncà, P. Torres, A. Llorente, C. Fernández, M. Tormo, M.P. Queipo de Llano, J. Bargay, M. Gallart, L. Florensa, P. Vivancos, J.M. Martí, Ll. Font, J. Berlanga, J. Esteve, J. Bueno, J.M. Ribera, S. Brunet, J. Sierra, J.F. Nomdedéu*,

for the CETLAM GroupSpain

Laboratori d'Hematologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avda Sant Antoni M. Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

Accepted 15 February 2005

Abstract

Background and objectives: A consecutive series of acute myeloid leukemias (AML) patients was analyzed in conditions which reduce the inter-assay variations (the same flow cytometer, the same observers and the same panel of monoclonal antibodies) in order to investigate the prognostic information provided by flow cytometry.

Design and methods: Two hundred and sixty-six bone marrow (BM) samples from 326 patients enrolled in the LMA-99 protocol from the CETLAM group were studied by multiparametric flow cytometry. Immunophenotyping studies were performed on erythrocyte-lysed BM samples. Antigen expression of leukemic cells was analyzed using triple stainings with fluorochrome-conjugated combinations of monoclonal antibodies.

Results: CD2 was positive in 21 cases (8%); an associated inv(16) was detected in eight CD2+ cases (38%). Two-year overall survival (OS) rate for CD2+/inv(16)+ patients was 75%, whereas it was 0% for CD2+/inv(16)– patients and 47% for CD2– patients ($p=0.0001$). CD36 was expressed in 37% of patients ($n=98$). Two-year leukemia-free survival (LFS) rate was 34% for CD36+ patients and 55% for CD36– patients ($p=0.001$). In the multivariate analysis, CD2+ (RR = 8.4; $p=0.0001$) and adverse karyotype (RR = 10.2; $p=0.0001$) were associated with a lower CR rate, CD36+ (RR = 1.5; $p=0.03$), CD2+ (RR = 2; $p=0.04$) and adverse karyotype (RR = 4; $p=0.0001$) were associated with a lower OS and CD36+ (RR = 2; $p=0.002$) and adverse karyotype (RR = 3.5; $p=0.005$) predicted a lower LFS.

Conclusions: CD2+ patients had a very poor OS when CD2/inv(16)+ cases were excluded. CD36 and CD2 expression at diagnosis can provide prognostically important information in adult de novo AML.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: AML; Prognostic factors; CD36; CD2; CD7

1. Introduction

Acute myeloid leukemias (AML) are a heterogeneous group of diseases with respect to their pathogenesis, natural history and prognosis. Immunophenotyping findings provide valuable information to establish the AML diagnosis [1–3]. The combination of surface and intracellular antigen analysis using flow cytometry allows to distinguish lymphoid from

myeloid leukemias, and to detect the lineage infidelity, the maturational asynchrony and the abnormal antigenic expression, which can be used in minimal residual disease studies [4,5].

Despite these improvements, the prognostic value of immunophenotyping in AML remains controversial. Some studies have failed to show any significant association between immunophenotype and the response to chemotherapy and survival, whereas others have shown an adverse prognosis associated with expression of antigens, such as terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), CD7, CD34 or

* Corresponding author. Tel.: +34 93 2919000x2359; fax: +34 93 2919192.
E-mail address: jfnomde@santpau.es (J.F. Nomdedéu).

CD56. These studies are prone to reproducibility difficulties mostly attributable to technical constraints (different clone and fluorochromes, analysis procedures) [2,3,6–10] and to the impact of other prognostic factors, such as cytogenetics, early blast clearance and molecular findings (FLT3) [11–14].

In this report, we analyzed the immunophenotypic findings in 266 adult patients with de novo AML included in a multicenter trial in conditions which minimize the interassay variations; the same panel of monoclonal antibodies was used throughout the study, the same flow cytometer was employed and all analyses were performed by the same two observers.

2. Patients and methods

2.1. Patients

Between November 1998 and July 2003, 326 adult patients with de novo AML were included sequentially in a multicenter LMA-99 protocol from the CETLAM (Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias agudas y Mielodisplasias) study group. The protocol inclusion criteria comprised patients with age ≤ 60 years and first diagnosis of de novo AML, excluding acute promyelocytic leukemia and secondary AML. A bone marrow sample at diagnosis for immunophenotyping study was available in 266 of 326 patients and only these patients were eligible for the present study. Immunophenotyping was centrally performed in the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) in Barcelona. Flow cytometry results were analyzed twice and concordance between the results for each antigen was checked. Standard karyotyping was performed in each participating center and was available in 254 patients (95%). The definition of a cytogenetic clone and descriptions of karyotypes followed the International System of Human Cytogenetic Nomenclature [15]. FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD⁺), AML1-ETO, CBF β -MYH11 and MLL rearrangements were also centrally analyzed at the HSCSP in Barcelona following well-established protocols [16–19]. The white blood cell count (WBC), FAB diagnosis, clinical and outcome data were collected for each patient.

2.2. Treatment strategy

All patients (except one case) were uniformly treated following the LAM-99 protocol consisting of one or two (if complete remission (CR) was not achieved with one chemotherapy course) cycles of induction therapy with IDICE (idarubicin, 12 mg/m² days 1, 3 and 5; etoposide, 100 mg/m² days 1, 2 and 3 and cytarabine, 500 mg/m²/12 h days 1, 3, 5 and 7). Patients who achieved a morphologic CR received one course of intensification treatment consisting of cytarabine (500 mg/m²/12 h days 1–6) and mitoxantrone (12 mg/m² days 4, 5 and 6). Patients in CR were then allocated to different risk groups according to the karyotype (CETLAM criteria) and the number of induction therapy courses required to

achieve CR. The good prognosis group included patients with inv(16) or t(8;21). These patients were treated with high-dose cytarabine (HDAC) and were not considered for transplant in first CR. Patients included in the intermediate prognosis group were those with a normal karyotype (analyzed ≥ 20 metaphases) who only needed one induction therapy course to achieve CR. These patients received an autologous stem cell transplant (auto-SCT). Finally, the poor prognosis group included patients with cytogenetic abnormalities other than inv(16)/t(8;21) and/or patients with a normal karyotype that required two induction therapy cycles to achieve CR. These patients received an allogeneic stem cell transplant (allo-SCT) if an HLA sibling donor was available, or an autologous transplant in those cases without HLA sibling donor. Patients without available karyotype (not performed or no mitosis) or with fewer than 20 metaphases were also included in the poor prognosis group.

After induction therapy, 193 (73%) patients achieved a CR. According to the LMA-99 protocol, 31 patients received HDAC and 121 received a stem cell transplant (77 auto-SCT and 44 allo-SCT). The remaining 41 CR patients were not transplanted for different causes: pre-transplant relapse ($n = 19$), contraindication ($n = 18$) or mortality related to the intensification therapy ($n = 4$).

2.3. Immunophenotyping

The immunophenotype was performed on erythrocyte-lysed bone marrow samples obtained at diagnosis. The number of cells was quantified by microscopy and adjusted to 1×10^6 in each tube. Antigenic expression of leukemic cells was analyzed by triple fluorochrome (fluorescein isothiocyanate, FITC; phycoerythrin, PE; peridinin–chlorophyll protein, PerCP or phycoerythrin–cyanine 5, PE/Cy 5) conjugated monoclonal antibody combinations as follows: CD15/CD34/HLA-DR, CD10/CD20/CD19, CD2/CD33/CD19, CD22/CD13/CD3, CD7/CD117/CD45, CD66/CD56/CD64, CD36/glycophorin A (GA)/CD45, CD34/CD41/CD45, CD34/CD11b/CD45, CD4/CD123/HLA-DR, CD14/CD135/CD45, CD5/CD16/CD45, myeloperoxidase (MPO)/CD79a/CD3, TdT/MPO and lysozyme/lactoferrin/CD3.

The clones used in the study were: CD22 (4KB128 FITC), GA (JC159 PE), CD41 (5B 12 PE), CD79a (HM57 PE), CD20 (B-Ly1 PE), CD66 (Kat4c FITC), TdT (HT-6FITC), CD117 (10402 PE), CD64 (10.1 PerCP), CD19 (HD37 PE/Cy5) and MPO (MPO-7 FITC, PE) from DAKO, Glostrup, Denmark; CD34 (8G12 FITC, PE), HLA-DR (L243 PerCP), CD10 (W8E7 FITC), CD2 (S5.2 FITC), CD33 (P67.6 PE), CD7 (4H9 FITC), CD45 (2D1 PerCP), CD13 (L138 PE), CD14 (M0P9 FITC), CD3 (SK7 PerCP), CD4 (SK4 FITC), CD5 (L17F12 FITC), CD56 (MY31 PE), CD16 (3G8 PE) and CD11b (D12 PE) purchased from Becton Dickinson, San José, California, USA (BDIS); CD15 (CYT-15F4 FITC) and CD36 (CYT-36F FITC) from Cytognos, Salamanca, Spain; lysozyme (LZ.2 FITC), lactoferrin (3C5

PE) and CD135 (BV10A4H2 PE) from Caltag Laboratories, Burlingame, USA; CD123 (9F5 PE) from Pharmingen, San Diego, CA, USA.

The acquisition and analyses were performed on a FAC-SCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). At least 10,000 events/tube were measured. Analytical gates were established according to CD45 reactivity and to FSC/SSC patterns. The PAINT-A-GATE PRO[®] software program (BDIS) was employed for subsequent data analysis. The positivity threshold was 20% for all markers except for intracellular/intranuclear markers and for CD117, for which a 10% value was used.

2.4. TCR analysis

T-cell receptor (TCR) status was investigated in DNA from BM samples at diagnosis. PCR amplification was performed using a multiplex master mixed target conserved regions flanking the CDR-3 region of TCR γ (Tube A: V γ If and V γ 10 primers + J γ 1.1/2.1 and J γ 1.3/2.3 and Tube B: V γ 9 and V γ 11 primers + J γ 1.1/2.1 and J γ 1.3/2.3) and TCR β (Tube A: 23V β + 6J β 1 and 3J β 2 primers and Tube B: 23V β + 4J β 2 primers) obtained from InVivoScribe Technologies (Carlsbad, CA, USA). PCR products were analyzed by differential fluorescence detection using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.5. Statistical analyses

Complete remission (CR) and relapse were defined according to the criteria of the National Cancer Institute-sponsored workshop on AML [20]. For statistical analysis cytogenetic stratification was established following the CET-LAM and the MRC criteria [11]. Overall survival (OS) was measured from the date of enrolment until date of death, and leukemia-free survival (LFS) for patients who achieved CR was measured from the date of CR to relapse or death. OS and LFS were plotted by the Kaplan–Meier method; differences between curves were analyzed by the log-rank test. For descriptive statistics, median, range and mean or percentage of cases was calculated. Antigenic expression variability (positive versus negative) and other categorical variables were evaluated with the chi-square (χ^2) test. Multivariate analysis was performed using the Cox regression model to determine the independent prognostic factors for OS, LFS and CR rate. A p -value ≤ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Antigenic expression in AML patients

Complete immunophenotype was available in 266 patients (81%). Median age was 44 years with 35% of patients over 50 years. According to the FAB criteria, the most frequent subtypes observed were M2 (23%) and M5 (25%). Cyto-

Table 1
Main clinical and biological characteristics

	Whole series (<i>n</i> = 326)	Eligible patients (<i>n</i> = 266)
Age, median (range) (years)	45 (16–60)	44 (16–60)
>50 years (%)	118 (36)	93 (35)
Sex (%)		
Male	188 (58)	154 (58)
Female	138 (42)	112 (42)
WBC ^a ($\times 10^9/l$)		
Median (range)	18.5 (0.8–410)	18 (0.8–410)
FAB classification (%)		
M ₀	21 (6)	15 (6)
M ₁	62 (19)	50 (19)
M ₂	75 (23)	61 (23)
M ₄	55 (17)	44 (16)
M _{4Eo}	15 (4)	11 (4)
M ₅	74 (23)	66 (25)
M ₆	7 (2)	6 (2)
M ₇	2 (1)	2 (1)
AML + dysplasia	9 (3)	6 (2)
Not classified	6 (2)	5 (2)
Cytogenetics (%)	312/326 (95)	254/266 (95)
Normal (\geq metaphases)	120 (38)	99 (39)
t(8;21)	24 (8)	21 (8)
inv(16)/t(16;16)	27 (9)	22 (9)
Complex karyotype	31 (10)	25 (10)
+8	9 (3)	8 (3)
Other abnormalities	53 (17)	53 (21)
Absence of mitosis	38 (12)	26 (10)
FLT3 (%)	237/326 (73)	222/266 (83)
Wild type	176 (74)	165 (74)
Internal tandem duplication	61 (26)	57 (26)
MLL (%)	225/326 (69)	211/266 (79)
Wild type	202 (90)	188 (89)
Rearranged	23 (10)	23 (11)
Outcome (%)	324/326	265/266
Complete remission	237 (73)	193 (73)
Failure	53 (16)	41 (15)
Death	34 (11)	31 (12)
OS ^b (months) (median, range)	13.5 (0.03–67.4)	11.7 (0.03–63)
LFS ^c (months) (median, range)	11.5 (0.7–63.5)	10.5 (0.7–59)

^a WBC: white blood count.

^b OS: overall survival.

^c LFS: leukemia-free survival.

netic analysis was available in 95% of cases. Clinical and biological characteristics are shown in Table 1.

Immunophenotypic analysis showed that almost all AML patients expressed CD13, CD33 and CD117 on leukemic cells. Co-expression of these antigens was observed in 81% of cases whereas isolated lack of expression of any of them was observed in 4, 5 and 5%, respectively (Table 2). CD123 positivity was found in all the cases [21].

CD34 and HLA-DR were commonly detected in AML (66 and 85%, respectively), and were co-expressed in 60% of cases. In 24 patients (9%), CD34 and HLA-DR were neg-

Table 2
Antigen expression in acute myeloid leukemia

Antigen	Positive cases (%)	Antigen	Positive cases (%)
CD34	175/266 (66)	CD36	98/266 (37)
CD15	162/263 (62)	CD7	42/264 (16)
HLA-DR	226/266 (85)	CD2	21/264 (8)
CD13	244/264 (92)	CD4	83/258 (32)
CD33	249/264 (94)	CD79a	0/266 (0)
CD117	242/265 (91)	CD22	0/266 (0)
CD123	266/266 (100)	MPO	209/266 (79)
CD56	49/264 (19)	TdT	30/266 (11)

active and this phenotype was associated with FLT3-ITD⁺ in 11 cases ($p=0.009$). CD15 expression was associated with CD34 and HLA-DR positivity in 58% (95/162) of cases whereas CD15 expression was associated with CD34 and HLA-DR negativity in only 3% of cases.

CD56 was expressed in 19% of cases, CD4 in 32%, TdT in 11% and CD7 in 16% of cases. No single case showed expression of CD10, CD22 and cytoplasmic CD79a. No differences in survival or in CR were observed according to CD56, CD34, CD15 and TdT expression. CD7 expression was associated in univariate analysis with a lower remission rate ($p=0.05$), unfavorable cytogenetics ($p=0.004$), FLT3-ITD⁺ ($p=0.009$), CD56 negativity ($p=0.002$) and CD2 positivity ($p=0.05$). In the multivariate analysis, CD56 negativity, CD2 positivity and adverse cytogenetics were the only statistically significant factors associated with CD7 expression.

3.2. CD2 expression was associated with a dismal outcome in CBF/MYH11-patients

The CD2 antigen was detected in 21 cases (8%). It was expressed in all FAB AML subtypes, but was more common in M4 (48%, including four cases of M4 with eosinophilia) and M5 (19%) cases. Univariate analysis showed a positive association between CD2 and other antigens: CD34 ($p=0.002$), CD7 ($p=0.05$) and HLA-DR ($p=0.05$); and a negative association with CD33 ($p=0.003$). Most CD2+ patients were chemo-resistant to induction therapy (only 35% of patients achieved CR versus 76% of CD2- patients, $p=0.001$) and most of them relapsed (74% versus 39%, $p=0.006$). The 2-year OS was 31% for CD2+ patients and 47% for CD2- patients ($p=0.01$) (Fig. 1a).

Cytogenetic analysis was available in all CD2+ patients. Normal karyotype was present in six cases (28%), inv(16) in eight cases (38%), adverse karyotype according to the MRC criteria in four cases (19%), other abnormalities in two cases (9%) and the remaining patient showed no mitosis. No single t(8;21) patient expressed CD2.

CD2+ patients were analyzed according to the presence or absence of inv(16). Table 3 summarizes these findings. CD7 expression was detected in 50% of CD2+/inv(16)- cases whereas no CD2+/inv(16)+ displayed CD7 expression. No single CD2+/inv(16)-/CD7+ AML case showed positivity for other T-cell lineage antigens, such as CD4, CD8, CD5

Table 3
CD2-positive patient characteristics according to the presence of inv(16)

	CD2+/inv(16)-	CD2+/inv(16)+	p-value
Age >50 years	1/13	5/8	0.01
CD15-	8/13	0/8	0.007
CD7+	7/13	0/8	0.01
CD4-	12/13	3/8	0.01
MPO-	7/13	0/8	0.01
MLL	1/13	0/7	ns
Adverse cytogenetics ^a	4/13	0/8	ns
FLT3-ITD ⁺	4/12	0/7	ns
CR	1/13	6/8	0.004

MPO: myeloperoxidase; ITD: internal tandem duplication; ns: not significant.

^a According to the MRC criteria.

or cytoplasmic CD3, whereas TdT were expressed in two of these cases. CD13 and CD117 were positive in all these cases. When we compared the OS for patients CD2+/inv(16)-, CD2+/inv(16)+ and for CD2- patients, the worse results were those obtained for CD2+/inv(16)- patients: 2-year OS was 0, 75 and 47%, respectively ($p=0.0001$) (Fig. 1b). The lower CR rate observed in CD2+ patients was attributable to the fatal outcome of CD2+/inv(16)- patients. TCR rearrangements were studied in 12CD2+/inv(16)- patients. In three of these cases, a TCR γ rearrangement was detected (25%) [22,23].

3.3. AML patients with CD36 expression had a poor outcome

CD36 positivity was observed in 98 cases (37%) (Table 4). CD36+ and CD36- cases were comparable in terms of age and sex distribution. Cytogenetic analysis was available in 92 of 98 CD36+ patients. Normal karyotype was present in 36 patients (39%), 14 patients had an inv(16) (15%) and CD36 was associated with t(8;21) only in one case. Other chromosomal abnormalities were detected in 37 CD36+ cases

Table 4
Patients' characteristics according to CD36 expression

	CD36+	CD36-	p-value
Age >50 years	29/98	64/168	ns
M4/M5	73/96	48/167	0.0001 ^a
WBC >20 × 10 ⁹ /l	63/98	62/168	0.0001 ^a
CD34-	43/98	48/168	0.01
HLA-DR+	92/98	134/168	0.002
CD15+	84/96	78/167	0.0001 ^a
CD117-	12/88	7/143	0.005
CD4+	44/94	39/164	0.0001
+8	7/92	1/163	0.004 ^a
MLL	12/83	11/128	ns
FLT3-ITD ⁺	27/85	30/138	ns
Risk of relapse (%)	61 ± 7	40 ± 5	0.002

WBC: white blood count; ITD: internal tandem duplication; ns: not significant.

^a Variables with statistical significance in the multivariate study: CD15+ (RR = 4.5; $p=0.0001$), WBC >20 × 10⁹/l (RR = 2; $p=0.03$), +8 (RR = 14; $p=0.03$) and M4/M5 (RR = 4.7; $p=0.0001$).

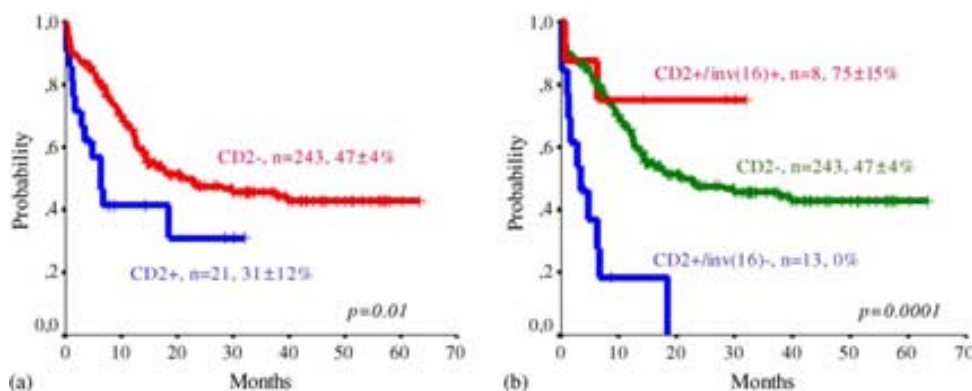


Fig. 1. (a) OS curve according to CD2 expression. (b) OS curves for CD2+ patients according to inv(16) and CD2- patients.

as follows: seven patients had MLL rearrangements, seven patients disclosed a +8, 10 patients had a complex karyotype and 13 showed other abnormalities. In four cases, the karyotype was normal but fewer than 20 metaphases were analyzed. Adverse karyotype, according to the MRC criteria, was not significantly associated with CD36 expression but an association between CD36+ and +8 was detected. In the whole series, eight patients showed +8 as a single chromosomal abnormality and CD36 was expressed in seven (87%) of these cases ($p=0.004$). In the multivariate analysis, WBC $>20 \times 10^9/l$ at diagnosis, CD15 expression, M4/M5 FAB subtypes and +8 were significantly associated with CD36 expression.

An association between FLT3-ITD⁺ and monocytic markers such as CD36 has previously been reported [19]. In this series, FLT3-ITD⁺ was detected in 27 out of 85 CD36+ patients analyzed (32%) while in CD36- patients, this mutation was found in 22% of cases. This positive association, however, was not statistically significant. Outcome was not different for CD36+ patients according to the FLT3 status.

To establish comparisons between CD36+ and CD36- cases in terms of chemosensitivity, clinical response was evaluated after induction therapy. CD36 positivity did not influence the CR rate; CR was achieved in 123/167 CD36- patients (74%) and in 69/98 CD36+ patients (70%). No differences in post-remission therapy between CD36+ and CD36- cases were observed; 64% of CD36+ patients and 62% of CD36- received a stem cell transplant.

Survival analysis was performed and, as depicted in Fig. 2a, the 2-year OS and LFS rates were shorter in CD36+ patients than in CD36- cases. The OS rates were 39% for CD36+ patients and 49% for CD36- patients ($p=0.02$), and the LFS rates were 34 and 55%, respectively ($p=0.001$). A higher risk of relapse for CD36+ patients was also observed (61% versus 40%, $p=0.002$).

A normal karyotype was present in 99 cases (39%) and CD36 was positive in 36 (36%). Frequency of CD36 positivity was the same for the entire series and for normal karyotype subgroups (37% versus 36%). The 2-year LFS rate was shorter in CD36+ patients (32% for CD36+ patients ver-

sus 56% for CD36- patients, $p=0.01$; Fig. 2b) and the risk of relapse was higher (63% for CD36+ patients and 38% for CD36-). We also analyzed survival for patients CD36+ according to the presence of +8, and observed that patients with CD36+ associated with +8 had a poorer LFS (0% than CD36+ patients without +8 (37%; $p=0.0001$) (Fig. 2c).

3.4. Immunophenotyping findings are of prognostic relevance in AML

To assess the prognostic significance of antigenic expression in AML, univariate and multivariate analyses were performed. Table 5 summarizes results from these studies. Variables included in multivariate analysis were those with a relevant influence on AML patients' outcome such as age (<50 years versus >50 years), WBC at diagnosis, karyotype, FLT3-ITD⁺, MLL rearrangement and the time to achieve

Table 5
Univariate and multivariate analysis for overall survival (OS), leukaemia-free survival (LFS) and induction therapy failure

	Univariate analysis	Multivariate analysis	
	<i>p</i>	RR	<i>p</i>
Induction failure			
Adverse cytogenetics ^a	0.0001	10.2	0.0001
CD2	0.0001	8.4	0.0001
CD7	0.05		ns
OS			
Adverse cytogenetics ^a	0.0001	4	0.0001
WBC	0.02		ns
CD2	0.02	2	0.04
CD36	0.03	1.5	0.03
LFS			
Adverse cytogenetics ^a	0.0006	3.5	0.005
WBC	0.04		ns
FLT3-ITD ⁺	0.003		ns
CD36	0.002	1.9	0.002

RR indicates relative risk; ns: not significant, only significant parameters are shown; WBC: white blood count; ITD: internal tandem duplication.

^a According to MRC criteria.

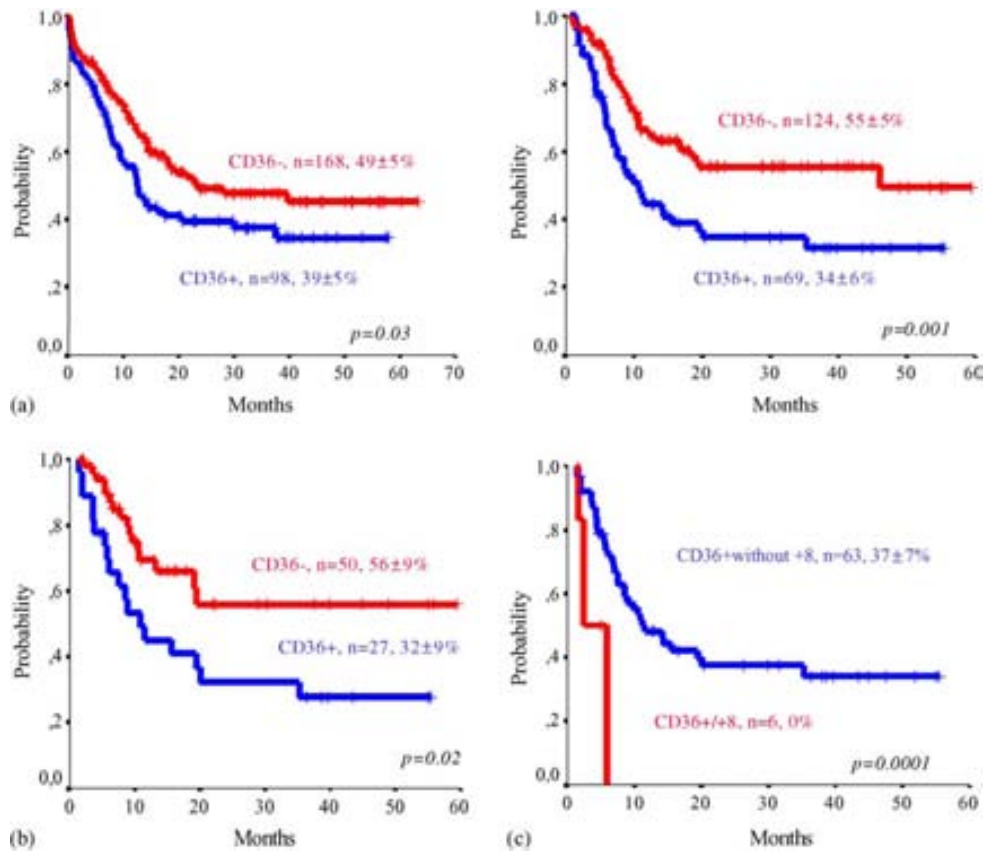


Fig. 2. (a) OS and LFS curves according to CD36 expression. (b) LFS curve according to CD36 expression in normal karyotype patients. (c) LFS curve for CD36+ patients according to +8.

CR (after one or two induction therapy courses) [12–14]. The CD36, CD7, CD2, TdT and CD34 expression were also included in these analyses. Using a logistic regression model, CD2 expression and adverse karyotype at diagnosis predicted failure to induction treatment; CD36 and CD2 positivity and adverse karyotype correlated with lower OS. CD36 expression and adverse karyotype correlated with lower LFS.

Allografted patients had better OS and LFS than patients who received an auto-SCT, although differences were not statistically significant. Multivariate analysis was performed taking into account only transplant patients ($n = 121$). Cytogenetics was not included as a variable as most patients were considered to belong to the intermediate group ($n = 88$). For this group of patients, FLT3-ITD⁺ ($p = 0.04$) and CD36 positivity ($p = 0.009$) correlated with poor LFS. The type of transplant received (allo-SCT versus auto-SCT) was not associated with worse LFS in this analysis.

4. Discussion

The correlation between morphology, myeloid blast cell immunophenotype, cytogenetics and patients' clinical outcome has been addressed in several studies [2,3,6–10]. Approaches to improve AML therapy have often focused on a

better stratification for intensity of post-induction treatment according to defined risk categories based on genetic criteria. However, about half of the patients do not yet have well-recognized chromosomal or molecular abnormalities and additional prognostic factors are required to optimize treatment protocols. The prognostic value of surface antigen expression in AML has long been controversial. Lack of methodological standardization, size and type of the patient population studied, single versus multi-institutional series and other factors have all contributed to the controversy. Our goal was to analyze a consecutive series of de novo AML patients in a strictly uniform way. In the light of the results obtained, we can conclude that some antigens may help to identify patients with an adverse outcome irrespective of associated genetic lesions.

The first antigen identified with prognostic impact in the current series was CD36. This molecule is a cell surface glycoprotein composed of a single polypeptide chain. It interacts with a large variety of ligands, including collagen types I and IV, thrombospondin and lipids. Its expression is restricted to a few cell types, such as adipocytes, platelets, erythroblasts, microvascular endothelium and monocyte/macrophages. CD36 is involved in the phagocytosis of apoptotic cells and foam cell formation by uptake of oxidized low-density lipoproteins. CD36 is commonly expressed

in myeloblasts. The polyomavirus enhancer-binding protein 2/ core-binding factor (PEBP2/CBF) family plays a major role in the transcriptional regulation of the CD36 gene. Disruption of the PEBP2/CBF site markedly diminishes the CD36 promoter activity [24–27]. In our study, CD36 expression helped to identify those patients with a lower LFS and higher relapse rate, irrespective of karyotype and FLT3 status. Seven of eight AML cases with isolated trisomy, eight expressed CD36. These data are in line with published results suggesting that +8 AML is a defined entity [28,29].

The CD2 is a glycoprotein monomer, which can mediate both cell-to-cell adhesion and trigger mitogenic as well as activation signals. This molecule plays an important role in T-cell development. CD2 has been shown to interact with multiple ligands, including the LFA-3/CD58, the complement regulatory protein CD59 and CD48. CD2 is physically associated with the Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn. Association with the CD2 receptor results in increased baseline activity of these tyrosine kinases and engagement of the CD2 receptor further triggers their activation, leading to enhanced tyrosine phosphorylation of multiple phosphoprotein substrates and calcium mobilization [30–35].

The proliferation-inducing effect of the CD2–CD58-mediated cell–cell contact may contribute to the high WBC count in AML-M4Eo and in M3v. The expression of the CD2 and CD58 antigen induces high WBC counts and facilitates dissemination of leukemic cells to lymphoid tissues [36–38].

The prognostic value of CD2 expression in AML is controversial because CD2 has been associated with both favorable and poor prognosis. In line with our results, this discrepancy may be explained by the fact that CD2+ AML forms a complex AML group with both relatively good prognosis cases (e.g. AML-M4Eo) and very poor prognosis cases (immature types of AML and acute undifferentiated leukemias).

CD56 and CD7 expression have both previously been associated with an unfavorable outcome in AML [6,39,40]. However, we did not find such an association for CD56. CD7 expression was more commonly expressed in the unfavorable cytogenetic group, but although it was associated with a lower CR rate in the univariate analysis, multivariate analysis failed to detect an association with a bad outcome.

It can be concluded that the most common phenotype pattern observed in de novo AML patients was: CD34+, HLA-DR+, CD13+, CD33+, CD117+, CD123+ and MPO+. CD2+ patients had a very poor OS when CD2+/inv(16)+ cases were excluded. CD36 expression was associated with low OS and LFS in AML patients, and it could be used to identify a subgroup of patients with an adverse prognosis irrespective of molecular or cytogenetic abnormalities. CD36 and CD2 expression at diagnosis could provide valuable prognostic information in adult de novo AML. Further studies performed in larger series patients are required to establish whether CD2+ and CD36+ reactivity may be used in the stratification of de novo AML patients.

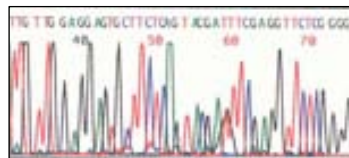
Acknowledgements

This work has been supported by the Instituto de Salud Carlos III grants G03/008 and C03/010. GP is recipient of a grant from the Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH).

References

- [1] Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783–6.
- [2] Béné MC, Bernier M, Castoldi G, Faure GC, Knapp W, Ludwig WD, et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica* 1999;84:1024–34.
- [3] Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, Deneys V, et al. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 2003;17:515–27.
- [4] Martínez A, San Miguel JF, Vidriales MB, Ciudad J, Caballero MD, López-Berges MC, et al. An abnormal CD34+ myeloid/CD34+ lymphoid ratio at the end of chemotherapy predicts relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Cytometry* 1999;38:70–5.
- [5] San Miguel JF, Martínez A, Macedo A, Vidriales MB, López-Berges C, González M, et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90:2465–70.
- [6] Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, Roncelli D, Testoni N, Nardi G, et al. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia* 2001;15:1161–4.
- [7] Geller RB, Zahurak M, Hurwitz CA, Burke PJ, Karp JE, Piantadosi S, et al. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: the significance of the stem-cell glycoprotein CD34 (My10). *Br J Hematol* 1990;76:340–7.
- [8] Repp R, Schaeckel U, Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U, et al. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry* 2003;53B:11–9.
- [9] Valet G, Repp R, Link H, Ehninger A, Gramatzki M, The SHG-AML study group. Pretherapeutic identification of high-risk acute myeloid leukemia (AML) patients from immunophenotypic, cytogenetic, and clinical parameters. *Cytometry* 2003;53B:4–10.
- [10] Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2004;28:43–8.
- [11] Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998;92:2322–33.
- [12] Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of pre-mission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000;96:4075–83.
- [13] Burnett AK, Wheatley K, Goldstone AH, Stevens RF, Hann IM, Rees JH, et al. The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML 10 trial. *Br J Hematol* 2002;118:385–400.
- [14] Gale RE. FLT3 mutations and leukaemia. *Br J Hematol* 2003;122:523–38.
- [15] Mitelman F, editor. *ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger; 1995.
- [16] Muñoz L, Nomdedéu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM, et al. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinical features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 2003;17:76–82.

- [17] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318–57.
- [18] Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kanebo H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;19:1911–8.
- [19] Muñoz L, Aventín A, Villamor N, Juncà J, Acebedo G, Domingo A, et al. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with *FLT3* internal tandem duplication. *Haematologica* 2003;88:637–45.
- [20] Cheson BD, Cassilech PA, Head DR, Schiffer CA, Bennett JM, Bloomfield CD, et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990;8:813–9.
- [21] Muñoz L, Nomdedéu JF, López O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventín A, et al. Interleukin-3 receptor α chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* 2001;86:1261–9.
- [22] Adriaansen HJ, Soeting PW, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in acute non-lymphocytic leukemias. Analysis of 54 cases and a review of the literature. *Leukemia* 1991;5:744–51.
- [23] Sánchez I, San Miguel JF, Corral J, Martín C, Pérez R, González M, et al. Gene rearrangement in acute non-lymphoblastic leukaemia: correlation with morphological and immunophenotypic characteristics of blast cells. *Br J Hematol* 1995;89:104–9.
- [24] Armesilla AL, Calvo D, Vega MA. Structural and functional characterization of the human CD36 gene promoter. *J Biol Chem* 1996;271:7781–7.
- [25] Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992;80:1105–15.
- [26] Armesilla AL, Vega MA. Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem* 1994;269:18985–91.
- [27] Moodley Y, Rigby P, Bundell C, Bunt S, Hayashi H, Misso N, et al. Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 2003;162:771–9.
- [28] Wolman SR, Gundacker H, Appelbaum FR, Slovak ML. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2002;100:29–35.
- [29] Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, Caligiuri MA, et al. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1124–9.
- [30] Paietta E, Wiernik P, Andersen J, Bennet J, Yunis J. Acute myeloid leukemia M4 with *inv(16)* (p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993;82:2595.
- [31] Osato M, Asou N, Okubo T, Nishimura S, Yamasaki H, Era T, et al. Myelomonoblastic leukaemia cells carrying the *PEBP2 β /MYH11* fusion gene are CD34⁺, c-KIT⁺ immature cells. *Br J Hematol* 1997;97:656–8.
- [32] Lenormand B, Vannier JP, Bene MC, Falkenrodt A, Bayle C, Favre M, et al. CD2+ CD19+ acute lymphoblastic leukaemia in 16 children and adults: clinical and biological features. *Br J Hematol* 1993;83:580–8.
- [33] Uckun FM, Steinherz PG, Sather H, Trigg M, Arthur D, Tubergen D, et al. CD2 antigen expression on leukemic cells as a predictor of event-free survival after chemotherapy for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group Study. *Blood* 1996;88:4288–95.
- [34] Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F, et al. Prognosis of *inv(16)*/*t(16;16)* acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003;102:462–9.
- [35] Lutterbach B, Hou Y, Durst KL, Hiebert SW. The *inv(16)* encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12822–7.
- [36] Adriaansen HJ, te Boekhorst PAW, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJM. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and *inv(16)*(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993;81:3043–51.
- [37] Biondi A, Luciano A, Bassan R, Mininni D, Specchia G, Lanzi E, et al. CD2 expression in acute promyelocytic leukemia is associated with microgranular morphology (FAB M3v) but not with any PML gene breakpoint. *Leukemia* 1995;9:1461–6.
- [38] Claxton DF, Reading CL, Nagarajan L, Tsujimoto Y, Andersson BS, Estey E, et al. Correlation of CD2 expression with PML gene breakpoints in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1992;80:582–6.
- [39] Suzuki R, Yamamoto K, Seto M, Kagami Y, Ogura M, Yatabe Y, et al. CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia: a distinct hematolymphoid disease entity. *Blood* 1997;90:2417–28.
- [40] Miwa H, Kita K, Nishii K, Morita N, Takakura N, Ohishi K, et al. Expression of *MDR1* gene in acute leukemia cells: association with CD7⁺ acute myeloblastic leukemia/acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;82:3445–51.



5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

ANÁLISIS DE INESTABILIDAD GENÉTICA EN LMA

La inestabilidad genética es uno de los principales mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de neoplasias (Imai K, Carcinogenesis 2008). Los sistemas de reparación del ADN son imprescindibles para el mantenimiento de la estabilidad genética. Las alteraciones en alguno de ellos, como el *mismatch repair DNA* (MMR-DNA), dan lugar a una elevada ratio de mutaciones espontáneas, sobre todo en las regiones de los microsatélites. Por tanto, la inestabilidad de microsatélites (MSI) refleja, en la mayoría de los casos, una alteración en estos genes de reparación del ADN. La MSI y las mutaciones en los genes del sistema MMR-DNA, sobre todo hMLH1 y el hMSH2, fueron descritas inicialmente en el cáncer de colon familiar no polipósico, pero también se han detectado en neoplasias esporádicas, especialmente de colon, endometrio y neoplasias gástricas (Mori Y, Cancer Res 2001). La MSI que tiene lugar en regiones codificantes causa mutaciones *frameshift* y pérdida de la función de la proteína. La MSI codificante representa un mecanismo crucial en la tumorigénesis de las neoplasias asociadas a este fenómeno. Entre los genes susceptibles a padecer este tipo de mutaciones se incluyen TGFBR2, IGRF2, BAX, hMSH3, hMSH6, BCRA1, BCRA2, E2F4, receptor tipo II de la activina y otros muchos (Mori Y, Cancer Res 2001; Komatsu N, Blood 2000). En las LMA no está claro cual es el papel que la MSI puede desempeñar en la leucemogénesis.

En nuestro estudio destaca la relativa frecuencia de MSI en pacientes jóvenes (≤ 60 años) con LMA *de novo* (14%) con un predominio de casos con alta MSI (70%). Se estima que la frecuencia de MSI en la LMA en general es de 0-10%. En la mayoría de los estudios realizados, la presencia de MSI se asocia a LMA *de novo* en pacientes mayores (10%) y a LMA secundarias a tratamiento quimio-/radioterápico (LMA-t) previo (0-44%) (Das-Gupta EP, Br J Haematol 2001). También se ha correlacionado la presencia de MSI con fases

avanzadas de la enfermedad, como demuestran algunos estudios que observan una mayor frecuencia de MSI en crisis blásticas de la LMC, sola o asociada a LOH (Wada C, Blood 1994), y en LMA en el momento de la recaída (35%) (Tasaka T, Br J Haematol 1997). En algunos estudios que incluían LMA *de novo* no se ha detectado MSI en ninguno de los casos analizados (Rimsza LM, Leukemia 2000).

Las discrepancias entre los diferentes trabajos pueden explicarse en parte por el pequeño número de pacientes incluidos y la heterogeneidad de los mismos, y por la metodología utilizada. Los métodos antiguos que utilizaban geles basados en el uso de electroforesis radioactivas no permitían diferenciar bien entre LOH y MSI. Por último también influye el panel de MSI utilizado. Se ha demostrado que los microsatélites BAT25, BAT26 y BAT40 son los más sensibles para detectar MSI en cáncer de colon (Dietmaier W, Cancer Res 1997). Sin embargo, han sido aplicados en LMA y no se han identificado MSI o, en el caso de BAT40, con una frecuencia muy baja (Rimsza LM, Leukemia 2000; Maeck L, Br J Haematol 2000; Faulkner RD, Br J Haematol 2004). La amplificación de BAT26 permite detectar también el porcentaje de tejido normal contaminante, por lo que sería útil en caso de ausencia de tejido normal. Cuando aplicamos BAT26 en el estudio de 39 casos de LMA, no se detectó MSI en ninguno de ellos, lo que sugeriría la falta de utilidad de este marcador para detectar MSI en este contexto.

En nuestro estudio se ha observado la asociación de la MSI con diferentes lesiones moleculares, lo que iría a favor de que este mecanismo no es dependiente de ninguna vía molecular específica. Aunque hay que destacar que se asoció más frecuentemente a reordenamientos del gen MLL.

En las neoplasias sólidas la MSI se asocia a una pérdida de la expresión de genes del MMR-DNA, sobre todo del gen hMLH1 y hMSH2. En el caso del gen hMLH1 su inactivación se debe a mutaciones (sobre todo en cáncer de colon familiar) o a hipermetilación del promotor que provocan un silenciamiento de su expresión (Imai K, Carcinogenesis 2008).

En el caso de la LMA no se han detectado mutaciones en regiones codificantes de hMLH1 (Auner HW, Br J Haematol 1999) y tampoco es frecuente la hipermetilación de este gen (Sheikhha MH, Br J Haematol 2002; Seedhouse C, Leukemia 2003). En nuestra serie hemos observado hipermetilación del promotor de este gen en un 25% de los casos y, todos menos 1, presentaron MSI elevada. Los casos con baja-MSI no se han asociado tan claramente a las alteraciones de MMR-DNA, al menos en neoplasias sólidas (Boland CR, Cancer Res 1998; Perucho M, Cancer Res 1999). Estos pacientes con el promotor hipermetilado mostraron una expresión normal o ligeramente disminuida de hMLH1 mientras que los 6 pacientes sin metilación del promotor presentaron una disminución de la expresión de hMLH1. Esto sugiere que no existe una buena correlación entre los niveles de expresión y el estatus de promotor.

Hemos detectado niveles de expresión disminuidos del gen hMSH2 en el 70% de los pacientes con LMA y MSI. En casos de LMA-t y en LMA de pacientes mayores con MSI y disminución de la expresión de este gen se han descrito LOH en el locus hMSH2 y mutaciones en el codón 419 (Horiike S, Leukemia 1999; Zhu YM, Blood 1999). Este hecho, además, se ha asociado a una mayor incidencia de mutaciones de p53, lo cual podría explicar la mayor frecuencia de citogenéticas de mal pronóstico en los pacientes con LMA-t y MSI (Das Gupta EP, Br J Haematol 2001, Ben-Yehuda D, Blood 1996; Horiike S, Leukemia 1999). La deficiencia del alelo germinal de p53 permitiría la viabilidad de cadenas dobles de ADN sin reparar que contribuirían al desarrollo de la inestabilidad cromosómica (Honma M, Mol Carcinog 2000).

La patogénesis de la MSI en LMA se ha estudiado sobre todo en LMA-t. Se cree que los pacientes que desarrollan estas LMA-t presentan una susceptibilidad leucemogénica, y de hecho en una elevada proporción de pacientes con LMA-t, la MSI también se ha detectado en el tumor primario (Olipitz, W, Genes Chromosomes Cancer 2002). Se sugiere que la *stem cell* hematopoyética podría tener ya la alteración del sistema MMR-DNA en el

momento del diagnóstico de la primera neoplasia y, cuando el paciente recibe el tratamiento antineoplásico, la acumulación de mutaciones en genes reguladores del crecimiento celular promoverían el desarrollo de la LMA o SMD (Olipitz W, Genes Chromosomes Cancer 2002). En este sentido, se han investigado mutaciones en genes que podrían estar implicados en el desarrollo de tumores, como el gen de la caspasa-5 que se encuentra mutado en pacientes con cáncer gastro-intestinal y en el 20% de las LMA-t y SMD. La caspasa 5 está implicada en la apoptosis y protege de la tumorigénesis (Offman J, Mol Cancer Res 2005). Además, se ha demostrado que la alteración del sistema MMR-DNA puede afectar al funcionamiento normal de otros sistemas de reparación del ADN, como el HRR (homologous recombination repair). La alteración en el sistema HRR en las LMA-t conlleva una inestabilidad cromosómica concomitante (Worrillow LJ, Oncogene 2006).

La MSI puede interpretarse también como un mecanismo de adaptación en respuesta al proceso de transformación neoplásica o como un signo de agotamiento de la *stem cell* (Reese JS, Blood 2003). Las líneas celulares deficientes en la proteína hMSH2 no muestran aumento en la ratio de mutaciones, o sólo un ligero incremento, cuando las células se mantienen en el cultivo en condiciones óptimas. Pero se observa la acumulación de una elevada proporción de mutaciones en estas células cuando se mantienen en una densidad muy alta en el cultivo y en condiciones restrictivas (Richards B, Science 1997; Parsons R, Science 1995). La limitación al crecimiento del tumor da lugar a una respuesta adaptativa en términos darwinianos como demuestra la hipermutabilidad observada en el análisis de MSI. Esta hipermutabilidad permite al tumor superar los diferentes obstáculos, como son la restricción de nutrientes, la inadecuada irrigación o la situación de hipoxia, y le proporciona una ventaja adaptativa. La infiltración masiva de la médula ósea podría determinar una situación de restricción de nutrientes y de hipoxia que daría lugar a este fenotipo mutador, tal y como sucede en las líneas celulares. Esto podría

explicar por qué la mayoría de LMA tienen disminuidos los niveles de los genes MMR-DNA. Por otro lado, estudios recientes sugieren que la *stem cell* en la médula ósea se sitúa preferentemente en las áreas con menor concentración de O₂. Los niveles bajos de O₂ juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la función de la *stem cell*, pero también es importante en el desarrollo de MSI (Parmar K, Proc Natl Acad Sci USA 2007). El factor inducido por la hipoxia (HIF) es una de las primeras respuestas celulares a la hipoxia. Se ha observado que su isoforma HIF2 α promueve señales autocrinas de crecimiento y de progresión del ciclo celular. HIF podría ser uno de los genes que contribuyen a la ventaja adaptativa de los tumores (Franovic A, Proc Natl Acad Sci USA 2009).

Recientemente se ha observado una relación entre la MSI y la UPD adquirida. La UPD adquirida es un fenómeno que se ha descrito en un 13-20% de LMA con citogenética normal y es también un signo de inestabilidad genética (Raghavan M, Cancer Res 2005, Gorletta TA, Genes Chromosomes Cancer 2005, Bullinger L, Leukemia 2010). En este estudio se ha observado que la mayoría de pacientes con UPD presentaban además una MSI. Este hallazgo sugiere que existe un mecanismo de recombinación genética común que es activo en ambos tipos de lesiones moleculares (Serrano E, Leuk Lymph 2008).

No hemos podido demostrar que la existencia de una MSI conlleve diferencias en el pronóstico de los pacientes con LMA. Sin embargo, hay que destacar la mala evolución que presentó el paciente con LMA e inv(16). Otro caso similar se describe en la literatura, en este caso un paciente mayor de 60 años con una t(8;21) (Das-Gupta EP, Br J Haematol 2001). Habría que identificar si el peor pronóstico de los pacientes mayores con LMA asociadas a citogenética de buen pronóstico, se asocia a una mayor frecuencia de MSI.

Por último, hay que destacar que las células con MSI y, sobre todo los homocigotos para mutaciones de hMSH2, son más sensibles a los efectos de los agentes metilantes del

ADN, lo que puede provocar un estatus de hipermutabilidad. Esto podría tener relevancia desde un punto de vista terapéutico ya que existen nuevos fármacos demetilantes que se están empleando en el tratamiento de LMA y SMD.

A la vista de nuestros resultados se puede concluir que la MSI no es un hallazgo infrecuente en pacientes jóvenes con LMA *de novo*, pero su presencia no modifica el pronóstico de estos pacientes. Son necesarios más estudios que investiguen el papel que la MSI desempeña en la patogénesis de la LMA.

ANÁLISIS DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA ANALIZADA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y PCR CUANTITATIVA EN PACIENTES CON LMA ASOCIADAS A CITOGÉNÉTICA DE BUEN PRONÓSTICO [t(8;21) e inv(16)]

Las LMA asociadas a la t(8;21) y a la inv(16)/t(16;16) se incluyen dentro del grupo citogenético de buen pronóstico. La mayoría de los pacientes alcanzan la RC tras tratamiento quimioterápico estándar y entre un 60-70% de los casos presentan una larga SLE tras tratamiento de consolidación con altas dosis de citarabina o trasplante autólogo. A pesar de estos resultados, un 30-40% de los pacientes recaen (Schlenk RF, J Clin Oncol 2004; Marcucci G, J Clin Oncol 2005; Grimwade D, Blood 2010). La presencia de ERM en muestras de pacientes con LMA en RC se ha asociado a un mayor riesgo de recaída. Los dos métodos de elección para realizar el seguimiento de la ERM son la CF multiparamétrica y las técnicas moleculares basadas en la detección de genes quiméricos de fusión (PCR). Los resultados de nuestro estudio demuestran que el seguimiento de la ERM en LMA asociadas a citogenética de buen pronóstico permite identificar pacientes con mayor riesgo de recaída independientemente del método utilizado, CF o PCR cuantitativa. Se han definido unos valores críticos, tanto para CF (>0,1%) como para PCR cuantitativa (>10 copias transcrito/ABL), que permiten separar a los pacientes en dos grupos con un riesgo de recaída significativamente diferente, sobre todo al final del tratamiento quimioterápico. Ambas técnicas se complementan y permiten realizar un seguimiento más adecuado de los pacientes.

Se observa una elevada concordancia entre ambos métodos (67%), aun así en un 26% de las muestras sólo se detecta ERM mediante PCR y por el contrario en un 7% de los casos sólo se detecta ERM mediante CF. Ambos métodos tienen ventajas e inconvenientes (Shook D, Clin Lymphoma Myeloma 2009; Al-Mawali A, Am J Clin Pathol 2009; Kern W, Cancer 2008). Mediante la CF es posible detectar fenotipos aberrantes entre el 80-90% de los pacientes, especialmente si se utilizan las combinaciones de anticuerpos adecuadas

y el análisis multiparamétrico de más de 5 antígenos. Además, permite evaluar la celularidad no leucémica de la muestra y puede diferenciar entre células viables y células apoptóticas. La utilización de las técnicas moleculares específicas, por el contrario, queda restringida a aquellas LMA con alteraciones cromosómicas/moleculares específicas (<50% de los casos). Ahora bien, la especificidad y la sensibilidad de la PCR (10^{-4} - 10^{-6}) son superiores a las de la CF (10^{-3} - 10^{-5}). Esta mayor sensibilidad de la PCR puede explicar, en parte, los resultados discordantes entre ambos métodos. Entre las limitaciones de la CF destaca que se ha de disponer de un amplio panel de anticuerpos monoclonales para detectar las alteraciones inmunofenotípicas más habituales y requiere un alto grado de experiencia para poder ser interpretada de forma correcta, se precisa un entrenamiento adecuado y la comparación con los patrones de normalidad observados en médula ósea normal. En nuestro estudio para estudiar la ERM se emplearon unas combinaciones fijas de anticuerpos monoclonales y se aplicaron a todos los pacientes. Esto podría aumentar el número de falsos negativos, pero el hecho de haber estudiado estas combinaciones en médulas óseas normales de forma exhaustiva redujo este riesgo considerablemente.

Otra causa de falsos negativos en el análisis de ERM mediante CF es que el perfil fenotípico de los blastos puede cambiar en la recaída. El fenotipo de la LMA es muy heterogéneo debido a la existencia de diferentes subpoblaciones de células leucémicas en un mismo paciente y es importante identificarlas correctamente en el momento del diagnóstico (Macedo A, Leukemia 1995). La frecuencia de los cambios inmunofenotípicos oscila entre un 3-25% aunque en algunos estudios como el del CALGB se objetivan hasta un 60% (Baer MR, Blood 2001). A pesar de todo, en el 80% de los casos, al menos uno de los fenotipos aberrantes presentes al diagnóstico también es detectable en la recaída (Voskova D, Cytometry B Clin Cytom 2004).

Estudios previos han demostrado la importancia pronóstica de la detección de ERM en pacientes con LMA en RC utilizando la CF. En la mayoría de estudios la presencia de ERM

se asocia a una mayor probabilidad de recaída y a una menor supervivencia. Las cuestiones discutidas con más frecuencia en los diferentes trabajos son, la elección de un valor crítico que discrimine entre pacientes con alto y bajo riesgo de recaída, y el momento de la evolución de la enfermedad en que el estudio de la ERM tiene mayor utilidad. Algunos autores destacan la importancia de medir la ERM al inicio del tratamiento, dando relevancia a la rapidez con que se eliminan las células leucémicas. El grupo alemán demostró que la persistencia de fenotipos aberrantes en el día 16 del tratamiento de inducción y el grado de reducción en el número de células con fenotipo aberrante entre el día 1 y el día 16 representaba un factor pronóstico independiente que afectaba la RC, la EFS, la SG y la RFS (Kern W, Blood 2004; Kern W, Haematologica 2004). San Miguel y col. demostraron que niveles de ERM $>0,5\%$ al final de la inducción y de $0,2\%$ al final de la consolidación identificaban a dos grupos de pacientes con diferente duración de la SLR y de la SG (San Miguel JF, Blood 1997). Y este mismo grupo posteriormente fue capaz de estratificar a los pacientes de acuerdo con los niveles de ERM detectada tras la inducción en 4 grupos: $<0,01\%$, $0,01-0,1\%$, $0,1\%-1\%$ y $>1\%$. Estos 4 grupos presentaban una SG estadísticamente diferente independientemente de otros factores pronósticos (San Miguel JF, Blood 2001). Otros estudios observan que, aunque es posible identificar un valor crítico predictivo tanto post-inducción como post-consolidación, en el estudio multivariado sólo la ERM detectada tras la inducción mantiene su significado pronóstico (Al-Mawali A, Cytometry 2009).

En nuestra serie de pacientes con LMA y citogenética de buen pronóstico los niveles de ERM detectados mediante CF tras la inducción no permitieron diferenciar pacientes con mayor riesgo de recaída. Por el contrario, la detección de ERM al final del tratamiento de primera línea sí fue predictiva de recaída. El valor de $0,1\%$ al final de la consolidación ha sido utilizado también por otros autores (Feller N, Leukemia 2004).

Estos resultados coinciden con los de otros autores que defienden que la determinación de ERM en momentos más tardíos de la evolución (tras la consolidación) es más informativa. Venditti y col. definieron que la detección de $>3,5 \times 10^{-4}$ de ERM tras la consolidación predecía una mayor frecuencia de recaídas y una menor SG y RFS (Venditti A, Blood 2000). Esta observación fue confirmada en otros estudios realizados por el mismo grupo (Buccisano F, Leukemia 2006; Maurillo L, J Clin Oncol 2008). Las discrepancias entre los diferentes grupos se pueden explicar por la diferente intensidad del tratamiento utilizado en la inducción. Un tratamiento menos intensivo produce un menor aclaramiento de las células leucémicas, lo que se traduce en diferentes niveles de ERM asociados a riesgo de recaída y en un diferente efecto rescate del tratamiento de consolidación.

El interés de la identificación precoz de los casos con ERM positiva sería el poder seleccionar enfermos candidatos a recibir tratamientos más intensivos de forma más rápida. Pero algunos autores alertan del riesgo de tratar en exceso a los pacientes. Aproximadamente el 30% de los enfermos que no presentaban ERM tras la consolidación eran todavía positivos tras la inducción, lo cual evidencia el impacto del tratamiento de consolidación en la erradicación de las células leucémicas. Y lo que es más importante, estos pacientes considerados como respondedores lentos no tuvieron una evolución diferente a la de los pacientes con ERM negativa en el momento de la inducción. En base a esta observación y, aunque la ERM negativa tras la inducción predisponga a una evolución más favorable de la enfermedad, hay autores que proponen realizar la valoración de los pacientes una vez finalizado el tratamiento de primera línea, aunque esto suponga retrasar una decisión terapéutica, pues ofrece una estratificación del riesgo más real y evita las complicaciones de tratar en exceso a los pacientes (Buccisano F, Curr Opin Oncol 2009). Además, se ha descrito que la ERM detectada tras la consolidación tiene relación con la evolución post-trasplante. De forma que en los pacientes con

presencia de ERM tras consolidación, el trasplante autólogo no ofrecería ninguna ventaja y sólo el trasplante alogénico podría mejorar la evolución de estos pacientes (Maurillo L, J Clin Oncol 2008).

El valor crítico para predecir el riesgo de recaída varía en los múltiples estudios publicados y es difícil llegar a un consenso. Pero cada vez más se están utilizando métodos estadísticos específicos para determinar estos valores críticos de forma más adecuada. Probablemente esta sea la base para poder estandarizar los resultados (Maurillo L, J Clin Oncol 2008; Al-Mawali A, Cytometry 2009).

La PCR cuantitativa puede determinar la cantidad de los transcritos de fusiones generados por translocaciones cromosómicas. Esta aproximación se ha utilizado con éxito en otros tipos de leucemias como son las LLA con t(12;21) (Pallisgaard N, Genes Chromosomes Cancer 1999). En los pacientes con AML1-ETO y CBFβ-MYH11 no hay resultados de protocolos clínicos que hayan aplicado esta técnica. En este sentido son importantes los esfuerzos realizados por BIOMED para estandarizar la técnica y que pueda ser utilizada a nivel asistencial (Van Dongen JJM, Leukemia 1999; Gabert J, Leukemia 2003). Los primeros estudios realizados tanto en t(8;21) como en inv(16) utilizaban técnicas de PCR cualitativa y sus resultados son bastante controvertidos, en parte debido al pequeño número de pacientes incluidos en muchos de ellos y a la diferente sensibilidad de las PCR utilizadas (Tablas 14 y 16). En el caso de las LMA con la t(8;21), se observó que la persistencia del transcrito AML1-ETO, incluso después de trasplante alogénico, era compatible con una RC persistente, lo que iría a favor del modelo cooperativo de leucemogénesis (Nucifora G, Blood 1993; Jurlander J, Blood 1996; Saunders MJ, Leuk Res 1994). Otros autores defienden que es necesaria la negatividad de la PCR para conseguir una RC duradera en estos pacientes (Morschhauser F, J Clin Oncol 2000), igual que en los pacientes con inv(16). Además, en el caso de los pacientes con inv(16) se observa que pueden tardar varios meses después de la RC en conseguir la negativización de la PCR y

que hasta un 20-30% de pacientes que negativizan la PCR recaen (Martinelli G, Bone Marrow Transplant 1999; Martin G, Haematologica 2000; Laczika K, Leuk Lymphoma 2001). Por tanto, es difícil interpretar un resultado positivo y uno negativo en base a esta técnica. La PCR cuantitativa permite cuantificar el nivel de transcrito de fusión al diagnóstico, estudiar la cinética de su reducción durante el tratamiento y detectar de forma precoz la recaída. Todos los estudios realizados están de acuerdo en que la reducción de la cantidad de transcrito inicial en 2 log tras el tratamiento de inducción es un requisito indispensable para una RC duradera (Marcucci G, Leukemia 2001; Tobal K, Blood 2000; Viehman S, Leukemia 2003 Leroy H, Leukemia 2005 (2), Krauter J, J Clin Oncol 2003 , Guerrasio A, Leukemia 2002). En algunos trabajos el grado de reducción del transcrito al final de la consolidación en relación a la cantidad detectada al diagnóstico es el factor pronóstico más importante para predecir probabilidad de recaída, EFS y SG (Schnittger S, Blood 2003; Weisser M, Leukemia 2007; Guièze R, Leukemia 2010). Por último, la cantidad de transcrito inicial también se ha correlacionado con el riesgo de recaída y con la supervivencia (Schnittger S, Blood 2003; Yoo SJ, Haematologica 2005). Muchos autores han intentado definir niveles críticos de transcrito que identifiquen pacientes con alto riesgo de recaída, tanto en LMA con AML1-ETO como CBFβ-MYH11, especialmente en estadios finales del tratamiento (Buonamici S, Blood 2002; Guerrasio A, Leukemia 2002; Krauter J, J Clin Oncol 2003; Schnittger S, Blood 2003; Leroy H, Leukemia 2005 (2); Stentoft J, Leuk Res 2006).

En nuestro estudio intentamos definir un nivel crítico de transcrito en diferentes momentos de la evolución, pero ni al diagnóstico ni en las fases iniciales de la RC conseguimos detectar un valor que permitiera separar pacientes con diferente pronóstico. Por el contrario, observamos que al final del tratamiento la persistencia de >10 copias del transcrito de fusión permitió identificar pacientes con una mayor probabilidad de recaída. Este resultado está en concordancia con los publicados por otros grupos (Marcucci G,

Leukemia 2001; Guerrasio A, Leukemia 2002; Corbacioglu A, J Clin Oncol 2010). Se ha sugerido que la falta de impacto pronóstico de la ERM en fases iniciales podría explicarse por la buena respuesta al tratamiento que tienen estas leucemias.

Hay que destacar un diferente comportamiento entre ambos tipos de leucemias. En los pacientes con la t(8;21) la detección de pequeñas cantidades de transcrito, incluso >10 copias en algún momento de la evolución es compatible con RC, tal y como se había reportado previamente (Viehman S, Leukemia 2003). Por el contrario, los pacientes con inv(16) en RC continuada suelen alcanzar el nivel de 1 copia, y lo más importante es que se mantienen en estos niveles. Por el contrario, la mayoría de los pacientes que recaen no alcanzan este límite de 1 copia. Esta observación también ha sido descrita por otros autores (Guerrasio A, Leukemia 2002). Recientemente se ha demostrado que la cinética de las recaídas es diferente en cada tipo de alteración molecular. Los pacientes con inv(16) serían los que tienen una cinética más lenta y tardan más en recaer después de un resultado de PCR positivo, mientras que los pacientes con t(8;21) recaerían antes. En base a esta observación y, tras aplicar un modelo matemático, los autores sugieren que la monitorización óptima de estos pacientes para predecir el 90% de las recaídas sería de 6 y 4 meses respectivamente (Ommen HB, Blood 2010).

Los datos de la literatura permiten sugerir que la combinación de las dos técnicas, CF y PCR, en el seguimiento de los pacientes con LMA en RC permitiría reducir el riesgo de falsos negativos y se podría estratificar de forma más adecuada a los pacientes en grupos de alto y bajo riesgo de recaída (Neale GAM, Leukemia 2004; Kerst G, Br J Haematol 2005; Ryan J, Br J Haematol 2009). La utilización conjunta de ambos métodos tiene especial interés en los casos en los que puede haber variaciones de los transcritos de fusión. Los reordenamientos de CFBF-MYH11 son muy heterogéneos y pueden no detectarse por los métodos moleculares convencionales, como es el caso del nuevo tipo de transcrito CFBF-MYH11, llamado Z, descrito previamente por nuestro grupo (Aventín A,

Cancer Genet Cytogenet 2000). La CF tiene un papel importante en estos casos. Otra aproximación para entender mejor el significado de la remisión en estos grupos de pacientes es monitorizar paralelamente otra diana molecular, como puede ser WT1 (Østergaard M, Br J Haematol 2004; Nowakowska-Kopera, A, Leuk Lymph 2009; Lasa A, Leuk Res 2009). Se ha observado una elevada concordancia entre los niveles de WT1 y de los transcritos AML1-ETO y CBFβ-MYH11 durante el seguimiento de estas leucemias. Ambas determinaciones se complementan y reducen el riesgo de resultados falsos negativos.

El objetivo del seguimiento de la ERM en las LMA con citogenética de buen pronóstico es poder guiar el tratamiento de los pacientes, tal y como actualmente se hace en los pacientes con LPA (Sanz MA, Blood 2009). Si bien las técnicas de PCR cuantitativa están bastante estandarizadas, no sucede lo mismo con la CF. Por tanto, de cara al futuro, los esfuerzos deberían ir dirigidos a la estandarización de las diferentes técnicas y a la definición de las estrategias óptimas de monitorización. Sería aconsejable valorar el uso de sangre periférica en la monitorización de la ERM para facilitar el seguimiento de los pacientes. Hay evidencias que apuntan a que ambos tipos de muestra son igual de informativas (Stentoft J, Leuk Res 2006; Corbacioglu A, J Clin Oncol 2010), aunque en algunas situaciones las muestras de médula ósea parecen ser más sensibles, como sería el caso de la inv(16) durante el período de tratamiento (Corbacioglu A, J Clin Oncol 2010). Por otro lado se debería investigar el significado de la ERM en el contexto de otros marcadores moleculares con importancia pronóstica en este tipo de leucemias, como son, las mutaciones de KIT (Schnittger S, Blood 2006; Paschka P, J Clin Oncol 2006; Cairoli R, Blood 2006).

CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LAS LMA AL DIAGNÓSTICO

La utilidad de la citometría de flujo en el diagnóstico de las LMA está bien establecida. Mediante la combinación de diferentes antígenos de membrana y antígenos intracelulares, la citometría de flujo permite identificar el origen mieloide o linfoide de las células blásticas, así como su grado de maduración o de diferenciación. Es de gran utilidad en el diagnóstico de las leucemias agudas bifenotípicas (Béné MC, *Leukemia* 1995; Matutes E; *Haematologica* 1997) y es imprescindible para la identificación de las LMA indiferenciadas morfológicamente (M0) (Béné MC, *Br J Haematol* 2001) y para detectar blastos de línea eritroide y megacariocítica. Además, algunos perfiles inmunofenotípicos son característicos de tipos específicos de LMA, como sería el caso de la LPA (Paietta E, *Leukemia* 1994; Orfao A, *Haematologica* 1999). La citometría de flujo además permite detectar aberraciones antigénicas que pueden ser utilizadas posteriormente para el estudio de la ERM con las implicaciones pronósticas que ello conlleva (Al-Mawali A, *Am J Clin Pathol* 2009; Kern W, *Cancer* 2008; Buccisano F, *Leukemia* 2006).

Sin embargo, aún en la actualidad sigue siendo controvertido el valor pronóstico de las características inmunofenotípicas al diagnóstico en la LMA. En algunos estudios no se demuestra ninguna asociación entre el inmunofenotipo y la evolución de los pacientes, y en otros se observa un impacto negativo de algunos marcadores. Aunque muchos antígenos se han asociado con pronóstico desfavorable, aquellos en los que esta correlación se ha confirmado en más de un estudio son el CD34, CD7, CD14, CD56, CD11b, CD13, TdT (Casasnovas RO, *Leukemia* 2003; Repp R, *Cytometry* 2003; Chang H, *Leuk Res* 2004; Legrand O, *Blood* 2000; Geller RB, *Br J Haematol* 1990; Venditti A, *Leukemia* 1998; Raspadori D, *Leukemia* 2001; Solary E, *Leukemia* 1992).

Por otro lado, es difícil establecer comparaciones entre los diferentes estudios, en parte debido a la falta de estandarización de la técnica, ya que se utilizan diferentes combinaciones antigénicas, diferentes clonas y diferentes métodos de análisis; y en parte

por la heterogeneidad de los estudios realizados en cuanto al número y características de los pacientes. A esto hay que añadir que no siempre se valora el significado del inmunofenotipo en el contexto de otros factores pronósticos, como son la citogenética o determinadas anomalías moleculares como la FLT3-ITD.

En la actualidad, la intensidad de los tratamientos post-inducción en la LMA se ajustan al riesgo de los pacientes en función de diferentes factores pronósticos clínicos, citogenéticos y moleculares. Pero en algunos enfermos no se identifican anomalías genéticas ni moleculares y es en estos casos en los que sería interesante identificar otros factores de riesgo que ayuden a optimizar el tratamiento.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar las características inmunofenotípicas en una serie de pacientes ≤ 60 años con LMA *de novo* tratados de forma homogénea. De los resultados de este estudio cabe destacar que las características fenotípicas al diagnóstico tienen un importante valor pronóstico independiente de otras lesiones genéticas.

Uno de los antígenos con impacto pronóstico en nuestra serie fue CD36. Esta molécula es una glicoproteína de membrana compuesta por una única cadena polipeptídica. CD36 interacciona con una gran variedad de ligandos, incluyendo el colágeno tipo I y IV, trombospondina y lípidos. Su expresión queda restringida a algunos tipos celulares como son los adipocitos, células del endotelio microvascular, y a nivel hematológico, a las plaquetas, eritroblastos y monocitos/macrófagos. Además se expresa con frecuencia en las células blásticas de la LMA, entre un 34-47%, especialmente en las que tienen diferenciación monocítica (Casasnovas RO, *Leukemia* 2003; Webber BA, *Int J Clin Exp Pathol* 2008; Xu Y, *Leukemia* 2006). CD36 está implicado en la fagocitosis de células apoptóticas y en la formación de células espumosas por fagocitosis de lipoproteínas oxidadas. El promotor de CD36 está regulado por el complejo CBF del que forman parte AML1/RUNX1 y CBFb (Armesilla AL, *J Biol Chem* 1996; Greenwalt DE, *Blood* 1992; Armesilla AL, *J Biol Chem* 1994; Moodley Y, *Am J Pathol* 2003). En nuestro estudio

observamos que la expresión de CD36 se asoció con una menor supervivencia y con una mayor probabilidad de recaída, tanto en la serie global como en el grupo de pacientes con citogenética normal. Las LMA con expresión de CD36 presenta con mayor frecuencia una cifra de leucocitos más elevada al diagnóstico y una mayor frecuencia de FLT3-ITD. La relación entre la expresión de marcadores monocíticos, como CD36, y la FLT3-ITD ya se había reportado previamente (Muñoz L, Haematologica 2003). Sin embargo, el impacto pronóstico negativo de CD36 fue independiente de otras anomalías genéticas asociadas, tales como la citogenética y la FLT3-ITD. Se detectó positividad de CD36 en todos los grupos citogenéticos, pero hay que destacar la relación entre la trisomía 8 y la expresión de CD36: 7 de los 8 pacientes con trisomía 8 expresaban CD36, y aunque el número de pacientes era pequeño, la SLE de los pacientes con esta anomalía citogenética y CD36 positivos fue significativamente menor que la del resto de pacientes. Estos datos irían en concordancia con los estudios que sugieren que las LMA con trisomía 8 son una entidad clínico-biológica diferente (Wolman SR, Blood 2002; Virtaneva K, Proc Natl Aca Sci USA 2001).

CD2 también se ha asociado con un peor pronóstico en este estudio. CD2 es una glicoproteína monomérica que actúa como mediador de la adhesión celular y como desencadenante mitogénico. También interviene en la activación de señales importantes en el desarrollo de la célula T. CD2 interacciona con diferentes ligandos, incluyendo CD58, la proteína reguladora del complemento CD59 y CD48. CD2 se relaciona con la familia Src de tirosín-quinasas Lck y Fyn. La asociación con el receptor CD2 conlleva un incremento en la actividad basal de estas tirosín-quinasas y su posterior activación, lo cual provoca un aumento de la fosforilación de múltiples fosfoproteínas (Paietta E, Blood 1993; Osato M, Br J Haematol 1997; Lenormand B, Br J Haematol 1993, Uckun FM, Blood 1996).

La unión de CD2 con su ligando CD58, una glicoproteína de membrana que se expresa en muchos tejidos, incluidos la mayoría de las células de origen hematológico, induce un

aumento de la proliferación celular. Este efecto puede contribuir a la mayor leucocitosis que se observa en las LAM M4 con eosinofilia y en la LPA variante. Además, la expresión de CD2 y CD58 facilita la diseminación de las células leucémicas hacia otros tejidos linfoides (Adriaansen HJ, Blood 1993).

Hemos observado positividad de CD2 en un 8% (n=21) de los casos, y de éstos, el 38% (n=8) presentaban una inv(16)/t(16;16). Los pacientes con expresión de CD2 en ausencia de esta anomalía citogenética presentaron una menor probabilidad de alcanzar RC tras el tratamiento de inducción y una menor SG. La expresión de CD2 no cambia el buen pronóstico de los pacientes con inv(16)/t(16;16). Entre los pacientes CD2+/inv(16)- fue frecuente la coexpresión de CD2 y CD7 y por el contrario en los CD2+/inv(16)+ se observó con más frecuencia la coexpresión de CD2 y CD4.

Las LMA M4Eo con inv(16) se caracterizan, desde un punto de vista inmunofenotípico, por presentar un fenotipo heterogéneo en el que se identifican diferentes subpoblaciones, algunas inmaduras y otras más maduras con diferenciación monocítica (Adriaansen HJ, Blood 1993; Osato M, Br J Haematol 1997). La expresión de CD2 se detecta en ambos tipos de poblaciones, y también se ha observado con frecuencia la expresión de su ligando, CD58 (Adriaansen HJ, Blood 1993; Osato M, Br J Haematol 1997). Curiosamente, se ha observado que en las LMA con inv(16) con transcritos poco frecuentes la expresión de CD2 es más débil (Schnittger S, Leukemia 2007).

La expresión de CD2 es también un hallazgo común en las LPA, aproximadamente un 23% de los casos son CD2+ (Albano F, Haematologica 2006; Lin P, Am J Clin Pathol 2004). En estas LMA el significado pronóstico de CD2 es más controvertido. Mientras en algunos estudios no parece tener ningún valor pronóstico (Albano F, Haematologica 2006), en otros se asocia a una menor duración de la RC (Lin P, Am J Clin Pathol 2004) y en otros incluso se ha asociado con una evolución más favorable (Guglielmi C, Br J Haematol 1998). En lo que sí coinciden casi todos los estudios es que la positividad de

CD2 en estas leucemias se asocia a la morfología M3 variante, a la expresión de CD34+, a una mayor cifra de leucocitos al diagnóstico y a la forma corta del transcrito PML-RARA (bcr3) (Claxton DF, *Blood* 1992; Biondi A, *Leukemia* 1995; Lin P, *Am J Clin Pathol* 2004; Albano F, *Haematologica* 2006). Todos ellos, factores que parece que conllevan una evolución más desfavorable de este tipo de leucemias (Callens C, *Leukemia* 2005).

Por tanto, el significado pronóstico de CD2 es especialmente negativo en ausencia de citogenéticas de buen pronóstico, sobre todo a causa de una mayor refractariedad al tratamiento quimioterápico de inducción (Bradstodk K, *Blood* 1994). La expresión de CD2 también se ha asociado con LMA inmaduras e indiferenciadas (Adriaansen HJ, *Blood* 1993).

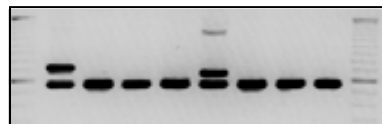
La infidelidad de línea que se observa a nivel fenotípico en las leucemias se extiende a nivel genómico, pues hasta en una tercera parte de las LMA se detectan reordenamientos de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas o del receptor de la célula T (TCR). En nuestro trabajo identificamos reordenamientos TCR γ en 3 de 12 pacientes con CD2+/inv(16)-. Aunque la presencia de estos reordenamientos se había asociado con estadios iniciales de la diferenciación celular y con la expresión de marcadores linfoides (Adriaansen HJ, *Leukemia* 1991), parece ser que estos reordenamientos genéticos son independientes de la morfología y del inmunofenotipo de los blastos, a excepción de la asociación de CD7 y los reordenamientos TCR γ y TCR δ (Sánchez I, *Br J Haematol* 1995).

Otros marcadores que también se han relacionado con el pronóstico en la LMA son CD56 y CD7 (Suzuki R, *Blood* 1997; Miwa H, *Blood* 1993; Raspadori D, *Leukemia* 2001). En nuestra serie no hemos encontrado ninguna asociación entre CD56 y la evolución de los pacientes. Hemos observado una mayor frecuencia de CD7+ en los pacientes con citogenética de mal pronóstico y en pacientes con la FLT3-ITD. Estos hallazgos están en concordancia con los datos descritos en la literatura (Ogata K, *Blood* 2002; Chauhan PS, *Med Oncol* 2010; Rausei-Mills V, *Am J Clin Pathol* 2008). Aunque en el estudio univariado

la expresión de CD7 se correlacionó con una menor probabilidad de alcanzar RC, en el multivariado no se confirmó esta asociación.

Aunque parece que la expresión de CD2 y CD36 puede aportar información valiosa en las LMA *de novo* del adulto, es necesario confirmar estos resultados en otras series grandes de pacientes e incluir en el análisis otras anomalías moleculares con importancia pronóstica en los pacientes con citogenética normal, como son las mutaciones de NPM1 ó CEPBA (Schlenk RF, N Engl J Med 2008; Wouters BJ, Blood 2009; Paschka P, J Clin Oncol 2008) y en el caso de los pacientes con leucemias con afectación del CBF las mutaciones de KIT (Paschka P, J Clin Oncol 2006).

En un análisis preliminar realizado en la serie de pacientes incluidos en el protocolo LMA-2003 del grupo CETLAM no se han podido reproducir los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de CD36. Hay que destacar que en este protocolo se incluyen modificaciones importantes respecto al anterior, como son: la administración de G-CSF junto con la quimioterapia de inducción e intensificación y la inclusión de la FLT3-ITD, reordenamientos de MLL y de la persistencia de ERM al final de la intensificación en la estratificación del riesgo de los pacientes. Este cambio conlleva que un porcentaje de pacientes de riesgo intermedio reciban un tratamiento más intensivo, y quizá esto pueda variar el valor pronóstico de CD36.



6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

OBJETIVO 1. Análisis de inestabilidad genética en LMA

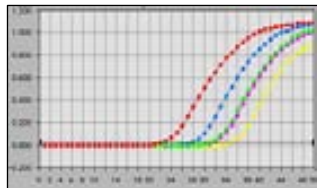
1. La MSI no es una anomalía infrecuente en pacientes jóvenes (≤ 60 años) con LMA *de novo*.
2. El microsatélite BAT26 no es útil como marcador para la detección de MSI en pacientes con LMA a diferencia de lo observado en pacientes con neoplasias sólidas.
3. La MSI no se asocia de forma significativa con ninguna lesión molecular concreta lo que sugiere que esta alteración no es dependiente de ninguna vía molecular específica. Aunque en nuestra serie destaca una mayor frecuencia de reordenamientos del gen MLL en pacientes con LMA y MSI.
4. Sólo en un 25% de los casos de LMA con MSI se ha detectado hipermetilación del promotor del gen MLH1, siendo las bases moleculares de la mayoría de MSI en LMA todavía desconocidas.
5. La MSI no fue un factor pronóstico significativo en los pacientes con LMA.

OBJETIVO 2. Análisis de la enfermedad residual mínima mediante citometría de flujo y PCR cuantitativa en pacientes con citogenética de buen pronóstico [t(8;21) e inv(16)].

1. La citometría de flujo y la PCR cuantitativa son dos métodos útiles y eficaces para el seguimiento de la ERM en pacientes con LMA asociadas a citogenética de buen pronóstico en RC. La detección de ERM durante el seguimiento de estos pacientes permite identificar aquellos casos con mayor riesgo de recaída independientemente de la técnica utilizada.
2. La ERM detectada al final del tratamiento quimioterápico es la que mejor se correlaciona con la evolución de los pacientes. Los valores críticos que predicen recaída son: >0,1% para la citometría de flujo y >10 copias para la PCR cuantitativa.
3. La t(8;21) y la inv(16) presentan diferencias en cuanto a la cinética de la recaída, de forma que, mientras la detección de pequeñas cantidades de transcrito quimérico son compatibles con RC duradera en pacientes con t(8;21), en los pacientes con inv(16) es imprescindible la negatividad de la PCR para garantizar la RC.
4. Existe una elevada concordancia entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos. La utilización conjunta de las dos técnicas permitiría obtener información adicional en estos pacientes.

OBJETIVO 3. Impacto pronóstico de la expresión de antígenos al diagnóstico en las células leucémicas, en pacientes con LMA *de novo*

1. La expresión del antígeno linfoide CD2 es poco frecuente en las LMA *de novo* en general. Sin embargo, existe una asociación entre la expresión de CD2 y las LMA con inv(16)/t(16;16), tal y como está descrito en la literatura.
2. La expresión de CD2 en los pacientes con LMA *de novo*, y en ausencia de la inv(16)/t(16;16), se asocia a una menor probabilidad de alcanzar RC tras quimioterapia de inducción. El pronóstico de las LMA asociadas a esta anomalía citogenética no se ve modificado por la expresión de CD2.
3. El antígeno CD36 se expresa con frecuencia en las LMA *de novo* del adulto, especialmente en aquellas con diferenciación monocítica. La expresión de CD36 es un factor pronóstico independiente asociado a una menor supervivencia y a un mayor riesgo de recaída.
4. Las características inmunofenotípicas de los blastos al diagnóstico pueden aportar información pronóstica valiosa en estos pacientes.



7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas S, Rotmans G, Löwenberg B, Valk PJ. Exon 8 splice site mutations in the gene encoding the E3-ligase CBL are associated with core binding factor acute myeloid leukemias. *Haematologica* 2008; 93: 1595-1597.
2. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, Malinge S, Yao J, Kilpivaara O, Bhat R, Huberman K, Thomas S, Dolgalev I, Heguy A, Paietta E, Le Beau MM, Beran M, Tallman MS, Ebert BL, Kantarjian HM, Stone RM, Gilliland DG, Crispino JD, Levine RL. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009; 114: 144-147.
3. Adriaansen HJ, Soeting PW, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in acute non-lymphocytic leukemias. Analysis of 54 cases and a review of the literature. *Leukemia* 1991; 5: 744-751.
4. Adriaansen HJ, Jacobs BC, Kappers-Klunne MC, Hahlen K, HooijkaasH, van Dongen JJ. Detection of residual disease in AML patients by use of double immunological marker analysis for terminal deoxynucleotidyl transferase and myeloid markers. *Leukemia* 1993; 7: 472-481.
5. Adriaansen HJ, te Boekhorst PAW, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJM. Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993; 81: 3043-3051.
6. Albano F, Mestice A, Pannunzio A, Lanza F, Martino B, Pastore D, Ferrara F, Carluccio P, Nobile F, Castoldi G, Liso V, Specchia G. The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. *Haematologica* 2006; 91: 311-316.

7. Alcalay M, Mani N, Gelmetti V, Fantozzi A, Fagioli M, Orleth A, Riganelli D, Sebastiani C, Cappelli E, Casciari C, Scurpi MT, Mariano AR, Minardi SP, Luzi L, Muller H, Di Fiore PP, Frosina G, Pelicci PG. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest* 2003; 112: 1751-1761.
8. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, Meani N, Diverio D, Bernard L, Tizzoni L, Volorio S, Luzi L, Colombo E, Lo Coco F, Mecucci C, Falini B, Pelicci PG. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem cell maintenance. *Blood* 2005; 106: 899-902.
9. Al-Mawali AH, Gillis D, Hissaria P, Lewis ID. Incidence, sensitivity and specificity of leukaemia associated phenotypes in acute myeloid leukaemia patients using specific five-colour multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 934-945.
10. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The use of receiver operating characteristic analysis for detection of minimal residual disease using five-color multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia identifies patients with high risk of relapse. *Cytometry* 2009; 76B: 91-101.
11. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 16-26.
12. Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, Slovak ML, Gundacker HM, Kim HT, Dewald GW, Kantarjian HM, Pierce SR, Estey EH. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *Br J Haematol* 2006; 135: 165-173.

13. Armesilla AL, Vega MA. Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem* 1994; 269: 18985-18991.
14. Armesilla AL, Calvo D, Vega MA. Structural and functional characterization of the human CD36 gene promoter: identification of a proximal PEBP2/CBF site. *J Biol Chem* 1996; 271: 7781-7787.
15. Auner HW, Olipitz W, Hoefler G, Bodner C, Konrad D, Crevenna R, Linkesch W, Sill H. Mutational analysis of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 1999; 106: 706-708.
16. Aventín A, La Starza R, Nomdedéu J, Brunet S, Sierra J, Mecucci C. Typical CBFbeta/MYH11 fusion due to insertion of the 3'-MYH11 gene into 16q22 in acute monocytic leukemia with normal chromosomes 16 and trisomies 8 and 22. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 123: 137-139.
17. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* 2009; 23: 2233-2241.
18. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006; 107: 3847-3853.
19. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood* 2008; 111: 2527-2537.
20. Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Kohlmann A, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TET2 and CBL genes: novel molecular markers in myeloid malignancies. *Ann Hematol* 2010; 89: 643-652.
21. Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, Arthur DC, Byrd JC, Davey FR, Schiffer CA, Bloomfield CD. Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Blood* 1997; 90: 1643-1648.

22. Baer MR, Stewart C, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 2001; 97: 3574-3580.
23. Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt DF, Liyanarachchi S, Choi C, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 1051-1056.
24. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD. 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: 1613-1618.
25. Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G. *BAALC* expression and *FLT3* internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol* 2006; 24: 790-797.
26. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, Beverloo HB, Chang M, Creutzig U, Dworzak MN, Forestier E, Gibson B, Hasle H, Harrison CJ, Heerema NA, Kaspers GJ, Leszl A, Litvinko N, Nigro LL, Morimoto A, Perot C, Pieters R, Reinhardt D, Rubnitz JE, Smith FO, Stary J, Stasevich I, Strehl S, Taga T, Tomizawa D, Webb D, Zemanova Z, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009; 114: 2489-96.

27. Ball ED, Davis RB, Griffin JD, Mayer RJ, Davey FR, Arthur DC, Wurster-Hill D, Noll W, Elghetany MT, Allen SL, et al. Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. *Blood* 1991; 77: 2242-2250.
28. Barbarroja N, Torres LA, Luque MJ, Carretero RM, Valverde-Esteba A, Lopez-Sanchez LM, Rodriguez-Ariza A, Velasco F, Torres A, López-Pedreira C. Additive effect of PTK787/ZK222584, a potent inhibitor of VEGFR phosphorylation, with idarubicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2009; 37: 679-691.
29. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EM, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Sonneveld P, de Greef GE, Löwenberg B, Delwel R. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003; 101: 837-845.
30. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Whitman SP, Wu YZ, Schwind S, Paschka P, Powell BL, Carter TH, Kollitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 596-604.
31. Béné MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. European Group for the immunological classification of acute leukemias: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1783-1790.
32. Béné MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, van der Holt B, Knapp W, Lemez P, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, Schoch C, Sperling C, van't

- Veer MB. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol* 2001; 113: 737-745.
33. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative group. *Ann Intern Med* 1985; 103: 620-625.
34. Ben-Yehuda D, Krichevsky S, Caspi O, Rund D, Polliack A, Abeliovich D, Zelig O, Yahalom V, Paltiel O, Or R, Peretz T, Ben-Neriah S, Yehuda O, Rachmilewitz EA. Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype. *Blood* 1996; 88: 4296-4303.
35. Beran M, Luthra R, Kantarjian H, Estey E. FLT3 mutation and response to intensive chemotherapy in young adults and elderly patients with normal karyotype. *Leuk Res* 2004; 28: 547-550.
36. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, Hoelzer D. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* 1997; 90: 1217-1225.
37. Blum W, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Rao KW, Pettenati MJ, Anastasi J, Larson RA, Bloomfield CD. Adult de novo acute myeloid leukemia with t(6;11)(q27;q23): results from Cancer and Leukemia Group B Study 8461 and review of the literature. *Cancer* 2004; 101: 1420-1427.
38. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1416-1424.
39. Biondi A, Luciano A, Bassan R, Mininni D, Specchia G, Lanzi E, Castagna S, Cantù-Rajnoldi A, Liso V, Masera G, et al. CD2 expression in acute promyelocytic

- leukemia is associated with microgranular morphology (FAB M3v) but not with any PML gene breakpoint. *Leukemia* 1995; 9: 1461-1466.
40. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, Tigaud I, Castaigne S, Raffoux E, De Botton S, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C. Prevalence, clinical profile and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3618-3620.
41. Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, Raffoux E, Leblanc T, Thomas X, Hermine O, Quesnel B, Baruchel A, Leverger G, Dombret H, Preudhomme C; Acute Leukemia French Association (ALFA); Leucémies Aiguës Myéloblastiques de l'Enfant (LAME) Cooperative Groups. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006; 20: 965-970.
42. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257.
43. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997; 3:730-737.
44. Bornhäuser M, Illmer T, Schaich M, Soucek S, Ehninger G, Thiede C, for the AML SHG 96 study group. Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML [letter]. *Blood* 2007; 109: 2264-2265.
45. Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, Langabeer SE, Kottaridis PD, Moorman AV, Burnett AK, Linch DC. *RAS* mutations in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* 2005; 106: 2113-2119.

46. Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, Patel Y, Allen C, Green C, Gale RE, Hills R, Linch DC. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia* 2009; 23: 203-206.
47. Bradstock K, Matthews J, Benson E, Page F, Bishop J. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. *Blood* 1994; 84: 1220-1225.
48. Braithwaite AW, Del Sal G, Lu X. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ* 2006; 13: 984-993.
49. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderren-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, Nieuwint A, Jotterand M, Hagemeyer A, Beverloo HB, Löwenberg B. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 4791-4797.
50. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, Del Poeta G, Del Principe ML, Cox MC, Panetta P, Irno Consalvo M, Mazzone C, Neri B, Ottaviani L, Fraboni D, Lo-Coco F, Amadori S, Venditti A. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 1783-1789.
51. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Del Principe MI, Ceresoli E, Lo Coco F, Arcese W, Amadori S, Venditti A. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2009; 21: 582-588.
52. Bueno C, Montes R, Martín L, Prat I, Hernandez MC, Orfao A, Menendez P. NG2 antigen is expressed in CD34+ HPCs and plasmacytoid dendritic cell precursors: is NG2 expression in leukemia dependent on the target cell where leukemogenesis is triggered?. *Leukemia* 2008; 22 :1475-1478.

53. Bullinger L, Krönke J, Schön C, Radtke I, Urbauer K, Botzenhardt U, Gaidzik V, Carió A, Senger C, Schlenk RF, Downing JR, Holzmann K, Döhner K, Döhner H. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia* 2010; 24: 438-449.
54. Buonamici S, Ottaviani E, Testoni N, Montefusco V, Visani G, Bonifazi F, Amabile M, Terragna C, Ruggeri D, Piccaluga PP, Isidori A, Malagola M, Baccarani M, Tura S, Martinelli G. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002; 99: 443-449.
55. Cairoli R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, Colapietro P, Nichelatti M, Pezzetti L, Lunghi M, Cuneo A, Viola A, Ferrara F, Lazzarino M, Rodeghiero F, Pizzolo G, Larizza L, Morra E. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias. An Italian retrospective study. *Blood* 2006; 107: 3463-3468.
56. Calado RT, Regal JA, Hills M, Yewdell WT, Dalmazzo LF, Zago MA, Lansdorp PM, Hogge D, Chanock SJ, Estey EH, Falcão RP, Young NS. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 1187-1192.
57. Caligiuri MA, Schichman SA, Strout MP, Mrózek K, Baer MR, Frankel SR, Barcos M, Herzig GP, Croce CM, Bloomfield CD. Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* 1994; 54: 370-373.
58. Callea V, Morabito F, Martino B, Stelitano C, Oliva B, Nobile F. Diagnostic and prognostic relevance of the immunophenotype in acute myelocytic leukemia. *Neoplasma* 1990; 37: 431-438.

59. Camós M, Torrebadell M, Pratcorona M, Rozman M, Esteve J. Identificación de mutaciones relevantes en leucemia mieloblástica aguda. Impacto clínico. *Haematologica* (edición española) 2009; 94 (Extra 1): 83-88.
60. Campana D, Coustan-Smithe, Janossy G. The immunonologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1990; 76: 163-171 Erratum in: *Blood* 1990 Nov 1;76(7):1901.
61. Campana D, Ching-Hon P. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 6: 11416-1434.
62. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38: 139-152.
63. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Devaux Y, Treille D, Larese A, Maupas J, Gentilhomme O, Ehram A, Fiere D. Surface markers expresión in adult acute myeloid leukaemia: correlations with inicial characteristics, morphology and response to therapy. *Br J Haematol* 1989; 72: 161-166.
64. Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Löwenberg B, Reilly JT. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003; 121: 775-777.
65. Casasnovas RO, Slimane FK, Garand R, Faure GC, Campos L, Deneys V, Bernier M, Falkenrodt A, Lecalvez MM, Béné MC. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 2003; 17: 515-527.
66. Castilla LH, Garrell L, Adya N, Orlic D, Dutra A, Anderson S, Owens J, Eckhaus M, Bodine D, Liu PP. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and

- predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 1999; 23: 144-146.
67. Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, Giarin E, Masetti R, Rossi V, Locatelli F, Martelli MF, Basso G, Pession A, Biondi A, Falini B. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 1419-1422.
68. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 319-330.
69. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, Gottardi E, Fava M, Schnittger S, Weiss T, Izzo B, Nomdedeu J, van der Heijden A, van der Reijden BA, Jansen JH, van der Velden VH, Ommen H, Preudhomme C, Saglio G, Grimwade D. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European Leukemia Net study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5195-5201.
70. Claxton DF, Reading CL, Nagarajan L, Tsujimoto Y, Andersson BS, Estey E, Cork A, Huh YO, Trujillo J, Deisseroth AB. Correlation of CD2 expression with PML gene breakpoints in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1992; 80: 582-586.
71. Corbacioglu A, Scholl C, Schlenk RF, Eiwen K, Du J, Bullinger L, Fröhling S, Reimer P, Rummel M, Derigs HG, Nachbaur D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Döhner K. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFβ-MYH11-positive acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28:3724-3729.
72. Cornelissen JJ, van Putten WLJ, Verdonck LF, Theobald M, Jacky E, Daenen SM, van Marwijk Kooy M, Wijermans P, Schouten H, Huijgens PC, van der Lelie H, Fey M, Ferrant A, Maertens J, Gratwohl A, Lowenberg B. Results of a HOVON/SAKK

- donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits from who?. *Blood* 2007; 109: 3656-3666.
73. Costello R, Sainty D, Blaise D, Gastaut JA, Gabert J, Poirel H, Buzyn-Veil A, Macintyre E. Prognosis value of residual disease monitoring by polymerase chain reaction in patients with CBF beta/MYH11-positive acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1997; 89: 2222-2223.
74. Cross AH, Goorha RM, Nuss R, Behm FG, Murphy SB, Kalwinsky DK, Raimondi S, Kitchingman GR, Mirro J Jr. Acute myeloid leukemia with T-lymphoid features: a distinct biologic and clinical entity. *Blood* 1988; 72: 579-587.
75. Czuczman MS, Dodge RK, Stewart CC, Frankel SR, Davey FR, Powell BL, Szatrowski TP, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Value of immunophenotype in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia. Cancer and Leukemia Group B Study 8364. *Blood* 1999; 93: 3931-3939.
76. Chang CC, Esho C, Kampalath B, Shidham VB, FIAC, MRCPATH, Perkins S. Immunophenotypic profile of myeloid cells in granulocytic sarcoma by immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 2000; 114: 807-811.
77. Chang H, Salma F, Yi Q, Patterson L, Brien B, Minden B. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2004; 28: 43-48.
78. Chang H, Brandwein J, Yi QL, Chun K, Patterson B, Brien B. Extramedullary infiltrates of AML are associated with CD56 expression, 11q23 abnormalities and inferior clinical outcome. *Leuk Res* 2004 (2); 28: 1007-1011.
79. Chauhan PS, Brushan B, Mishra AK, Singh LC, Saluja S, Verma S, Gupta DK, Mittal V, Chaudhry S, Kapur S. Mutation of FLT3 gene in acute myeloid leukemia with

- normal cytogenetics and its association with clinical and immunophenotypic features. *Med Oncol* 2010; Mar 31.
80. Chen W, Rassidakis GZ, Li J, Routbort M, Jones D, Kantarjian H, LJ Medeiros, Bueso-Ramos CE. High frequency of *NPM1* gene mutations in acute myeloid leukemia with prominent nuclear invaginations ("cuplike" nuclei). *Blood* 2006; 108: 1783-1784.
81. Chen Z, Tong JH, Dong S, Zhu J, Wang ZY, Chen SJ. Retinoid acid regulatory pathways, chromosome translocations, and acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15: 147-156.
82. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Löwenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD; International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4642-4649.
83. Chillón MC, Santamaría C, García-Sanz R, Balanzategui A, María Eugenia S, Alcoceba M, Marín L, Caballero MD, Vidriales MB, Ramos F, Bernal T, Díaz-Mediavilla J, de Coca AG, Peñarrubia MJ, Queizán JA, Giraldo P, San Miguel JF, González M. Long FLT3 internal tandem duplications and reduced PML-RAR α expression at diagnosis characterize a high-risk subgroup of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica* 2010; 95: 745-751.
84. Chou WC, Tang JL, Wu SJ, Tsay W, Yao M, Huang SY, Huang KC, Chen CY, Huang CF, Tien HF. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by

- quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (NPM1) mutations. *Leukemia* 2007; 21: 998-1004.
85. Chung KY, Morrone G, Schuringa JJ, Wong B, Dorn DC, Moore MA. Enforced expression of an FLT3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis. *Blood* 2005; 105: 77-84.
86. Damm F, Heuser M, Morgan M, Yun H, Grosshennig A, Göhring G, Schlegelberger B, Döhner K, Ottmann O, Lübbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar A, Fiedler W, Kirchner H, Döhner H, Heil G, Ganser A, Krauter J. Single nucleotide polymorphism in the mutational hotspot of WT1 predicts a favorable outcome in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28: 578-585.
87. Das-Gupta EP, Seedhouse CH, Russell NH. Microsatellite instability occurs in defined subsets of patients with acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2001; 114: 307-312.
88. De Botton S, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Thomas X, Guerci A, Fey M, Rayon C, Huguet F, Sotto JJ, Gardin C, Cony Makhoul P, Travade P, Solary E, Fegueux N, Bordessoule D, San Miguel J, Link H, Desablens B, Stamatoullas A, Deconinck E, Geiser K, Hess U, Maloisel F, Castaigne S, Preudhomme C, Chomienne C, Degos L, Fenaux P; European APL Group. Additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) do not confer poor prognosis: results of APL 93 trial. *Br J Haematol* 2000; 111:801-806.
89. Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F, Lamy T, Auvrignon A, Blaise D, Pigneux A, Mugneret F, Bastard C, Dastugue N, Van den Akker J, Fièrè D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Dombret H. Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2003; 102: 462-469.

90. Derolf AR, Björklund E, Mazur J, Björkholm M, Porwit A. Expression patterns of CD33 and CD15 predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymph* 2008, 49: 1279-1291.
91. Di Bona E, Sartori R, Zambello R, Guercini N, Madeo D, Rodeghiero F. Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2002; 87: 250-256.
92. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57: 4749-4756.
93. Di Martino J, Cleary ML. MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol* 1999; 106: 614-626.
94. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H. AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 114: 5201-5205.
95. Döhner H. Implication of the molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Book* 2007: 412-419.
96. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2010; 115: 453-474.
97. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H. 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. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3254-3261.
98. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics – interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106: 3740-3746.
99. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 976-982.
100. Dreyling MH, Schrader K, Fonatsch C, Schlegelberger B, Haase D, Schoch C, Ludwig W, Löffler H, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W, Bohlander SK. MLL and CALM are fused to AF10 in morphologically distinct subsets of acute leukemia with translocation t(10;11): both rearrangements are associated with a poor prognosis. *Blood*. 1998; 91: 4662-4667.
101. Du X, Ho M, Pastan I. New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother* 2007; 30: 607-613.
102. Elmaagacli AH, Beelen DW, Stockova J, Trzensky S, Kroll M, Schaefer UW, Stein C, Opalka B. Detection of AML1/ETO fusion transcripts in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1997; 90: 3230-3231.
103. Elmaagacli AH, Beelen DW, Kroll M, Trzensky S, Stein C, Schaefer UW. Detection of CBFbeta/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 159-166.
104. Esteve J, Escoda L, Martín G, Díaz-Mediavilla J, González M, Rivas C, Álvarez C, González San Miguel JD, Brunet S, Tomás JF, Tormo M, Sayas MJ, Sánchez Godoy P, Colomer D, Bolufer P, Sanz MA. Outcome of patient with acute

- promyelocytic leukemia mailing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of and early intervention. *Leukemia* 2007; 21: 446-452.
105. Estey E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1908-1915.
106. Eto T, Akashi K, Harada M, Shibuya T, Takamatsu Y, Teshima T, Niho Y. Biological characteristics of CD7 positive acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1992; 82: 508-514.
107. Evans PA, Short MA, Jack AS, Norfolk DR, Child JA, Shiach CR, Davies F, Tobal K, Liu Yin JA, Morgan GJ. Detection and quantitation of the CBFbeta/MYH11 transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with AML. *Leukemia* 1997; 11: 364-369.
108. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettrossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352: 254-266.
109. Falini B, Bolli N, Shan J, Martelli MP, Liso A, Pucciarini A, Bigerna B, Pasqualucci L, Mannucci R, Rosati R, Gorello P, Diverio D, Roti G, Tiacci E, Cazzaniga G, Biondi A, Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W, Martelli MF, Gu W, Mecucci C, Nicoletti I. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc⁺ AML. *Blood* 2006; 107: 4514-4523.
110. Falini B, Martelli MP, Mecucci C, Liso A, Bolli N, Bigerna B, Pucciarini A, Pileri S, Meloni G, Martelli MF, Haferlach T, Schnittger S. Cytoplasmic mutated

- nucleophosmin is stable in primary leukemic cells and in a xenotransplant model of NPMc+ acute myeloid leukemia in SCID mice. *Haematologica* 2008; 93: 775-779.
111. Farag SS, Archer AS, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Vardiman JW, Pettenati MJ, Baer MR, Qumsiyeh MB, Koduru PR, Ning Y, Mayer RJ, Stone RM, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood* 2006; 108: 63-73.
112. Faulkner RD, Seedhouse CH, Das-Gupta EP, Russell NH. BAT-25 and BAT-26, two mononucleotide microsatellites, are not sensitive markers of microsatellite instability in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 124: 160-165.
113. Feller N, van der Pol MA, van Stijn A, Weijers GWD, Westra AH, Evertse BW, Ossenkuppele GJ, Schuurhuis GJ. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 1380-1390.
114. Ferrara F, Di Noto R, Annunziata M, Copia C, Lo Pardo C, Boccuni P, Sebastio L, Del Vecchio L. Immunophenotypic analysis enables the correct prediction of t(8;21) in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 102: 444-448.
115. Ferrara F, Morabito F, Martino B, Specchia G, Liso V, Nobile F, Boccuni P, Di Noto R, Pane F, Annunziata M, Schiavone ET, De Simone M, Guglielmi C, Del Vecchio L, Lo Coco F. CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1295-1300.
116. Figueroa ME, Wouters BJ, Skrabanek L, Glass J, Li Y, Erpelinck-Verschueren CA, Langerak AW, Löwenberg B, Fazzari M, Grealley JM, Valk PJ, Melnick A, Delwel

- R. Genome-wide epigenetic analysis delineates a biologically distinct immature acute leukemia with myeloid/T-lymphoid features. *Blood* 2009; 113: 2795-2804.
117. Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, Smith ML, Debernardi S, Skoulakis S, Lillington D, Lister TA, Young BD. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005; 65: 9152-9154.
118. Frankel AE, Ränge J, Kiser M, Alexander R, Kucera G, Miller MS. Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor. *Protein Engineering* 2000; 13: 575-581.
119. Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13092-13097.
120. Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S. Human cancer converge at the HIF-2 α oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 21306-21311.
121. Friedman AD. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2002; 21: 3377-3390.
122. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007; 26: 6816-6828.
123. Friedman AD. Cell cycle and developmental control of hematopoiesis by Runx1. *J Cell Physiol* 2009; 219: 520-524.
124. Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K; AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Group Ulm. *Blood* 2002; 100: 4372-4380.

125. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. 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.
126. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia- A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318-2357.
127. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, Krauter J, Schlegelberger B, Ganser A, Döhner H, Döhner K; German-Austrian AML Study Group. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* 2009; 113: 4505-4511.
128. Gaiger A, Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Greinix H, Kalhs P, Tisljar K, Priglinger S, Laczika K, Mitterbauer M, Novak M, Mitterbauer G, Mannhalter C, Haas OA, Lechner K, Jäger U. Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1886-1894.
129. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, Srirangan S, Wheatley K, Burnett AK, Linch DC. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 2005; 106: 3658-3665.

130. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. 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; 11: 2776-2784.
131. Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 49-59.
132. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 3183-3189.
133. Geller RB, Zahurak M, Hurwitz CA, Burke PJ, Karp JE, Piantadosi S, Civin CI. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia : The significance of the stem cell glycoprotein CD34 (My-10). *Br J Haematol* 1990; 76: 340-347.
134. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100: 1532-1542.
135. Goemans BF, Zwaan CM, Miller M, Zimmermann M, Harlow A, Meshinchi S, Loonen AH, Hähnen K, Reinhardt D, Creutzig U, Kaspers GJ, Heinrich MC. Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1536-1542.
136. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-Myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 2007; 11: 335-347.

137. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, Roti G, Rosati R, Martelli MF, Diverio D, Lo Coco F, Biondi A, Saglio G, Mecucci C, Falini B. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006; 20: 1103-1108.
138. Gorletta TA, Gasparini P, D'Elios MM, Trubia M, Pelicci PG, Di Fiore PP. Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leucemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44: 334-337.
139. Graf M, Reif S, Kröll T, Hecht K, Nuessler V, Schmetzer H. Expression of MAC-1 (CD11b) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with an unfavorable prognosis. *Am J Hematol* 2006; 81: 227-235.
140. Greaves MF, Chan LC, Furley AJW, Watt SM, Molgaard HV. Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 1986; 67: 1-11.
141. Green C, Linch DC, Gale RE. Most acute myeloid leukaemia patients with intermediate mutant FLT3/ITD levels do not have detectable bi-allelic disease, indicating that heterozygous disease alone is associated with an adverse outcome. *Br J Haematol* 2008; 142: 423-426.
142. Green C, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2739-2747.
143. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992; 80: 1105-1115.

144. Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y, Tse W. Molecular prognostic markers for adult acute leukemia with normal cytogenetics. *Hematol Oncol* 2009; 2: 23.
145. Griffin JD, Davis R, Nelson DA, Davey FR, Mayer RJ, Schiffer C, McIntyre OR, Bloomfield CD. Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1986; 68: 1232-1241.
146. Griffiths M, Mason J, Rindl M, Akiki S, McMullan D, Stinton V, Powell H, Curtis A, Bown N, Craddock C. Acquired isodisomy for chromosome 13 is common in AML, and associated with FLT-3 mutations [letter]. *Leukemia* 2005; 19: 2355-2358.
147. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322-2333.
148. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood* 2001; 98: 1312-1320.
149. Grimwade D, Lo Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1959-1973.
150. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:385-95.
151. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, Diverio D, Jones K, Aslett H, Batson E, Rennie K, Angell R, Clark RE, Solomon E, Lo Coco F,

- Wheatley K, Burnett AK. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol* 2010; 27; 3650-3658.
152. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. 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.
153. Gröschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwien K, Goudswaard C, van Putten WJ, Kayser S, Verdonck LF, Lübbert M, Ossenkoppele GJ, Germing U, Schmidt-Wolf I, Schlegelberger B, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Löwenberg B, Döhner K, Delwel R. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2101-2107.
154. Growney JD, Clark JJ, Adelsperger J, Stone R, Fabbro D, Griffin JD, Gilliland DG. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* 2005; 106: 721-724.
155. Gudgin E, Huntly B. Acute myeloid leukemia biology and leukemia stem cells. *Hematology Education: the education program for the annual congress of the European Hematology Association* 2009; 3: 17-23.
156. Guerrasio A, Pilatrinio C, De Micheli D, Cilloni D, Serra A, Gottardi E, Parziale A, Marmont F, Diverio D, Divona M, Lo Coco F, Saglio G. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia* 2002; 16: 1176-1181.

157. Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D, Fenu S, Vegna ML, Cantu-Rajnoldi A. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. *Br J Haematol* 1998; 102: 1035-1041.
158. Guièze R, Renneville A, Cayuela JM, Abdelali RB, Boissel N, de Botton S, Rubio MT, Mazingue F, Macintyre EA, Cheok M, Sigaux F, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C. Prognostic value of minimal residual disease by real-time quantitative PCR in acute myeloid leukemia with CFBF-MYH11 rearrangement: the French experience. *Leukemia* 2010; 24: 1386-1388.
159. Gunther S, Rother K, Frommel C. Molecular flexibility in protein-DNA interactions. *Biosystems* 2006; 85: 126-136.
160. Gupta M, Raghavan M, Gale RE, Chelala C, Allen C, Molloy G, Chaplin T, Linch DC, Cazier JB, Young BD. Novel regions of acquired uniparental disomy discovered in acute myeloid leucemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 729-739.
161. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008; 22 :1539-1541.
162. Haferlach C, Dicker F, Kohlmann A, Schindela S, Weiss T, Kern W, Schnittger S, Haferlach T. AML with CFBF-MYH11 rearrangement demonstrate RAS pathway alterations in 92% of all cases including a high frequency of NF1 deletions. *Leukemia* 2010; 24: 1065-1069.
163. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, Dugas M, Hiddemann W, Kern W, Schoch C. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood* 2005; 106: 1189-1198.

164. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, Brandts C, Serve H, Roesel J, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller GJ, Nimer S, Stone RM, Wang Y, Kindler T, Cohen PS, Huber C, Fischer T. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* 2006; 107: 293-300.
165. Hernández JM, Martín G, Gutiérrez NC, Cervera J, Ferro MT, Calasanz MJ, Martínez-Climent JA, Luño E, Tormo M, Rayón C, Díaz-Mediavilla J, González M, González-San Miguel JD, Pérez-Equiza K, Rivas C, Esteve J, Alvarez Mdel C, Odriozola J, Ribera JM, Sanz MA; PETHEMA Cooperative Group, Spain. Additional cytogenetic changes do not influence the outcome of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with an ATRA plus anthracyclin based protocol. A report of the Spanish group PETHEMA. *Haematologica* 2001; 86: 807-813.
166. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Döhner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Ganser A. High meningeoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* 2006; 108: 3898-3905.
167. Heuser M, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Yung E, Piper J, Fung S, Schlenk RF, Dohner K, Hinrichsen T, Rudolph C, Schambach A, Baum C, Schlegelberger B, Dohner H, Ganser A, Humphries RK. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood* 2007; 110: 1639-1647.
168. Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5830-5845.

169. Honma M, Momose M, Tanabe H, Sakamoto H, Yu Y, Little JB, Sofuni T, Hayashi M. Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosomal integrity. *Mol Carcinog* 2000; 28: 203-214.
170. Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Sasai Y, Kobayashi M, Fujii H, Tanaka S, Yagita M, Abe T, Kashima K, Taniwaki M. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 1999; 13: 1235-1242.
171. Horwitz M. The genetics of familial leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1347-1359.
172. Hrušák O, Porwit-MacDonald. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002; 16: 1233-1258.
173. Iiluzá Y, Aiso M, Oshimi K, Kanemaru M, Kawamura M, Takeuchi J, Horikoshi A, Ohshima T, Mizoguchi H, Horie T. Myeloblastoma formation in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 1992; 16: 665-671.
174. Illmer T, Thiede C, Fredersdorf A, Stadler S, Neubauer A, Ehninger G, Schaich M. Activation of the *RAS* pathway is predictive for a chemosensitive phenotype of acute myelogenous leukemia blast. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3217-3224.
175. Illmer T, Schaich M, Ehninger G, Thiede C; DSIL2003 AML study group. Tyrosine kinase mutations of JAK2 are rare events in AML but influence prognosis of patients with CBF-leukemias. *Haematologica* 2007; 92: 137-138.
176. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29: 673-680.

177. Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, Soma T, Tani Y, Tatekawa T, Oji Y, Tamaki H, Kyo T, Dohy H, Hiraoka A, Masaoka T, Kishimoto T, Sugiyama H. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood* 1996; 88: 2267-2278.
178. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Naoe T. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2009; 83: 90-98.
179. Ito S, Ishida Y, Oyake T, Satoh M, Aoki Y, Kowata S, Uchiyama T, Enomoto S, Sugawara T, Numaoka H, Suzuki K, Murai K. Clinical and biological significance of CD56 antigen expression in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2004; 45: 1783-1789.
180. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2001.
181. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, Meyerrose T, Rossi R, Grimes B, Rizzieri DA, Luger SM, Phillips GL. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2000; 14: 1777-1784.
182. Juliusson G, Antunovic P, Derolf Å, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A, Höglund M. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 2009; 113: 4179-4187.
183. Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, Baer MR, Strout MP, Oberkircher AR, Hoffmann L, Ball ED, Frei-Lahr DA, Christiansen NP, Block AM, Knuutila S, Herzig GP, Bloomfield CD. Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients

- treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 1996; 88: 2183-2191.
184. Kainz B, Heintel D, Marculescu R, Schwarzinger I, Sperr W, Le T, Weltermann A, Fonatsch C, Haas OA, Mannhalter C, Lechner K, Jaeger U. Variable prognostic value of *FLT3* internal tandem duplication in patients with *de novo* AML and normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol J* 2002; 3: 283-289.
185. Kamikubo Y, Zhao L, Wunderlich M, Corpora T, Hyde RK, Paul TA, Kundu M, Garrett L, Compton S, Huang G, Wolff L, Ito Y, Bushweller J, Mulloy JC, Liu PP. Accelerated leukemogenesis by truncated CBF β -SMMHC defective in high-affinity binding with RUNX1. *Cancer Cell* 2010; 17: 455-468.
186. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005; 105: 4187-4190.
187. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Fischer T, Döhner K; German-Austrian AML Study Group (AMLSG). Insertion of *FLT3* internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114: 2386-2392.
188. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 179-198.
189. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR et al. PML/RAR α and *FLT3*-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 8283-8288.
190. Kern W, Haferlach C, Bacher U, Haferlach T, Schnittger S. Flow cytometric identification of acute myeloid leukemia with limited differentiation and *NPM1* type A mutation: a new biologically define entity. *Leukemia* 2009; 23: 1361-1364.

191. Kern W, Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute leukemia patients. *Haematologica* 2004; 89: 528-540.
192. Kern W, Voskova D, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 104: 3078-3085.
193. Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 112: 4-16.
194. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, Campana D, Koscielniak E, Niemeyer C, Schlegel PG, Müller I, Niethammer D, Bader P. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 2005; 128: 774-782.
195. Kim DH, Lee NY, Lee MH, Sohn SK, Do YR, Park JY. 9. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene (VEGFA) polymorphism can predict the prognosis in acute myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* 2008; 140: 71-79.
196. Kindle KB, Troke PJ, Collins HM et al. MOZ-TIF2 inhibits transcription by nuclear receptors and p53 by impairment of CBP function. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 988-1002.
197. King-Underwood L, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 1998; 91: 2961-2968.
198. Kita K, Miwa H, Nakase K, Kawakami K, Kobayashi T, Shirakawa S, Tanaka I, Ohta C, Tsutani H, Oguma S, Kyo T, Dohy H, Kamada N, Nasu K, Uchino H (The

- Japan Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma). Clinical importance of CD7 expression in acute myelocytic leukemia. The Japan Cooperative Group of Leukemia/Lymphoma. *Blood* 1993; 81: 2399-2405.
199. Komatsu N, Takeuchi S, Ikezoe T, Tasaka T, Hatta Y, Machida H, Williamson IK, Bartram CR, Koeffler HP, Taguchi H. Mutations of the E2F4 gene in hematological malignancies having microsatellite instability. *Blood* 2000; 95:1509-1510.
200. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, Wadleigh M, DeAngelo DJ, Stone RM, Sakamaki H, Appelbaum FR, Döhner H, Antin JH, Soiffer RJ, Cutler C. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* 2009; 301: 2349-2361.
201. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-1759.
202. Krauter J, Görlich K, Ottmann O, Lübbert M, Döhner H, Heit W, Kanz L, Ganser A, Heil G. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4413-4422.
203. Krauter J, Wagner K, Schäfer I, Marschalek R, Meyer C, Heil G, Schaich M, Ehninger G, Niederwieser D, Krahl R, Büchner T, Sauerland C, Schlegelberger B, Döhner K, Döhner H, Schlenk RF, Ganser A. Prognostic factors in adult patients up

- to 60 years old with acute myeloid leukemia and translocations of chromosome band 11q23: individual patient data-based meta-analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3000-3006.
204. Kuo YH, Zaidi SK, Gornostaeva S, Komori T, Stein GS, Castilla LH. Runx2 induces acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfbeta-SMMHC in mice. *Blood* 2009; 113: 3323-3332.
205. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, Laiho M. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor supresor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 2004; 5: 465-475.
206. Kusec R, Laczika K, Knöbl P, Friedl J, Greinix H, Kahls P, Linkesch W, Schwarzingler I, Mitterbauer G, Purtscher B, et al. AML1/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of all patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia* 1994; 8: 735-739.
207. Laane E, Derolf AR, Björklund E, Mazur J, Everaus H, Söderhäll S, Björkholm M, Porwit-MacDonald A. The effect of allogeneic stem cell transplantation on outcome in younger acute myeloid leukemia patients with minimal residual disease detected by flow cytometry at the end of post-remission therapy. *Haematologica* 2006; 91: 833-836.
208. Laczika K, Novak M, Hilgarth B, Mitterbauer M, Mitterbauer G, Scheidel-Petrovic A, Scholten C, Thalhammer-Scherrer R, Brugger S, Keil F, Schwarzingler I, Haas OA, Lechner K, Jaeger U. Competitive CBFbeta/MYH11 reverse-transcriptase polymerase chain reaction for quantitative assessment of minimal residual disease during postremission therapy in acute myeloid leukemia with inversion(16): a pilot study. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1519-1525.

209. Laczika K, Mitterbauer G, Mitterbauer M, Knöbl P, Schwarzingler I, Greinix HT, Rabitsch W, Fonatsch C, Mannhalter C, Lechner K, Jaeger U. Prospective monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with inversion(16) by CBFbeta/MYH11 RT-PCR: implications for a monitoring schedule and for treatment decisions. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 923-931.
210. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, Whitman SP, Paschka P, Mrózek K, Baldus CD, Vukosavljevic T, Liu CG, Ross ME, Powell BL, de la Chapelle A, Koltz JE, Larson RA, Marcucci G, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B (CALGB). 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: 5371-5379.
211. Langer C, Marcucci G, Holland KB, Radmacher MD, Maharry K, Paschka P, Whitman SP, Mrózek K, Baldus CD, Vij R, Powell BL, Carroll AJ, Koltz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. 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. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3198-3204.
212. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C, Lai JL, Ballerini P, Mazingue F, Fasola S, Dehée A, Bellman F, Adam M, Labopin M, Douay L, Leverger G, Preudhomme C, Landman-Parker J. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1507-1515.
213. Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, Löwenberg B, Estey EH, Dombret H, Theobald M, Voliotis D, Bennett JM, Richie M, Leopold LH, Berger MS, Sherman ML,

- Loken MR, van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* 2005, 104: 1442-1452.
214. Lasa A, Carricondo M, Estivill C, Bussaglia E, Gich I, Brunet S, Aventin A, Sierra J, Nomdedéu JF. WT1 monitoring in core binding factor AML: comparison with specific chimeric products. *Leuk Res* 2009; 33: 1643-1649.
215. La Starza R, Trubia M, Crescenzi B, Matteucci C, Negrini M, Martelli MF, Pelicci PG, Mecucci C. Human homeobox gene HOXC13 is the partner of NUP98 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 420-423.
216. Legrand O, Perrot JY, Baudard Y, Cordier M, Lautier A, Simonin R, Zittoun R, Casadevall N, Marie JP. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000; 96: 870-877.
217. Lenormand B, Vannier JP, Bene MC, Falkenrodt A, Bayle C, Favre M, Garand R, Griveau AM, Briquet MT, Reman O, et al. CD2 + CD19 + acute lymphoblastic leukaemia in 16 children and adults: clinical and biological features. Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (G.E.I.L.). *Br J Haematol* 1993; 83: 580-588.
218. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 2005; 23: 16-43.
219. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Fenaux P, Preudhomme C. *CEBPA* point mutations in haematological malignancies. *Leukemia* 2005; 19: 329-334.
220. Leroy H, de Botton S, Gardel-Duflos N, Darre S, Leleu X, Roumier C, Morschhauser F, Lai JL, Bauters F, Fenaux P, Preudhomme C. Prognosis value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). *Leukemia* 2005 (2); 19: 367-372.

-
221. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2424-2433.
222. Licht JD, Sternberg DW. The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Book* 2005; 137-142.
223. Lin LI, Chen CY, Lin DT, Tsay W, Tang JL, Yeh Yh, Shen HL, Su FH, Yao M, Huang SY, Tien HF. Characterization of *CEBPA* mutations in acute myeloid leukemia: most patient with *CEBPA* mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1372-1379.
224. Lin P, Hao S, Medeiros J, Estey EH, Pierce SA, Wang X, Glassman AB, Bueso-Ramos C, Huh YO. Expresión of CD2 in acute promyelocytic leukemia correlatos with short form of PML-RAR α transcripts and poorer prognosis. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 402-407.
225. Lin TC, Hou HA, Chou WC, Ou DL, Yu SL, Tien HF, Lin LI. *CEBPA* methylation as a prognostic biomarker in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 32-40.
226. Liu S, Wu LC, Pang J, Santhanam R, Schwind S, Wu YZ, Hickey CJ, Yu J, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Li C, Whitman SP, Mishra A, Stauffer N, Eiring AM, Briesewitz R, Baiocchi RA, Chan KK, Paschka P, Caligiuri MA, Byrd JC,
-

- Croce CM, Bloomfield CD, Perrotti D, Garzon R, Marcucci G. Sp1/NFkappaB/HDAC/miR-29b regulatory network in KIT-driven myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2010; 17: 333-347.
227. Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 12-22.
228. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:776-781.
229. Löwenberg B, Beck J, Graux C, van Putten W, Schouten HC, Verdonck LF, Ferrant A, Sonneveld P, Jongen-Lavrencic M, von Lilienfeld M, Biemond BJ, Vellenga E, Breems D, de Muijnck H, Schaafsma R, Verhoef G, Döhner H, Gratwohl A, Pabst T, Ossenkoppele GJ, Maertens J. for the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group (HOVON), German Austrian AML Study Group (AMLSG) and Swiss Group of Clinical Cancer Research Collaborative Group (SAKK). Gemtuzumab ozogamicin as postremission treatment in AML at 60 years of age or more: results of a multicenter phase 3 study. *Blood* 2010; 115: 2586-2591.
230. Lucio P, Pareira A, van der Beemd MWM, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJM, San Miguel JF. Flow cytometry analysis of normal B differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor B-ALL. *Leukemia* 1999; 13: 419-427.
231. Lück SC, Russ AC, Du J, Gaidzik V, Schlenk RF, Pollack JR, Döhner K, Döhner H, Bullinger L. KIT mutations confer a distinct gene expression signature in core binding factor leukaemia. *Br J Haematol* 2010; 148: 925-937.
232. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, Beverloo HB, Löwenberg B, Delwel R. High EVI1 levels predict adverse

- outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008; 11: 4329-4337.
233. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, San Miguel JF. Phenotypic characterization of normal myeloid differentiation. *Sangre* 1994; 39: 277-282.
234. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, López-Berges MC, Valverde B, González M, Caballero MD, Ramos F, Martínez M, Fernández-Calvo J, Martínez A, San Miguel JF. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 1995; 70: 189-194.
235. Macedo A, Orfao A, González M, Vidriales MB, López-Berges MC, Martínez A, San Miguel JF. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia* 1995; 9: 993-998.
236. Maeck L, Haase D, Schoch C, Hiddemann W, Alves F. Genetic instability in myelodysplastic syndrome: detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in bone marrow samples with karyotype alterations. *Br J Haematol* 2000; 109: 842-846.
237. Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Defining the "absence" of the CBFbeta/MYH11 fusion transcript in patients with acute myeloid leukemia and inversion of chromosome 16 to predict long-term complete remission: a call for definitions. *Blood* 1997; 90: 5022-5024.
238. Marcucci G, Caligiuri MA, Döhner H, Archer KJ, Schlenk RF, Döhner K, Maghraby EA, Bloomfield CD. Quantification of CBFbeta/MYH11 fusion transcript by real time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2001; 15: 1072-1080.

239. Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia: is molecular monitoring by RT-PCR useful clinically?. *Eur J Haematol* 2003; 71: 143-154.
240. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Maharry K, Kolitz JE, Moore JO, Mayer RJ, Pettenati MJ, Powell BL, Edwards CG, Sterling LJ, Vardiman JW, Schiffer CA, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5705-5717.
241. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, Mrózek K, Baldus CD, Carroll AJ, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B Study. 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. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3337-3343.
242. Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Vukosavljevic T, Paschka P, Whitman SP, Langer C, Baldus CD, Liu CG, Ruppert AS, Powell BL, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD. Prognostic significance of, and gene 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.
243. Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrózek K, Ruppert AS, Paschka P, Vukosavljevic T, Whitman SP, Baldus CD, Langer C, Liu CG, Carroll AJ, Powell BL, Garzon R, Croce CM, Kolitz JE, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1919-1928.

244. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2348-2355.
245. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipok C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009; 361: 1058-1066.
246. Martelli AM, Papa V, Tazzari PL, Ricci F, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Cappellini A, Martinelli G, Ottaviani E, Pagliaro P, Horn S, Bäsecke J, Lindner LH, Eibl H, McCubrey JA. Erucylphosphocholine, the first intravenously applicable alkylphosphocholine, is cytotoxic to acute myelogenous leukemia cells through JNK- and PP2A-dependent mechanisms. *Leukemia* 2010; 24: 687-698.
247. Martín G, Barragán E, Bolufer P, Chillón C, García-Sanz R, Gómez T, Brunet S, González M, Sanz MA. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica* 2000; 85: 699-703.

248. Martinelli G, Ottaviani E, Testoni N, Visani G, Terragna C, Amabile M, Trabacchi E, Montefusco V, Tura S. Molecular remission in PCR-positive acute myeloid leukemia patients with inv(16): role of bone marrow transplantation procedures. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 694-697.
249. Martinelli G, Buonamici S, Visani G, Malagola M, Piccaluga PP, Isidori A, Bosi C, Bonifazi F, Soverini S, Terragna C, Amabile M, Giannini B, Baccarani M. Molecular monitoring of acute myeloid leukemia associated with inv(16): threshold of CBFbeta/MYH11 transcript copy number above which relapse occurs and below which continuous Complete Remission is likely. *Leukemia* 2003; 17: 650-651.
250. Martínez A, San Miguel JF, Vidriales MB, Ciudad J, Caballero MD, López-Berges MC, Moro MJ, Calmuntia MJ, Ortega F, Orfao A. An abnormal CD34+ myeloid/cd34+ lymphoid ratio at the end of chemotherapy predicts relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Cytometry* 1999; 38: 70-75.
251. Mason KD, Juneja SK, Szer J. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis?. *Blood Rev* 2006; 20: 71-82.
252. Matutes E, Morilla R, Farahat N, Carbonell F, Swansbury J, Dyer M, Catovsky D. Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 1997; 82: 64-66.
253. Maurillo L, Buccisano F, Spagnoli A, Del Poeta G, Panetta P, Neri B, Del Principe MI, Mazzone C, Consalvo MI, Tamburini A, Ottaviani L, Fraboni D, Sarlo C, De Fabritiis P, Amadori S, Venditti A. Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. *Haematologica* 2007; 92: 605-611.
254. Maurillo L, Buccisano F, Del Principe MI, Del Poeta G, Spagnoli A, Panetta P, Ammatuna E, Neri B, Ottaviani L, Sarlo C, Venditti D, Quaresima M, Cerretti R, Rizzo M, de Fabritiis P, Lo Coco F, Arcese W, Amadori S, Venditti A. Toward

- optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4944-4951.
255. Mayers RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E 3rd. Intensive post-remission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994; 331: 896-903.
256. Mead AJ, Linch DC, Hills RK, Wheatley K, Burnett AK, Gale RE. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 1262-1270.
257. Medeiros BC, Kohrt HE, Arber DA, Bangs CD, Cherry AM, Majeti R, Kogel KE, Azar CA, Patel S, Alizadeh AA. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemia with *inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2)*. *Leuk Res* 2010; 34: 594-597.
258. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 3167-3215.
259. Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL, Sweetser DA, Buckley JD, Tjoa TK, Bernstein ID, Radich JP. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 89-94.
260. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4263-4269.
261. Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T, Hummel M, Sauerland MC, Heinecke A, Berdel WE, Büchner T, Wörmann B, Mansmann U, Braess J, Spiekermann K, Hiddemann W, Buske C, Bohlander SK. 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. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5031-5038.
262. Minelli A, Maserati E, Giudici G, Tosi S, Olivieri C, Bonvini L, De Filippi P, Biondi A, Lo Curto F, Pasquali F, Danesino C. Familial partial monosomy 7 and myelodysplasia: different parental origin of the monosomy suggests action of a mutator gene. *Cancer Gen Cytogen* 2001;124: 147-151.
263. Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T, Takenaka K, Mizuno S, Gondo H, Okamura T, Dohy H, Niho Y. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996; 87: 4789-4796.
264. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7521-7526.
265. Miwa H, Kita K, Nishii K, Morita N, Takakura N, Ohishi K, Mahmud N, Kageyama S, Fukumoto M, Shirakawa S. Expression of MDR1 gene in acute leukemia cells: association with CD7+ acute myeloblastic leukemia/acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 3445-3451.
266. Montesinos P, Rayón C, Vellenga E, Brunet S, González J, González M, Holowiecka A, Esteve J, Bergua J, González JD, Rivas C, Tormo M, Rubio V, Bueno J, Manso F, Milone G, de la Serna J, Pérez I, Pérez-Encinas M, Krsnik I, Ribera JM, Escoda L, Lowenberg B, Sanz MA. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with *all-trans* retinoic acid and anthracycline-based regimens. *Blood* 2011; 117: 1799-1805.
267. Moodley Y, Rigby P, Bundell C, Bunt S, Hayashi H, Misso N, McAnulty R, Laurent G, Scaffidi A, Thompson P, Knight D. Macrophage recognition and

- phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 2003; 162: 771-779.
268. Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, Kuehl PM, Langenberg P, Meltzer SJ, Stine OC. Instability typing: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61: 6046-6049.
269. Mori Y, Yoshimoto G, Kumano T, Miyamoto T, Iino T, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Kinukawa N, Nagafuji K, Teshima T, Shimoda K, Akashi K, Harada M. Distinctive expression of myelomonocytic markers and down-regulation of CD34 in acute myelogenous leukaemia with FLT3 tandem duplication and nucleophosmin mutation. *Eur J Haematol* 2007; 79: 17-24.
270. Morschhauser F, Cayuela JM, Martini S, Baruchel A, Rousselot P, Socié G, Berthou P, Jouet JP, Straetmans N, Sigaux F, Fenaux P, Preudhomme C. Evaluation of minimal residual disease using reverse-transcription polymerase chain reaction in t(8;21) acute myeloid leukemia: a multicenter study of 51 patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 778-794.
271. Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru P, Rao K, Strout M, Hutchinson R, Moore J, Mayer R, Schiffer C, Bloomfield C. Adult patients with the novo acute myeloid leukemia and t(9;11) (q22;q23) have superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 1997; 11: 4532-4538.
272. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. 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: 431-448.

273. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Bloomfield CD. Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 711-718.
274. Muñoz L, Nomdedéu JF, López O, Carnicer MJ, Bellido M, Aventín A, Brunet S, Sierra J. Interleukin-3 receptor α chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* 2001; 86: 1261-1269.
275. Muñoz L, Nomdedéu JF, Brunet S, Villamor N, Tormo M, Sierra J. CD56 expression could be associated with monocytic differentiation in acute myeloid leukemia with t(8;21). *Haematologica* 2001 (2); 86: 763-764.
276. Muñoz L, Aventín A, Villamor N, Juncà J, Acebedo G, Domingo A, Rozman M, Torres JP, Tormo M, Nomdedéu JF. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3-internal tandem duplication. *Haematologica* 2003; 88: 637-645.
277. Muñoz L, Nomdedéu JF, Villamor N, Guardia R, Colomer D, Ribera JM, Torres JP, Berlanga JJ, Fernández C, Llorente A, Queipo de Llano MP, Sánchez JM, Brunet S, Sierra J. Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia* 2003; 17: 76-82.
278. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-1918.
279. Nanri T, Matsuno N, Kawakita T, Suzushima H, Kawano F, Mitsuya H, Asou N. Mutations in the receptor tyrosine kinase pathway are associated with clinical outcome in patients with acute myeloblastic leukemia harboring t(8;21)(q22;q22). *Leukemia* 2005; 19: 1361-1366.

280. Neale GAM, Coustan-Smith e, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui C-H, Campana D. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 934-938.
281. Neubauer A, Maharry K, Mrózek K, Thiede C, Marcucci G, Paschka P, Mayer RJ, Larson RA, Liu ET, Bloomfield CD. Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4603-4609.
282. Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, Thomas X, Rigal-Huguet F, Lioure B, Auvrignon A, Fièrè D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Socié G, Dombret H. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloide leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2002; 99: 3517-3523.
283. Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, Boissel N, Renneville A, Philippe N, Dombret H, Dreyfus F, Quesnel B, Geffroy S, Quentin S, Roche-Lestienne C, Cayuela JM, Roumier C, Fenaux P, Vainchenker W, Bernard OA, Soulier J, Fontenay M, Preudhomme C. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood* 2010; 116: 1132-1135.
284. Nomdedéu J, Bussaglia E, Villamor N, Martínez C, Esteve J, Tormo M, Estivill C, Queipo MP, Guardia R, Carricondo M, Hoyos M, Llorente A, Juncà J, Gallart M, Domingo A, Bargay J, Mascaró M, Moraleta JM, Florensa L, Ribera JM, Gallardo D, Brunet S, Aventín A, Sierra J; on behalf of the Spanish CETLAM. Immunophenotype of acute myeloid leukemia with NPM mutations: Prognostic impact of the leukemic compartment size. *Leuk Res* 2011; 35: 163-168.

285. Nowakowska-Kopera A, Sacha T, Florek I, Zawada M, Czekalska S, Skotnicki AB. Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1326-1332.
286. Nucifora G, Birn DJ, Erickson P, Gao J, LeBeau MM, Drabkin HA, Rowley JD. Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci and of an AML1/ETO fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood* 1993; 81: 883-888.
287. Oelschlaegel U, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Kroschinsky F, Illmer T, Ehninger G, Thiede C. HLA-DRneg patients without acute promyelocytic leukemia show distinct immunophenotypic, genetic, molecular, and cytomorphologic characteristics compared to acute promyelocytic leukemia. *Cytometry* 2009; 76B: 321-327.
288. Offman J, Gascoigne K, Bristow F, Macpherson P, Bignami M, Casorelli I, Leone G, Pagano L, Sica S, Halil O, Cummins D, Banner NR, Karran P. Repeated sequences in CASPASE-5 and FANCD2 but not NF1 are targets for mutation in microsatellite-unstable acute leukemia/myelodysplastic syndrome. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 251-260.
289. Ogata K, Nakamura K, Yokose N, Tamura H, Tachibana M, Taniguchi O, Iwakiri R, Hayashi T, Sakamaki H, Murai Y, Tohyama K, Tomoyasu S, Nonaka Y, Mori M, Dan K, Yoshida Y. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002; 100: 3887-3896.
290. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, Kim EH, Hosen N, Murakami M, Fujioka T, Masuda T, Taniguchi Y, Nishida S, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction

- and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003; 101: 1698-1704.
291. Okumura AJ, Peterson LF, Okumura F, Boyapati A, Zhang DE. t(8;21)(q22;q22) fusion proteins preferentially bind to duplicated ARM1/RUNX1 DNA-binding sequences to differentially regulate gene expression. *Blood* 2008; 112: 1392-1401.
292. Olipitz W, Hopfinger G, Aguiar RC, Gunsilius E, Girschikofsky M, Bodner C, Hiden K, Linkesch W, Hoefler G, Sill H. Defective DNA-mismatch repair: a potential mediator of leukemogenic susceptibility in therapy-related myelodysplasia and leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34: 243-248.
293. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, Ommen IB, Hasle H, Østergaard M, Grimwade D, Hokland P. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFβ-MYH11 acute myeloid leukemias. *Blood* 2010; 115: 198-205.
294. Orfao A, Chillón MC, Bortolucci AM, López-Berges MC, García-Sanz R, González M, Tabernero MD, García-Marcos MA, Rasillo AI, Hernández-Rivas J, San Miguel JF. The flow cytometry pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukaemia is highly characteristic of the presence of PML/RAR α gene rearrangements. *Haematologica* 1999; 84: 405-412.
295. Osato M, Asou N, Okubo T, Nishimura S, Yamasaki H, Era T, Suzushima H, Kawano F, Matsuoka R, Oka H, Bae SC, Ito Y, Takatsuki K. Myelomonoblastic leukaemia cells carrying the PEBP2beta/MYH11 fusion gene are CD34, c-KIT+ immature cells. *Br J Haematol* 1997; 97: 656-658.
296. Østergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of

- acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol* 2004; 125: 590-600.
297. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia – a review. *Br J Haematol* 2008; 140: 123-132.
298. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med* 2001; 7: 444-451.
299. Pabst T, Mueller BU. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* 2007; 26: 6829-6837.
300. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. Somatic CEBPA mutations are frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5088-5093.
301. Pabst T, Mueller BU. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5303-5307.
302. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer* 2009; 100: 1343-1346.
303. Paietta E, Wiernik PH, Andersen J, Bennett J, Yunis J. Acute myeloid leukemia M4 with inv(16) (p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 1993; 82: 2595.
304. Paietta E, Andersen J, Gallagher R, Bennett J, Yunis J, Cassileth P, Rowe J, Wiernik PH. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia* 1994; 8: 1108-1112.
305. Paietta E, Andersen J, Yunis J, Rowe JM, Cassileth PA, Tallman MS, Bennett JM, Wiernik PH. Acute myeloid leukaemia expressing the leucocyte integrin

- CD11b-a new leukaemic syndrome with poor prognosis: result of an ECOG database analysis. Eastern Cooperative Oncology Group. *Br J Haematol* 1998; 100:265-272.
306. Pallisgaard N, Clausen N, Schroder H, Hokland P. Rapid and sensitive minimal residual disease detection in acute leukemia by quantitative real-time RT-PCR exemplified by t(12;21) TEL-AML1 fusion transcript. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 355-365.
307. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, Mellert G, Hiddemann W, Spiekermann K. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol* 2009; 144: 517-523.
308. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5431-5436.
309. Parsons R, Li GM, Longley M, Modrich P, Liu B, Berk T, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* 1995; 268: 738-740.
310. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman JW, Carroll AJ, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukaemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3904-3911.
311. Paschka P. Core binding factor acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008; 35: 410-417.
312. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, Langer C, Baldus CD, Zhao W, Powell BL, Baer MR, Carroll AJ, Caligiuri MA, Kolitz

- JE, Larson RA, Bloomfield CD. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4595-4602.
313. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campbell K, Iervolino A, Condorelli F, Gambacorti-Passerini C, Caligiuri MA, Calabretta B. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 2002; 30: 48-58.
314. Perucho M. Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58: 5248-5257, 1998. *Cancer Res* 1999; 59: 249-256.
315. Perucho M. Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene* 2003; 22: 2223-2235.
316. Peterson LF, Yan M, Zhang DE. The p21Waf1 pathway is involved in blocking leukemogenesis by the t(8;21) fusion protein AML1-ETO. *Blood* 2007; 109: 4392-4398.
317. Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Ho PA, Zeng R, Ravindranath Y, Dahl G, Lacayo NJ, Becton D, Chang M, Weinstein HJ, Hirsch B, Raimondi SC, Heerema NA, Woods WG, Lange BJ, Hurwitz C, Arceci RJ, Radich JP, Bernstein ID, Heinrich MC, Meshinchi S. Prevalence and prognostic significance of KIT mutations in pediatric patients with core binding factor AML enrolled on serial pediatric cooperative trials for de novo AML. *Blood* 2010;115: 2372-2379.
318. Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, Ciolli S, Guglielmelli P, Antonioli E, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. The size of duplication does not add

- to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 2074-2076.
319. Preudhomme C, Philippe N, Macintyre E, Henic N, Lai JL, Jouet JP, Cosson A, Fenaux P. Persistence of AML1/ETO fusion mRNA in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) in prolonged remission: is there a consensus? *Leukemia* 1996; 10: 186-188.
320. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, Thomas X, Raffoux E, Lamandin C, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H; ALFA Group. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002; 100: 2717-2723.
321. Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ, Lister TA, Young BD. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 2005; 65: 375-378.
322. Raspadori D, Damiani D, Lenoci M, Rondelli D, Testoni N, Nardi G, Sestigiani C, Mariotti C, Birtolo S, Tozzi M, Lauria F. CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia* 2001; 15: 1161-1164.
323. Rausei-Mills V, Chang KL, Gaal KK, Weiss LM, Huang Q. Aberrant expression of CD7 in myeloblasts is highly associated with de novo acute myeloid leukemias with FLT3/ITD mutation. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 624-629.
324. Ravandi F, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 340-344.
325. Reese JS, Liu L, Gerson SL. Repopulating defect of mismatch repair-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 102: 1626-1633.

326. Reindl C, Bagringtseva K, Vempati S, Schnittger S, Ellwart JW, Wenig K, Hopfner KP, Hiddemann W, Spiekermann K. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 2006; 107: 3700-3707.
327. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 22: 915-931.
328. Renneville A, Boissel N, Gachard N, Naguib D, Bastard C, de Botton S, Nibourel O, Pautas C, Reman O, Thomas X, Gardin C, Terré C, Castaigne S, Preudhomme C, Dombret H. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication. *Blood* 2009; 113: 5090-5093.
329. Repp R, Schaekel U, Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U, Wandt H, Aulitzky W, Bodenstein H, Sonnen R, Link H, Ehninger G, Gramatzki M, AML-SHG Study Group. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry* 2003; 53B: 11-19.
330. Richards B, Zhang H, Phear G, Meuth M. Conditional mutator phenotypes in hMSH2-deficient tumor cell lines. *Science* 1997; 277: 1523-1526. Erratum in: *Science* 1999; 283: 641.
331. Rimsza LM, Kopecky KJ, Ruschulte J, Chen IM, Slovak ML, Karanes C, Godwin J, List A, Willman CL. Microsatellite instability is not a defining genetic feature of acute myeloid leukemogenesis in adults: results of a retrospective study of 132 patients and review of the literature. *Leukemia* 2000; 14: 1044-1051.

332. Röhrs S, Scherr M, Romani J, Zaborski M, Drexler HG, Quentmeier H. CD7 in acute myeloid leukemia: correlation with loss of wild-type *CEBPA*, consequence of epigenetic regulation. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 15.
333. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature reviews* 2007; 7:105-117.
334. Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Experimental Hematology* 2005; 33: 131-143.
335. Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 74-82.
336. Rucker FG, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka DB, Wessendorf S, Fröhling S, Bentz M, Miller S, Scholl C, Schlenk RF, Radlwimmer B, Kestler HA, Pollack JR, Lichter P, Döhner K, Döhner H. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3887-3894.
337. Ryan DH, Van Dongen JJM: Detection of residual disease in acute leukemia using immunological markers, in Bennett JM, Foon KA (eds.): *Immunologic Approaches to the Classification and Management of Lymphomas and Leukemias*. Norwell, MA, Kluwer Academic, 1988; p 173.
338. Ryan J, Quinn F, Meunier A, Boublikova L, Crampe M, Tewari P, O'Marcaigh A, Stallings R, Neat M, O'Meara A, Breatnach F, McCann S, Browne P, Smith O, Lawler M. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time-points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *Br J Haematol* 2009; 144: 107-115.

339. Sánchez I, San Miguel JF, Corral J, Martín C, Pérez R, González M, Cañizo MC, Orfao A, González-Sarmiento R. Gene rearrangement in acute non-lymphoblastic leukaemia: correlation with morphological and immunophenotypic characteristics of blast cells. *Br J Haematol* 1995; 89: 104-109.
340. San Miguel JF, Ojeda E, González M, Orfao A, Cañizo MC, Sanchez J, Lopez-Borrasca A. Prognostic value of immunological markers in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1989; 3: 108-111.
341. San Miguel JF, Martínez A, Macedo A, Vidriales MB, López-Berges C, González M, Caballero D, García-Marcos MA, Ramos F, Fernández-Calvo J, Calmuntia MJ, Díaz-Mediavilla J, Orfao A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukaemia patients. *Blood* 1997; 90: 2465-2470.
342. San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges MC, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Pérez JJ, González M, Orfao A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to , postinduction treatment stratification. *Blood* 2001; 98: 1746-1751.
343. Sanz MA. Leucemia mieloblástica aguda. Prous Science, Barcelona, 2001.
344. Sanz MA, Sierra J. Leucemia mieloide aguda. En *Hematología*. JF San Miguel, J Sierra, A Urbano-Ispizua, V Vicente, JL Vives. Eds. Arán Ediciones, Madrid 2003; 1007-1028.
345. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, Lo Coco F. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2009; 113: 1875-1891.

346. Satake N, Maseki N, Kozu T, Sakashita A, Kobayashi H, Sakurai M, Ohki M, Kaneko Y. Disappearance of AML1-MTG8(ETO) fusion transcript in acute myeloid leukaemia patients with t(8;21) in long-term remission. *Br J Haematol* 1995; 91: 892-898.
347. Satoh C, Tamura H, Yamashita T, Tsuji T, Dan K, Osaka K. Aggressive characteristics of myeloblasts expressing CD7 in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2009; 33: 326-331.
348. Saunders MJ, Tobal K, Yin JA. Detection of t(8;21) by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients in remission of acute myeloid leukaemia type M2 after chemotherapy or bone marrow transplantation. *Leuk Res* 1994; 18: 891-895.
349. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, Griffith D, Lee FY, Bokemeyer C, Deininger MW, Druker BJ, Heinrich MC. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res* 2006; 66: 473-481.
350. Schittenhelm MM, Yee KW, Tyner JW, McGreevey L, Haley AD, Town A, Griffith DJ, Bainbridge T, Brazier RM, O'Farrell AM, Cherrington JM, Heinrich MC. FLT3 K663Q is a novel AML-associated oncogenic kinase: Determination of biochemical properties and sensitivity to Sunitinib (SU11248). *Leukemia* 2006; 20: 2008-2014.
351. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, Büchner T, Sauerland C, Ehninger G, Schaich M, Mohr B, Niederwieser D, Krahl R, Pasold R, Döhner K, Ganser A, Döhner H, Heil G. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3741-3750.

352. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H for the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-1918.
353. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W, Griesinger F. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14: 796-804.
354. Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Büchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59-66.
355. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003; 102: 2746-2755.
356. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favourable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733-3739.
357. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, Schoch C. *KIT*-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with imparid event-free and overall survival. *Blood* 2006; 107: 1791-1799.

358. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Rare CBFβ-MYH11 fusion transcripts in AML with inv(16)/t(16;16) are associated with therapy-related AML M4eo, atypical cytomorphology, atypical immunophenotype, atypical additional chromosomal rearrangements and low white blood cell count: a study on 162 patients. *Leukemia* 2007; 21: 725-731.
359. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, Haferlach C, Haferlach T. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood* 2009; 114: 2220-2231.
360. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddeman W, Haferlach T. AML with 11q23/*MLL* abnormalities as defined by the WHO-classification: incidence, partner chromosomes, FAB-subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML. *Blood* 2003; 102: 2395-2402.
361. Schwarzingler I, Valent P, Koller U, Marosi C, Schneider B, Haas O, Knapp W, Lechner K, Bettelheim P. Prognostic significance of surface marker expression on blasts of patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 423-430.
362. Seedhouse CH, Das-Gupta EP, Russell NH. Methylation of the hMLH1 promoter and its association with microsatellite instability in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003; 17: 83-88.
363. Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, Kantarjian HM, Estey E. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* 2009; 113: 28-36.

364. Serrano E, Carnicer MJ, Orantes V, Estivill C, Lasa A, Brunet S, Aventín AM, Sierra J, Nomdedéu JF. Uniparental disomy may be associated with microsatellite instability in acute myeloid leukemia (AML) with a normal karyotype. *Leuk Lymph* 2008; 49: 1178-1183.
365. Seymour JF, Pierce SA, Kantarjian HM, Keating MJ, Estey EH. Investigation of karyotypic, morphologic and clinical features in patients with acute myeloid leukemia blast cells expressing the neural cell adhesion molecule (CD56). *Leukemia* 1994; 8: 823-826.
366. Sheikha MH, Tobal K, Liu Yin JA. High level of microsatellite instability but not hypermethylation of mismatch repair genes in therapy-related and secondary acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2002; 117: 359-365.
367. Shih LY, Liang DC, Huang CF, Chang YT, Lai CL, Lin TH, Yang CP, Hung IJ, Liu HC, Jaing TH, Wang LY, Yeh TC. Cooperating mutations of receptor tyrosine kinases and Ras genes in childhood core-binding factor acute myeloid leukemia and a comparative analysis on paired diagnosis and relapse samples. *Leukemia* 2008; 22: 303-307.
368. Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. KIT mutations, and not FLT3 internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 2006; 107: 1806-809.
369. Shook D, Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Campana D. Minimal residual disease quantitation in acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9 Suppl 3:S281-S285.

370. Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Löwenberg B, Dombret H, Karanes C, Theobald M, Bennett JM, Sherman ML, Berger MS, Eten CB, Loken MR, van Dongen JJ, Bernstein ID, Appelbaum FR; Mylotarg Study Group. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3244-3254.
371. Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, Gerbing RB, Bernstein ID, Smith FO, Arceci RJ, Woods WG, Loken MR. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group Study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; 101: 3398-3406.
372. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96: 4075-4083.
373. Slovak ML, Gundacker H, Bloomfield CD, Dewald G, Appelbaum FR, Larson RA, Tallman MS, Bennett JM, Stirewalt DL, Meshinchi S, Willman CL, Ravindranath Y, Alonzo TA, Carroll AJ, Raimondi SC, Heerema NA. A retrospective study of 69 patients with t(6;9)(p23;q34) AML emphasizes the need for a prospective, multicenter initiative for rare 'poor prognosis' myeloid malignancies. *Leukemia* 2006; 20: 1295-1297.
374. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Eng J Med* 2004; 351: 2403-2407.
375. Solary E, Casasnovas RO, Campos L, Bene MC, Faure G, Maingon P, Falkenrodt A, Lenormand B, Genetet N. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: Correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR- phenotypes

- with shorter survival. Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL). *Leukemia* 1992; 6: 393-399.
376. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufirin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gerwitz M, Maris JM, Gilliland DG. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature Genetics* 1999; 23: 166-175.
377. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 502-513.
378. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Blersch C, Kuhn S, Schauer S, Döhner H, Döhner K. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011 May 3 (en prensa).
379. Stein C, Kellner C, Kügler M, Reiff N, Mentz K, Schwenkert M, Stockmeyer B, Mackensen A, Fey GH. Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol* 2010; 148: 879-889.
380. Stentoft J, Hokland P, Ostergaard M, Hasle H, Nyvold CG. Minimal residual core binding factor AMLs by real time quantitative PCR--initial response to chemotherapy predicts event free survival and close monitoring of peripheral blood unravels the kinetics of relapse. *Leuk Res* 2006; 30: 389-395.
381. Stirewalt DL, Meshinchi S, Kussick SJ, Sheets KM, Pogossova-Agadjanyan E, Willman CL, Radich JP. Novel *FLT3* point mutations within exon 14 found in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004; 124: 481-484.
382. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. Size of FLT3 internal

- tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107: 3724-3726.
383. Summers K, Stevens J, Kakkas I, Smith M, Smith LL, Macdougall F, Cavenagh J, Bonnet D, Young BD, Lister TA, Fitzgibbon J. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia* 2007; 21: 550-551.
384. Suzuki R, Yamamoto K, Seto M, Kagami Y, Ogura M, Yatabe Y, Suchi T, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Saito H, Ueda R, Nakamura S. CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia: a distinct hematolymphoid disease entity. *Blood* 1997; 90: 2417-2428.
385. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
386. Syampurnawati M, Tatsumi E, Ardianto B, Takenokuchi M, Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S, Saigo K, Matsui T, Takahashi T, Nagai K, Gunadi, Nishio H, Yabe K, Kondo S, Hayashi Y. DR negativity is a distinctive feature of M1/M2 AML cases with *NPM1* mutation. *Leuk Res* 2008; 32: 1141-1143.
387. Tang JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, Huang CF, Lee FY, Liu MC, Yao M, Huang SY, Ko BS, Hsu SC, Wu SJ, Tsay W, Chen YC, Lin LI, Tien HF. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 2009; 114: 5352-5361.
388. Tasaka T, Lee S, Spira S, Takeuchi S, Nagai M, Takahara J, Koeffler HP. Microsatellite instability during the progression of acute myelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 98: 219-221.

389. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia* 1990; 4: 657-663.
390. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99: 4326-4335.
391. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, Ehninger G. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107: 4011-4020.
392. Thol F, Damm F, Wagner K, Göhring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, Lübbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar A, Fiedler W, Kirchner H, Heil G, Heuser M, Krauter J, Ganser A. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 116: 614-616.
393. Tien HF, Wang CH, Lin MT, Lee MY, Liu MC, Chuang SM, Chen YC, Shen MC, Lin KH, Lin DT. Correlation of cytogenetic results with immunophenotype, genotype, clinical features, and ras mutation in acute myeloid leukemia. A study of 235 Chinese patients in Taiwan. *Cancer Genet Cytogen* 1995; 84: 60-68.
394. Tien HF, Chou CC, Wang CH, Chang CH, Hsing CC. Putative normal counterparts of leukaemic cells from CD7-positive acute myeloid leukaemia can be demonstrated in human haemopoietic tissues. *Br J Haematol* 1996; 94: 501-506.
395. Tobal K, Saunders MJ, Grey MR, Yin JA. Persistence of RAR alpha-PML fusion mRNA detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients in long-term remission of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 90: 615-618.

396. Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PAS, Morgan G, Lucas GS, Liu Yin JA. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 2000; 95: 815-819.
397. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 2823-2829.
398. Tucker J, Dorey E, Gregory WM, Simpson AP, Amess JA, Lister TA, Horton MA. Immunophenotype of blast cells in acute myeloid leukemia may be a useful predictive factor for outcome. *Hematol Oncol* 1990; 8: 47-58.
399. Uckun FM, Steinherz PG, Sather H, Trigg M, Arthur D, Tubergen D, Gaynon P, Reaman G. CD2 antigen expression on leukemic cells as a predictor of event-free survival after chemotherapy for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* 1996; 88: 4288-4295.
400. Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, Beverloo HB, Moorhouse MJ, van der Spek PJ, Löwenberg B, Delwel R. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1617-1628.
401. Van der Reijden BA, Simons A, Luiten E, van der Poel SC, Hogenbirk PE, Tönnissen E, Valk PJ, Löwenberg B, De Greef GE, Breuning MH, Jansen JH. Minimal residual disease quantification in patients with acute myeloid leukemia and inv(16)/CBFB/MYH11 gene fusion. *Br J Hematol* 2002; 118: 411-418.
402. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action:

- investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1901-1928.
403. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox-Froncillo MC, Aronica G, Bruno A, Del Moro B, Epiceno AM, Battaglia A, Forte L, Postorino M, Cordero V, Santinelli S, Amadori S. Prognostic relevance of the expression of Tdt and CD7 in 335 cases of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1056-1063.
404. Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, Battaglia A, Catalano G, Del Moro B, Cudillo L, Postorino M, Masi M, Amadori S. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3948-3952.
405. Venditti A, Maurillo L, Buccisano F, Del Poeta G, Mazzone C, Tamburini A, Del Principe MI, Consalvo MI, De Fabritiis P, Cudillo L, Picardi A, Franchi A, Lo-Coco F, Amadori S. Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 2003; 17: 2178-2182. Erratum in: *Leukemia* 2004;18: 373.
406. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106: 3747-3754.
407. Verhaak RG, Wouters BJ, Erpelinck CA, Abbas S, Beverloo HB, Lugthart S, Löwenberg B, Delwel R, Valk PJ. Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*. 2009; 94: 131-134.
408. Viehmann S, Teigler-Schlegel A, Bruch J, Langebrake C, Reinhardt D, Harbott J. Monitoring of minimal residual disease (MRD) by real-time quantitative

- reverse transcription PCR (RQ-RT-PCR) in childhood acute myeloid leukemia with AML1/ETO rearrangement. *Leukemia* 2003; 17: 1130-1136.
409. Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, Allen C, Green C, Quentmeier H, Drexler H, Burnett A, Linch D, Bonnet D, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5429-5435.
410. Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM, Yuan B, Lemon WJ, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de La Chapelle A, Krahe R. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1124-1129.
411. Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 62: 25-38.
412. Wada C, Shionoya S, Fujino Y, Tokuhiko H, Akahoshi T, Uchida T, Ohtani H. Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 83: 3449-3456.
413. Wagner K, Damm F, Göhring G, Görlich K, Heuser M, Schäfer I, Ottmann O, Lübbert M, Heit W, Kanz L, Schlimok G, Raghavachar AA, Fiedler W, Kirchner HH, Brugger W, Zucknick M, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Krauter J. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2356-2364.

414. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, Dpersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ, Graubert TA. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic síndromes. *Leukemia* 2011, Mar 18 (en prensa).
415. Ward CW, Dale DC. Genetic and molecular diagnosis of severe congenital neutropenia. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 9-13.
416. Webber BA, Cushing MM, Li S. Prognostic significance of flow cytometric immunophenotyping in acute myeloid leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1: 124-133.
417. Weisser M, Haferlach C, Hiddemann W, Schnittger S. The quality of molecular response to chemotherapy is predictive for the outcome of AML1-ETO-positive AML and is independent of pretreatment risk factors. *Leukemia* 2007; 21: 1177-1182.
418. Westervelt P, Lane AA, Pollock JL, Oldfather K, Holt MS, Zimonjic DB, Popescu NC, DiPersio JF, Ley TJ. High-penetrance mouse model of acute promyelocytic leukemia with very low levels of PML-RARalpha expression. *Blood* 2003; 102: 1857-1865.
419. Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Hann IM, Harrison CJ, Rees JKH, Stevens RF, Walker H. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. *Br J Haematol* 1999; 107; 69-79.
420. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult *de novo* acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem

- duplication of *FLT3*: a Cancer and Leukemia Group B study. *Cancer Res* 2001; 61: 7233-7239.
421. Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, Rush LJ, Yu L, Liu C, Klisovic MI, Maharry K, Guimond M, Strout MP, Becknell B, Dorrance A, Klisovic RB, Plass C, Bloomfield CD, Marcucci G, Caligiuri MA. The *MLL* partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood* 2005; 106: 345-352.
422. Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Vukosavljevic T, Powell BL, Carroll AJ, Koltz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and *MLL* partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2007; 109: 5164-5167.
423. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL, Koltz JE, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. *FLT3* D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking *FLT3* internal tandem duplications. *Blood* 2008; 111: 1552-1559.
424. Whitman SP, Hackanson B, Liyanarachchi S, Liu S, Rush LJ, Maharry D, Margeson D, Davuluri R, Wen J, Witte T, Liu C, Bloomfield CD, Marcucci G, Plass C, Caligiuri MA. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, *SLC5A8*, in acute myeloid leukemia with the *MLL* partial tandem duplication. *Blood* 2008 (2); 112: 2013-2016.
425. Wolman SR, Gundacker H, Appelbaum FR, Slovak ML; Southwest Oncology Group. Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and

- survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2002; 100: 29-35.
426. Worrillow LJ, Allan JM. Deregulation of homologous recombination DNA repair in alkylating agent-treated stem cell clones: a possible role in the aetiology of chemotherapy-induced leukaemia. *Oncogene* 2006; 25: 1709-1720.
427. Wouters BJ, Jordà MA, Keeshan K, Louwers I, Erpelinck-Verschueren CAJ, Tielemans D, Langerak AW, He Y, Yashiro-Ohtani Y, Zhang P, Hetherington CJ, Verhaak RGW, Valk PJM, Löwenberg B, Tenen DG, Pear WS, Delwel R. Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced *CEBPA* and mutations in *NOTCH1*. *Blood* 2007; 110: 3706-3714.
428. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double *CEBPA* mutations, but not single *CEBPA* mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113: 3088-3091.
429. Wouters BJ, Löwenberg B, Delwel R. A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects. *Blood* 2009 (2); 113: 1552-1559.
430. Xu Y, McKenna RW, Wilson KS, Kaandikar NJ, Schultz RA, Kroft SH. Immunophenotypic identification of acute myeloid leukemia with monocytic differentiation. *Leukemia* 2006; 20: 1321-1324.
431. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kadera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of *FLT3* in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97: 2434-2439.

432. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, Zhu YM, Tang L, Zhang XW, Liang WX, Mi JQ, Song HD, Li KQ, Chen Z, Chen SJ. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 43:309-15.
433. Yang DH, Lee JJ, Mun YC, Shin HJ, Kim YK, Cho SH, Chung IJ, Seong CM, Kim HJ. Predictable prognostic factor of CD56 expression in patients with acute myeloid leukemia with t(8;21) after high dose cytarabine or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2007; 82: 1-5.
434. Yoo SJ, Chi HS, Jang S, Seo EJ, Seo JJ, Lee JH, Park HS, Park CJ. Quantification of AML1-ETO fusion transcript as a prognostic indicator in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005; 90: 1493-1501.
435. Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, Hiebert SW, Tenen DG. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1231-1240.
436. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 2002; 21: 3295-3313.
437. Zhu X, Ma Y, Liu D. Novel agents and regimens for acute myeloid leukemia: 2009 ASH annual meeting highlights. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 17.
438. Zhu YM, Das-Gupta EP, Russell NH. Microsatellite instability and p53 mutations are associated with abnormal expression of the MSH2 gene in adult acute leukemia. *Blood* 1999; 94: 733-740.
439. Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature* 2008; 453: 306-313.

