



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

TESI DOCTORAL

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

**Caracterització i valor pronòstic de l'estudi
citogenètic de les leucèmies mieloides agudes
incloses en protocols CETLAM.**

Tesi doctoral presentada per Neus Ruiz Xivillé per optar al títol de
Doctora.

Directors: Josep Maria Ribera Santasusana
Isabel Granada Font

Tutor: Josep Maria Ribera Santasusana

Badalona, 2022.

Als meus pares i a en Dani.

AGRAÏMENTS

Per fi, després de molt temps i esforç, he acabat la Tesi. Aquestes dues pàgines són per donar les gràcies. Perquè aquest gran esforç no ha estat només meu. Molta gent ha fet possible que avui estigui aquí, amb aquest treball acabat i tancant una etapa professional i personal molt important per mi.

En primer lloc, agrair als directors de la Tesi, el Dr. Josep Maria Ribera i la Dra. Isabel Granada, la seva paciència infinita i la seva fe en aquest projecte. Gràcies pels consells, les correccions i la bona predisposició que sempre heu tingut amb mi quan he trucat a la vostra porta.

No em puc oblidar la Dra. Salut Brunet i el Dr. Jorge Sierra, promotors dels estudis de CETLAM, que m'han donat l'oportunitat de treballar amb unes dades tan preuades i que m'han orientat en el seguiment d'aquest treball.

I també un especial agraïment a la Dra. Fuensanta Millá, al Dr. Jordi Juncà i al Dr. Evarist Feliu que amb els seus coneixements i saber fer m'han ajudat a créixer professionalment.

I ara perdoneu que deixi els formalismes i doni les gràcies als meus companys i amics de l'hospital.

Als companys i amics de Clínica: Juanma, Blanca, Susana, Christelle, Montse, Albert, Míriam, Anna i un llarg etcètera. Gràcies per ser accessibles sempre.

A la Mireia, no només per l'anàlisi estadística, també per la seva meticulositat, les seves explicacions i la seva paciència amb la meua ignorància estadística. Gràcies i més gràcies.

Als companys i amics del Laboratori: Tomás, Inés, Marc, Elisa, Alba, Mariana, Mery, Minerva, Sara, Marian... I tots els residents que aneu passant per aquí. Gràcies per fer-me confiança, pel que m'heu ensenyat cadascú de vosaltres i per fer més divertides les hores de dinar!

A les companyes i amigues de Molecular: Lurdes, Sílvia, Diana, Itzi, Pepe i Lluís. Gràcies per ajudar-me a entendre tots els intrínquils del món de la biologia molecular i, sobretot, per fer-me riure sempre que vinc pel vostre laboratori.

A la Marta, que no sabia si posar aquí o amb la família o amb les amigues de la infància. Perquè la veritat és que ha estat a tot arreu. Un model a seguir, que m'ha acompanyat

durant aquest treball però que, sobretot, he tingut al costat sempre que he necessitat. Gràcies.

A les companyes i amigues de Citogenètica: Carmen, Nani, Aleix, Marisol i Javier, gràcies per la vostra companyonia, per donar-me ànims sempre que ho he necessitat i per fer que mai sigui avorrit venir a treballar. I un especial gràcies a l'Adela, no pas només pels teus coneixements en citogenètica no hematològica, sinó per la teva complicitat i amistat.

I a la Isabel, ara no com a directora de la Tesi, sinó com a responsable de Citogenètica. Gràcies per ensenyar-me tot el que sé sobre cromosomes, per animar-me a créixer i avançar professionalment, per les oportunitats que m'has donat i per la confiança.

En un pla més personal, també haig de donar gràcies a l'Anna, la meva millor amiga des de no recordo quan. La seva positivitat, empena i suport m'han ajudat sempre. Però sobretot gràcies per saber que sempre podré comptar amb la teva amistat.

Finalment, un sentit agraïment a la meva família. Als avis, àvies, tiet i tieta, que tot i veure'ns poc, sempre esteu allà, seguint les nostres vides atents i carinyosos. Als cunyats Jordi i Xavi i als meus nebots, que sempre us heu interessat per mi, fent-me sentir valorada i important a casa vostra. A la meva germana Núria i al Ricard que, tot i estar farts de sentir parlar d'aquesta "història interminable", heu seguit escoltant-me i aconsellant-me fins al final. Però sobretot gràcies per ser-hi; per poder compartir-ho tot, sempre. Als meus pares, a qui els ho dec tot. M'heu ensenyat que les coses importants requereixen un esforç i que l'esforç es veu recompensat. Gràcies papa i mama, us estimo moltíssim.

I per últim a en Dani i a les meves dues joies, la Núria i la Laia. Dani, has aguantat el que no està escrit durant l'última etapa d'aquest treball, però sobretot m'has donat el suport emocional per tirar-ho endavant. També gràcies a tu tinc el que més estimo d'aquest món, les meves dues nenes. Sou l'alegria de la meva vida, sou la meva vida. Us estimo amb bogeria.

A tots, GRÀCIES.

GLOSSARI

ADAC: Dosis altes de Citarabina

ADN: àcid desoxiribonucleic

Alo-TPH: trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics

Alo-DE: trasplantament al·logènic de donant emparentat

Alo-DNE: trasplantament al·logènic de donant no emparentat

Auto-TPH: trasplantament autòleg de progenitors hematopoètics

CALGB: *Cancer and Leukemia Group B*

CBF: *complex core binding factor*

CETLAM: Grup Cooperatiu d'Estudi i Tractament de les Leucèmies Agudes i Mielodislàsies

CIR: incidència acumulada de recaiguda (*cumulative incidence of relapse*)

CK: cariotip complex

Cr: cromosoma

DFS: supervivència lliure de malaltia (*disease-free survival*)

ELN: *European Leukemia Net*

FAB: Grup Franc-Americà-Britànic

FISH: Hibridació *in situ* fluorescent (*fluorescence in-situ hybridization*)

GCECGH: *Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica*

G-CSF: factors estimulants de colònies granulocitàries

Hb: Hemoglobina

IDAC: dosi intermèdia de citarabina

IDICE: Idarubicina-dosi intermèdia de Citarabina-Etopòsid

ICE: Idarubicina-Citarabina-Etopòsid

ISCN: Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenètica Humana (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*)

ITD: duplicació interna en tàndem

LMA: leucèmia mieloide aguda

MK: cariotip monosòmic

MMR: malaltia mínima residual

MO: medul·la òssia

MRC: *United Kingdom Medical Research Council*

NGS: seqüenciació de nova generació (*Next Generation Sequencing*)

NK: cariotip normal

NMP: neoplàsies mieloproliferatives

NOS: sense cap altra especificació (*not otherwise specified*)

OMS: Organització Mundial de la Salut

OS: supervivència global (*overall survival*)

PCR: reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PHSP: progenitors hemopoètics en sang perifèrica

RC: remissió completa

SMD: síndromes mielodisplàsiques

SP: sang perifèrica

t-LMA: leucèmia mieloide aguda secundària a tractament

TPH: transplantament de progenitors hematopoètics

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1: Classificació de la FAB de les leucèmies mieloides agudes. FAB: grup Franco-Americà-Britànic; MPO: mieloperoxidasa; CD: <i>cluster of differentiation</i> ; HLA: antigen leucocitari humà.....	42
Taula 2: Classificació de la OMS (2017) de les leucèmies mieloides agudes.	43
Taula 3: Proposta de classificació genètica de la LMA (Papaemmanuil).	44
Taula 4: Alteracions citogenètiques recurrents en la LMA. Es mostren les associacions més freqüents amb algun tipus segons les classificacions FAB/OMS. (Font: Yang <i>et al.</i> , 2017). Incidències extretes de mateixa font més Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, MRC i CALGB.	49
Taula 5: Mutacions genètiques recurrents en LMA <i>de novo</i> en adults. (Font: Short, 2018) ...	57
Taula 6: Grups de risc citogenètic dels principals grups d'estudi de la LMA de l'adult. (Font: Grimwade, 2011)	63
Taula 7: Classificació pronòstica de la ELN 2017 (guies europees) i del NCCN (guies americanes Tallman <i>et al.</i> , 2019).....	65
Taula 8: Classificació pronòstica més recent de MRC (Grimwade <i>et al.</i> , 2016). Cytogenetic and molecular genetic abnormalities conferring independent prognostic information in younger adults with AML.....	66
Taula 9: Comparativa dels esquemes de tractament dels protocols CETLAM. * índex leucocitari = xifra de leucòcits en SP x (% blasts en MO/100).....	78
Taula 10: Característiques clíniques i biològiques dels 1417 pacients inclosos en l'estudi i distribució dels pacients segons el tipus de LMA i risc citogenètic. *percentatges sobre els casos analitzats i amb resultat valorable; **percentatges sobre els casos amb informació de citologia	100
Taula 11: Freqüència de totes les alteracions detectades distribuïda per cromosoma i per tipus. * Els percentatges estan calculats considerant com a denominador els cariotips valuables (N=1254).....	102
Taula 12: Freqüència de co-ocurrència de les diverses parelles d'alteracions analitzades i significació estadística.	109
Taula 13: Translocacions detectades i no descrites prèviament en LMA.	111
Taula 14: Taxa de remissió completa (RC) del casos amb cariotip normal (NK) segons biologia molecular.	112
Taula 15: Supervivència global (OS), supervivència lliure de malaltia (DFS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) del casos amb cariotip normal (NK) segons biologia molecular.	112
Taula 16: Freqüència de casos amb inv(16) o t(8;21) distribuïts segons el número d'alteracions acompanyants.	114
Taula 17: Taxa de remissió completa (RC) del casos amb inv(16) segons número d'anomalies acompanyants.	114
Taula 18: Taxa de remissió completa (RC) del casos amb t(8;21) segons número d'anomalies acompanyants.	114
Taula 19: Supervivència global (OS), supervivència lliure de malaltia (DFS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) del casos amb inv(16) segons número d'anomalies acompanyants.	114

Taula 20: Supervivència global (OS), supervivència lliure de malaltia (DFS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) del casos amb t(8;21) segons número d'anomalies acompanyants.	115
Taula 21: Mostra la taxa de remissió completa (RC) dels grups de pacients segons nombre d'anomalies cromosòmiques.	117
Taula 22: Mostra la supervivència global (OS), la supervivència lliure de malaltia (DFS) i la incidència acumulada de recaiguda (CIR) dels grups de pacients segons nombre d'anomalies cromosòmiques.	117
Taula 23: Mostra la taxa de remissió completa dels grups de pacients segons si tenen cariotip complex (CK) o cariotip monosòmic (MK).	117
Taula 24: Mostra la supervivència global (OS), la supervivència lliure de malaltia (DFS) i la incidència acumulada de recaiguda (CIR) dels grups de pacients segons si tenen cariotip complex (CK) o cariotip monosòmic (MK).	118
Taula 25: Distribució i freqüència de les anomalies citogenètiques de la sèrie de pacients exclosos els CBF, els CK i els MK. * Els percentatges estan calculats considerant com a denominador els cariotips avaluable (N=1254).	119
Taula 26: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la taxa de remissió completa (RC).	120
Taula 27: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la probabilitat de supervivència global (OS). ¹ Dades a 1 any; ² dades als 3 anys.	122
Taula 28: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la supervivència lliure de malaltia (DFS). ¹ Dades als 3 anys; ² dades als 2 anys.	124
Taula 29: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la incidència acumulada de recaiguda (CIR). ¹ Dades als 3 anys; ² dades als 2 anys	126
Taula 30: Factors amb significat pronòstic independent per la supervivència global (OS) resultants de l'anàlisi multivariant.	128
Taula 31: Característiques clíniques i biològiques dels 80 pacients amb translocacions 11q23 inclosos en l'estudi i distribució dels pacients segons el tipus de LMA. Comparativa amb les LMA de cariotip normal (NK).	130
Taula 32: Comparativa de les característiques clíniques i biològiques dels diversos tipus de translocacions 11q23.	131
Taula 33: Impacte de les reordenacions 11q23 sobre la supervivència global (OS), la durada de la remissió completa (CRD) i la supervivència lliure de malaltia (DFS) als 3 anys.	132
Taula 34: Impacte dels diversos tipus de translocacions 11q23 sobre la supervivència global (OS), la durada de la remissió completa (CRD) i la supervivència lliure de malaltia (DFS) als 3 anys.	132
Taula 35: Mostra la comparativa entre les tres classificacions pronòstiques per la taxa de remissió completa (RC), la supervivència global (OS) als 8 anys i la incidència acumulada de recaiguda (CIR) als 8 anys.	137
Taula 36: Comparativa entre diverses sèries de pacients de la freqüència de les alteracions citogenètiques recurrents reconegudes a la classificació de la OMS.	141
Taula 37: Descripció de les característiques que presenten els casos amb alteracions cromosòmiques significatives i no significatives en l'anàlisi univariant. *núm casos total que s'inclouen a l'univariant, només cert per OS. **leucocitosi desfavorable >50-100. (a) Citologia desfavorable: LMA eritroide, LMA megacariocítica i LMA amb displàsia	149

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1: Etiologia de la LMA. Factors endògens i exògens, generalment diversos i inespecífics, contribueixen al desenvolupament de la malaltia.	36
Figura 2: Model de cooperació entre alteracions genètiques associades amb l'aparició de la LMA (adaptat de Lagunas-Rangel <i>et al</i> , 2017).	37
Figura 3: "Diagrama circos" que mostra els esdeveniments genètics que contribueixen a la patogènesi de la LMA. S'han identificat nou categories funcionals de gens mutats. Les línies que connecten diferents categories gèniques reflecteixen les associacions entre mutacions en diferents vies, mentre que hi pot haver alteracions mútuament excloents entre les àrees que no estan connectades. Cada cas de LMA pot tenir diverses mutacions gèniques en diferents categories funcionals. PTP, proteïnes tirosina fosfatases; MLL PTD, duplicació parcial de tàndem de MLL. (Font: Chen <i>et al</i> , 2013).....	39
Figura 4: Factors a tenir en compte en el tractament de la LMA.	45
Figura 5: Recomanacions terapèutiques per la LMA a l'actualitat (adaptat de Daver, 2020). AHD: antecedent de malaltia hematològica; MRC: canvis relacionats amb mielodisplàsia; GO: gemtuzumab ozogamicina; FLAG-ida: fludarabina-AraC-filgastrim i idarubicina; CLIA: cladribina-idarubicina-AraC; CPX-351: combinació de daunorubicina i citarabina liposòmica.	46
Figura 6: Tractaments de la LMA dirigits segons les alteracions genètiques (adaptat de Ley et al, 2013).	48
Figura 7: Esquema de l'acció leucemogènica dels factors citogenètics i moleculars més coneguts en LMA (Font: Lagunas-Rangel <i>et al</i> , 2017)	48
Figura 8: Supervivència global de les quatre categories pronòstiques proposades per Breems <i>et al</i> . (Font: Breems et al, 2008).	53
Figura 9: A) Cariotip monosòmic no complex: 45,XY,del(6)(q21q25),-10[10]. B) Cariotip complex no monosòmic: 46,XY,t(4;5)(q25;q15),del(6)(p22),add(8)(q22),add(11)(q13),del(15)(q22q26),del(17)(q12), der(17)t(11;17)(q13;q21)[15]. C) Cariotip complex i monosòmic: 44,XX,-4,del(5)(q12q33),-18, ider(20)(q10)del(20)(q11.2),ins(21)(q11.2),del(22)(q13)[20].	54
Figura 10: Heterogeneïtat molecular de la LMA de NK. (Font: Döhner, 2010)	56
Figura 11: Vies de senyalització de FLT3 (Font: Swords <i>et al</i> , 2012).	59
Figura 12: Estructura de FLT3 (Font: Cuervo-Sierra <i>et al</i> , 2012).	59
Figura 13: Procediment tècnic per a l'obtenció de metafases i bandes G. (Font: Yanming Zhang)	81
Figura 14: Aparell HANABI PII de processament automàtic de mostres per a l'anàlisi citogenètica.	82
Figura 15: Flux de treball de l'equip HANABI PII.	82
Figura 16: Exemple d'equip de cerca i captura automàtica de metafases; i imatge de la pantalla on es mostra el rastreig i les metafases que es van capturant (Metafer, Metasystems Inc., Alemanya).	84
Figura 17: Exemple de software per al processament d'imatge i anàlisi del cariotip (Ikaros, Metasystems Inc., Alemanya).	85
Figura 18: Procediment tècnic de la FISH (adaptat de Yanming Zhang).	86

Figura 19: Exemple de software per al processament d'imatge i anàlisi de FISH (Metafer, Metasystems Inc., Alemanya).	87
Figura 20: Esquema del disseny de la sonda LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) per a les reordenacions de 11q23.	88
Figura 21: Esquema del disseny de la sonda LSI CFBF Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) per a la reordenació de 16q22.	88
Figura 22: Esquema del disseny de la sonda LSI PML/RARA Dual Color Dual Fusion Translocation Probe (Vysis) per a la t(15;17)(q24;q21).....	89
Figura 23: Gel d'agarosa on els quatre primers pous corresponen a pacients FLT3-ITD negatius, en el cinquè pou hi ha el control positiu (pacient FLT3-ITD+) i al sisè el control negatiu. El pou núm. 7 correspon al marcador de pes molecular.	90
Figura 24: A. Imatge d'un pacient WT per a l'estudi de les mutacions de NPM1. B. Imatge d'un pacient mutat.	91
Figura 25: Gràfic del número i distribució de les aneuploidies segons el cromosoma afectat.	103
Figura 26: Gràfic del número i distribució de les alteracions estructurals segons el cromosoma afectat.	104
Figura 27: Distribució de les alteracions numèriques dels diversos cromosomes en funció del grau de complexitat del cariotip. Els símbols + i - indiquen si es tracta d'una trisomia o d'una monosomia, respectivament.	106
Figura 28: Distribució de les alteracions estructurals dels diversos cromosomes en funció del grau de complexitat del cariotip.	107
Figura 29: Distribució de les alteracions estructurals recurrents en LMA en funció del grau de complexitat del cariotip.	107
Figura 30: Gràfiques de la supervivència global, la supervivència lliure de malaltia i la incidència acumulada de recaiguda dels pacients amb cariotip normal segons la biologia molecular.	113
Figura 31: Gràfiques de la supervivència global, la supervivència lliure de malaltia i la incidència acumulada de recaiguda dels pacients amb inv(16) segons el número d'anomalies acompanyants.	115
Figura 32: Gràfiques de la supervivència global, la supervivència lliure de malaltia i la incidència acumulada de recaiguda dels pacients amb t(8;21) segons el número d'anomalies acompanyants.	116
Figura 33: Probabilitat de supervivència global (OS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) pels tres grups de risc proposats per CETLAM.....	129
Figura 34: Gràfiques de la durada de la RC, la supervivència global i la supervivència lliure de malaltia de les diverses translocacions 11q23 i del cariotip normal.	133
Figura 35: Gràfiques de la durada de la RC, la supervivència global i la supervivència lliure de malaltia dels pacients amb t(9;11) i t(11;19) agrupats comparat amb la t(6;11) i el cariotip normal.....	134
Figura 36: Distribució dels pacients de la sèrie segons els sistemes de classificació MRC i CALGB.	135
Figura 37: Probabilitat de supervivència global (OS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR). Hi ha diferències estadísticament significatives entre els tres grups tant si són classificats segons MRC com per CALGB.....	136

ÍNDEX

RESUM & SUMMARY	27
RESUM.....	29
SUMMARY	30
1. INTRODUCCIÓ.....	33
1.1 LEUCÈMIA MIELOIDE AGUDA	35
1.1.1 Incidència, etiologia i patogènia.	35
1.1.2 Diagnòstic	40
1.1.3 Classificació	41
1.1.4 Tractament.....	45
1.2 GENÈTICA DE LA LMA.....	48
1.2.1 Alteracions citogenètiques	49
1.2.2 Alteracions moleculars.....	55
1.3 CLASSIFICACIÓ EN GRUPS DE RISC	61
1.3.1 Sistemes d'estratificació basats en la citogenètica	62
1.3.2 Sistemes d'estratificació que combinen alteracions citogenètiques i moleculars..	65
2. HIPÒTESI.....	68
3. OBJECTIUS	72
4. MATERIAL I MÈTODE	76
4.1 PACIENTS	78
4.2 MOSTRES	79
4.3 ANÀLISI CITOGÈNÈTICA	79
4.4 ANÀLISI MOLECULAR	89
4.5 ANÀLISI DELS RESULTATS I TRACTAMENT DE LES DADES	91
4.6 ANÀLISI ESTADÍSTICA I DEFINICIONS.....	92
5. RESULTATS	97
5.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DELS PACIENTS CETLAM.....	99
5.2 CARACTERÍSTIQUES DE LES ALTERACIONS CITOGÈNÈTIQUES	101
5.2.1 Alteracions cromosòmiques numèriques	103
5.2.2 Alteracions cromosòmiques estructurals	104
5.2.3 Alteracions cromosòmiques i complexitat.....	105
5.2.4 Co-ocurrència de les principals alteracions citogenètiques	108
5.2.5 Recurrència de les translocacions cromosòmiques.....	110
5.3 ANÀLISI DE SUPERVIVÈNCIA	111

5.3.1 Validació del NK com a grup de referència	111
5.3.2 Anàlisi del grup CBF	113
5.3.3 Definició de complexitat	116
5.3.4 Anàlisi del cariotip monosòmic	117
5.3.5 Impacte de les alteracions citogenètiques en la supervivència.....	118
5.3.6 Anàlisi multivariant.....	128
5.4 ESTUDI DE LES REORDENACIONS DEL GEN <i>KMT2A</i>	129
5.4.1 Característiques de la sèrie del pacients amb translocacions 11q23:	129
5.4.2 Anàlisi de supervivències de les translocacions 11q23:.....	131
5.5 VALIDACIÓ DELS SCORE MRC, CALGB I CETLAM	134
6. DISCUSSIÓ	139
7. CONCLUSIONS	161
8. LÍNIES DE FUTUR	167
9. BIBLIOGRAFIA	171
10. ANNEXES.....	187
Annexa 1. Participació dels hospitals en els protocols CETLAM.	189
Annexa 2. Taules per l'anàlisi de la complexitat en termes d'OR per a l'assoliment de la RC i de HR per a l'OS i la DFS.	190
Annexa 3. Taula per la validació dels sistemes d'estratificació MRC, CALGB i CETLAM en termes d'OR per a l'assoliment de la RC.	191
Annexa 4. Resultat de l'anàlisi multivariant per a la OS amb la xifra de leucòcits com a variable categòrica.	192
Annexa 5. Comunicació oral de l'estudi dels reordenaments del gen <i>KMT2A</i> al congrés nacional de la SEHH de 2016.	193

RESUM & SUMMARY

RESUM

Les leucèmies mieloides agudes (LMA) són un grup heterogeni de neoplàsies hematològiques amb diferents característiques clíniques i genètiques. Les alteracions citogenètiques de la LMA s'associen tant a característiques clíniques específiques com a la resposta al tractament; i defineixen els esquemes d'estratificació del risc en la LMA. Tanmateix, la importància pronòstica d'algunes anomalies citogenètiques recurrents segueix sent incerta. En aquest treball s'han analitzat les alteracions citogenètiques i el seu impacte sobre el pronòstic de 1417 pacients adults diagnosticats de LMA *de novo* (excloent LMA amb t(15;17) o reordenació PML-RARA) i inclosos en protocols CETLAM de quimioteràpia intensiva entre el 1994 i el 2012.

En l'anàlisi multivariant, la t(8;21)(q22;q22) i la inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) han estat les úniques anomalies que prediuen un pronòstic relativament favorable. A més, en pacients amb t(8;21) o inv(16)/t(16;16), les anomalies citogenètiques addicionals no tenen un efecte advers significatiu en el pronòstic. Per altra banda, diverses anomalies han predit un resultat significativament més dolent, concretament la monosomia del cromosoma 7, les alteracions estructurals del cromosoma 1, el cariotip complex de més de 4 anomalies (CK) i el cariotip monosòmic (MK).

Finalment, els pacients d'aquesta sèrie s'han distribuït en tres grups pronòstic segons les alteracions citogenètiques que presentaven i d'acord amb tres sistemes d'estratificació del risc (MRC, CALGB i el proposat per CETLAM en aquest treball). S'ha demostrat que els tres sistemes són vàlids per classificar els pacients en tres grups pronòstic ben definits.

Aquest treball consolida la importància pronòstica de les alteracions citogenètiques en la LMA i obre algunes vies per seguir investigant en el camp de la citogenètica de la LMA.

SUMMARY

Acute myeloid leukemias (AML) are a heterogeneous group of hematological neoplasms with distinct clinical and genetic features. Cytogenetic abnormalities in AML are strongly associated with both clinical features and therapeutic outcome and provide the framework for risk-stratification schemes in AML. However, the prognostic significance of some recurring cytogenetic abnormalities remains uncertain. This study analyzes the cytogenetic alterations and their impact on the prognosis of 1417 adult patients diagnosed with *de novo* AML (excluding AML with t(15;17) or PML::RARA rearrangement) and included in CETLAM protocols for intensive chemotherapy between 1994 and 2012.

In multivariable analysis, t(8;21)(q22;q22) and inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) were the only abnormalities predicting a relatively favorable prognosis. In patients with t(8;21) or inv(16)/t(16;16), additional cytogenetic abnormalities did not have a significant adverse effect. On the other hand, several abnormalities predicted a significantly worse outcome, namely monosomy of chromosome 7, structural alterations of chromosome 1, complex karyotype with more than 4 abnormalities (CK) and monosomal karyotype (MK).

Finally, the patients in this series were distributed in three prognostic groups according to their cytogenetic alterations and according to three risk stratification systems (MRC, CALGB and the one proposed by CETLAM in this work). All three systems have been shown to be valid for classifying patients into three well-defined prognostic groups.

This work consolidates the prognostic importance of cytogenetic alterations in AML and opens some paths for further research in the field of AML cytogenetics.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 LEUCÈMIA MIELOIDE AGUDA

1.1.1 Incidència, etiologia i patogènia.

La leucèmia mieloide aguda (LMA) és un trastorn maligne resultant de la proliferació clonal de cèl·lules mieloides immadures o blasts. Degut a l'alteració en els mecanismes de regulació del creixement i de diferenciació cel·lular de les cèl·lules hematopoètiques, es produeix una acumulació de precursors mieloides immadurs a la medul·la òssia que impedeix l'hematopoesi normal i acaba causant una insuficiència medul·lar.

La LMA és el tipus més freqüent de leucèmia aguda en adults i causant del 1,2% de la mortalitat global per càncer. Les incidències publicades són variables, des de 2,9 i 3,7 nous casos per 100.000 habitants a l'any en bases de dades europees (1-3) fins 4.3 nous casos per 100.000 habitants/any a Estats Units (4). Tot i que pot ocórrer en qualsevol grup d'edat, la incidència de la LMA augmenta progressivament amb l'edat, fins assolir un pic de 12,6 casos/100.000 habitants/any a partir dels 68 anys (5) i s'estima que afectarà a un 0.5% de la població en algun moment de la seva vida (4,6). A Espanya, la LMA representa el 26% de les neoplàsies mieloides diagnosticades, amb una edat mitjana al diagnòstic de 68 anys i una taxa bruta d'incidència de 3.59 casos/100.000 habitants (7). Els avanços en els tractaments oncològics en general estan comportant un augment de la supervivència d'aquests pacients. Alhora, però, aquest augment de població que ha estat sotmesa a tractaments amb fàrmacs citotòxics es tradueix en una creixent prevalença de les LMA relacionades amb tractament (8).

La etiologia de la LMA és encara en gran part desconeguda. Tot i així, s'han identificat diversos factors que predisposen al desenvolupament de LMA (Figura 1).

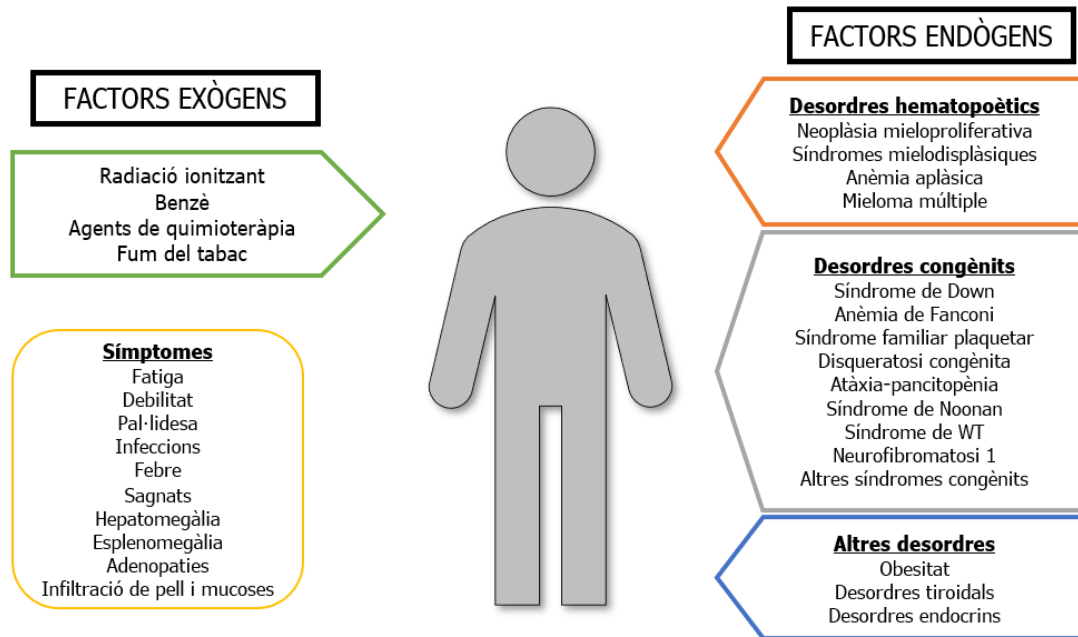


Figura 1: Etiologia de la LMA. Factors endògens i exògens, generalment diversos i inespecífics, contribueixen al desenvolupament de la malaltia.

Dels diversos factors exògens que contribueixen al desenvolupament neoplàsic, els més importants són l'exposició a altes dosis de radiació, l'exposició crònica a altes dosis de benzè, el tabaquisme crònic i els fàrmacs quimioteràpics com els agents alquilants i els inhibidors de la topoisomerasa II principalment. Aquests agents exògens tenen la capacitat de produir danys en l'ADN que acaben conduint a la transformació maligna de les cèl·lules (9).

D'altra banda, la LMA pot desenvolupar-se com una progressió d'altres trastorns clonals de cèl·lules mare hematopoètiques com a resultat de la inestabilitat genòmica i de l'adquisició de mutacions addicionals. Els exemples principals són les neoplàsies mieloproliferatives (MPN) i les síndromes mielodisplàstiques (SMD), que amb els anys poden acabar transformant-se en LMA. Algunes malalties congènites caracteritzades per presentar una insuficiència medul·lar progressiva, com és el cas de l'anèmia de Fanconi, també s'associen a un risc més elevat de desenvolupar una LMA. Per últim, també s'ha vist que la predisposició de línia germinal per desenvolupar una leucèmia sembla ser més freqüent del que es pensava, tot i que, en la majoria d'aquests pacients no és possible identificar un clar factor predisposant a la LMA (10).

La carcinogènesi és un procés gradual des del teixit sa cap a un estat pre-neoplàsic asimptomàtic que finalment esdevé maligne clínicament. L'adquisició seqüencial

d'alteracions genètiques, com ara variacions en el nombre de còpies, reordenacions cromosòmiques i mutacions genètiques, així com canvis epigenètics primerencs, condueixen l'evolució de les cèl·lules somàtiques a clons neoplàsics amb una elevada capacitat de proliferació cel·lular i un bloqueig de la diferenciació i l'apoptosi (11).

Tot i que les causes genètiques involucrades en la leucemogènesi s'estan estudiant des de fa molts anys, el procés no es coneix del tot. La caracterització sistemàtica d'anomalies cromosòmiques estructurals juntament amb la incorporació dels estudis moleculars i de seqüenciació, han descobert la implicació d'un gran nombre de gens en els mecanismes que determinen la transformació maligna de les cèl·lules precursors de l'hematopoesi. Totes aquestes troballes, han demostrat que la majoria dels gens involucrats no són capaços per si sols de transformar una cèl·lula progenitora i, per tant, és necessària la cooperació amb altres esdeveniments oncogènics. Així doncs es va proposar un model de cooperació entre tres tipus d'alteracions genètiques o mutacions (Figura 2).

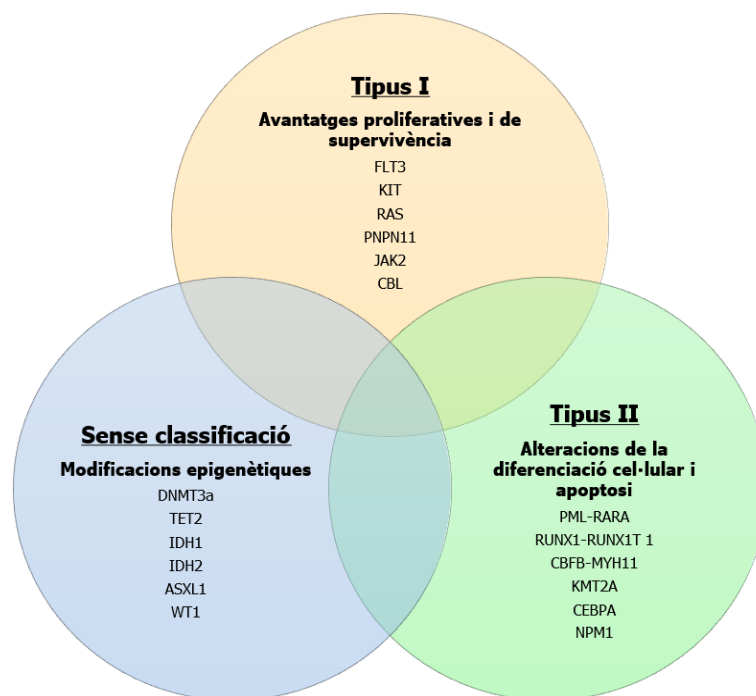


Figura 2: Model de cooperació entre alteracions genètiques associades amb l'aparició de la LMA (adaptat de Lagunas-Rangel *et al*, 2017).

Les mutacions de classe I, que inclouen *FLT3*, *KIT* i *RAS* entre d'altres, confereixen avantatges proliferatius i de supervivència als progenitors hematopoètics. Per altra banda, les de classe II, entre els que destaquen reordenacions de gens del complex *core binding factor* (*CBF*), *KMT2A*, *RARA*, *MECOM*, *NPM1* o *CEBPA*, donen lloc a la pèrdua de la

diferenciació hematopoètica i a l'adquisició aberrant de propietats d'auto renovació (12). Aquestes alteracions es presenten majoritàriament en el moment del diagnòstic i rarament durant l'evolució de la malaltia ni en subclons, fet que suggereix que representen esdeveniments primaris de la leucemogènesi. Per últim, un tercer grup de mutacions que no s'ajusten a cap de les dues classes anteriorment proposades, com són les mutacions de *DNMT3A*, *TET2* i *ASXL1*, promouen principalment modificacions epigenètiques (12–14). Aquestes s'han arribat a identificar en cèl·lules progenitores hematopoètiques prèviament al desenvolupament de la LMA, fet que suggereix que poden ser esdeveniments primerencs que precedeixen a la transformació leucèmica (10).

En general, les alteracions de la mateixa classe o categoria són mútuament excloents. No obstant això, hi ha algunes excepcions: s'ha evidenciat co-ocurrència de mutacions *RUNX1* i reordenacions de *KMT2A*, s'han observat mutacions de *DNMT3A*, *NPM1* i *IDH1/2* alhora, i també es poden produir simultàniament mutacions de *DNMT3A* i *NPM1* amb alteracions clàssiques de classe I i classe II.

També s'ha de tenir en compte l'existència d'altres gens com és el cas de *TP53*, conegut gen supressor tumoral que juga un paper important en l'apoptosi, la inestabilitat genètica i la inhibició de l'angiogènesi. S'ha suggerit que la inhibició de *TP53* pot afavorir l'aparició de noves alteracions citogenètiques durant el desenvolupament de la LMA (15). Aquest fet, juntament amb l'associació de *TP53* amb el cariotip complex (16) i amb mutacions tant de classe I com de classe II, fan que també s'hagi de tenir en compte la implicació de les mutacions de *TP53* en la leucemogènesi (17).

Per tant, amb la identificació de noves alteracions genètiques pendents de classificació i d'un número creixent d'interaccions cooperatives d'aquestes alteracions, la classificació "clàssica" en les tres classes no acaba d'ajustar-se a la realitat. Recentment, a través del projecte *Cancer Genome Atlas*, s'ha proposat un model revisat basat en categories funcionals i que inclou tots els gens identificats (18) (Figura 3).

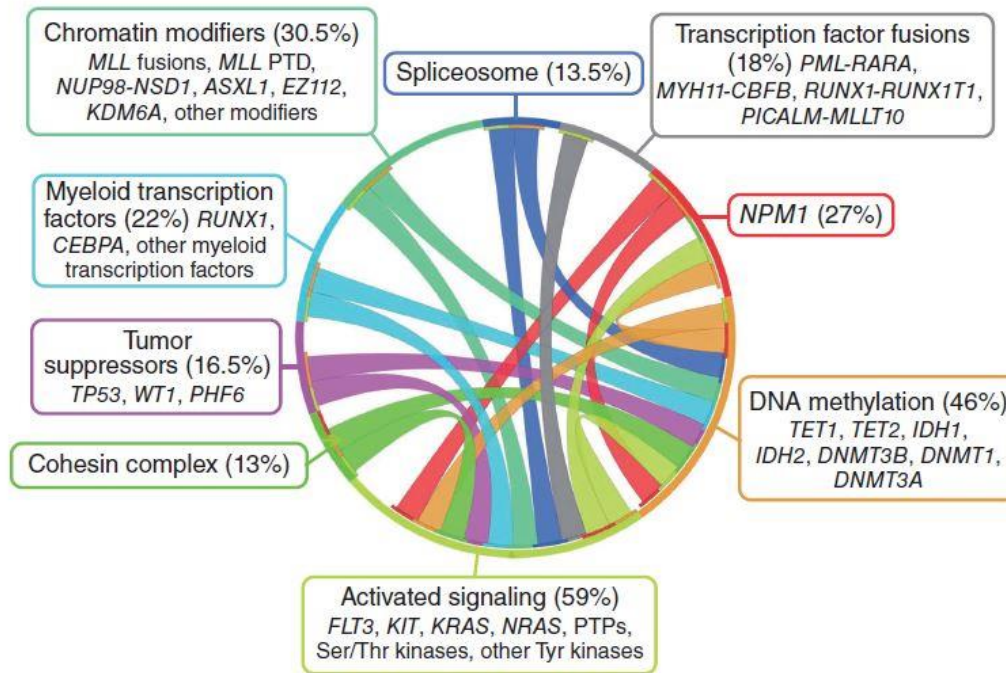


Figura 3: "Diagrama circos" que mostra els esdeveniments genètics que contribueixen a la patogènesi de la LMA. S'han identificat nou categories funcionals de gens mutats. Les línies que connecten diferents categories gèniques reflecteixen les associacions entre mutacions en diferents vies, mentre que hi pot haver alteracions mútuament excloents entre les àrees que no estan connectades. Cada cas de LMA pot tenir diverses mutacions gèniques en diferents categories funcionals. PTP, proteïnes tirosina fosfatases; MLL PTD, duplicació parcial de tàndem de MLL. (Font: Chen *et al.*, 2013)

En aquest estudi de Ley i col·laboradors es va realitzar una anàlisi a gran escala de les alteracions genòmiques i epigenòmiques de la LMA. Es van descriure més de 2.500 mutacions en seqüències codificants i es van identificar 23 gens amb una incidència de mutació superior a l'esperada (inclosos els coneguts *DNMT3A, FLT3, NPM1, IDH1, IDH2* i *CEBPA*; així com altres gens *drivers* descoberts recentment com *U2AF1, EZH2, SMC1A* i *SMC3*). Gairebé tots els casos (99,5%) presentaven almenys una mutació gènica rellevant. Un altre punt rellevant d'aquest estudi va ser la integració de tots els gens mutats en una categorització funcional, amb la que s'ampliava fins a nou el número de classes de gens funcionalment rellevants en la LMA (14,19) (Figura 3). En aquest model hi ha tant cooperació com mútua exclusivitat entre els diferents grups de mutacions gèniques. Des d'un punt de vista fisiopatològic, la concurrència de mutacions pot suggerir relacions complexes entre diferents vies genètiques, mentre que l'exclusivitat mútua implica que les mutacions en aquestes vies són *drivers* que afavoreixen la iniciació i/o el desenvolupament de la LMA.

La identificació d'aquestes relacions funcionals entre vies i gens mutats proporciona una base per comprendre la patogènesi de la LMA, però queden encara moltes qüestions per

resoldre. Per exemple, dilucidar com les alteracions identificades actuen conjuntament per induir la LMA. A més, el valor pronòstic de les mutacions gèniques recentment descobertes i de les categories definides s'hauria d'establir en estudis multicèntrics més grans. Aquest model complex de cooperació i de exclusivitat mútua entre diferents mutacions i vies associades a la LMA pot fer que la seva integració en les guies clíniques sigui un gran repte però, alhora, pot permetre desenvolupar noves estratègies de tractament a mida.

1.1.2 Diagnòstic

Els signes i símptomes de la LMA són diversos i inespecífics, però la majoria d'ells s'atribueixen principalment a la insuficiència medul·lar causada per la infiltració per cèl·lules blàstiques de la medul·la òssia i/o a la infiltració leucèmica d'altres òrgans i teixits. Normalment, els pacients presenten cansament, sagnats, anorèxia, febre i infeccions degudes a la neutropènia, l'anèmia i/o la trombocitopènia. La infiltració leucèmica extramedul·lar pot produir una gran varietat de manifestacions clíniques depenent del teixit o òrgan afectat. En destaquen l'hepatomegàlia, esplenomegàlia, hipertròfia gingival, pneumònia i hemorràgia pulmonar, trastorns per afectació del sistema nerviós central, entre moltes altres.

El diagnòstic precoç de la LMA i un tractament dirigit a temps són imprescindibles, especialment en els casos en que la leucèmia ve acompanyada de síndrome de lisi tumoral o coagulació intravascular disseminada, que poden ser fatals sense el tractament adequat ràpid.

Davant la sospita clínica de LMA es realitza un aspirat de medul·la òssia (MO). El diagnòstic definitiu de LMA es basarà en l'anàlisi i caracterització de les cèl·lules blàstiques de la MO (o de la sang perifèrica (SP) en cas de no poder obtenir MO) a nivell morfològic, citoquímic, immunofenotípic, citogenètic i molecular. La integració de totes aquestes tècniques permetrà la caracterització completa de cada cas, que és el requisit per a un diagnòstic i tractament òptims de la LMA.

L'estudi citomorfològic i citoquímic és el punt de partida indispensable per al diagnòstic de les malalties hematològiques. Al microscopi òptic s'avalua el percentatge i distribució relativa de l'eritropoesi, la granulopoesi i la monocitopoesi per identificar un possible trastorn hematològic; i es poden distingir les cèl·lules normals de les patològiques i potencialment leucèmiques. Per a un diagnòstic de LMA es requereix la presència d'un 20% o més de blasts (mieloblasts, monoblasts o megacarioblasts) en l'estudi citològic de la MO o

la SP. Com a excepció, també es pot concloure un diagnòstic de LMA en casos de leucèmia extramedul·lar (o sarcoma mieloide). Les tincions citoquímiques (esterases no específiques, mieloperoxidasa i ferro) permeten o faciliten la determinació del llinatge cel·lular i l'avaluació de la displàsia, necessari per la classificació i el diagnòstic diferencial del subtipus de leucèmia.

A més a més de l'avaluació morfològica, l'immunofenotipatge mitjançant citometria de flux servirà per confirmar l'origen mieloide de la població maligna així com el grau de maduració, ajudant així a la categorització del subtipus de LMA segons els seu fenotip. A més, la citometria de flux permet diferenciar i quantificar poblacions cel·lulars sanes i malignes, de manera que és essencial en el seguiment de la malaltia residual durant i després del tractament.

Finalment, per a un correcte diagnòstic de les LMA actualment, també són essencials els estudis genètics, per a detectar alteracions cromosòmiques, reordenacions genètiques i mutacions adquirides a la cèl·lula leucèmica. Aquests estudis engloben les tècniques citogenètiques (anàlisi cromosòmica o cariotip i hibridació *in situ* fluorescent (FISH)) i les tècniques de biologia molecular. Malgrat que algunes LMA es caracteritzen encara principalment per trets morfològics i immunofenotípics, l'actual classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) reconeix 11 subgrups de LMA definits per la presència d'anomalies genètiques recurrents específiques (6). En alguns casos, inclús independentment del recompte de cèl·lules blàstiques en l'estudi citològic, el diagnòstic de LMA pot venir determinat per la presència d'alteracions cromosòmiques o moleculars recurrents que són patognomòniques de LAM. Aquests alteracions genètiques són la t(8;21) que forma el gen de fusió *RUNX1::RUNX1T1* i la inv(16) o t(16;16) que comporten la fusió *CBFB::MYH11*, ambdós casos definitoris de les LMA CBF; i la t(15;17) que genera el gen de fusió *PML::RARA* i que defineix la leucèmia promielocítica aguda (6). A part de la rellevància d'aquestes alteracions per a la classificació de l'OMS, les alteracions genètiques tenen un paper crucial en l'estratificació pronòstica, la decisió terapèutica i l'avaluació de la resposta.

1.1.3 Classificació

Durant molts anys, el diagnòstic de la LMA es va basar únicament en la revisió citològica de la medul·la òssia i de la sang perifèrica. La variabilitat morfològica de les cèl·lules segons el tipus de llinatge i el grau de diferenciació permetia establir certs subgrups. Inicialment el 1976, el grup franco-americà-britànic (FAB) (20) va establir un mètode de classificació que

dividia les LMA en sis subtipus diferents, segons l'aspecte morfològic dels blasts i la seva positivitat per tincions histoquímiques, com la mieloperoxidasa, el Sudan negre i esterases no específiques (α -naftil acetat i α -naftil butirat). Posteriorment, en revisions successives, es va anar refinant aquesta classificació amb la incorporació d'alguns marcadors immunològics de superfície cel·lular o citoplasmàtics analitzats per citometria de flux. Finalment, van quedar definits vuit tipus de LMA (Taula 1) (21,22). Tanmateix, aquesta classificació no reflecteix la diversitat genètica en la majoria dels casos de LMA.

Taula 1: Classificació de la FAB de les leucèmies mieloides agudes. FAB: grup Franco-Americà-Britànic; MPO: mieloperoxidasa; CD: *cluster of differentiation*; HLA: antigen leucocitari humà.

TIPUS	MORFOLOGIA	FREQÜÈNCIA
LMA0	Sense diferenciació, <3% blasts MPO+, marcadors cel·lulars mieloides o positivitat per MPO	3%
LMA1	Sense maduració, \geq 3% blasts MPO+; absència o poca granulació en els blasts	15-20%
LMA2	Amb maduració granulocítica. \geq 3% blasts MPO+; granulació en més d'un 10% dels blasts	25-30%
LMA3	Promielocítica. Granulació intensa, estelles citoplasmàtiques; negativitat per HLA-DR. Hi ha una variant hipogranular	5-10%
LMA4	Mielomonocítica aguda, >20% promonòcits, esterases inespecífiques positives.	25-30%
LMA4 EO	Mielomonocítica aguda variant amb eosinofília	5-10%
LMA5 A I B	Monocítica. Dues variants: LMA5a (monoblasts) i LMA5b (promonòcits). Positivitat per esterases i marcadors cel·lulars monocítics (CD14 i CD11)	2-10%
LMA6	Eritroleucèmia. Eritroblasts >50% i \geq 30% blasts mieloides entre les cèl·lules no eritroides; glicoforina positiva	3-5%
LMA7	Megacarioblàstica. Positivitat per marcadors plaquetars per citometria de flux (CD41 i CD61).	3-12%

Davant la necessitat d'incorporar nous paràmetres per a una millor classificació, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va proposar al 2002 una nova classificació dels diferents subgrups de LMA basada en la correlació clínica, morfològica, immunofenotípica i genètica (23–25). Aquesta classificació tenia diferències importants respecte la classificació de la FAB. En destaquen el valor llindar de blasts per al diagnòstic de la LMA, que es va modificar del 30% al 20%, i la categorització de les LMA en subgrups biològics i clínics. Els avanços en el coneixement de la biologia de les LMA ha fet necessària la revisió i actualització d'aquesta classificació fins la última versió publicada el 2017 (6).

L'última versió de la classificació de la OMS, igual que l'anterior, reconeix per una banda tres grans subgrups de LMA: LMA amb anomalies genètiques recurrents, LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia i neoplàsies mieloides relacionades amb el tractament. Per altra banda, aquells casos que no compleixen criteris d'aquests subgrups o dels que no es disposa d'alteracions genètiques específiques s'han de considerar en el quart subgrup: LMA sense cap altra especificació (NOS), que es basa principalment en la classificació de la FAB.

Un dels reptes de l'última revisió ha estat com incorporar el coneixement genètic recentment descobert en l'esquema de classificació de LMA i, alhora, seguir el principi de l'OMS de definir entitats homogènies i biològicament rellevants basades no només en estudis genètics o en el seu pronòstic si no també en estudis clínics, morfològics i immunofenotípics. Això ha estat especialment problemàtic amb les mutacions més freqüents i d'importància pronòstica en LMA de cariotip normal com són les mutacions de *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* i *CEBPA*. Els casos amb aquestes mutacions tenen característiques variables i les mutacions no són mútuament excloents. En la següent taula es mostra la classificació definitiva actual (Taula 2).

Taula 2: Classificació de la OMS (2017) de les leucèmies mieloides agudes.

Leucèmia mioide aguda (LMA) i neoplàsies relacionades
LMA amb alteracions genètiques recurrents: LMA amb t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 LMA amb inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ/MYH11 LA promielocítica amb t(15;17)(q22;q12); PML/RARA LMA amb t(9;11)(p21.3;q23.3); KMT2A-MLLT3 LMA amb t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 LMA amb inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM LMA (megacarioblàstica) amb t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15-MKL1 LMA amb BCR-ABL1 LMA amb mutació de NPM1 LMA amb mutació bial·lèlica de CEBPA LMA amb mutació de RUNX1
LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia
Neoplàsies mieloides relacionades amb tractament
LMA sense cap altra especificació (NOS): LMA mínimament diferenciada LMA sense maduració LMA amb maduració LA mielomonocítica LA monoblàstica i monocítica Leucèmia eritroide pura LA megacarioblàstica LA basofílica Panmielosi aguda amb mielofibrosi
Sarcoma mioide
Proliferacions mieloides relacionades amb la síndrome de Down

Neoplàsia blàstica de cèl·lules dendrítiques plasmocitoides

LA de llinatge ambigu

LA indiferenciada

LA de fenotip mixte amb t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1

LA de fenotip mixte amb t(v;11q23.3); KMT2A reordenat

LA de fenotip mixte B/mieloide, NOS

LA de fenotip mixte T/mieloide, NOS

LA de fenotip mixte, NOS, tipus rars

El requisit previ per al reconeixement d'una entitat per part de l'OMS és la seva rellevància clínica i homogeneïtat biològica, que la fa discernible no només per una determinada alteració genètica, sinó també per les seves característiques clíniques, morfològiques i/o immunofenotípiques. És per aquest motiu que s'intenta identificar alteracions genètiques que puguin correlacionar-se amb la clínica i puguin definir noves categories de LMA. Amb aquest objectiu Papaemmanuil *et al.* van intentar dissenyar una classificació exclusivament genètica de la LMA. La majoria de classes identificades per aquest nou enfoc genètic equivalien a entitats reconegudes per la classificació de l'OMS, però es van definir tres classes genètiques noves (Taula 3). No obstant això, un subconjunt de pacients (4%) complia criteris per a dues o més classes, fet que planteja la pregunta sobre quina alteració tindria prioritat diagnòstica. En aquest estudi, només l'11% dels pacients van romandre sense classificar; mentre que l'actual categoria NOS de l'OMS inclou un 25-30% dels pacients amb LMA (26).

Taula 3: Proposta de classificació genètica de la LMA (Papaemmanuil).

GRUP GENÈTIC PROPOSAT	ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES I GENS FREQUÈNTMENT MUTATS (%)	FREQÜÈNCIA
NPM1	NPM1 (100), DNMT3A (54), FLT3-ITD (39), NRAS (19), TET2 (16), PTPN11 (15)	27%
CROMATINA I/O SPLICEOSOMA	RUNX1 (39), MLLPTD (25), SRSF2 (22), DNMT3A (20), ASXL1 (17), STAG2 (16), NRAS (16), TET2 (15), FLT3-ITD (15)	18%
ANEUPLOÏDIA TP53	Cariotip complex (68), -5/5q (47), -7/7q (44), TP53 (44), -17/17p (31), -12/12p (17), +8/8q (16)	13%
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ::MYH11	inv(16) (100), NRAS (53), +8/8q (16), +22 (16), KIT (15), FLT3-TKD (15)	5%
CEBPA BIAL·LÈLIC	CEBPA bial·lèlic (100), NRAS (30), WT1 (21), GATA2 (20)	4%
t(15;17)(q22;q12); PML::RARA	t(15;17) (100), FLT3-ITD (35), WT1 (17)	4%
t(8;21)(q22;q22); RUNX1::RUNX1T1	t(8;21) (100), KIT (38), -Y (33), -9q (18)	4%
FUSIONS KMT2A; t(v;11q23)	t(v;11q23) (100), NRAS (23)	3%
Inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (EVI1)	inv(3) (100), -7 (85), KRAS (30), NRAS (30), PTPN11 (30), ETV6 (15), PHF6 (15), SF3B1 (15)	1%

IDH2 ^{R172}	IDH2R172 (100), DNMT3A (67), +8/8q (17)	1%
t(6;9)(p23;q34); DEK::NUP214	t(6;9) (100), FLT3-ITD (80), KRAS (20)	1%

Així doncs, el gran objectiu encara és trobar característiques significatives i rellevants que permetin classificar tots aquests casos de LMA inclassificables en el futur. És probable que això millori l'estratificació, el tractament i l'evolució dels pacients amb LMA.

1.1.4 Tractament

Els diversos grups de tractament de pacients amb LMA segueixen protocols terapèutics amb unes línies generals comunes o molt similars que, tot i poder diferir en algun punt, fan que siguin comparables entre ells. Així, el primer gran objectiu del tractament quimioteràpic intensiu és assolir una remissió completa (RC) de la malaltia i, a més llarg plaç, la curació de la LMA. Hi ha diversos factors a tenir en compte a l'hora de decidir el tipus de tractament (Figura 4). El criteri principal i decisiu per al tractament intensiu és l'edat del pacient. Els pacients menors de 70 anys i els que tenen entre 70 i 79 anys sense comorbilitats en general poden sotmetre's a un tractament de quimioteràpia intensiva. En els pacients majors de 80 anys aquesta decisió ja depèn de més factors, com el risc citogenètic, l'estat general del pacient, entre altres.

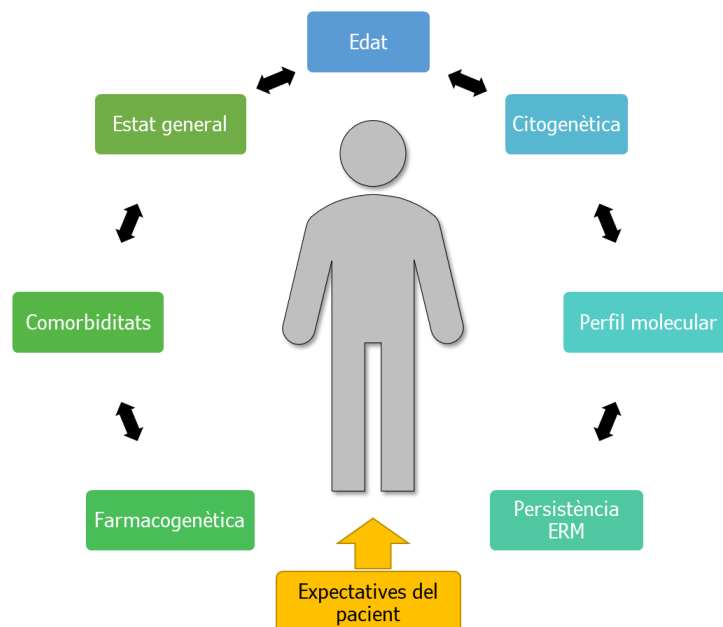


Figura 4: Factors a tenir en compte en el tractament de la LMA.

El tractament de la LMA amb quimioteràpia intensiva es pot descriure en dues fases: un primer tractament d'inducció, on s'intenta eliminar el màxim número de cèl·lules leucèmiques i assolir la RC, seguit de la post-inducció. Aquesta fase consisteix en un tractament de consolidació, en el que es vol eliminar les cèl·lules residuals que puguin quedar, i finalment un tractament post-intensificació adaptat al risc que intenta evitar la recaiguda de la malaltia (Figura 5).

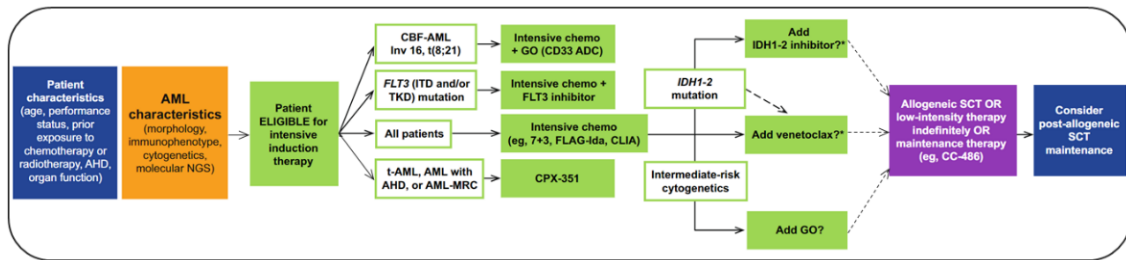


Figura 5: Recomanacions terapèutiques per la LMA a l'actualitat (adaptat de Daver, 2020). AHD: antecedent de malaltia hematològica; MRC: canvis relacionats amb mielodisplàsia; GO: gemtuzumab ozogamicina; FLAG-ida: fludarabina-AraC-filgrastim i idarubicina; CLIA: cladribina-idarubicina-AraC; CPX-351: combinació de daunorubicina i citarabina liposòmica.

Tractament d'inducció:

La combinació de 3 dies d'antraciclina (idarubicina) i 7 dies de citarabina segueix sent l'estàndard a seguir en el tractament d'inducció. Altres tractaments no han demostrat millors taxes de RC i, de fet, no hi ha hagut canvis importants d'aquest tractament en els darrers 40 anys. Sí que és cert que recentment s'estan incorporant pacients a assajos clínics amb fàrmacs diana-específics basats en els estudis moleculars i en el grup pronòstic (Figura 6), com són els anti *FLT3* o els inhibidors tirosin-cinasa en LMA *CBF* amb mutació de *c-Kit*.

Tractament post inducció:

En primer lloc, es segueix un tractament de consolidació amb antraciclina i citarabina o bé només citarabina a altes dosis. Seguidament s'inicia el tractament post-consolidació o d'intensificació que està adaptat al risc. Els pacients amb un pronòstic favorable segueixen el tractament amb altes dosis de citarabina. Els pacients de risc intermedi es sotmeten a un transplantament de progenitors hematopoètics (TPH), autòleg (auto) o al·logènic (alo) segons el cas. L'evolució després de l'auto-TPH és similar a l'observada amb la quimioteràpia intensiva post-remissió i no s'ha observat que millori la supervivència, de manera que diversos grups de tractament estan deixant d'utilitzar l'auto-TPH com a opció terapèutica en

LMA. Per últim, els pacients amb pronòstic advers es sotmeten a un alo-TPH. El benefici de l'alo-TPH es deu al règim de quimioteràpia d'acondicionament i a l'efecte de l'empelt contra leucèmia. Tot i ser la millor estratègia terapèutica, associada a un risc de recaiguda més baix, s'ha de tenir en compte que el benefici es veu limitat per l'elevada mortalitat relacionada amb el propi alo-TPH.

Altres tractaments:

Avui dia, la informació genètica al diagnòstic condueix cada vegada més a un tractament individualitzat i a una teràpia dirigida. Un dels casos més estandarditzats és el cas de la LMA amb mutacions de *FLT3*, que es tracta amb inhibidors de la proteïna FLT3 com la midostaurina. Però cada vegada es descriuen més mutacions genètiques (com *IDH*, *SF3B1* o *KIT* entre d'altres) que també poden influir en l'elecció del tractament (Figura 6). La malaltia mínima residual que es pot seguir mitjançant immunofenotip o tècniques moleculars també pot comportar estratègies de seguiment i tractament individuals. En el cas de recaiguda, les alteracions genètiques poden diferir de les del moment del diagnòstic i es recomana reavaluar tot el cas per decidir la millor teràpia de rescat. En casos de pacients majors de 65 anys i amb citogenètica de risc advers sembla que s'obtenen millors resultats amb tractament amb azacididina (fàrmac hipometilant) en comparació amb la teràpia convencional (que inclou quimioteràpia, baixes dosis de citarabina i suport). De manera similar, en aquest subconjunt de pacients, els que presenten mutacions de *TP53* i *NRAS* es beneficien del tractament amb azacididina, mentre que els pacients amb mutacions *FLT3* i *TET2* tenen un millor resultat en règims de quimioteràpia convencionals (27).

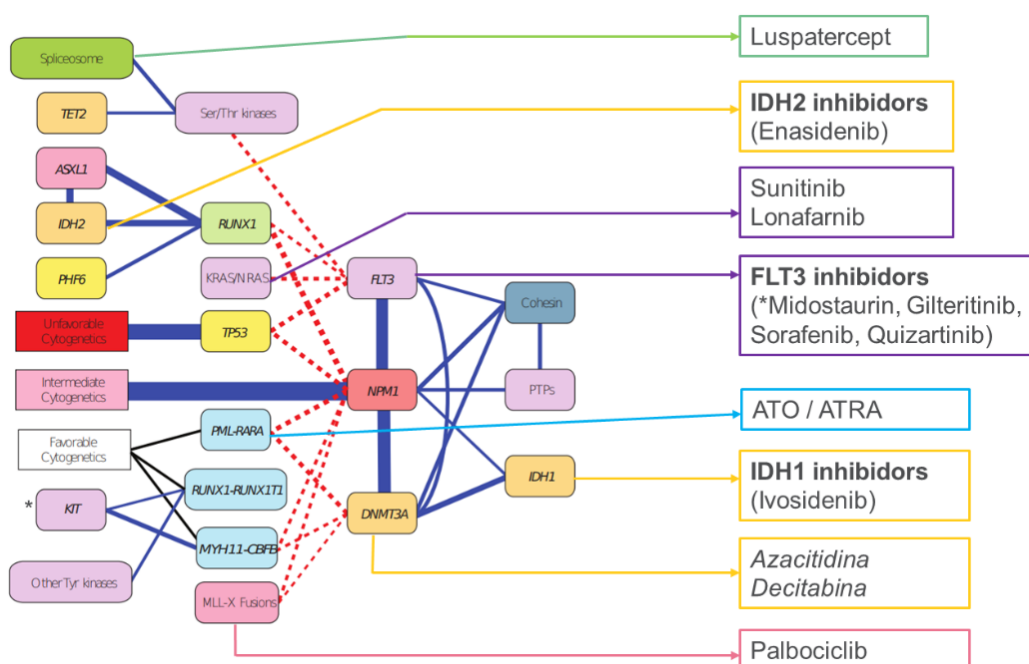


Figura 6: Tractaments de la LMA dirigits segons les alteracions genètiques (adaptat de Ley et al, 2013).

1.2 GENÈTICA DE LA LMA

La introducció de les tècniques de bandeig cromosòmic (28) va ser fonamental a la dècada dels 1970 per descobrir que les cèl·lules de LMA contenen anomalies citogenètiques recurrents, com ara la t(8;21)(q22;q22) en una LMA2 segons la FAB o la t(15;17)(q22;q21) en la leucèmia promielocítica aguda (29,30). Això va obrir el camí a la identificació dels gens implicats en les reordenacions cromosòmiques i a conèixer com la conseqüent interrupció/activació de gens o la formació de gens de fusió promouen la transformació leucèmica (Figura 7). Els avanços en les tècniques de seqüenciació també han permès identificar una gran quantitat de gens mutats en LMA, com *FLT3*, *NPM1* i *CEBPA* (31–33).

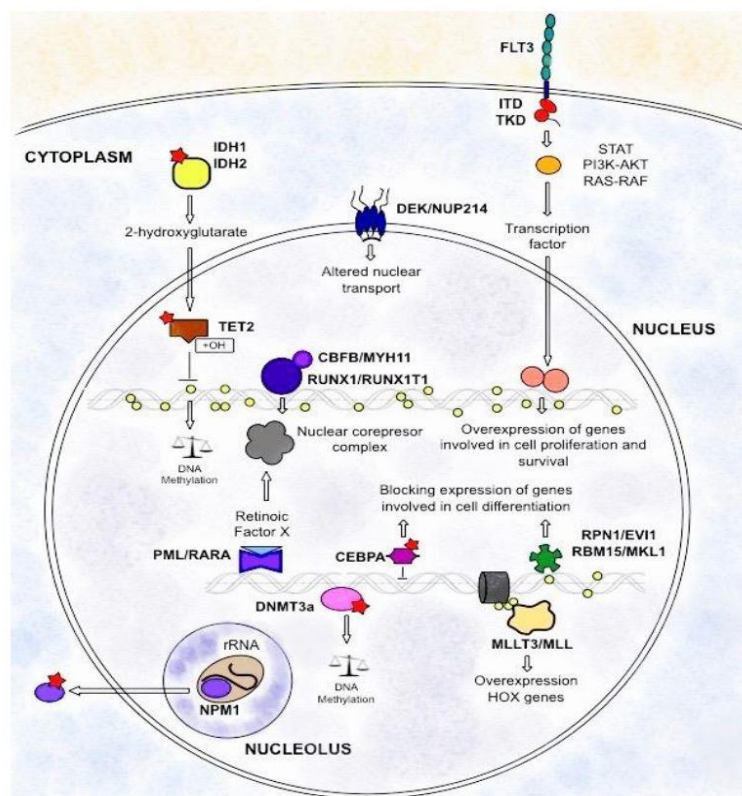


Figura 7: Esquema de l'acció leucemogènica dels factors citogenètics i moleculars més coneguts en LMA (Font: Lagunas-Rangel *et al*, 2017)

Tota aquesta informació s'ha adoptat per definir les estratègies de diagnòstic i maneig de les LMA fins al punt que actualment l'estudi citogenètic i el molecular són imprescindibles en el

moment del diagnòstic d'una LMA, en l'estratificació pronòstica i en l'elecció del tractament a seguir.

1.2.1 Alteracions citogenètiques

S'ha descrit que entre un 50% i un 60% dels pacients amb LMA presenten alteracions cromosòmiques en el moment del diagnòstic (34–37). Fins ara, s'han identificat i clonat més de 100 reordenacions cromosòmiques equilibrades (translocacions, insercions i inversions) considerades esdeveniments iniciadors de la leucemogènesi (*Mitelman Database, Accessed August 2, 2011*). En un 30% dels casos de LMA es detecten alteracions citogenètiques recurrents de la classificació de la OMS (6).

A la taula es descriuen algunes de les alteracions cromosòmiques recurrents descrites en pacients amb LMA i la seva correlació amb el diagnòstic citològic (Taula 4):

Taula 4: Alteracions citogenètiques recurrents en la LMA. Es mostren les associacions més freqüents amb algun tipus segons les classificacions FAB/OMS. (Font: Yang *et al.*, 2017). Incidències extretes de mateixa font més Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, MRC i CALGB.

ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES	TIPUS DE LMA	INCIDÈNCIA
t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	M2 / LMA amb anomalia genètica recurrent	5-10%
t(15;17)(q22;q12); <i>PML::RARA</i>	M3 / Leucèmia promielocítica aguda	5-10%
inv(16)(p13q22) i t(16;16); <i>CBFB::MYH11</i>	M4-Eo / LMA amb anomalia genètica recurrent	5-8%
Reordenacions 11q23; <i>KMT2A</i>	M4 i M5 / LMA amb anomalia genètica recurrent	~5%
inv(3)(q21q26) i t(3;3); <i>GATA2::MECOM</i>	M1 i M7 / LMA amb anomalia genètica recurrent	1-2%
t(6;9)(q23;q34); <i>DEK::NUP214</i>	M2 i M4 amb basofília / LMA amb anomalia genètica recurrent	0.7-1.8%
t(1;22)(p13.3;q13.1); <i>RBM15::MKL1</i>	M7 / LMA amb anomalia genètica recurrent	<1%
t(8;16)(p11;p13) i inv(8); <i>MOZ::CBFB</i>	M4 i M5	0.5%
t(1;3)(p36;q21); <i>RPN1::PRDM16</i>	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	~50 casos
t(3;5)(q25;q35); <i>NPM1::MLF1</i>	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	<1%
t(3;12)(q26;p13); <i>ETV6::MECOM</i>	Sense subtipus específic	~50 casos
t(3;21)(q26;q22); <i>RUNX1::MECOM</i>	M2 i M4, LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	0,14%
t(7;11)(p15;p15); <i>NUP98::HOXA9</i>	M2	~80 casos
t(16;21)(p11;q22); <i>FUS::ERG</i>	Sense subtipus específic	~40 casos
EQUILIBRADES: TRANSLOCACIONS I INVERSIONS		
DESEQUILIBRADES: DELECCIONS	del(9q)	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia 2%

del(11q)	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	1%
anomalies 12p	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	2-3%
del(5q)	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia i LMA secundàries a tractament	3%
del(7q)	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia i LMA secundàries a tractament	2%
del(17p) i i(17)(q10)	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	2-3%
der(1;7)(q10;p10)	Sense subtipus específic	0.2-2%

(continuació)

ALTERACIONS CROMOSÒMIQUES	TIPUS DE LMA	INCIDÈNCIA	
ALTERACIONS NUMÈRIQUES	Monosomia 5	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	2%
	Monosomia 7	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	5%
	Monosomia 17	LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia	2-3%
	Trisomia 8 (aïllada)	M4 i M6	5-6%
	Trisomia 11 (aïllada)	M1, M2, M4 i displàsia multilínia	1%
	Trisomia 13	Sense subtipus específic	1-3%
	Trisomia 21 (adquirida)	Sense subtipus específic	3-6%
	Trisomia 22	-	2-3%

1.2.1.1 Alteracions estructurals equilibrades

Són reordenacions cromosòmiques que no comporten pèrdua ni guany de material genètic. Els dos tipus més freqüents són les translocacions (intercanvi d'un fragment cromosòmic entre dos cromosomes de manera recíproca) i les inversions (fragment que gira o s'inverteix dins del mateix cromosoma). La conseqüència d'aquestes anomalies acostuma a ser l'activació d'un gen crític, com un oncogen, o la generació d'un gen híbrid, i per tant una nova proteïna quimèrica amb propietats oncogèniques. Aquest últim mecanisme és segurament el més freqüent en LMA. Els exemples de translocacions recurrents més freqüents i conegudes serien la t(15;17) amb la reordenació *PML::RARA*, la t(8;21) amb *RUNX1::RUNX1T1* i la inv(16) o t(16;16) amb *CBFB::MYH11*. També s'han identificat gens que poden reordenar-se amb una gran varietat de gens *partner* fet que pot donar lloc a diagnòstics i pronòstics diferents. Aquest és el cas del gen *KMT2A* (prèviament anomenat *MLL*) que es troba en el cromosoma 11q23. Fins a la data, s'han identificat i caracteritzat

més de 90 gens *partner* diferents (38), que produeixen com a conseqüència la gran heterogeneïtat d'aquest grup de leucèmies. La translocació més freqüent és la $t(9;11)(p23;q23) / MLLT3::KMT2A$ reconeguda per la classificació OMS com a categoria específica (6). Les restants translocacions 11q23, com ara la $t(6;11)(q27;q23) / AFDN::KMT2A$, la $t(10;11)(p12;q23) / MLLT10::KMT2A$ o la $t(11;19)(q23;p13.1) / ELL::KMT2A$, són menys freqüents i menys caracteritzades.

1.2.1.2 Alteracions estructurals desequilibrades

Es tracta d'anomalies cromosòmiques que comporten la pèrdua o el guany de material genètic. Hi ha una gran diversitat de tipus d'alteracions (isocromosomes, cromosomes derivatius, anells, entre altres) però les més freqüents són les delecions, en les que es produeix una pèrdua neta de material cromosòmic. En aquests casos generalment es produeix la pèrdua o truncament de gens crítics, generalment gens supressors tumorals. En LMA, les delecions que es veuen més freqüentment són les que afecten als cromosomes 5q, 7q, 11q, 12p, 13q, 17p i 20q. Aquestes alteracions (a excepció de la delecio 20q) es consideren suficients segons l'última versió de la OMS per a diagnosticar una LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia. Per altra banda, aproximadament el 70% del pacients amb LMA secundàries a tractament (t-LMA) presenten alteracions desequilibrades de les descrites, sent les més habituals les delecions 5q i 7q. Aquestes delecions sovint es presenten acompanyades d'una o més anomalies addicionals i s'associen a t-LMA amb trets displàsics i a períodes llargs de latència post-tractament amb agents alquilants i/o radiacions ionitzants (Taula 4).

1.2.1.3 Alteracions numèriques o aneuploidies

Són els guanys (trisomies) o pèrdues (monosomies) de cromosomes sencers. La +8 és la trisomia aïllada més freqüent en LMA, mentre que les -5 i -7 són les monosomies més freqüents. No es coneix encara exactament com les trisomies contribueixen a la leucemogènesi. En canvi, les monosomies acostumen a comportar la pèrdua de gens importants pel control del cicle cel·lular i en general s'associen a mal pronòstic.

1.2.1.4 Cariotip complex i cariotip monosòmic

El cariotip complex (CK) s'observa en un 10-14% dels pacients amb LMA *de novo* i fins a un 23% en pacients d'edat més avançada (36,39). Sovint conté nombroses anomalies cromosòmiques que, mitjançant l'anàlisi convencional de bandes G, són parcialment interpretades. Aquestes anormalitats inclouen translocacions desequilibrades amb material cromosòmic no identificable per les tècniques de tinció convencionals, cromosomes marcadors, anells, regions de tinció homogènia o dobles minuts. En general, els pacients amb LMA amb CK es caracteritzen per guanys i pèrdues cromosòmiques, en lloc de translocacions equilibrades, fet que suggereix mecanismes diferents en la leucemogènesi (40).

La definició de CK ve determinada pel seu impacte sobre el pronòstic. Aquest concepte es va introduir per primera vegada per C. Bloomfield i col·laboradors el 1982 en el *Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia* (41). Des d'aleshores, s'aplica el terme CK per catalogar el risc però la seva definició varia segons els diferents grups d'estudi i tractament de la LMA. La majoria de grups apliquen aquest terme a cariotips que inclouen almenys tres anomalies cromosòmiques no relacionades [en la majoria dels casos, excloent la t(15;17), la t(8;21) i la inv(16) o t(16;16)], mentre que la classificació de *UK Medical Research Council* considera 4 o més anomalies (34-36,42). Posteriorment a aquests estudis, Stolzel *et al.* també revalida el tall per complexitat de cariotip en LMA amb ≥ 4 anomalies (43). A part del número d'alteracions a partir del qual es defineixi la complexitat, també s'han dut a terme estudis sobre altres paràmetres citogenètics que puguin modular l'impacte pronòstic del CK. En aquest sentit, el *Southwest Oncology Group* (SWOG) va demostrar que els pacients amb CK però sense afectació de cromosomes 5 o 7 tenien una taxa de remissió completa del 50% i una supervivència global del 20%, mentre que els pacients amb CK i implicació de cromosomes 5 o 7 tenien taxes significativament més baixes (44). També el Grup Cooperatiu Alemany d'Estudi del Transplantament va demostrar que una classificació jeràrquica dels cariotips de risc advers d'acord a tres grups segons alteracions genètiques estratificava millor els pacients sotmesos a alo-TPH (45). Concretament van demostrar que les anomalies de 17p (afectació de *TP53*) o les alteracions del cromosoma 5 (monosomies i delecions del braç q) representaven uns subgrups de pacients amb pitjor supervivència que la resta de cariotips de risc advers (inclouent CK).

Amb aquesta heterogeneïtat de definicions i classificacions, el grup HOVON (*Haemato Oncology Foundation for Adults in the Netherlands*) va revisar la classificació citogenètica de la LMA amb l'objectiu de determinar un tipus de cariotip amb impacte pronòstic i, més

important, una definició única i inequívoca. Així, va distingir un subgrup de pacients amb l'anomenat cariotip monosòmic (MK) que es caracteritza per un pronòstic especialment dolent (46) (Figura 8).

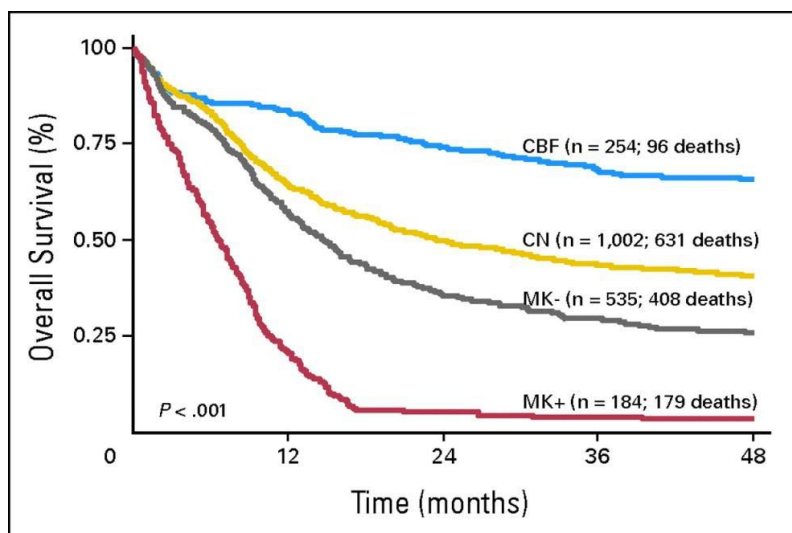


Figura 8: Supervivència global de les quatre categories pronòstiques proposades per Breems *et al.* (Font: Breems *et al.*, 2008).

El MK es defineix com la pèrdua d'un cromosoma autosòmic en combinació amb almenys una altra monosomia autosòmica o una anomalia estructural. Aquests cariotips inclouen gairebé sempre almenys una anomalia cromosòmica associada a risc advers (-5/del(5q), -7, anomalies 17p) mentre que presenten una freqüència significativament menor de mutacions dels gens *NPM1* i *FLT3-ITD* (47-49). Cal tenir en compte que la majoria de MK són també CK, ja que fins a un 75% dels CK són hipodiploïdies (és a dir, tenen ≤ 45 cromosomes) i que els pseudodiploïdies (46 cromosomes) i els hiperdiploïdies (≥ 47 cromosomes) també acostumen a presentar almenys una monosomia (40) (Figura 9). En general, aproximadament la meitat dels pacients definits com a cariotip advers segons els sistemes de classificació estàndard tenen un MK i diversos estudis ja han revalidat el pronòstic especialment pobre d'aquest subgrup de pacients (34,49,50). Pel que fa al tractament, no està clar que aquests pacients es puguin beneficiar d'un alo-TPH (48,50,51) i probablement s'haurien d'explorar noves estratègies terapèutiques.

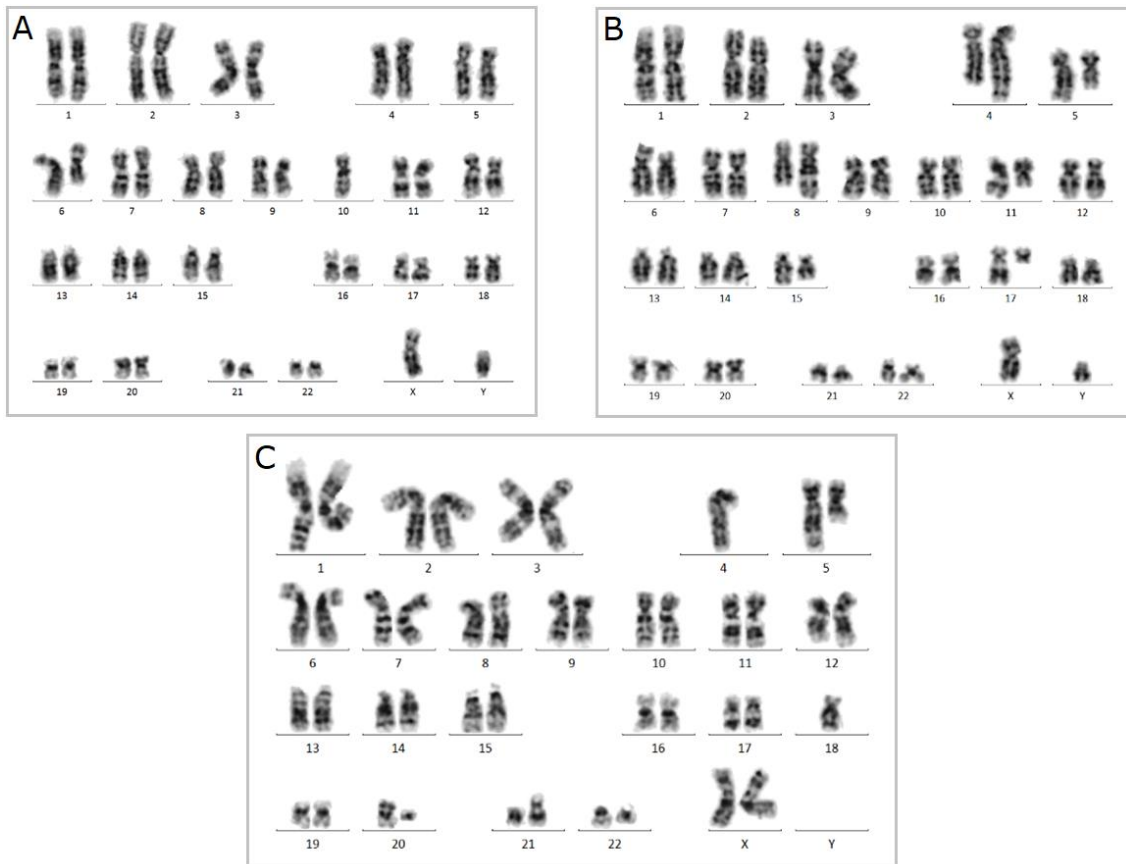


Figura 9: A) Cariotip monosòmic no complex: 45,XY,del(6)(q21q25),-10[10]. B) Cariotip complex no monosòmic: 46,XY,t(4;5)(q25;q15),del(6)(p22),add(8)(q22),add(11)(q13),del(15)(q22q26),del(17)(q12),der(17)t(11;17)(q13;q21)[15]. C) Cariotip complex i monosòmic: 44,XX,-4,del(5)(q12q33),-18,ider(20)(q10)del(20)(q11.2),ins(21)(q11.2),del(22)(q13)[20].

L'anàlisi citogenètica convencional té limitacions que cal tenir en compte. Per una banda, l'estudi del cariotip pot no ser informatiu en fins un 10% dels casos de LMA degut a una qualitat o quantitat insuficient de metafases per analitzar. Per altra banda, tot i tractar-se de casos excepcionals, s'han descrit alteracions críptiques en la LMA, és a dir, no identificables mitjançant el patró de bandes G. En són un exemple alguns reordenaments que afecten el gen *NUP98* en el cromosoma 11p15.5 i que confereixen un pronòstic desfavorable (52). També a tenir en compte que aproximadament un 5% dels pacients amb una reordenació associada a bon pronòstic (és a dir, *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1* o *CBFB::MYH11*) no la presenten amb la forma citogenètica clàssica (53–55). En aquests casos, el gen de fusió es pot formar mitjançant una inserció (i per tant el cromosoma implicat sembla normal), mitjançant translocacions variants (per exemple involucrant un cromosoma *partner* alternatiu), o bé alteracions més complexes que poden "amagar" la reordenació clàssica. En tots aquests casos es requereix l'estudi mitjançant FISH o bé tècniques

moleculars per detectar la presència d'alteracions rellevants per al diagnòstic i pronòstic de la LMA.

Per últim, en el 40-50% de les LMA de nou diagnòstic l'anàlisi citogenètica pot resoldre's en un cariotip normal (NK), definit com l'absència d'alteracions cromosòmiques clonals en l'anàlisi d'un mínim de 20 metafases. El NK representa el subconjunt citogenètic més gran de pacients amb LMA i es classifica com a risc intermedi per tots els grups més importants d'estudi i tractament de LMA (34–36). La LMA amb NK és un grup heterogeni caracteritzat per una variabilitat notable en termes de resposta al tractament (assoliment de CR, taxa de recaiguda, DFS i OS). Aquest fet ve determinat per la heterogeneïtat molecular de la LMA citogenèticament normal (Figura 10). En aquest context, la presència o absència de mutacions gèniques específiques i/o canvis en l'expressió gènica són determinants per valorar el pronòstic dels pacients.

1.2.2 Alteracions moleculars

La caracterització molecular de les LMA de nou diagnòstic és imprescindible degut a la seva importància en l'estratificació pronòstica, sobretot dels pacients amb NK en els que no hi ha un marcador citogenètic de referència que defineixi el diagnòstic ni el pronòstic de la LMA (Figura 10). En els darrers 15 anys, amb el desenvolupament de les tècniques de seqüenciació massiva, s'han produït avenços molt importants en la identificació de mutacions gèniques relacionades amb la patogènesi de la LMA.

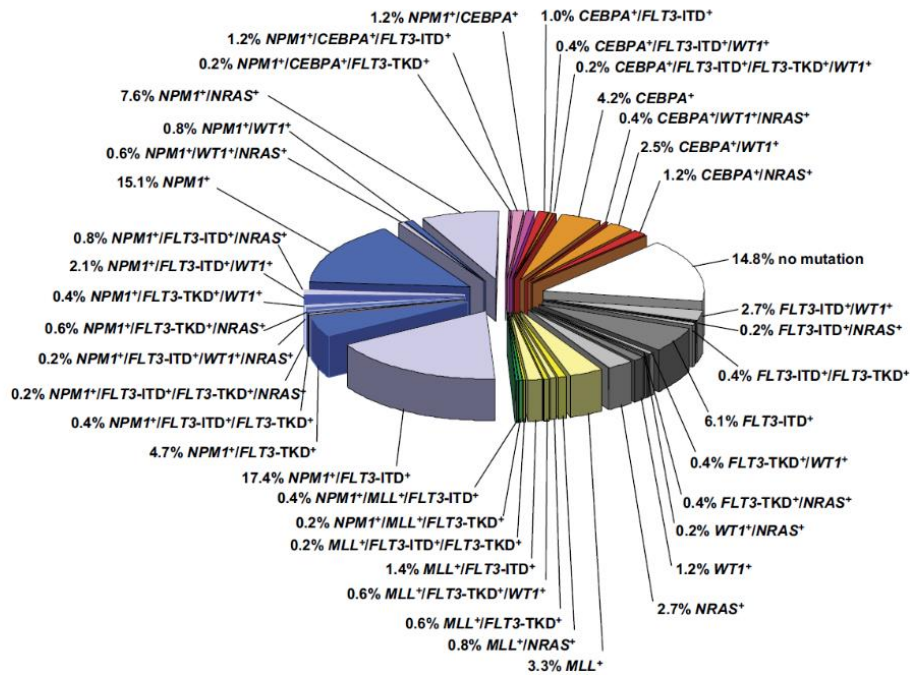


Figura 10: Heterogeneïtat molecular de la LMA de NK. (Font: Döhner, 2010)

Una mutació és una alteració permanent en la seqüència de nucleòtids de l'ADN d'un gen. La mida de les mutacions és variable; poden afectar des d'un únic nucleòtid (mutacions puntuals) fins a un segment d'ADN més gran. Hi ha diversos mecanismes d'alteració del DNA que donen lloc a les mutacions:

Insercions i delecions: Aquestes alteracions canvien el nombre de nucleòtids d'un gen afegint (insercions) o eliminant (delecions) un únic nucleòtid o un fragment d'ADN. Com a resultat, és possible obtenir una proteïna diferent o truncada.

Duplicacions: Consisteix en un fragment d'ADN que es copia de manera anormal una o més vegades.

Expansió per repeticions: Les repeticions de nucleòtids són seqüències curtes d'ADN que es repeteixen diverses vegades seguides. Per exemple, una repetició de trinucleòtids està formada per seqüències de 3 parells de bases. Per tant, es tracta d'un augment del nombre de vegades que es repeteix la seqüència d'ADN curt.

Quan es produeix una mutació, la funcionalitat de la proteïna codificada pot veure's alterada de diverses maneres depenent d'on i com es produeixi la mutació. D'acord amb això, hi ha diversos tipus de mutacions:

Mutació *missense*: Es tracta d'una mutació puntual. En aquest cas, el canvi en una de les bases de l'ADN es tradueix en la substitució d'un aminoàcid per un altre en la proteïna produïda pel gen. Pot alterar l'estructura o la funció de la proteïna si afecta a una posició crítica.

Mutació *nonsense*: És també una mutació puntual que causa, en aquest cas, l'aparició d'un codó stop. Aquest tipus de mutació es tradueix en una proteïna escurçada que pot funcionar de forma inadequada.

Mutació *silent*: Són mutacions puntuals en les quals el nou aminoàcid codificat és similar a l'antic aminoàcid, de manera que no es produeix un efecte fenotípic en l'organisme.

Mutació *frameshift*: En aquest cas s'afecten diverses bases de l'ADN (no múltiples de tres) de manera que es produeix un canvi en la pauta de lectura del gen i per tant canvia la codificació d'aminoàcids. La proteïna resultant sol ser no funcional. Les insercions, les delecions, les duplicacions i l'expansió per repeticions poden causar mutacions *frameshift*.

Mutació *in frame*: Afecten a diverses bases de l'ADN, però en aquest cas sempre múltiples de tres, per tant no canvia la pauta de lectura. De la mateixa manera que les anteriors, poden venir donades per insercions, delecions, duplicacions i expansions de repeticions.

Alguns dels gens identificats com a mutats de manera recurrent són *KIT*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *RAS*, *WT1*, *BAALC*, *ERG*, *MN1*, *DNMT*, *TET2*, *IDH*, *ASXL1*, *PTPN11* i *CBL* (Taula 5). D'entre tots aquests, en destaquen *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* i *RUNX1*, per la seva associació amb la resposta al tractament i el progrés de la malaltia (13,26,56,57).

Taula 5: Mutacions genètiques recurrents en LMA *de novo* en adults. (Font: Short, 2018)

	FREQÜÈNCIA	IMPACTE PRONÒSTIC	COMENTARIS
<i>FLT3</i>	20-25% (ITD) i 5-10% (D835 TKD)	Inferior supervivència per les ITD; no està clar en el cas de TKD	Més freqüent en LMA de NK (<35%), s'associa a pitjor pronòstic la ITD amb ràtio al·lèlica alta (>0.5), el pronòstic es veu afectat quan hi ha mutacions de <i>NPM1</i> concomitants, i significat pronòstic no ben establert amb l'ús d'inhibidors de <i>FLT3</i> .
<i>NPM1</i>	~30%	Millor supervivència (en absència de ràtios altes de <i>FLT3</i> -ITD)	Més freqüent en LMA de NK (<60%), si hi ha alteracions citogenètiques no afecten el pronòstic, augmenta la incidència en pacients joves, s'observa associació amb mutacions concomitants de <i>FLT3</i> , <i>IDH1/2</i> i <i>DNMT3A</i> , i és un bon marcador per monitoritzar la malaltia residual.
<i>CEBPA</i>	~10%	Millor supervivència (només si bial·lèlic)	Més freqüent en LMA de NK (<20%), si hi ha alteracions citogenètiques no afecten el pronòstic, augmenta la incidència en pacients joves, i s'han descrit mutacions germinals amb predisposició familiar a LMA.

<i>KIT</i>	~10%	Inferior supervivència en LMA CBF	Més freqüent en LMA CBF (25-35%), pitjor pronòstic en LMA amb t(8;21) que amb inv(16).
<i>DNMT3A</i>	~20%	Dades controvertides	Més freqüent en LMA de NK (<35%), augmenta la incidència en pacients d'edat avançada, empitjora el pronòstic quan es presenta amb altres mutacions i el pronòstic varia segons el tipus de mutació i l'edat del pacient.
<i>IDH1 i IDH2</i>	5-15% (<i>IDH1</i>) i 10-20% (<i>IDH2</i>)	Dades controvertides	Més freqüent en LMA de NK (<30%) i s'associen a mutacions de <i>NPM1</i> concomitants.
<i>NRAS</i>	~15%	Dades controvertides	S'associen a mutacions de <i>NPM1</i> i <i>CEBPA</i> bial·lèlica i a la inv(16) i la inv(3), s'observen millors supervivències en casos de mutacions <i>NRAS</i> en presència de mutacions <i>NPM1</i> i <i>DNMT3A</i> .
<i>TET2</i>	5-20%	Dades controvertides	Més freqüent en LMA de NK (<25%), augmenta la incidència en pacients d'edat avançada i són mútuament excloents amb les mutacions <i>IDH1</i> i <i>IDH2</i> .
<i>ASXL1</i>	5-15%	Inferior supervivència	Augmenta la incidència en pacients d'edat avançada, i s'associa a LMA secundària que progressa d'una malaltia hematològica prèvia.
<i>RUNX1</i>	5-20%	Inferior supervivència	Augmenta la incidència en pacients d'edat avançada, s'associa a LMA secundària que progressa d'una malaltia hematològica prèvia, i s'han descrit mutacions germinals amb predisposició familiar a LMA.
<i>TP53</i>	5-20%	Inferior supervivència	Augmenta la incidència en pacients d'edat avançada, i s'associa a CK, MK i LMA secundària (a tractament o a malaltia hematològica prèvia).

Mutacions de *FLT3*:

La tirosina cinasa 3 *Fms-like* (*FLT3*), membre de la família dels receptors tirosina cinasa classe III, s'expressa a la superfície dels progenitors hematopoètics normals i en un alt percentatge de cèl·lules blàstiques de pacients amb LMA (58). Aquest receptor i el seu lligand juguen un paper molt important en la proliferació, supervivència i diferenciació de les cèl·lules progenitores hematopoètiques. La unió al seu lligand comporta una dimerització del receptor que provoca una activació de l'activitat tirosina cinasa, fet que promou la proliferació cel·lular (Figura 11) (59).

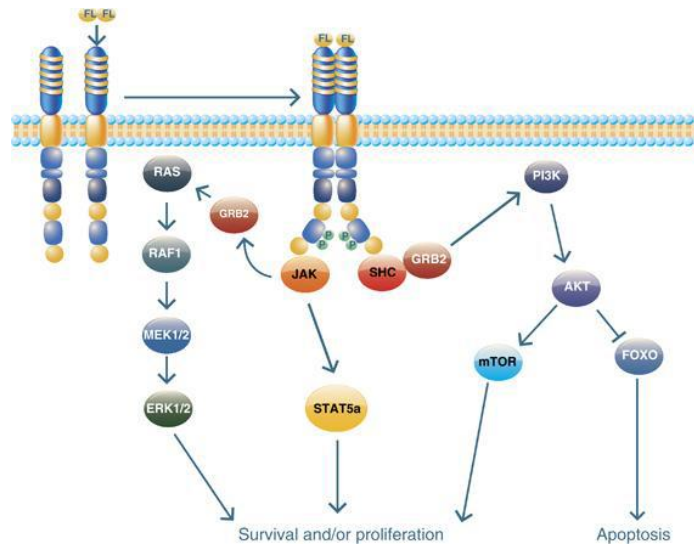


Figura 11: Vies de senyalització de FLT3 (Font: Swords *et al*, 2012).

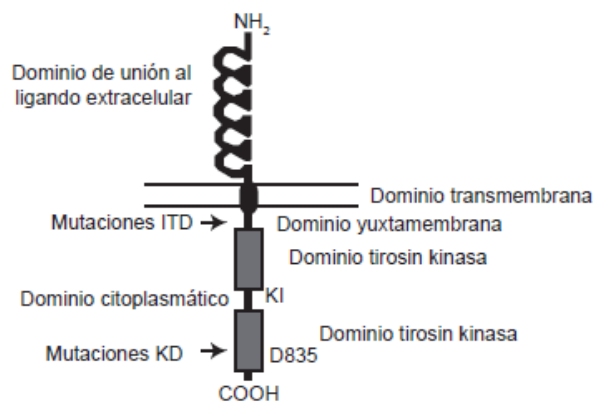


Figura 12: Estructura de FLT3 (Font: Cuervo-Sierra *et al*, 2012).

Aproximadament el 25% de les LMA presenten duplicacions internes en tàndem (ITD) del gen *FLT3* que afecten als exons 11 i 12 d'aquest gen localitzat en el cromosoma 13q12, zona que codifica pel domini juxtamembrana (JM) de la proteïna (Figura 12). Aquestes alteracions acostumen a ser una inserció de la seqüència entre els aminoàcids 575 i 613 de la proteïna FLT3. Les duplicacions poden ser de mides variables, s'han descrit duplicacions entre 3 i 400 parells de bases, i la seva posició exacta difereix entre els casos (60). Les ITD comporten una dimerització i una activació constitutiva del receptor en absència del seu lligand (61), i per tant, una activació de les vies de senyalització intracel·lular amb el consegüent augment de la proliferació cel·lular i inhibició de l'apoptosi. Aquesta alteració és detectada més freqüentment en pacients amb LMA i cariotip normal, i gairebé tots els estudis coincideixen en considerar com factor pronòstic advers la presència de mutacions de *FLT3*-ITD (62-64). Alguns estudis han suggerit també que el nombre de mutacions trobades en cada pacient o

la llargada dels segments duplicats podrien també ser importants pel pronòstic de la LMA (63,65), però aquests fets no han estat validats per estudis posteriors (66). El que sí s'ha demostrat és que no només influeix la presència de les ITD, sinó també la seva quantitat (calculada com a ràtio entre al·lel mutat i al·lel germinal o *wild-type*). Així, s'observa que els pacients amb LMA de risc citogenètic intermedi i una ràtio de *FLT3*-ITD baixa (<0.5) presenten una supervivència global comparable a la dels pacients amb LMA sense mutació *FLT3*-ITD (67). Anàlisis multivariants confirmen que elevats valors de ràtio mutat/*wild-type* són un factor de pronòstic independent (68).

Posteriorment a la identificació de les *FLT3*-ITD en pacients diagnosticats de LMA, es va reportar la presència de mutacions activadores que afectaven al codó 835 del segon domini tirosina cinasa (TKD) del gen *FLT3* (Figura 12) (69). S'ha demostrat una incidència d'aquestes mutacions en aproximadament el 7% dels pacients amb LMA. Aquestes mutacions provoquen una activació constitutiva de la proteïna (68). El significat pronòstic de les mutacions *FLT3*-D835 en les LMA és més controvertit i no sembla que confereixin mal pronòstic en els pacients de risc citogenètic intermedi o NK (70–72).

Mutacions de *NPM1*:

S'han descrit com un dels canvis genètics més freqüents en les LMA, ja que es troben en un 35% dels pacients amb LMA i aproximadament en el 50-60% de les LMA amb NK (73,74). El gen *NPM1* es troba en el cromosoma 5q32 i codifica per a una proteïna llançadora entre el nucli i el citoplasma que, entre d'altres funcions, modula factors de transcripció supressors de tumors. S'han descrit diversos tipus de mutacions que consisteixen en petites insercions o delecions d'entre 4 i 10 parells de bases en l'exó 12 del gen. Totes elles comporten un canvi en la pauta de lectura del gen que dona lloc a una proteïna variant que s'acumula al citoplasma i no desenvolupa la seva funció (75,76). Aquestes mutacions s'associen a un pronòstic relativament favorable en pacients amb NK que no tenen mutacions *FLT3*-ITD o bé amb ràtio al·lèlica *FLT3*-ITD/WT baixa (77,78). Tot i que la majoria d'estudis s'han centrat en la LMA de NK, també s'ha analitzat l'impacte de les mutacions *NPM1* en pacients amb alteracions citogenètiques. S'ha vist que en els casos amb un cariotip de risc intermedi i en absència de *FLT3*-ITD les mutacions *NPM1* també confereixen una millor supervivència (34,79). Per altra banda, un estudi recent ha posat de manifest que, en pacients amb un cariotip de risc advers sense mutació *FLT3*-ITD concomitant o amb ràtio al·lèlica baixa, la presència de mutacions de *NPM1* no compensa l'impacte negatiu de les alteracions citogenètiques adverses (80).

Mutacions de *CEBPA*:

S'han descrit en un 9% de les LMA i, en concret, en un 5-14% de les LMA amb NK (81,82). El gen *CEBPA* es troba en el cromosoma 19q13.1 i codifica per un factor de transcripció implicat en la diferenciació cel·lular. Les mutacions en causen la pèrdua de funció i el consegüent bloqueig de la diferenciació i maduració granulocítica. Hi ha dos tipus de mutacions de *CEBPA*: les que es produeixen en la regió N-terminal del gen, que condueixen a la formació d'una proteïna més curta, i les de la part C-terminal, que afecten a la regió d'unió al DNA. Els pacients amb LMA poden presentar una de les dues mutacions o les dues mutacions alhora, generalment en al·lels diferents. Diversos estudis han demostrat que tan sols els doble mutats amb mutació bial·lèlica s'associen a un pronòstic favorable (82–85).

Altres alteracions moleculars en la LMA:

Més recentment, sobretot degut als estudis realitzats amb noves tècniques de seqüenciació de nova generació, s'han identificat multitud de gens implicats en la fisiopatologia de la LMA, fet que permet una millor caracterització de la malaltia (Taula 5). S'han descrit, entre d'altres, mutacions de gens supressors tumorals, com *TP53* i *WT1*, mutacions de gens implicats en vies de senyalització, com *ckIT*, *KRAS* i *NRAS*, i mutacions en gens implicats en mecanismes de regulació epigenètica, com són *IDH1*, *IDH2*, *TET1*, *TET2*, *DNMT3*, *ASXL1* i *EZH2*. La importància pronòstica d'aquestes alteracions no està ben establerta encara en tots els casos.

1.3 CLASSIFICACIÓ EN GRUPS DE RISC

L'anàlisi citogenètica en el moment del diagnòstic és un dels factors pronòstics independents més importants en pacients amb LMA. Una correcta avaluació del risc citogenètic en aquests pacients permet l'estratificació de la LMA en diferents categories i decidir la millor opció de tractament post-remissió.

1.3.1 Sistemes d'estratificació basats en la citogenètica

Els principals grups cooperatius distingeixen típicament entre tres grups de risc citogenètica: favorable, intermedi o estàndard i advers. Tanmateix, s'observen diferències notables entre els diversos sistemes de classificació (Taula 6) que impliquen diferències en les decisions terapèutiques a emprendre pel pacient. A més, aquest fet també fa difícil la comparació de resultats entre els diversos assajos clínics, concretament a l'hora de treure conclusions sobre quins grups de pacients tenen més (i menys) probabilitats de beneficiar-se d'un trasplantament al·logènic en primera RC (86).

Taula 6: Grups de risc citogenètic dels principals grups d'estudi de la LMA de l'adult. (Font: Grimwade, 2011)

Risk-group Assignment	Cytogenetic Abnormalities							
	MRC (Grimwade et al., ⁷⁰ 1998)	SWOG/ECOG ^a (Slovak et al., ¹⁷⁰ 2000)	CALGB ^b (Byrd et al., ⁶⁴ 2002)	OS	GIMEMA/AML10 (Suciu et al., ¹⁷¹ 2003)	GERMAN AMLCG (Schoch et al., ¹⁷² 2003)	HOVON/SAKK (Cornelissen et al., ⁷¹ 2007)	MRC Refined (Grimwade et al., ⁵³ 2010)
Favorable	t(15;17), t(8;21), inv(16)/t(16;16)	t(15;17), t(8;21) [lacking del(9q) and complex karyotype], inv(16)/t(16;16)/del(16q)	t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(16;16)	t(8;21), inv(16)/t(16;16), del(9q) ^c	t(8;21), inv(16)/t(16;16)	t(15;17), t(8;21), inv(16)/t(16;16)	t(8;21) with WBC <20×10 ⁹ /L and lacking adverse abn	t(15;17), t(8;21), inv(16)/t(16;16)
Intermediate	Normal karyotype, +8, +21, +22, del(7q), del(9q), structural/numerical abn	Normal karyotype, +6, +8, -Y, del(12p)	Normal karyotype, -Y, t(9;11), del(9q), +8 sole, +8 with 1 other abn, +11, +13	Normal karyotype, -Y, del(5q), loss of 7q, t(9;11), +11, del(11q), abn(12p), +13, del(20q), +21	Normal karyotype, -Y	Normal karyotype, abn other than favorable or adverse	Normal karyotype, other noncomplex abn, pts without karyotype	Normal karyotype, abn other than favorable or adverse
Adverse	abn(3q), -5/del(5q), -7 complex karyotype (>5 abn, excluding pts with favorable changes)	-5/del(5q), -7/del(7q), abn(3q), abn(9q), abn(11q), abn(20q), abn(17p), t(6;9), complex karyotype (>3 abn)	-7, +21, complex karyotype [≥3 abn, excluding t(8;21), inv(16)/t(16;16) and t(9;11)]	inv(3) or t(3;3), t(6;9), t(6;11), -7, +8 sole, +8 with 1 other abn, t(11;19) (q23;p13.1), complex karyotype [≥3 abn, excluding pts with t(8;21), inv(16)/t(16;16) and t(9;11)]	complex karyotype (unspecified), abn(3q), -5/del(5q), -7/del(7q), abn(11q23), t(6;9), abn(17p), complex karyotype [≥3 abn], favorable abn ^d	inv(3)/t(3;3), -5/del(5q), -7/del(7q), abn(11q23), del(12p), abn(17p), complex karyotype (>3 abn)	abn(3q), -5/del(5q), -7/del(7q), abn(11q23), t(6;9), t(9;22), complex karyotype (>3 abn), pts with intermediate cytogenetics with a late CR, reached after cycle II of induction	abn(3q) [excluding t(3;5)], inv(3)/t(3;3), add(5q)/del(5q)-5, add(7q)/del(7q)-7 (excluding pts with favorable karyotype), t(6;11), t(10;11), t(11q23) [excluding t(9;11) and t(11;19)], t(9;22), -17/abn(17p), complex karyotype (>4 abn, excluding pts with favorable or adverse changes)

Abbreviations: CALGB, Cancer and Leukemia Group B; CIR, cumulative incidence of relapse; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; MRC, Medical Research Council; OS, overall survival; abn, abnormality; pts, patients; SWOG, Southwest Oncology Group.

^a All other, unclassified abnormalities were considered to have unknown risk.

^b Abnormalities not specified as conferring favorable, intermediate, or adverse risk were not included in the risk assessment model.

^c Favorable for a group of 13 patients with del(9q) that included 6 who underwent transplantation off protocol; intermediate for nontransplanted patients treated with chemotherapy only.

^d The abnormalities listed were denoted as "very bad." This classification also included "bad" cytogenetics, which was defined as "the presence of other abnormalities without good or very bad cytogenetic features."

La t(15;17), la t(8;21) i la inv(16) o t(16;16) es consideren de risc favorable en tots els esquemes de classificació. Tot i així, no hi ha hagut consens sobre la rellevància pronòstica de les anomalies citogenètiques addicionals en pacients amb leucèmia *CBF* (Taula 6). En particular, el grup SWOG exclou de la categoria de risc favorable aquells pacients en què la t(8;21) es produeix dins del context d'un CK (definit com a 3 o més anomalies) i/o aquells en els quals hi ha una deleció del cromosoma 9 [del(9q)]. L'exclusió dels pacients amb del(9q) es basa en un estudi amb pocs pacients en el qual es va veure que els pacients amb t(8;21) i del(9q) tenien un pitjor pronòstic (55). Tanmateix, aquest fet no s'ha demostrat en posteriors estudis de sèries molt més grans de pacients (34,35,87,88). Tampoc s'ha confirmat que el CK afecti negativament als pacients *CBF* (34,35). El grup SWOG també classifica la del(16q) com a risc favorable al costat de la inv(16), possiblement degut a una mala interpretació citogenètica d'una t(16;16) i per tant amb reordenació *CBFB::MYH11* (86).

El NK es presenta entre el 40% i el 45% dels casos de LMA en adults d'entre 16 i 60 anys i, en general, aquests pacients tenen un pronòstic intermedi. No obstant això, la LMA de NK és molt heterogènia a nivell molecular i és per això que l'anàlisi de mutacions és imprescindible avui en dia per a una correcta estratificació del risc en aquest grup (89,90).

Hi ha diverses anomalies cromosòmiques considerades universalment de mal pronòstic, com les delecions i monosomies dels cromosomes 5 i 7, o la inv(3) i la seva homòloga t(3;3). En canvi, hi ha menys consens sobre l'impacte pronòstic de la gran varietat d'anomalies recurrents en la LMA, tant estructurals com numèriques, i que es classifiquen en les categories de pronòstic intermedi o advers segons cada sèrie de pacients analitzada (Taula 6). També hi ha diferències significatives en la categorització del risc d'algunes de les entitats citogenètiques més infreqüents, que poden ser degudes a la mida insuficient de la mostra de pacients per a obtenir dades fiables de supervivència i resposta al tractament, o bé a les diferències de tractament rebut entre els pacients d'un mateix estudi o entre estudis diferents.

Una altra controvèrsia important fa referència a la definició de CK. Com s'ha comentat prèviament, la majoria de grups consideren CK el que inclou 3 o més anomalies no relacionades (excloent en la majoria dels casos la t(15;17) i les *CBF*), mentre que el MRC en la seva última revisió al 2010 defineix CK a partir de 4 o més anomalies (34).

Amb aquestes diferències observades entre grups es fa evident que seria molt útil aconseguir una estandardització global de l'estratificació del risc citogenètic de la LMA. Això facilitaria el desenvolupament de nous enfocaments terapèutics més optimitzats i permetria la intercomparació més fiable dels resultats dels diversos grans grups internacionals de tractament.

1.3.2 Sistemes d'estratificació que combinen alteracions citogenètiques i moleculars

La caracterització molecular dels pacients amb LMA ha crescut ràpidament en els darrers anys, degut en gran mesura a la necessitat de conèixer la genètica que hi ha al darrera de les LMA amb NK. Actualment, tenint en compte l'impacte d'alguns dels marcadors moleculars sobre el pronòstic de la LMA i la seva utilitat en el seguiment de la malaltia mínima residual, les principals guies europees (ELN -European Leukemia Net- i MRC) (Taules 7 i 8) i americanes (NCCN -National Comprehensive Cancer Network-) (Taula 7) es basen en classificacions pronòstiques de la LMA en les que es correlacionen les alteracions citogenètiques i les moleculars més rellevants (42,91,92). Aquests models inclouen l'estat mutacional de gens com *NPM1*, *FLT3-ITD*, *CEBPA* (bial·lèlic), *RUNX1*, *ASXL1* i *TP53*.

Taula 7: Classificació pronòstica de la ELN 2017 (guies europees) i del NCCN (guies americanes Tallman *et al*, 2019)

GRUP DE RISC	ANOMALIA CITOGENÈTICA/MOLECULAR
FAVORABLE	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1::RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB::MYH11</i> Mutació de <i>NPM1</i> sense <i>FLT3-ITD</i> o amb <i>FLT3-ITD</i> ràtio baixa (<0.5) Mutació bial·lèlica de <i>CEBPA</i>
INTERMEDI	Mutació de <i>NPM1</i> i <i>FLT3-ITD</i> ràtio alta <i>NPM1</i> no mutat sense <i>FLT3-ITD</i> o amb <i>FLT3-ITD</i> ràtio baixa (<0.5) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3::KMT2A</i> Alteracions citogenètiques no classificades de risc favorable ni advers
ADVERS	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3); reordenaments de <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR::ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> -5 o del(5q); -7; -17/alteracions 17p Cariotip complex (≥3 anomalies no relacionades), cariotip monosòmic <i>NPM1</i> no mutat i <i>FLT3-ITD</i> ràtio alta (>0.5) Mutacions de <i>RUNX1</i> Mutacions d' <i>ASXL1</i> Mutacions de <i>TP53</i>

Taula 8: Classificació pronòstica més recent de MRC (Grimwade *et al*, 2016). Cytogenetic and molecular genetic abnormalities conferring independent prognostic information in younger adults with AML

GRUP DE RISC	ANOMALIA CITOGENÈTICA/MOLECULAR
FAVORABLE	t(15;17)(922;q21)/PML::RARA t(8;21)(922;q22)/RUNX1::RUNX1T1 inv(16)(p139q22)/(16;16)(p13;q22)/CBFB::MYH11 Mutació de NPM1 (en absència de FLT3-ITD ni mutacions de DNMT3A) Mutació bial·lèlica de CEBPA
INTERMEDI	Anomalies citogenètiques/moleculares no classificades com a favorables o adverses
ADVERS	En absència d'anomalies citogenètiques/moleculares de risc favorable: Alt(3q) (excloent t(3;5)(q21-25;q31-35)/NPM1::MLF1], inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)/GATA2/EVI1 add(5q)/del(5q), -5 t(5;11)(q35;p15.5)/NUP98::NSD1 t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP214 add(7q)/del(7q), -7 t(11q23) (excloent t(9;11)(p21-22;q23) i t(11;19)(q23;p13)] t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL - 17/alt(17p)/mutacions de TP53 Cariotip complex (≥4 anomalies no relacionades) Mutacions d'ASXL1 Mutacions de DNMT3A FLT3-ITD MLL-PTD Mutacions de RUNX1

L'estratificació pronòstica actual no és trivial però els sistemes actuals d'estratificació del risc encara estan relativament simplificats. No incorporen paràmetres clínics ni específics del pacient i es poden trobar interdependències entre algunes alteracions genètiques. Alguns estudis han suggerit que els anàlisis de l'expressió gènica i de metilació de l'ADN també poden proporcionar informació pronòstica complementària (27).

Dissenyar un sistema d'estratificació de risc únic i universal que tingui en compte la influència de tots els paràmetres possibles és un repte difícil o impossible. La solució a aquest problema pot trobar-se en l'estratificació personalitzada del risc en cada pacient.

2. HIPÒTESI

1. L'anàlisi citogenètica en el moment del diagnòstic de les LMA és essencial per determinar el pronòstic i la decisió terapèutica en els pacients inclosos en els protocols de tractament del grup CETLAM (Grupo Cooperativo de Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias).
2. Les alteracions cromosòmiques poden classificar-se en diferents grups pronòstic ben definits. Aquest fet juntament amb el tractament homogeni rebut per tots els pacients permetrà establir les categories de risc citogenètica pròpies del grup CETLAM.

3. OBJECTIUS

L'objectiu general de la tesi és la descripció de les alteracions citogenètiques de la LMA i l'anàlisi del seu valor pronòstic en pacients inclosos en tres protocols consecutius de tractament del grup CETLAM (LMA-94, LMA-99 i LMA-03).

Amb aquest propòsit es plantegen els següents objectius específics:

1. Determinar la incidència, la recurrència i les característiques de les alteracions citogenètiques de les LMA incloses en aquest estudi.
2. Analitzar l'impacte pronòstic de les diverses alteracions citogenètiques recurrents, amb especial interès en els reordenaments del gen *KMT2A*.
3. Validar els *scores* pronòstics del MRC i CALGB (Alliance) en aquesta sèrie de pacients.

4. MATERIAL I MÈTODE

4.1 PACIENTS

S’ha realitzat l’estudi retrospectiu de 1417 pacients adults d’entre 15 i 70 anys, diagnosticats de LMA *de novo* (excloent LMA amb t(15;17) o reordenació *PML::RARA*) i inclosos en protocols CETLAM de quimioteràpia intensiva entre el 1994 i el 2012. El diagnòstic de la LMA es va realitzar localment a cada hospital a partir de l’anàlisi morfològica, immunofenotípica, citogenètica i molecular de mostres preferentment de medul·la òssia i segons els criteris de les classificacions de la FAB (21) i de la OMS (26). Els pacients es van incloure en el protocol de tractament CETLAM vigent en cada moment (LMA-94, LMA-99 i LMA-03) i en el qual van participar un total de 21 hospitals d’àmbit nacional (Annex A.1). Tots els protocols consistien en un esquema inicial de quimioteràpia d’inducció que incloïa idarubicina, citarabina i etopòsid (amb o sense factors estimulants de colònies granulocítiques, G-CSF), seguida d’una consolidació amb mitroxantona i altes dosis de citarabina. En els casos en que era possible, el tractament es completava amb un TPH, autòleg (n=319) o heteròleg (n=360). En els protocols LMA-99 i LMA-03, els pacients amb NK sense altres factors de risc eren candidats a auto-TPH, mentre que l’alo-TPH era l’opció per a la resta de pacients amb donant disponible. En el LMA-94, l’estratègia post-remissió (autòleg vs. alo-TPH) depenia exclusivament de la disponibilitat d’un germà compatible (Taula 9).

Taula 9: Comparativa dels esquemes de tractament dels protocols CETLAM. * índex leucocitari = xifra de leucòcits en SP x (% blasts en MO/100)

PROTOCOLS CETLAM	LMA-94	LMA-99	LMA-03
Estat	Tancat	Tancat	Tancat
Pacients	200	351	866
Edat màxima	60	60	70
Inducció	ICE	IDICE	IDICE + G-CSF
Consolidació	Mitoxantrona-IDAC	Mitoxantrona-IDAC	Mitoxantrona-IDAC + G-CSF
Estratificació segons el risc	Citogenètica	Citogenètica i cicles per a la RC	Citogenètica, cicles per a la RC, índex leucocitari*, <i>FLT3</i> , <i>KMT2A</i> o MMR
Pronòstic favorable	ADAC	ADAC	ADAC ± Auto-TPH
Pronòstic intermedi	Auto o Alo	Auto-TPH	Auto-TPH
Pronòstic desfavorable	TPH (assignació biològica)	Alo-Auto (assignació biològica)	Auto o Alo
Transplantament	Auto de MO Alo-DE	Auto de PHSP Alo-DE	Auto de PHSP Alo-DE Alo-DNE (mieloablatiu)

Per a l'estudi de l'impacte pronòstic de les diverses translocacions del cromosoma 11q23 que impliquen el gen *KMT2A*, degut a la baixa freqüència en la que es troben, es va necessitar una sèrie més gran de pacients. Es van sol·licitar les dades clínic-biològiques dels pacients amb aquestes translocacions al GCECGH (Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica) de la SEHH. Per a l'anàlisi de supervivència es van escollir aquells pacients que havien estat tractats amb protocols de quimioteràpia intensiva similars de manera que fossin comparables. El tractament consistia en una etapa d'inducció amb idarubicina i citarabina seguida d'una consolidació amb idarubicina o mitoxantrone més citarabina. El tractament es completava quan era possible amb un TPH autòleg o heteròleg.

Els protocols de tractament van ser aprovats pels comitès ètics de cada institució participant i tots els pacients inclosos van signar el consentiment informat prèviament al tractament quimioteràpic d'acord amb les directrius de cada centre.

4.2 MOSTRES

Per a l'anàlisi citogenètica i molecular s'ha utilitzat mostra fresca de medul·la òssia. La mostra de medul·la òssia s'obté mitjançant aspiració per punció a nivell esternal o de cresta ilíaca posterior-superior. Per a realitzar l'estudi citogenètic la mostra es recull en un tub cònic de centrífuga que conté medi de transport (5mL de medi RPMI-1640 i heparina sòdica al 1%) o bé directament en un tub d'heparina (liti o sòdica). Per a l'estudi molecular es recull la mostra en un tub EDTA.

En els casos en que no va ser possible obtenir mostra de medul·la òssia l'estudi es va realitzar a partir de sang perifèrica si hi havia una infiltració per cèl·lules blàstiques de més d'un 10%. Aquesta mostra s'obté mitjançant una punció venosa convencional. S'extreuen entre 2 i 5 mL de sang i es recullen en un tub d'heparina Li o Na per a l'estudi citogenètic i en un tub EDTA per al molecular.

4.3 ANÀLISI CITOGENÈTICA

L'anàlisi citogenètica consisteix en l'estudi de les alteracions cromosòmiques presents en les cèl·lules leucèmiques ja sigui a partir de l'anàlisi del cariotip o mitjançant sondes de FISH. El cultiu i processament de les mostres per a l'obtenció de metafases, així com també l'anàlisi, pot dur-se a terme de manera manual o bé automatitzada depenent dels recursos de cada laboratori de citogenètica; sense que aquest fet repercuteixi en el resultat final. De la

mateixa manera, les unitats de mesura descrites a continuació són aproximades, ja que cada laboratori citogenètic de referència les adapta per a optimitzar la qualitat dels seus resultats finals.

Cultiu i processament de les mostres

Per a l'estudi citogenètic (Figura 13) de LMA es realitzen cultius de 24h sense estimular a partir de les mostres de medul·la òssia o sang perifèrica. S'afegeixen entre 0.1 i 0.5 mL de mostra a un flascó de cultiu que conté medi RPMI-1640 (70%) suplementat amb sèrum bovi fetal al 20%, 2% d'antibiòtic (penicil·lina i estreptomicina), 2% de L-glutamina i 1% d'heparina sòdica. Els cultius es preparen i es sembren en condicions estèrils dins d'una campana de flux laminar i s'incuben a 37°C *overnight* en un incubador al 5% de pressió de CO₂ i una humitat del 90%.

L'endemà, s'afegeix al cultiu un fàrmac antimitòtic (colquicina o Colcemid®) que atura la divisió cel·lular en metafase interferint en la formació dels microtúbuls. D'aquesta manera s'aconsegueix una major quantitat de metafases per a l'anàlisi. Es deixa actuar durant 20 minuts a 37°C i es procedeix a sacrificar el cultiu.

La mostra en cultiu es traspassa a un tub cònic i es centrifuga durant 7 minuts a 1.700rpm. S'extreu el sobrenedant i es ressuspèn el sediment cel·lular obtingut. A continuació s'afegeixen 7-10mL de solució hipotònica (KCl 0.075M) temperada a 37°C i s'incuba durant 30 minuts a 37°C. Per òsmosi, les cèl·lules s'inflen i es tensiona la membrana citoplasmàtica; els cromosomes dins la cèl·lula tenen més espai i es separen entre ells. A més, els eritròcits es lisen. Posteriorment, s'afegeixen 10 gotes de fixador Carnoy (metanol + àcid acètic glacial en proporció 3:1). Es centrifuga, s'extreu el sobrenedant i es ressuspèn el botó cel·lular amb fixador. Aquest procés de fixació amb solució Carnoy es repeteix 3 vegades fins l'obtenció d'un botó cel·lular blanc o net. La solució Carnoy trenca la membrana citoplasmàtica, fixa els cromosomes en el fus cromàtic i, amb els successius rentats, fa que s'eliminin del sediment final les membranes i restes citoplasmàtiques, obtenint així les metafases i els nuclis cel·lulars (cèl·lules en interfase).

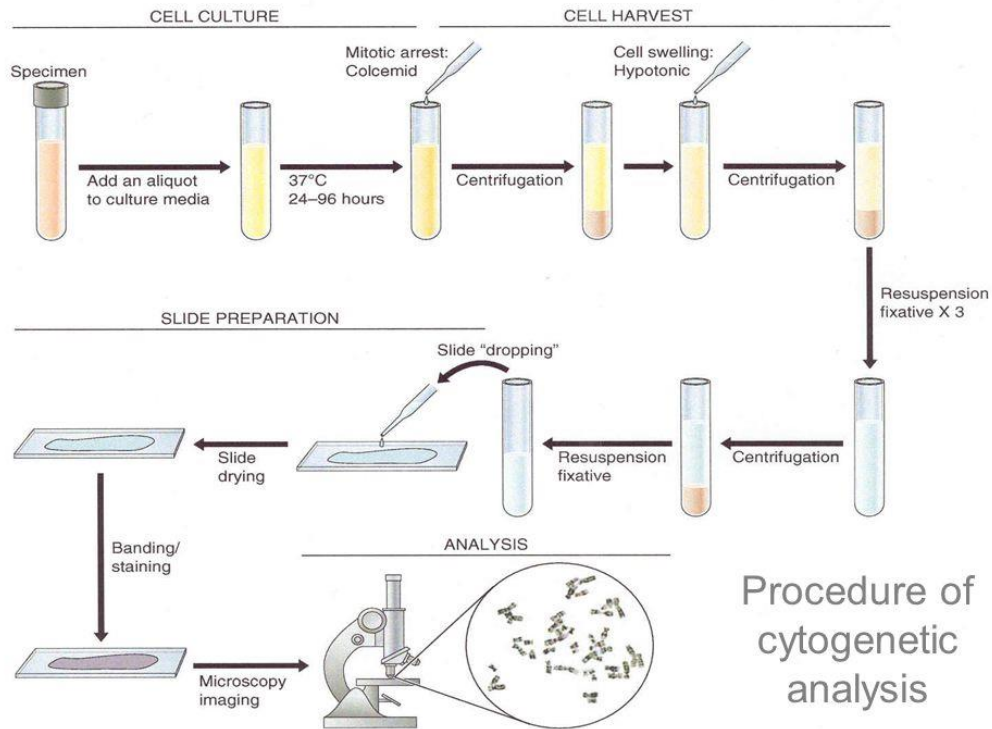


Figura 13: Procediment tècnic per a l'obtenció de metafases i bandes G. (Font: Yanming Zhang)

El procés prèviament descrit pot ser automatitzat. L'aparell anomenat HANABI-PII Metaphase Chromosome Harvester (ADS Biotec) té capacitat per processar fins a 24 mostres simultàniament. Amb l'automatització s'aconsegueix uniformitat en el processament de les mostres i per tant una millora en la qualitat de les metafases quan es treballa amb un gran volum de mostres (Figures 14 i 15).



Figura 14: Aparell HANABI PII de processament automàtic de mostres per a l'anàlisi citogenètica.

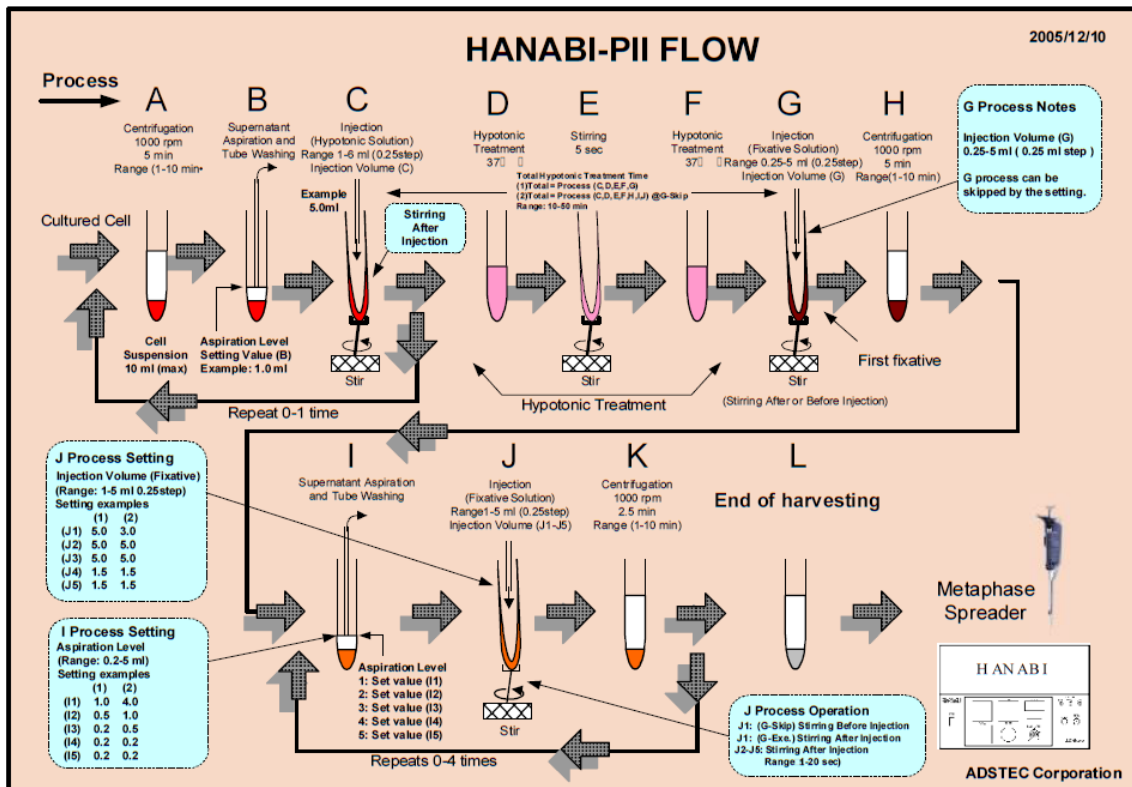


Figura 15: Flux de treball de l'equip HANABI PII.

Preparació de les extensions i tinció

El sediment obtingut es ressuspèn amb unes gotes de fixador fins obtenir una concentració adient i per a realitzar una extensió sobre portaobjectes amb un nombre i qualitat de metafases òptim per a l'anàlisi. Es realitzen les extensions a mà alçada sobre portaobjectes desengreixats prèviament en metanol fred. Es deixen assecar a l'aire o sobre una placa calenta a 37°C i es valora la qualitat de l'extensió i de les metafases en un microscopi invertit. Si es consideren de bona qualitat (cromosomes prou separats i sense restes citoplasmàtiques), les extensions s'envelleixen per temperatura dins d'una estufa. Cada laboratori adapta les seves pròpies condicions d'envelliment, però en general és a altes temperatures durant poc temps (exemple: 100°C durant 1 hora) o a la inversa (exemple: 60°C durant tota la nit). L'objectiu és mantenir l'estructura del cromosoma però debilitant la unió entre bases nitrogenades per permetre posteriorment que penetri la solució de tinció.

Finalment es realitza la tinció de les extensions anomenada tinció de bandes G, amb la qual s'obté el clàssic patró de bandes clares i fosques dels cromosomes. Les regions cromosòmiques riques en adenina i timina són més làbils perquè tenen dos ponts d'hidrogen entre les bases, mentre que les regions riques en guanina i citocina són més resistents per tenir-ne tres. Durant la tinció, el colorant penetra més fàcilment en aquelles regions del cromosoma més riques en adenina i timina (bandes fosques) i, en canvi, les regions amb més repeticions de guanina i citocina queden menys tenyides (bandes clares). Per a la tinció es diposita damunt les extensions una barreja de colorant Wright i solució Sörensen (proporció 1:3) durant 2 o 3 minuts aproximadament i, un cop transcorregut el temps indicat, es renten amb aigua. S'assequen a l'aire i estan a punt per ser analitzades al microscopi.

Estudi del cariotip

L'anàlisi cromosòmica es realitza al microscopi òptic, segons el patró de bandes G. Sempre que és possible, s'analitzen un mínim de 20 metafases per mostra i el cariotip es descriu d'acord al Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosòmica (ISCN) vigent en cada moment. Es considera un cariotip normal quan s'han analitzat 20 metafases totes elles normals i valorades, si és possible, per dos citogenetistes de manera independent. Les alteracions estructurals i les trisomies es consideren clonals quan s'observen en un mínim de dos metafases, i les monosomies quan es troben en un mínim de tres.

La majoria de laboratoris disposen d'un equip de rastreig i captura de metafases automàtic i utilitzen un software d'anàlisi cromosòmica que facilita l'estudi i descripció del cariotip (Figures 16 i 17).

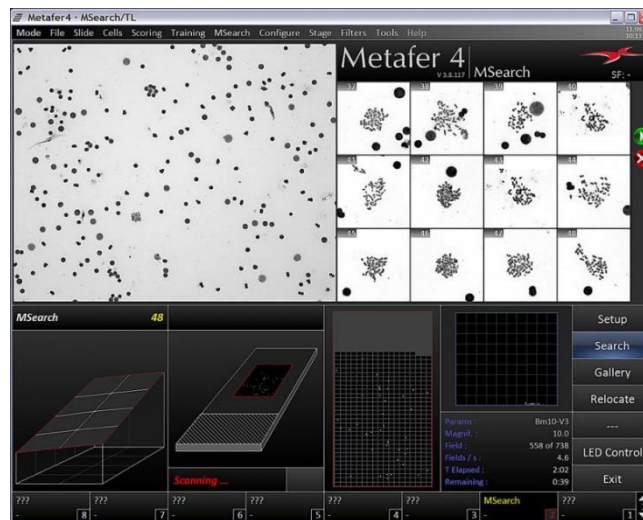
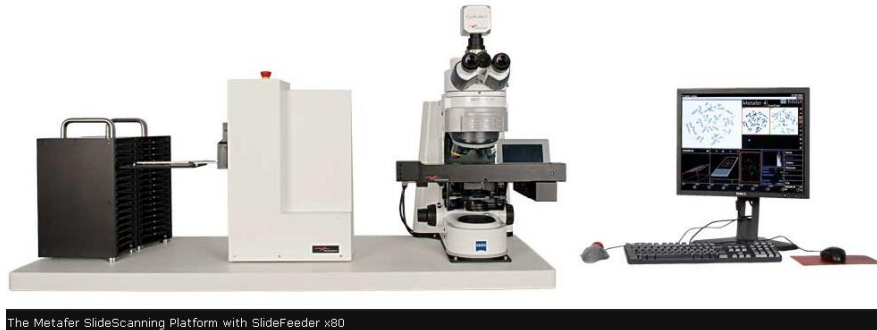


Figura 16: Exemple d'equip de cerca i captura automàtica de metafases; i imatge de la pantalla on es mostra el rastreig i les metafases que es van capturant (Metafer, Metasystems Inc., Alemanya).

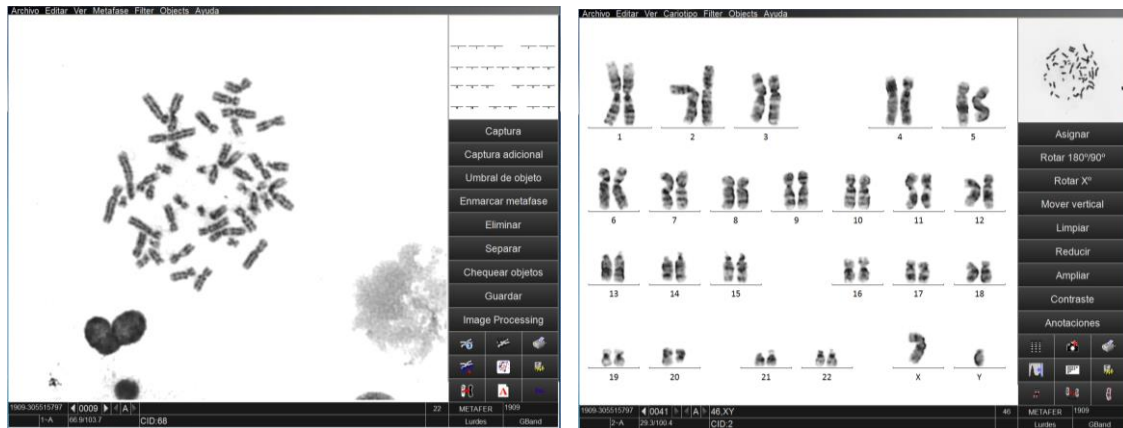


Figura 17: Exemple de software per al processament d'imatge i anàlisi del cariotip (Ikaros, Metasystems Inc., Alemanya).

Hibridació in situ fluorescent (FISH)

L'anàlisi mitjançant FISH (Figura 18) no es va realitzar en tot els casos de manera rutinària si no en aquells que requerien d'una prova complementària per a confirmar una sospita observada en el cariotip o bé per descartar alteracions críptiques o de difícil interpretació i d'importància diagnòstica en LMA.

Preparació de les extensions: Es diposita una gota de les cèl·lules fixades resultants del cultiu damunt un portaobjectes i es marca l'àrea d'hibridació amb un llapis de diamant. Es pot realitzar damunt una placa calenta per accelerar l'assecat de la gota i millorar la qualitat dels nuclis cel·lulars que es volen hibridar. En el cas de voler analitzar la FISH sobre les metafases prèviament cariotipades, es recuperen les extensions de l'estudi citogenètic de bandes G, s'elimina l'oli d'immersió amb un rentat en xylol i es destenyeixen amb solució Carnoy, un o dos minuts fins que desapareix completament la tinció.

Preparació de la sonda: Es descongela la sonda a temperatura ambient i protegida de la llum. Per a cada àrea d'hibridació de 18x18mm es necessiten 5µL de sonda, ja sigui d'un preparat comercial d'ús directe o bé d'una barreja realitzada manualment que conté 3,5µL de tampó d'hibridació, 0,5µL de sonda i 1µL d'aigua destil·lada.

Hibridació: Els 5µL de sonda es dipositen sobre l'àrea del portaobjectes a hibridar, es cobreix amb un cobreobjectes de 18x18mm tos i es segella amb cola o Parafilm®. Per a realitzar la desnaturalització de l'ADN, es col·loca l'extensió damunt una placa calenta durant 3 min a 74°C i seguidament s'introdueix en una cambra humida i fosca a 37°C durant tota la nit. Tot el procés de desnaturalització i hibridació es pot dur a terme de manera manual com s'ha descrit o dins d'un forn d'hibridació.

Rentats post-hibridació i tinció de contrast: Es retira el cobreobjectes i s'introdueix el portaobjectes en la primera solució de rentat (0.4xSSC / 0.3% Tween-20 o bé NP40) a 73°C durant 2 min. Seguidament l'extensió es renta amb la segona solució (2xSSC / 0.1% Tween-20 o bé NP40) a temperatura ambient durant 10-60 segons. Els rentats post-hibridació serveixen per eliminar l'excés de sonda no unida a l'ADN de la mostra i eliminar els híbrids imperfectes. El portaobjectes es deixa escórrer a les fosques per eliminar l'excés de solució de rentat i s'apliquen 7µL de DAPI II (reactiu de contrast) damunt l'àrea d'hibridació. Finalment es cobreix amb un cobreobjectes de 24x24mm i es guarda a les fosques al congelador a -20°C.

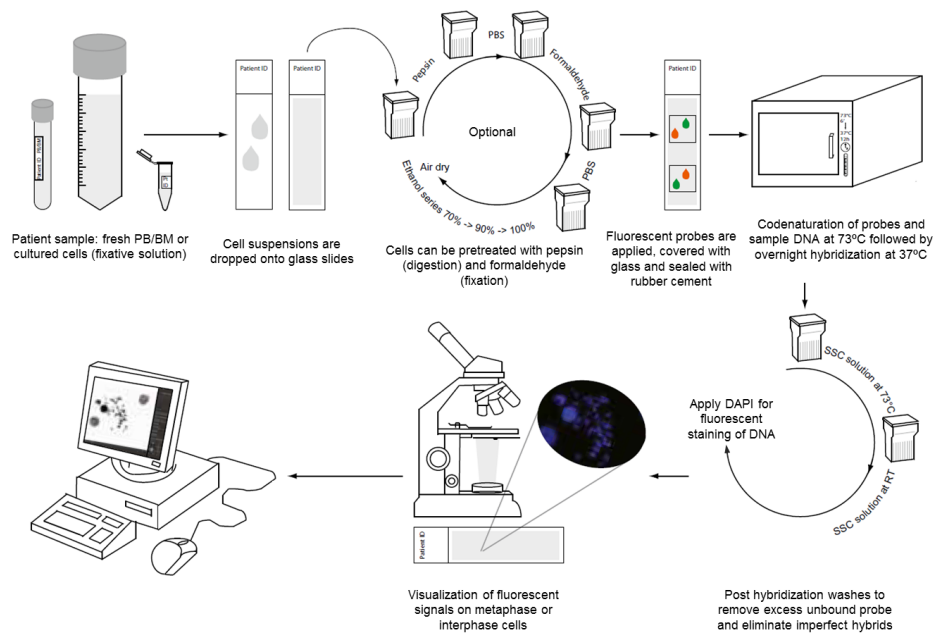


Figura 18: Procediment tècnic de la FISH (adaptat de Yanming Zhang).

Anàlisi del resultat: L'anàlisi de les senyals d'hibridació es realitza en un microscopi de fluorescència i es pot dur a terme mitjançant visualització directa al microscopi o bé de manera automatitzada (Figura 19). En cas d'estudiar nuclis interfàsics s'intenta analitzar-ne un mínim de 200, sobretot en casos de FISH normal per evitar falsos negatius. En cas d'estudiar metafases, el patró de FISH resultant ha de ser demostrat en un mínim de dues metafases. Els resultats es descriuen d'acord a la normativa ISCN vigent en cada moment [ref Shaffer et al].

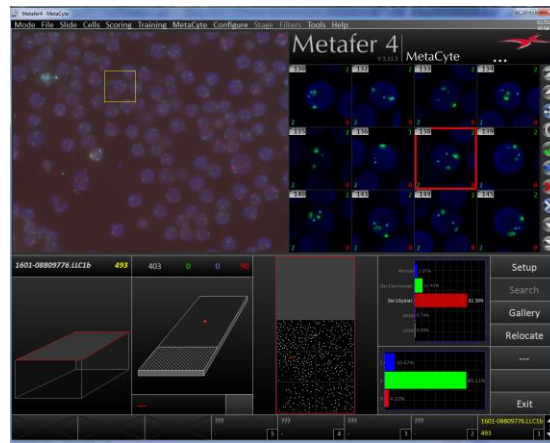


Figura 19: Exemple de software per al processament d'imatge i anàlisi de FISH (Metafer, Metasystems Inc., Alemanya).

Les sondes utilitzades per a la caracterització de les alteracions citogenètiques de les LMA han estat, principalment, les següents:

- *LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis)*: amb aquesta sonda s'han descartat possibles reordenacions críptiques de 11q23 en cariotips aparentment normals i també s'han caracteritzat els cromosomes *partner* en casos amb translocació de 11q23. Consisteix en una mescla de dues sondes que es solapen just en el punt de trencament del gen *KMT2A* i hibriden cap a la regió centromèrica del gen (la sonda marcada amb fluorocrom verd) i cap a la regió telomèrica (la marcada amb fluorocrom vermell) (Figura 20).

Interpretació dels resultats: les cèl·lules normals mostren un patró de dues senyals de fusió (2F) mentre que les cèl·lules amb reordenació a 11q23 mostren una senyal de fusió, una senyal verda i una senyal vermella (1F1G1R). El valor de tall (*cutoff*) per aquesta sonda és de 2-5% depenent de cada laboratori, tot i que en un diagnòstic de LMA el número nuclis alterats acostuma a ser alt degut a la elevada infiltració per blasts.

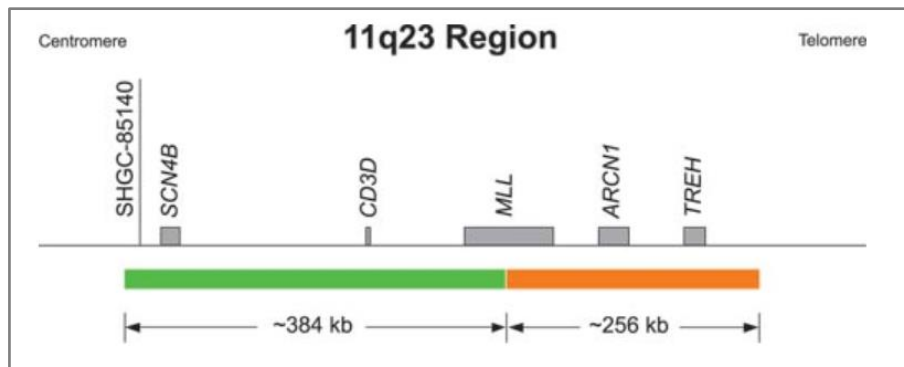


Figura 20: Esquema del disseny de la sonda LSI MLL Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) per a les reordenacions de 11q23.

- *LSI CFBF Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis)*: amb aquesta sonda s'han confirmat els casos amb inv(16)(p13q22) dubtosos per bandes G. També consisteix en dues sondes marcades amb dos fluorocroms diferents que hibriden a la regió 5' i 3' del gen *CBFB* respectivament (Figura 21).

Interpretació dels resultats: les cèl·lules normals mostren un patró 2F i les cèl·lules amb reordenació positiva del gen mostren 1F1R1G. El valor de tall també és de 2-5%.

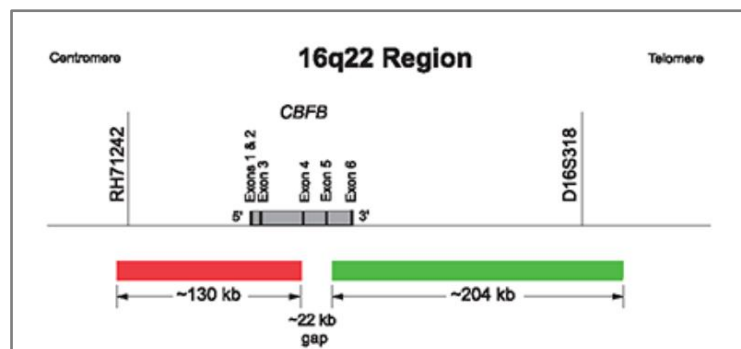


Figura 21: Esquema del disseny de la sonda LSI CFBF Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) per a la reordenació de 16q22.

- *LSI PML/RARA Dual Color Dual Fusion Translocation Probe (Vysis)*: amb aquesta sonda s'han pogut confirmar els casos amb sospita d'una translocació entre els cromosomes 15q24 i 17q21 (o reordenació *PML::RARA*) i s'han exclòs així de la sèrie global de pacients. Consisteix en dues sondes marcades amb fluorocroms diferents que hibriden la regió 15q22-24 (que inclou el gen *PML*) i la regió 17q21 (que inclou *RARA*) respectivament. Les sondes es dissenyen amb un petit *gap* coincident amb el punt de trencament del gen, de manera que quan el gen es reordena, les sondes es divideixen en dues meitats (Figura 22).

Interpretació dels resultats: les cèl·lules normals mostren un patró de dues senyals vermelles i dues verdes (2R2G) mentre que les cèl·lules amb una t(15;17) estàndard mostren dues senyals de fusió, una senyal verda i una senyal vermella (2F1R1G).

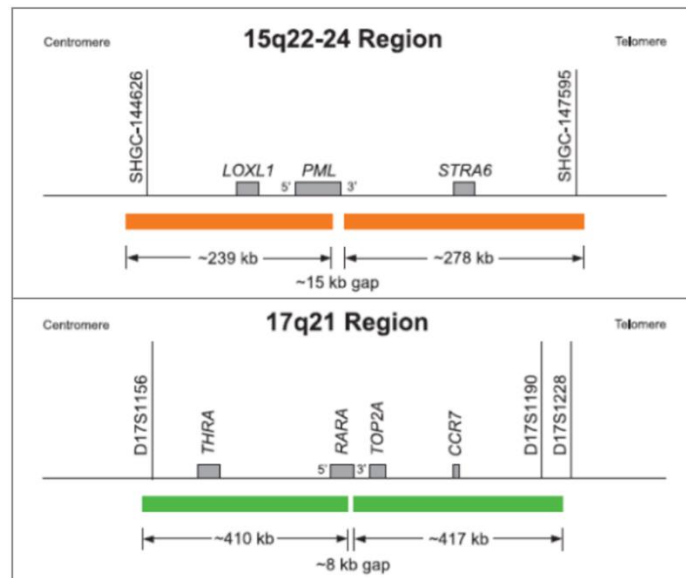


Figura 22: Esquema del disseny de la sonda LSI PML/RARA Dual Color Dual Fusion Translocation Probe (Vysis) per a la t(15;17)(q24;q21).

4.4 ANÀLISI MOLECULAR

Extracció d'àcids nucleics

L'extracció d'àcids nucleics es realitza a partir d'una mostra de medul·la òssia amb EDTA com anticoagulant. Els eritròcits de la mostra es lisen amb un tampó a base de clorur sòdic que permetrà obtenir pellets cel·lulars després de diversos rentats i centrifugacions. Aquests pellets es guarden a -20°C amb una solució estabilitzadora d'àcids nucleics. L'extracció de l'ADN és automatitzada i es realitza mitjançant un robot extractor d'àcids nucleics (Qiacube, de Qiagen) que utilitza la tecnologia de columnes de silicagel. Finalment es valora la qualitat de l'ADN extret en un espectrofotòmetre (tipus *nanodrop*). Les *ratios* d'absorbància amb les que es mesura la qualitat de l'ADN (Abs260/230 i Abs260/280) han d'estar al voltant de 2 per a ser òptimes i prosseguir amb els estudis moleculars.

Marcadors moleculars

Hi ha diverses alteracions moleculars que són essencials per a definir el pronòstic de la LMA dins del grup de pacients amb cariotip normal. Les següents alteracions són les que s'han utilitzat per a la caracterització molecular dels pacients de la sèrie estudiada.

Detecció de les duplicacions internes en tàndem del gen *FLT3*: El fragment de l'exó 11 fins al 12 del gen *FLT3* s'amplifica utilitzant els primers descrits prèviament per Nakao (60). La reacció d'amplificació es du a terme en les següents condicions: 1µL d'ADN, 1µL de cada primer *forward* i *reverse* (12.5µM), 5µL de Buffer PCR (10X), 1.5µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de dNTPs (10mM) i 0.4µL de Taq Polimerasa (5U/µL); i ajustant el volum a 50µL amb aigua destil·lada. Seguidament les mostres s'introdueixen al termociclador i, després d'una desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C, es repeteixen 35 cicles de les següents etapes d'amplificació: etapa de desnaturalització de 45 segons a 94°C, hibridació durant 45 segons a 56°C i 45 segons d'amplificació a 72°C. Finalment les mostres s'estan 7 minuts a 72°C i després es mantenen a 4°C fins a la seva utilització.

El producte de PCR es va analitzar en un gel d'agarosa amb bromur d'etidi. La imatge que s'obté en els pacients que no presenten cap duplicació és una única banda de 333pb, mentre que en els portadors d'alguna duplicació es veu la banda normal (333pb) i una altra superior, la mida de la qual pot ser variable (entre 3 i 400pb més) (Figura 23).

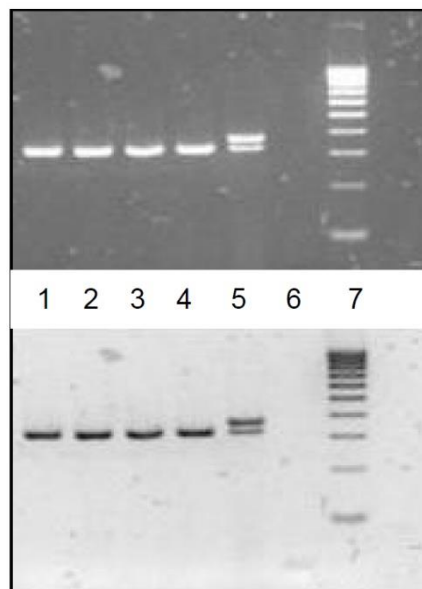


Figura 23: Gel d'agarosa on els quatre primers pous corresponen a pacients FLT3-ITD negatius, en el cinquè pou hi ha el control positiu (pacient FLT3-ITD+) i al sisè el control negatiu. El pou núm. 7 correspon al marcador de pes molecular.

Detecció de les mutacions del gen *NPM1*: Per determinar la presència de mutacions en l'exó 12 del gen *NPM1*, es van utilitzar els primers descrits prèviament per Gale (66). La reacció

d'amplificació es du a terme amb les següents condicions: 0.5µL d'ADN, 1.25µL de cada *primer forward* i *reverse* (10µM), 5µL de Buffer PCR (10X), 1.5µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de dNTPs (10mM) i 0.4µL de Taq Polimerasa (5U/µL); ajustant el volum a 50µL amb aigua destil·lada. Seguidament les mostres s'introdueixen al termociclador i, després d'una desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C, es repeteixen 28 cicles consistents en: etapa de desnaturalització de 45 segons a 95°C, hibridació durant 45 segons a 62°C i 45 segons d'amplificació a 72°C. Finalment les mostres s'estan 15 minuts a 72°C i després es mantenen a 4°C fins a la seva utilització.

El producte de PCR es va analitzar en un seqüenciador (AbiPrism 3130) mitjançant la funció d'anàlisi de fragments o GeneScan. En els pacients amb *NPM1* normal (*wild type*, WT) s'espera que la mida del producte amplificat sigui de 199pb, mentre que els pacients amb *NPM1* mutada presenten el pic de 199pb i un altre de 203pb (Figura 24).

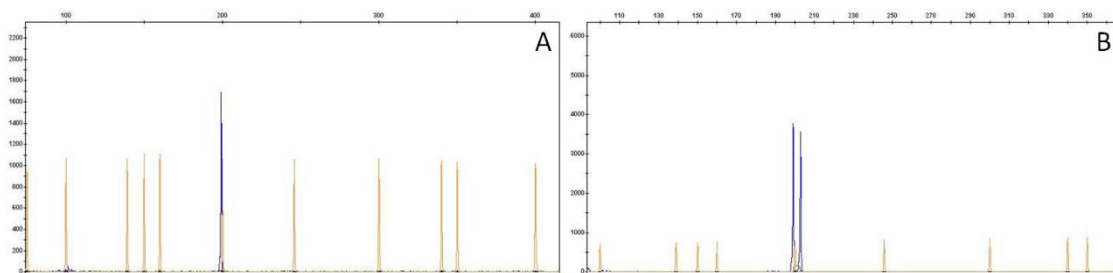


Figura 24: A. Imatge d'un pacient WT per a l'estudi de les mutacions de NPM1. B. Imatge d'un pacient mutat.

4.5 ANÀLISI DELS RESULTATS I TRACTAMENT DE LES DADES

Les dades demogràfiques, clíniques i biològiques dels pacients es van recollir en una base de dades Excel que es va anar completant i actualitzant fins al tancament del protocol CETLAM 03, l'any 2012. Pel que fa a la informació citogenètica, la base de dades tan sols recollia la fórmula cromosòmica del moment del diagnòstic de la LMA per a cada pacient inclòs. A partir d'aquí es va realitzar una primera revisió de totes les fórmules per detectar incorreccions o manca d'informació (per exemple, podia faltar el número de metafases analitzades o bé els braços cromosòmics implicats en una translocació). Es van aplicar a aquest propòsit les recomanacions i guies internacionals sobre nomenclatura citogenètica hematològica (93). D'aquesta manera, es va determinar NK quan es disposava de 20 metafases sense alteracions cromosòmiques i es van considerar anomalies clonals les

monosomies, quan es detectaven en un mínim de tres metafases analitzades, i les trisomies i les alteracions estructurals, quan es detectaven en un mínim de dues. Alhora, es van descartar com a alteracions adquirides de la LMA aquelles que es coneixen com polimorfismes de la població (per exemple la inversió pericèntrica del cromosoma 9). També es van identificar els casos amb la $t(8;21)$ o la $inv(16)$, per agrupar-los com a grup CBF, i els casos amb altres alteracions citogenètiques recurrents en la LMA. Seguidament es va analitzar el número d'alteracions de cada cas, per poder estudiar posteriorment la complexitat dels cariotips. Cada alteració que es descriu entre comes (,) en una fórmula cromosòmica es va comptar com una alteració, independentment de que fos una alteració equilibrada o desequilibrada. Finalment, també es van identificar aquells casos que complien la definició de MK (presència de dues monosomies autosòmiques o bé d'una monosomia autosòmica acompanyada d'una alteració estructural (46).

4.6 ANÀLISI ESTADÍSTICA I DEFINICIONS

Definicions

Remissió completa (RC): És el moment en el qual es detecta menys d'un 5% de blasts en l'estudi citològic de la medul·la òssia i no existeix malaltia extramedul·lar.

Recaiguda: Moment en el qual es detecta la reaparició de la malaltia després d'haver assolit una RC. Es considera recaiguda quan es detecta més d'un 5% de blasts a la medul·la òssia i amb la mateixa morfologia que al diagnòstic o bé es detecta malaltia extramedul·lar.

Supervivència global (overall survival, OS): La OS s'ha calculat des de la data en que el pacient es va incloure dins del protocol fins la data de l'última visita de seguiment registrada o bé la data d'èxitus per qualsevol causa, independentment de l'estat de la leucèmia.

Supervivència lliure de malaltia (disease free survival, DFS): La DFS s'ha definit com el temps transcorregut des de la data de RC fins la data de recaiguda o bé de mort per qualsevol causa. Els pacients que no experimenten cap dels dos esdeveniments s'han censurat a data de darrer control.

Incidència acumulada de recaiguda (cumulative incidence of relapse, CIR): La CIR s'ha calculat des de la data de RC fins a la data de recaiguda, considerant que tota mort no deguda a recaiguda és un risc competitiu.

Durada de la remissió completa (*complete remission duration*, CRD): La CRD s'ha definit com el temps transcorregut des de la data de RC fins la data de recaiguda.

Anàlisi estadística

En primer lloc, s'ha realitzat una anàlisi descriptiva de la sèrie global dels pacients inclosos a l'estudi, així com de totes les anomalies citogenètiques i marcadors moleculars. Per a les variables categòriques, s'han calculat les freqüències i percentatges mentre que, per a les variables contínues, s'ha indicat la mediana i els extrems. Per a la comparació entre grups de variables categòriques s'ha utilitzat la prova khi-quadrat de Pearson o el test exacte de Fisher.

La variable principal d'estudi ha estat la OS, i com a variables secundàries s'han considerat: la taxa de RC, DFS i CIR. Per a calcular l'estimació de la OS i DFS s'ha emprat el mètode de Kaplan-Meier i les diverses comparacions entre grups s'han realitzat mitjançant la prova de *log-rank*. En canvi, la CIR s'ha calculat amb el mètode de la funció d'incidència acumulada, considerant la mort no deguda a recaiguda com a risc competitiu. En aquest cas, les comparacions entre grups s'han realitzat mitjançant la prova de Gray.

L'anàlisi d'aquestes variables d'estudi amb les anomalies citogenètiques recurrents s'ha realitzat quan es disposava d'almenys 5 pacients (per l'anàlisi univariant) i 10 pacients (pel multivariant) amb l'alteració cromosòmica.

Per dur a terme l'anàlisi univariant de la taxa de RC, s'ha emprat el model de regressió logística binària indicant així els corresponents *odds ratio* (OR), mentre que per a les variables de supervivència (SG, DFS i CIR) s'ha indicat els *hazards ratio* (HR), utilitzant el model de Cox per a la SG i la DFS, i el model de Fine-Gray per a la CIR.

En l'anàlisi multivariant de la OS, s'han considerat candidates per a introduir al model de Cox les anomalies citogenètiques que havien estat significatives en l'anàlisi univariant prèvia, i s'ha ajustat per altres variables pronòstiques conegudes, com l'edat, el sexe, la xifra de leucòcits i el protocol de tractament rebut (CETLAM 94, 99 o 03).

Tant en l'anàlisi univariant com multivariant, les diferents anomalies citogenètiques s'han comparat amb el NK, definit com a categoria de referència.

El nivell de significació estadística s'ha establert en valors bilaterals de p inferiors a 0.05, i totes les estimacions s'han donat amb els intervals de confiança del 95% (95% CI). Tota

l'anàlisi estadística s'ha dut a terme amb els paquets estadístics SPSS versió 24 i R versió 3.5.2.

5. RESULTATS

5.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DELS PACIENTS CETLAM

La sèrie global inclou 1417 pacients adults diagnosticats de LMA *de novo* (excloent LMA amb t(15;17) o reordenació *PML::RARA*) i inclosos en protocols CETLAM de quimioteràpia intensiva entre el 1994 i el 2012. La mediana de seguiment dels pacients vius de la sèrie ha estat de 5,31 anys (extrems: 0,06 - 18,84). A la Taula 10 es resumeixen les principals característiques clíniques i biològiques dels 1417 pacients inclosos en l'estudi i la distribució dels pacients segons el tipus de LMA i risc citogenètic.

La sèrie de pacients analitzada consta de 638 (45%) dones i 779 (55%) homes amb una mediana d'edat de 50 anys (extrems: 15-70 anys). La mediana de la xifra de leucòcits va ser de $15 \times 10^9/L$ (extrems: 0.23-410), la d'hemoglobina de 89g/L (extrems:10-284) i la de plaquetes de $59 \times 10^9/L$ (extrems: 0-1105). El tipus de LMA segons la classificació de la OMS o de la FAB només s'ha pogut descriure en 861 (61%) pacients, tots ells del protocol CETLAM03, ja que anteriorment no es recollia aquesta informació.

Dels 1417 casos, el cariotip va ser valorable en 1254 (88.5%). D'aquests, 638 (51%) van ser cariotips alterats i 616 (49%) NK. En 100 casos (7%) no es van obtenir metafases suficients per a poder realitzar l'estudi citogenètic i dels restants 63 casos (4.5%) no es va poder disposar d'informació citogenètica.

Pel que fa als estudis moleculars, es va poder realitzar l'estudi de les duplicacions internes en tàndem dels exons 11 i 12 del gen *FLT3* en 1034 casos (73%), dels quals 248 (24%) van ser positius per la ITD. L'estudi de mutacions en l'exó 12 del gen *NPM1* es va poder realitzar en 690 casos (49%) dels quals 258 (37%) van presentar la mutació.

Taula 10: Característiques clíniques i biològiques dels 1417 pacients inclosos en l'estudi i distribució dels pacients segons el tipus de LMA i risc citogenètic. *percentatges sobre els casos analitzats i amb resultat valorable; **percentatges sobre els casos amb informació de citologia

CARACTERÍSTIQUES	N (%)	MEDIANA [EXTREMS]
EDAT (ANYS)		50 [15-70]
SEXE		
HOME	779 (55%)	
DONA	638 (45%)	
LEUCÒCITS (x10⁹/L)		15 [0.23-410]
HEMOGLOBINA (g/L)		89 [10-284]
PLAQUETES (x10⁹/L)		59 [0-1105]
PROTOCOL CETLAM		
1994	200 (14%)	
1999	351 (25%)	
2003	866 (61%)	
CLASSIFICACIÓ FAB/OMS**		
LMA AMB ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES RECURRENTS	130 (15%)	
LMA MÍNIMAMENT DIFERENCIADA	68 (8%)	
LMA SENSE MADURACIÓ	146 (17%)	
LMA AMB MADURACIÓ	106 (12%)	
LMA MONOCÍTICA	128 (15%)	
LMA MIELOMONOCÍTICA	143 (17%)	
LMA MEGACARIOCÍTICA	9 (1%)	
LMA AMB DISPLÀSIA MULTILÍNIA	77 (9%)	
LMA ERITROIDE	32 (4%)	
LMA NO CLASSIFICABLE	22 (3%)	
SENSE INFORMACIÓ	5 (0,6%)	
CARIOTIP		
NORMAL*	616 (49%)	
ALTERAT*	638 (51%)	
RISC CITOGENÈTIC SEGONS MRC		
FAVORABLE	177 (14%)	
INTERMEDI	866 (70%)	
ADVERS	192 (16%)	
RISC CITOGENÈTIC SEGONS CALGB (PER OS)		
FAVORABLE	177 (14%)	
INTERMEDI	690 (56%)	
ADVERS	257 (21%)	
INDETERMINAT	111 (9%)	
FLT3-ITD		
NO DUPLICAT*	786 (76%)	
DUPLICAT*	248 (24%)	
NPM1		
NO MUTADA*	432 (63%)	
MUTADA*	258 (37%)	

5.2 CARACTERÍSTIQUES DE LES ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES

S'han analitzat les fórmules cromosòmiques dels 638 casos de cariotips alterats tenint en compte el tipus d'alteracions (numèriques o estructurals), els cromosomes implicats i els braços cromosòmics afectats en el cas d'alteracions estructurals i el número d'alteracions presents en cada cas. S'han trobat alteracions numèriques i estructurals de tots els cromosomes, a excepció d'alteracions estructurals de la Y (Taula 11).

Taula 11: Frequència de totes les alteracions detectades distribuïda per cromosoma i per tipus. * Els percentatges estan calculats considerant com a denominador els cariotips avaluables (N=1254).

CROMOSOMA	DESCRIPCIÓ DE L'ANOMALIA	FREQUÈNCIA N (%)*	CROMOSOMA	DESCRIPCIÓ DE L'ANOMALIA	FREQUÈNCIA N (%)*
--	Cariotip normal	616 (49%)			
1	Monosomia	2 (<0.5%)	12	Monosomia	13 (1%)
	Alteració estructural	27 (2%)		Reord. 12p	18 (1%)
2	Trisomia	3 (<0.5%)	13	Altres	13 (1%)
	Monosomia	10 (1%)		Trisomia	5 (<0.5%)
	Alteració estructural	18 (1%)		Monosomia	8 (1%)
3	Trisomia	2 (<0.5%)	14	del13q	11 (1%)
	Monosomia	9 (1%)		Altres	9 (1%)
	inv(3)/t(3;3)	22 (2%)		Trisomia	12 (1%)
	t(3;5)	2 (<0.5%)		Monosomia	2 (<0.5%)
4	Altres	30 (2%)	15	Alteració estructural	12 (1%)
	Trisomia	4 (<0.5%)		Trisomia	5 (<0.5%)
	Monosomia	11 (1%)		Monosomia	13 (1%)
5	Alteració estructural	16 (1%)	16	Alteració estructural	13 (1%)
	Trisomia	9 (1%)		Trisomia	2 (<0.5%)
	Monosomia	20 (2%)		Monosomia	9 (1%)
6	del5q	42 (3%)	17	inv16/t(16;16)	92 (7%)
	Altres	15 (1%)		Altres	27 (2%)
	Trisomia	2 (<0.5%)		Trisomia	3 (<0.5%)
	Monosomia	6 (<0.5%)		Monosomia	25 (2%)
7	del6q	14 (1%)	18	Reord. 17p/i17	25 (2%)
	t(6;9)	19 (2%)		Altres	14 (1%)
	Altres	9 (1%)		Trisomia	1 (<0.5%)
	Trisomia	9 (1%)		Monosomia	16 (1%)
8	Monosomia	54 (4%)	19	Alteració estructural	6 (<0.5%)
	del7q	30 (2%)		Trisomia	5 (<0.5%)
	Altres	20 (2%)		Monosomia	6 (<0.5%)
	Trisomia	3 (<0.5%)		Alteració estructural	12 (1%)
9	Monosomia	7 (1%)	20	Trisomia	13 (1%)
	t(8;21)	85 (7%)		Monosomia	7 (1%)
	Altres	17 (1%)		del20q	12 (1%)
	Trisomia	94 (7%)		Altres	6 (<0.5%)
10	Monosomia	7 (1%)	21	Trisomia	5 (<0.5%)
	del9q	18 (1%)		Monosomia	12 (1%)
	Altres	14 (1%)		Alteració estructural	14 (1%)
	Trisomia	7 (1%)		Trisomia	19 (2%)
11	Monosomia	4 (<0.5%)	22	Monosomia	8 (1%)
	Alteració estructural	14 (1%)		Alteració estructural	12 (1%)
	Trisomia	6 (<0.5%)		Trisomia	14 (1%)
11	Monosomia	4 (<0.5%)	X	Monosomia	17 (1%)
	11q23	7 (1%)		Alteració estructural	7 (1%)
	del11q	12 (1%)	Y	Trisomia	3 (<0.5%)
	t(10;11)	2 (<0.5%)		Monosomia	37 (3%)
	t(11;19)	7 (1%)		Trisomia	1 (<0.5%)
	t(6;11)	5 (<0.5%)		1 anomalia	316 (55%)
	t(9;11)	9 (1%)		2 anomalies	111 (19%)
	Altres	35 (3%)		3 anomalies	40 (7%)
Trisomia	16 (1%)	4 anomalies	26 (4%)		
			Complexitat	5 o més anomalies	84 (15%)

5.2.1 Alteracions cromosòmiques numèriques

S'han analitzat detalladament els 638 casos amb cariotip alterat i s'han identificat un total de 550 aneuploidies, de les quals 243 (44%) són trisomies i 307 (56%) han estat monosomies. El següent gràfic mostra el número i la distribució de les trisomies i les monosomies segons el cromosoma concret afectat (Figura 25).

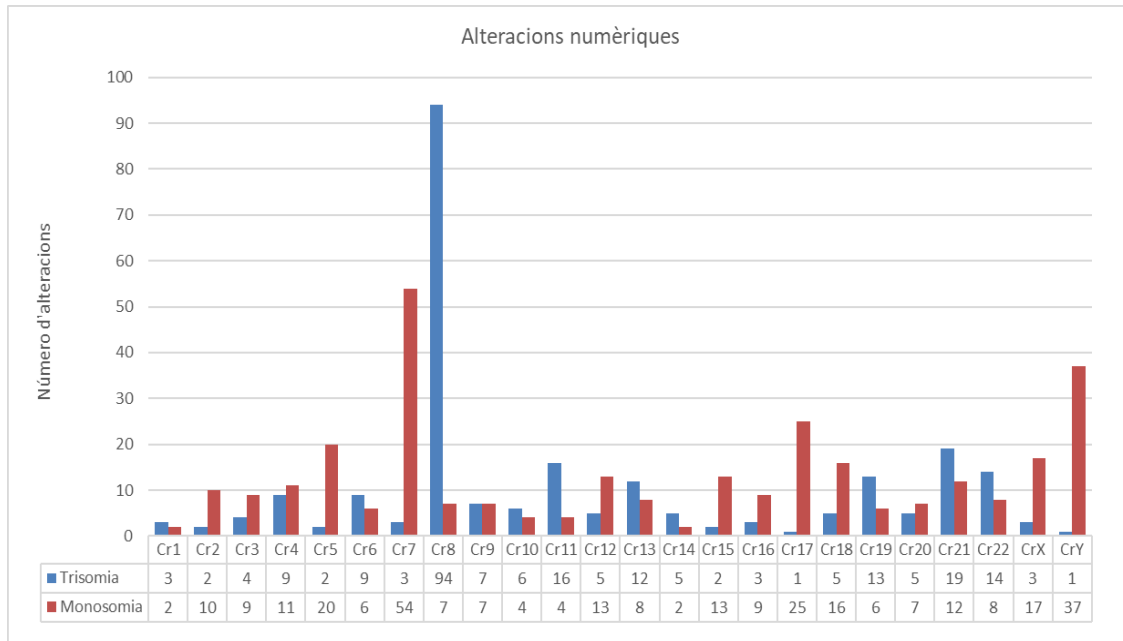


Figura 25: Gràfic del número i distribució de les aneuploidies segons el cromosoma afectat.

S'han observat tant monosomies com trisomies de tots els cromosomes autosòmics. La trisomia més freqüent ha estat la del cromosoma 8, que s'ha detectat en 94 casos (38,7% de les trisomies). Les següents trisomies més freqüents, detectades en més de 10 casos, han estat les dels cromosomes 21 (n=19; 7,8%), 11 (n=16; 6,6%), 22 (n=14; 5,8%), 19 (n=13; 5,3%) i 13 (n=12; 4,9%). Per altra banda, la monosomia més freqüent ha estat la del cromosoma 7, detectada en 54 casos (17,6% de les monosomies), i en segon lloc les monosomies 17 (n=25; 8,1%) i 5 (n=20; 6,5%). Les següents monosomies més freqüents, detectades en més de 10 casos, han estat les dels cromosomes 18 (n=16; 5,2%), 12 i 15 (ambdues n=13; 4,2%), 21 (n=12; 3,9%), 4 (n=11; 3,6%) i 2 (n=10; 3,3%). Cal destacar que tots els cromosomes tenen tendència o a guanyar-se o a perdre's, a excepció del cromosoma 21, del qual s'observen tant trisomies com monosomies en una proporció considerable.

Pel que fa a les aneuploidies dels cromosomes sexuals, pràcticament només s'observen pèrdues: 17 casos (5,5%) amb pèrdua de la X i 37 casos (12%) amb pèrdua de Y.

5.2.2 Alteracions cromosòmiques estructurals

S'han observat un total de 921 alteracions estructurals entre els 638 casos alterats. El gràfic a continuació mostra el número i la distribució de les alteracions estructurals identificades segons el cromosoma afectat i diferenciant entre alteracions equilibrades (translocacions i inversions) i desequilibrades (delecions, addicions, cromosomes derivatius i isocromosomes, principalment) (Figura 26). Tot i comptabilitzar-se més alteracions equilibrades que desequilibrades, aquest fet es deu en part a que les alteracions equilibrades són en molts casos translocacions que involucren dos cromosomes i, per tant, s'han comptabilitzat per duplicat.

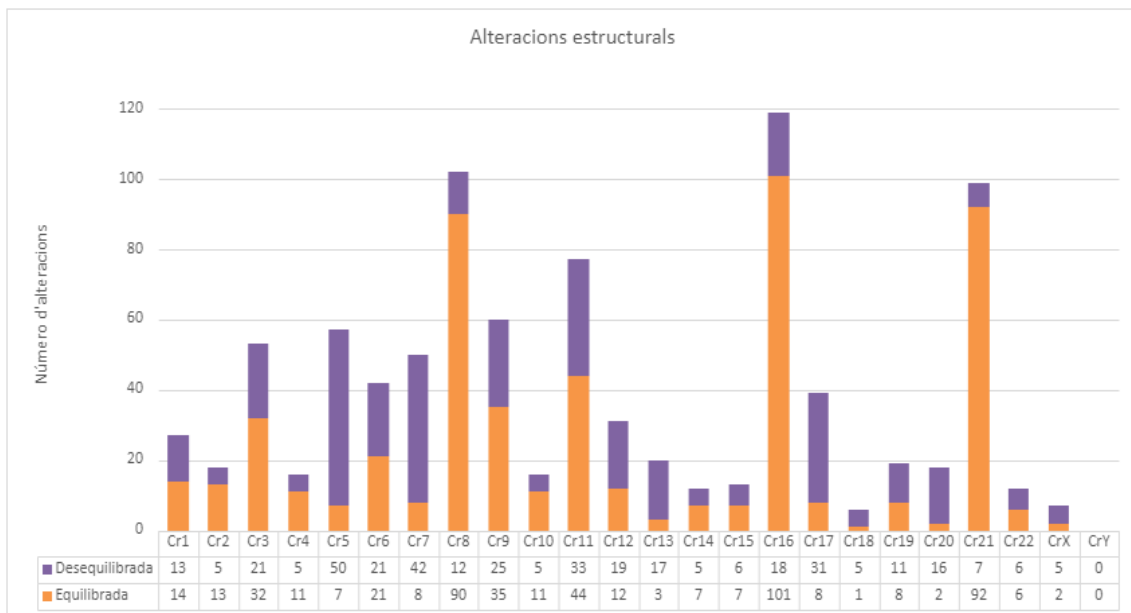


Figura 26: Gràfic del número i distribució de les alteracions estructurals segons el cromosoma afectat.

Els cromosomes més freqüentment afectats per alteracions estructurals, majoritàriament equilibrades, han estat el cromosoma 16 ($n=119$; 12,9%) degut bàsicament als casos d'inv(16)/t(16;16), el 8 ($n=102$; 11,1%) i el 21 ($n=99$; 10,7%) degut a la seva implicació en la t(8;21), i el cromosoma 11 ($n=77$; 8,4%) del qual aproximadament la meitat dels casos són reordenaments d'11q23. Altres cromosomes que també destaquen per la seva implicació en alteracions estructurals (detectats en més de 20 casos) són: el cromosoma 9 ($n=60$; 6,5%) que en més de la meitat dels casos és degut a una alteració equilibrada, el 5 ($n=57$; 6,2%) principalment afectat per les delecions del braç q, el 3 ($n=54$; 5,9%) degut a un reordenament de 3q26 en aproximadament la meitat dels casos, el 7 ($n=50$; 5,4%) en gran

mesura degut a delecions 7q, el 6 (n=42; 4,6%) que presenta tant alteracions equilibrades com desequilibrades, el 17 (n=39; 4,2%) principalment degut a alteracions desequilibrades que comporten la pèrdua del braç p, i el 12 (n=31; 3,4%) i l'1 (n=27; 2,9%) que també presenten indistintament alteracions equilibrades i desequilibrades i d'ambdós braços cromosòmics.

5.2.3 Alteracions cromosòmiques i complexitat

S'ha analitzat la distribució de les alteracions numèriques i estructurals dels diversos cromosomes en funció del grau de complexitat del cariotip (Figures 27, 28 i 29). Amb aquest propòsit, les alteracions cromosòmiques s'han distribuït en 5 grups diferents de complexitat: anomalia única o bé acompanyada per 1, 2, 3 o ≥ 4 alteracions.

Pel que fa a les alteracions numèriques, s'ha analitzat la relació amb la complexitat només d'aquelles de les que es disposa d'un mínim de 10 casos. Per una banda, s'observa que les monosomies acostumen a anar acompanyades d'altres anomalies i que la majoria de les més freqüentment observades (monosomies 4, 5, 12, 15, 17, 18 i 21) pràcticament només existeixen en context de cariotips complexes de ≥ 4 alteracions. La monosomia 7 és l'excepció, ja que també s'observa com anomalia única amb relativa freqüència. Per altra banda, les trisomies, bàsicament +8, +11 i +21, tant poden trobar-se aïllades com acompanyades per altres anomalies. En canvi, no s'ha trobat cap cas de +19 ni +22 aïllades, fet que suggereix que són alteracions acompanyants o secundàries enlloc de primàries.

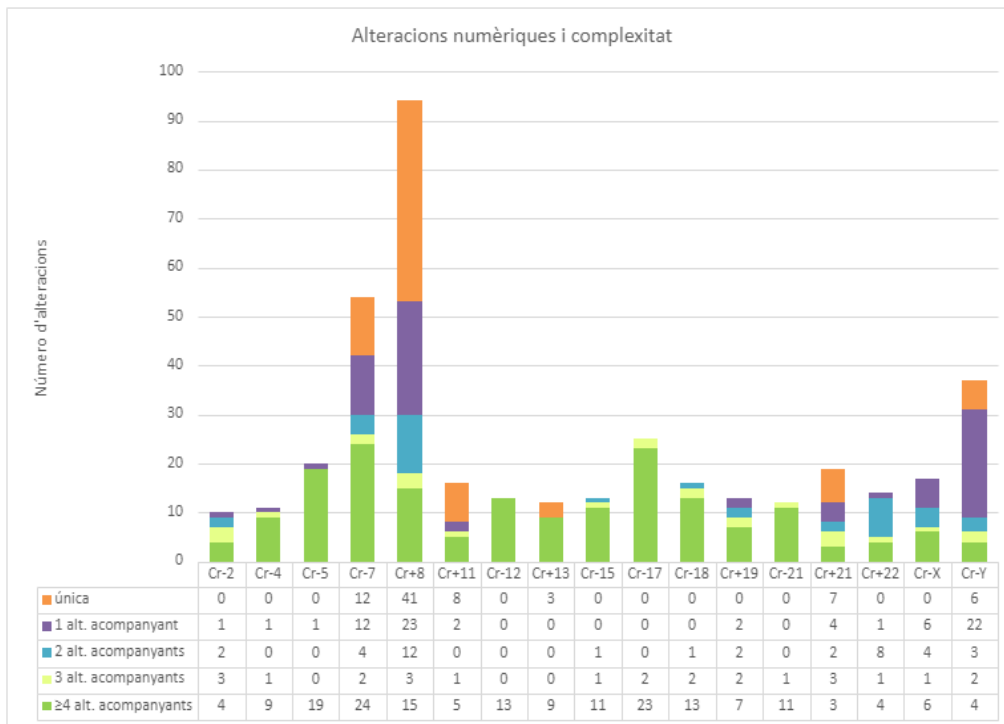


Figura 27: Distribució de les alteracions numèriques dels diversos cromosomes en funció del grau de complexitat del cariotip. Els símbols + i - indiquen si es tracta d'una trisomia o d'una monosomia, respectivament.

Pel que fa a les alteracions estructurals i la seva relació amb la complexitat, s'ha fet un primer anàlisi de tots els cromosomes independentment del tipus d'alteració estructural que presentin (Figura 28). En segon lloc, algunes de les alteracions s'han analitzat de manera individual per la seva recurrència en LMA (Figura 29).

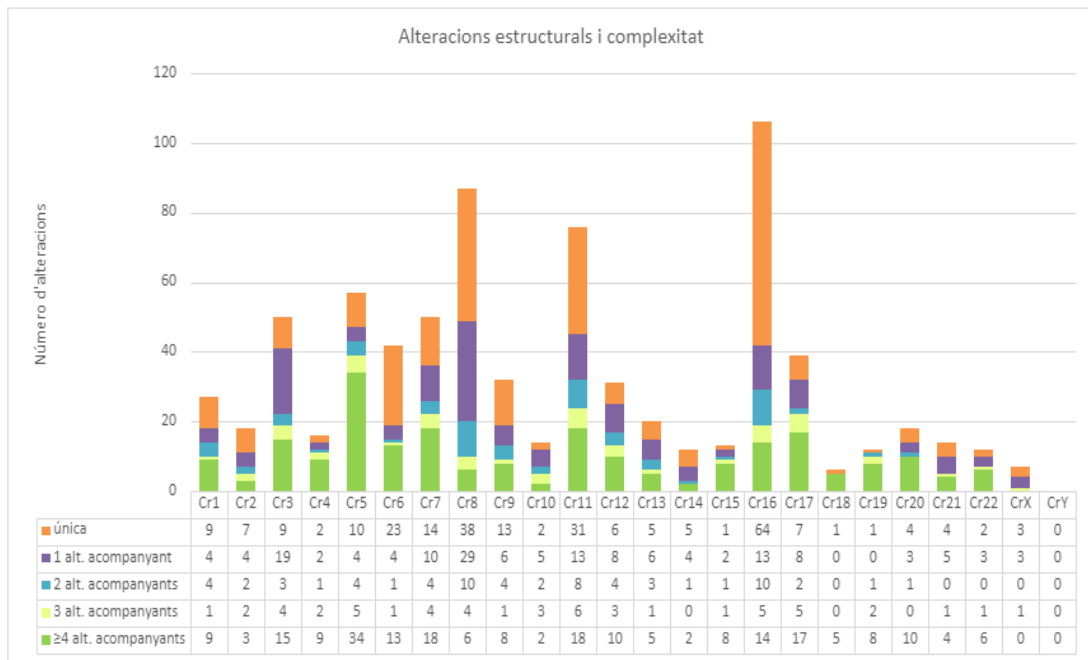


Figura 28: Distribució de les alteracions estructurals dels diversos cromosomes en funció del grau de complexitat del cariotip.

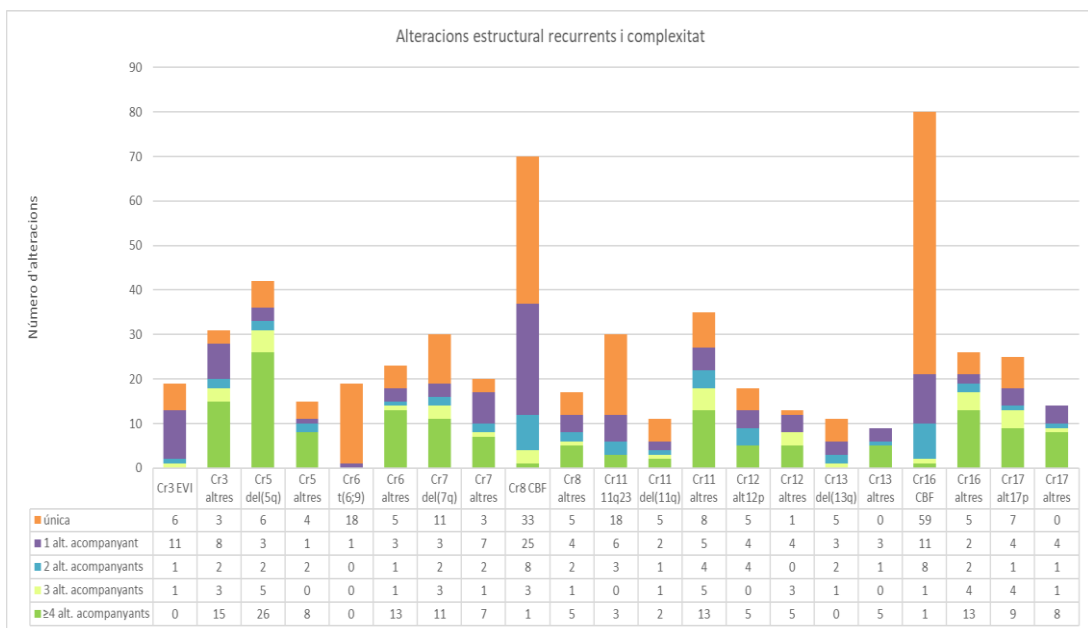


Figura 29: Distribució de les alteracions estructurals recurrents en LMA en funció del grau de complexitat del cariotip.

S'observa que les alteracions estructurals dels cromosomes 4, 5, 15, 16 (excloent inv(16)/t(16;16)) i 19 són més freqüents en un context de complexitat (≥ 4 alteracions acompanyants) que com a alteracions úniques o amb 1-3 acompanyants. En canvi, la t(8;21) i la inv(16)/t(16;16) rarament s'observen dins d'un cariotip de ≥ 4 alteracions. De manera similar, els reordenaments d'11q23 són més freqüents com a anomalia única mentre que la resta d'alteracions estructurals del cromosoma 11 són més freqüents en cariotips més

complexes. Per últim, també cal destacar que la t(6;9) pràcticament només existeix com anomalia única aïllada i que, en canvi, els reordenaments de 3q26 (EVI) s'acompanyen freqüentment d'una anomalia.

5.2.4 Co-ocurrència de les principals alteracions citogenètiques

S'ha realitzat un anàlisi de co-ocurrència entre les diverses parelles d'alteracions més recurrents en LMA per veure si hi ha associació entre algunes d'elles. S'han analitzat aquelles alteracions de les que se'n disposava d'un mínim de 5 casos i que alhora presentaven alguna alteració acompanyant (Taula 12).

Taula 12: Freqüència de co-ocurrència de les diverses parelles d'alteracions analitzades i significació estadística.

	inv(3)/ t(3;3)	mon5	del5q	mon7	del7q	tris8	t(8;21)	t(v;11q23)	inv(16)/ t(16;16)	mon17	alt17p	tris21	tris22	monX	monY
inv(3)/t(3;3) (n=22)		1/22	0/22	8/22***	0/22	1/22	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22	0/22	1/22
mon5 (n=20)	1/20		3/20	6/20**	4/20*	2/20	0/20	0/20	0/20	5/20**	5/20**	0/20	2/20	1/20	1/20
del5q (n=42)	0/42	3/42		7/42	6/42*	4/42	0/42	1/42	0/42	7/42***	4/42	0/42	2/42	2/42	1/42
mon7 (n=54)	8/54***	6/54**	7/54		0/54	4/54	0/54	1/54	0/54	8/54***	4/54	1/54	0/54	3/54	2/54
del7q (n=30)	0/30	4/30*	6/30*	0/30		3/30	1/30	0/30	3/30	1/30	3/30	1/30	1/30	1/30	2/30
tris8 (n=91)	1/91	2/91	4/91	4/91	3/91		0/91	3/91	8/91	4/91	4/91	4/91	6/91**	0/91	2/91
t(8;21) (n=85)	0/85	0/85	0/85	0/85	1/85	0/85		0/85	0/85	0/85	1/85	0/85	0/85	8/85**	22/85***
t(v;11q23) (n=30)	0/30	0/30	1/30	1/30	0/30	3/30	0/30		0/30	0/30	0/30	1/30	0/30	0/30	0/30
inv(16)/t(16;16) (n=92)	0/92	0/92	0/92	0/92	3/92	8/92	0/92	0/92		0/92	0/92	2/92	8/92***	1/92	1/92*
mon17 (n=24)	0/24	5/24**	7/24***	8/24***	1/24	4/24	0/24	0/24	0/24		1/24	0/24	2/24	3/24*	1/24
alt17p (n=25)	0/25	5/25**	4/25	4/25	3/25	4/25	1/25	0/25	0/25	1/25		0/25	0/25	0/25	3/25
tris21 (n=19)	0/19	0/19	0/19	1/19	1/19	4/19	0/19	1/19	2/19	0/19	0/19		3/19**	0/19	0/19
tris22 (n=14)	0/14	2/14	2/14	0/14	1/14	6/14**	0/14	0/14	8/14***	2/14	0/14	3/14**		1/14	0/14
monX (n=17)	0/17	1/17	2/17	3/17	1/17	0/17	8/17**	0/17	1/17	3/17*	0/17	0/17	1/17		0/17
monY (n=37)	1/37	1/37	1/37	2/37	2/37	2/37	22/37***	0/37	1/37*	1/37	3/37	0/37	0/37	0/37	

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001

S'han detectat associacions significatives en 15 parelles d'alteracions cromosòmiques. Pel que fa a les translocacions recurrents s'observa que la inv(16)/t(16;16) s'associa significativament a la trisomia 22 ($p < 0.001$) i que els reordenaments de 3q26 que impliquen el gen *MECOM* s'associen a la monosomia 7 ($p < 0.001$). Els reordenaments CBF també s'associen a monosomies de X o Y. En canvi els reordenaments de 11q23 que impliquen el gen *KMT2A* no s'associen a cap altra alteració.

També s'associen significativament la monosomia 5 amb les monosomies i les delecions de 7 ($p = 0.004$; $p = 0.011$) i de 17 ($p = 0.001$), la delecio 5q amb la delecio 7q ($p = 0.010$) i la monosomia 17 ($p < 0.001$), la monosomia 7 amb les monosomies 5 ($p = 0.004$) i 17 ($p < 0.001$); i la delecio 7q amb les monosomies i delecions del cromosoma 5 ($p = 0.011$; $p = 0.010$). Aquestes relacions significatives confirmen l'associació existent entre aquests tres cromosomes.

5.2.5 Recurrència de les translocacions cromosòmiques

S'han analitzat i comptabilitzat els casos que presenten translocacions equilibrades. Dels 638 casos de la sèrie global que presenten alteracions cromosòmiques, 170 casos tenen alguna translocació equilibrada. En total són 178 translocacions, 135 (76%) de les quals han estat descrites i són recurrents en la LMA i 11 (6%) no són informatives perquè no s'han pogut determinar amb exactitud els punts de trencament. Les 32 restants (18%) no han estat descrites prèviament en LMA segons les bases de dades consultades (*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* i *Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer*) i per tant es descriuen per primera vegada en aquest treball (Taula 13). No hi ha hagut cap translocació detectada més d'una vegada de manera que no es pot establir recurrència de cap de les translocacions descrites.

Taula 13: Translocacions detectades i no descrites prèviament en LMA.

TRANSLOCACIÓ	POSSIBLES GENS IMPLICATS
t(1;1)(p33;q23-24)	-
t(1;11)(q42;p12)	-
t(12;15)(p13;q12)	<i>ETV6</i> (12p13)
t(1;5)(q22;q23)	-
t(11;15)(p15;q22)	<i>NUP98</i> (11p15.4)
t(11;20)(q13;q13)	-
t(2;10)(p13;p11)	-
t(2;14)(q21;q22)	-
t(2;16)(p23;q23)	-
t(6;7)(p12;q22)	-
t(2;4)(q13;q35)	-
t(2;5)(p11;q11)	-
t(21;22)(q11;q11)	<i>NRIP1</i> (21q11.2) i <i>BCR</i> (22q11.23)
t(3;12)(q21;q24)	<i>RPN1</i> (3q21.3)
t(4;11)(p15;q23)	<i>KMT2A</i> (11q23)
t(4;12)(p15;q23)	-
t(2;11)(q13;p14)	<i>NUP98</i> (11p15.4)
t(4;12)(q27;q24)	-
t(4;15)(q13;q25)	-
t(4;16)(q35;q22)	<i>CBFB</i> (16q22.1)
t(4;17)(p16;q21)	<i>RARA</i> (17q21)
t(5;17)(p11;p11)	<i>SPECC1</i> (17p11.2)
t(6;9)(p23;q17)	<i>DEK</i> (6p22)
t(15;17)(p13;q11.2)	-
t(6;9)(q21;q24)	-
t(8;14)(q24;q34)	<i>TRPS1</i> (8q23.3) o <i>MYC</i> (8q24)
t(9;22)(q31;q12)	<i>MN1</i> (22q12.1) o <i>EWSR1</i> (22q12.2)
t(x;14)(q25;q32)	-
t(6;15)(p22;q21)	<i>DEK</i> (6p22)
t(9;22)(p22-23;q11)	<i>MLL3</i> (9p21.3) o <i>PSIP1</i> (9p22.3) o <i>JAK2</i> (9p24) i <i>BCR</i> (22q11.23)
t(12;16)(q24;p12)	<i>CREBBP</i> (16p13.3)
t(5;11)(q35;q23)	<i>NPM1</i> (5q35.1) i <i>KMT2A</i> (11q23)

5.3 ANÀLISI DE SUPERVIVÈNCIA

5.3.1 Validació del NK com a grup de referència

El grup de pacients amb NK és clàssicament considerat de pronòstic intermedi per no disposar de cap variable citogenètica que condicioni un altre pronòstic. Així, el NK es pot utilitzar com a grup de referència amb qui comparar la resta d'anomalies i establir-ne el seu pronòstic segons si mostren una millor o una pitjor supervivència en comparació amb el

NK. Prèviament a poder realitzar aquest anàlisi univariant amb totes les anomalies citogenètiques, s'ha validat el NK com a grup de referència comprovant que les alteracions moleculars de conegut impacte pronòstic no modificaven la supervivència del global del grup amb NK. Les alteracions que s'han analitzat són les mutacions de *NPM1* i les *FLT3*-ITD.

Dels 616 pacients amb NK, es disposa d'estudi molecular d'ambdues mutacions de 371 pacients, amb la següent descriptiva: 131 pacients eren doble negatius (*FLT3*-/*NPM1*-), 39 pacients eren *FLT3*+/*NPM1*-, 104 van ser *FLT3*-/*NPM1*+ i 97 van ser doble positius (*FLT3*+/*NPM1*+). No es disposa dels resultats moleculars de 245 pacients.

S'ha analitzat la taxa de resposta i la supervivència segons tres grups proposats: NK amb molecular positiva (inclou els casos doble positius, els *FLT3*-/*NPM1*+ i els *FLT3*+/*NPM1*-), NK amb molecular doble negativa i NK amb molecular no estudiada. No s'han observat diferències estadísticament significatives per a cap variable analitzada (taxa de RC, OS, DFS ni CIR) (Taules 14 i 15; Figura 30).

Taula 14: Taxa de remissió completa (RC) del casos amb cariotip normal (NK) segons biologia molecular.

	RC	NO RC	p
FLT3 - / NPM1 -	105 (80%)	26	0,192
BIOLOGIA MOLECULAR +	196 (82%)	43	
NO ESTUDIAT	184 (75%)	60	

Taula 15: Supervivència global (OS), supervivència lliure de malaltia (DFS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) del casos amb cariotip normal (NK) segons biologia molecular.

	OS als 4 anys (IC95%) p=0,560	DFS als 4 anys (IC95%) p=0,555	CIR als 4 anys (IC95%) p=0,512
FLT3 - / NPM1 -	40% (31% ; 49%)	39% (29% ; 49%)	45% (35% ; 55%)
BIOLOGIA MOLECULAR +	43% (36% ; 50%)	47% (40% ; 54%)	39% (32% ; 46%)
NO ESTUDIAT	40% (34% ; 46%)	43% (36% ; 50%)	42% (34% ; 49%)

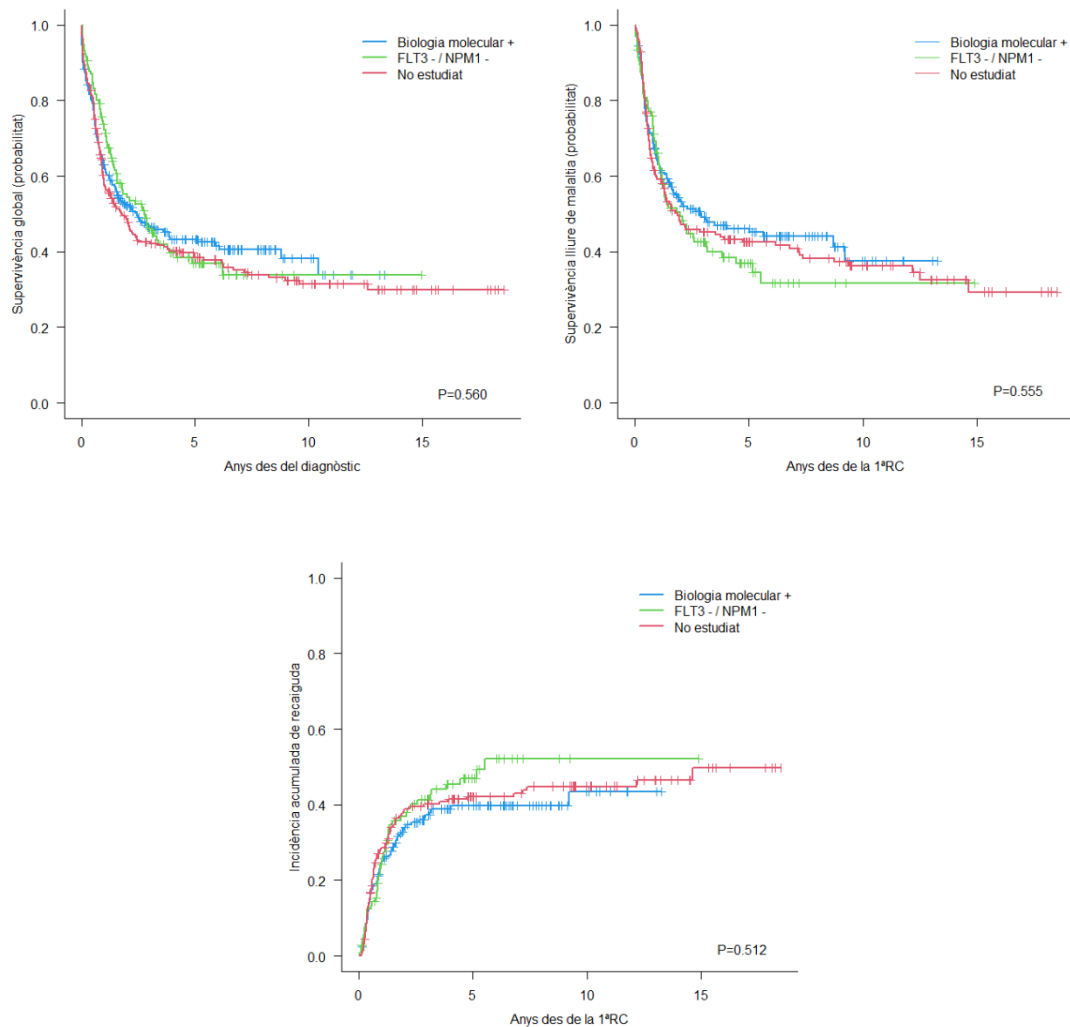


Figura 30: Gràfiques de la supervivència global, la supervivència lliure de malaltia i la incidència acumulada de recaiguda dels pacients amb cariotip normal segons la biologia molecular.

5.3.2 Anàlisi del grup CBF

Les LMA CBF tenen un pronòstic favorable ben establert en totes les sèries de pacients publicades però hi ha certes discrepàncies pel que fa a l'efecte que poden tenir les alteracions acompanyants. S'han analitzat els pacients amb anomalies CBF distribuïts segons el nombre d'anomalies acompanyants i s'ha determinat si aquestes podien tenir un impacte pronòstic.

D'un total de 177 pacients amb anomalies CBF, 92 són inv(16) i 85 són t(8;21), però només es coneixen les alteracions acompanyants de 80 i 70 casos, respectivament. S'han agrupat segons el número d'anomalies amb la següent distribució:

Taula 16: Freqüència de casos amb inv(16) o t(8;21) distribuïts segons el número d'alteracions acompanyants.

	inv(16) (N=92)	t(8;21) (N=85)
ANOMALIA ÚNICA	59/80 (74%)	33/70 (47%)
2 ANOMALIES	11/80 (14%)	25/70 (36%)
3 ANOMALIES	8/80 (10%)	8/70 (12%)
4 ANOMALIES	1/80 (1%)	3/70 (4%)
6 ANOMALIES	1/80 (1%)	1/70 (1%)

S'observa que la t(8,21) s'acompanya de més anomalies que la inv(16), de manera estadísticament significativa ($p=0,010$) (Taula 16).

S'ha analitzat la taxa de resposta i la supervivència dels dos grups proposats segons si presentaven una, dues o tres o més anomalies (s'han agrupat els pacients amb 3, 4 i 6 anomalies degut a un número insuficient de pacients per a realitzar una correcta anàlisi estadística). No s'han observat diferències estadísticament significatives per a cap variable analitzada (Taulas 17-20; Figures 31 i 32).

Taula 17: Taxa de remissió completa (RC) del casos amb inv(16) segons número d'anomalies acompanyants.

	RC	inv(16) No RC	p
ANOMALIA ÚNICA	49 (83%)	10	0,971
2 ANOMALIES	9 (82%)	2	
≥3 ANOMALIES	8 (80%)	2	

Taula 18: Taxa de remissió completa (RC) del casos amb t(8;21) segons número d'anomalies acompanyants.

	RC	t(8;21) No RC	p
ANOMALIA ÚNICA	30 (91%)	3	0,566
2 ANOMALIES	23 (92%)	2	
≥3 ANOMALIES	12 (100%)	0	

Taula 19: Supervivència global (OS), supervivència lliure de malaltia (DFS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) del casos amb inv(16) segons número d'anomalies acompanyants.

inv(16)	OS als 4 anys (IC95%) $p=0,804$	DFS als 4 anys (IC95%) $p=0,264$	CIR als 4 anys (IC95%) $p=0,121$
ANOMALIA ÚNICA	61% (48% ; 74%)	47% (32% ; 62%)	44% (29% ; 58%)
2 ANOMALIES	60% (30% ; 90%)	63% (30% ; 96%)	13% (0% ; 45%)
≥3 ANOMALIES	60% (30% ; 90%)	75% (45% ; 90%)	25% (3% ; 58%)

Taula 20: Supervivència global (OS), supervivència lliure de malaltia (DFS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) del casos amb t(8;21) segons número d'anomalies acompanyants.

t(8;21)	OS als 4 anys (IC95%) p=0,281	DFS als 4 anys (IC95%) p=0,274	CIR als 4 anys (IC95%) p=0,288
ANOMALIA ÚNICA	67% (51% ; 83%)	67% (50% ; 84%)	27% (12% ; 43%)
2 ANOMALIES	72% (53% ; 91%)	63% (42% ; 84%)	37% (17% ; 58%)
≥3 ANOMALIES	91% (74% ; 100%)	91% (74% ; 100%)	9% (0% ; 35%)

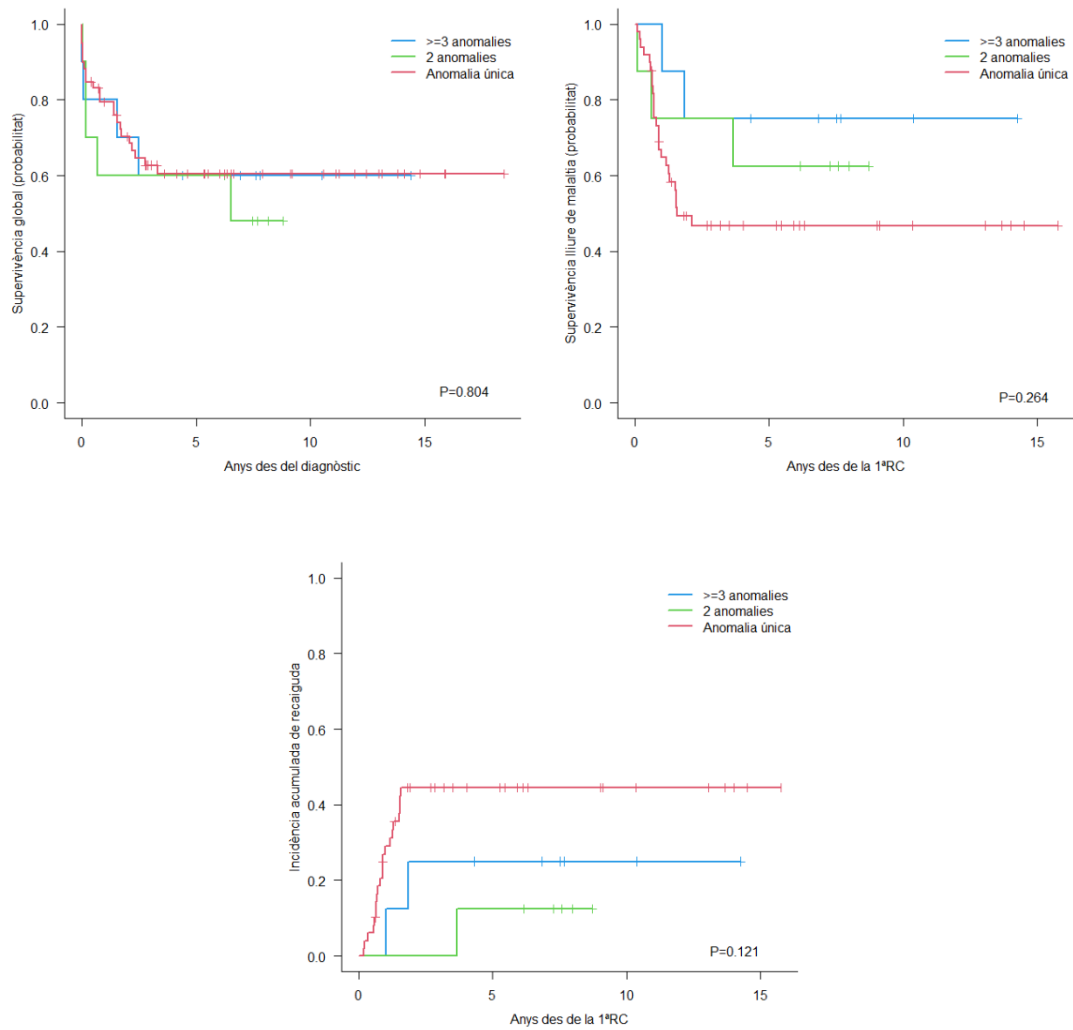


Figura 31: Gràfiques de la supervivència global, la supervivència lliure de malaltia i la incidència acumulada de recaiguda dels pacients amb inv(16) segons el número d'anomalies acompanyants.

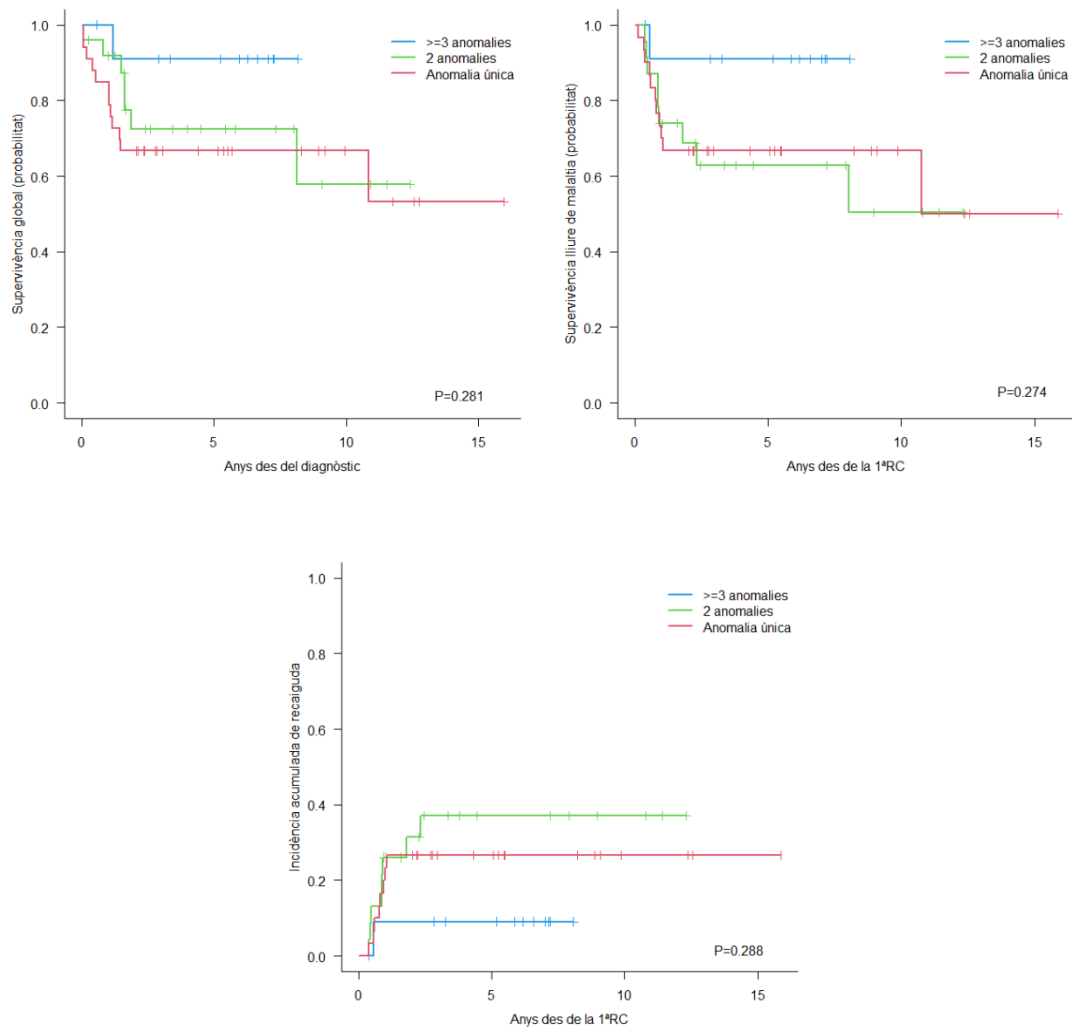


Figura 32: Gràfiques de la supervivència global, la supervivència lliure de malaltia i la incidència acumulada de recaiguda dels pacients amb t(8;21) segons el número d'anomalies acompanyants.

5.3.3 Definició de complexitat

S'han analitzat els pacients amb cariotip alterat (excloent CBF) per determinar a partir de quin nombre d'alteracions es defineix el CK en aquesta sèrie de pacients. Els 419 pacients amb cariotip alterat s'han agrupat per número d'anomalies i s'han analitzat les variables de supervivència comparant-les amb els pacients amb NK com a grup de referència. Només el grup de pacients amb ≥ 5 anomalies ha presentat diferències estadísticament significatives per a totes les variables de supervivència analitzades (Taulles 21 i 22). En termes d'OR per a l'assoliment de la RC i de HR per a la OS i la DFS també s'obtenen els mateixos resultats, en que només mostra diferències significatives el grup de ≥ 5 anomalies (Annex A.2). El grup amb 2 anomalies ha mostrat diferències estadísticament significatives per la taxa de RC i la

OS, però no s'ha tingut en compte ja que pot estar influït pel MK, que no s'ha exclòs d'aquesta anàlisi.

Taula 21: Mostra la taxa de remissió completa (RC) dels grups de pacients segons nombre d'anomalies cromosòmiques.

ANOMALIES	RC	p
0	485/614 (79%)	-
1	167/223 (75%)	0,206
2	44/72 (61%)	0,001
3	15/24 (63%)	0,054
4	15/22 (68%)	0,224
≥5	43/78 (55%)	<0,001

Taula 22: Mostra la supervivència global (OS), la supervivència lliure de malaltia (DFS) i la incidència acumulada de recaiguda (CIR) dels grups de pacients segons nombre d'anomalies cromosòmiques.

ANOMALIES	OS als 5 anys (IC95%)	p	DFS als 5 anys (IC95%)	p	CIR als 5 anys (IC95%)	p
0	40% (36% ; 44%)	-	43% (38% ; 48%)	-	42% (38% ; 47%)	-
1	38% (31% ; 45%)	0,757	42% (34% ; 50%)	0,903	43% (35% ; 50%)	0,888
2	27% (16% ; 38%)	0,031	41% (26% ; 56%)	0,738	47% (31% ; 62%)	0,444
3	36% (16% ; 56%)	0,283	33% (6% ; 60%)	0,442	39% (12% ; 67%)	0,649
4	26% (7% ; 45%)	0,103	40% (15% ; 65%)	0,374	33% (11% ; 58%)	0,737
≥5	6% (1% ; 11%)	<0,001	11% (2% ; 20%)	<0,001	58% (42% ; 72%)	0,002

5.3.4 Anàlisi del cariotip monosòmic

S'han analitzat els 95 casos que presenten un MK per determinar la seva importància pronòstica (comparat amb el NK). Per a això, s'ha diferenciat també si es tracta d'un MK "pur" segons la definició de Breems *et al.* o bé coincideix també amb el CK determinat en aquesta sèrie de pacients, definit per la presència de 5 o més anomalies. L'anàlisi estadística es resumeix a continuació i demostra que tant els CK com els MK presenten diferències estadísticament significatives respecte el NK per la taxa de RC i la OS. Destaca també que només els casos que compleixen ambdós criteris (MK i CK) mostren pitjors dades de supervivència per totes les variables estudiades de manera estadísticament significativa (Taulas 23 i 24).

Taula 23: Mostra la taxa de remissió completa dels grups de pacients segons si tenen cariotip complex (CK) o cariotip monosòmic (MK).

ALTERACIÓ	RC	p
-----------	----	---

NORMAL	485/614 (79%)	-
no MK i no CK	225/306 (74%)	0,063
no MK i CK	10/18 (56%)	0,036
MK i no CK	16/35 (46%)	<0,001
MK i CK	33/60 (55%)	<0,001

Taula 24: Mostra la supervivència global (OS), la supervivència lliure de malaltia (DFS) i la incidència acumulada de recaiguda (CIR) dels grups de pacients segons si tenen cariotip complex (CK) o cariotip monosòmic (MK).

ALTERACIÓ	OS als 5 anys (IC95%)	p	DFS als 5 anys (IC95%)	p	CIR als 5 anys (IC95%)	p
NORMAL	40% (36% ; 44%)	-	43% (38% ; 48%)	-	42% (38% ; 47%)	-
no MK i no CK	37% (31% ; 43%)	0,354	41% (34% ; 48%)	0,848	44% (37% ; 51%)	0,628
no MK i CK	12% (0% ; 27%)	0,004	20% (0% ; 45%)	0,110	60% (22% ; 84%)	0,299
MK i no CK	20% (6% ; 34%)	0,002	44% (20% ; 68%)	0,431	25% (7% ; 48%)	0,294
MK i CK	4% (0% ; 9%)	<0,001	8% (0% ; 18%)	<0,001	58% (38% ; 73%)	0,002

5.3.5 Impacte de les alteracions citogenètiques en la supervivència.

S'ha analitzat l'impacte de les alteracions citogenètiques sobre la taxa de RC, la OS, la DFS i la CIR. Els cariotips CBF, els CK i els MK s'han exclòs de l'anàlisi per evitar que interfereixin en la valoració del pronòstic de les alteracions individuals. S'ha analitzat l'impacte d'aquestes alteracions sobre el pronòstic ens els casos en que s'ha disposat d'almenys 5 pacients després de l'exclusió (Taula 25).

Taula 25: Distribució i freqüència de les anomalies citogenètiques de la sèrie de pacients exclosos els CBF, els CK i els MK. * Els percentatges estan calculats considerant com a denominador els cariotips avaluables (N=1254).

CROMOSOMA	DESCRIPCIÓ DE L'ANOMALIA	FREQÜÈNCIA N (%)*	CROMOSOMA	DESCRIPCIÓ DE L'ANOMALIA	FREQÜÈNCIA N (%)*
--	Cariotip normal	616 (49%)			
1	Monosomia	0	12	Monosomia	0
	Alteració estructural	14 (1%)		Reord. 12p	10 (1%)
	Trisomia	0		Altres	6 (<0.5%)
2	Monosomia	0	13	Trisomia	2 (<0.5%)
	Alteració estructural	12 (1%)		Monosomia	0
	Trisomia	0		del13q	10 (1%)
3	Monosomia	0	14	Altres	3 (<0.5%)
	inv(3)/t(3;3)	11 (1%)		Trisomia	3 (<0.5%)
	t(3;5)	0		Monosomia	0
	Altres	10 (1%)	Alteració estructural	9 (1%)	
4	Trisomia	0	15	Trisomia	0
	Monosomia	0		Monosomia	0
	Alteració estructural	4 (<0.5%)		Alteració estructural	4 (<0.5%)
5	Trisomia	4 (<0.5%)	16	Trisomia	0
	Monosomia	0		Monosomia	0
	del5q	13 (1%)		Altres	11 (1%)
	Altres	4 (<0.5%)	Trisomia	0	
6	Trisomia	0	17	Monosomia	0
	Monosomia	0		Reord. 17p/i17	12 (1%)
	del6q	6 (<0.5%)		Altres	6 (<0.5%)
	t(6;9)	19 (2%)	Trisomia	0	
7	Altres	3 (<0.5%)	18	Monosomia	0
	Trisomia	5 (<0.5%)		Alteració estructural	1 (<0.5%)
	Monosomia	15 (1%)		Trisomia	2 (<0.5%)
	del7q	14 (1%)	19	Monosomia	1 (<0.5%)
Altres	11 (1%)	Alteració estructural		2 (<0.5%)	
Trisomia	1 (<0.5%)	Trisomia		4 (<0.5%)	
8	Trisomia	1 (<0.5%)	20	Monosomia	1 (<0.5%)
	Monosomia	0		del20q	6 (<0.5%)
	Altres	9 (1%)		Altres	1 (<0.5%)
9	Trisomia	67 (5%)	21	Trisomia	3 (<0.5%)
	Monosomia	1 (<0.5%)		Monosomia	0
	del9q	12 (1%)		Alteració estructural	10 (1%)
	Altres	5 (<0.5%)	Trisomia	14 (1%)	
10	Trisomia	5 (<0.5%)	22	Monosomia	1 (<0.5%)
	Monosomia	0		Alteració estructural	5 (<0.5%)
	Alteració estructural	8 (1%)		Trisomia	2 (<0.5%)
11	Trisomia	1 (<0.5%)	X	Monosomia	2 (<0.5%)
	Monosomia	0		Alteració estructural	7 (1%)
	11q23	6 (<0.5%)		Trisomia	0
	del11q	7 (1%)	Y	Monosomia	9 (1%)
	t(10;11)	2 (<0.5%)		Trisomia	0
	t(11;19)	6 (<0.5%)			
	t(6;11)	4 (<0.5%)			
	t(9;11)	8 (1%)			
	Altres	17 (1%)			
Trisomia	9 (1%)				

Impacte de les alteracions cromosòmiques en la taxa de RC

S'ha analitzat l'impacte de les alteracions citogenètiques comparat amb el NK sobre la taxa de RC. Les OR són donades comparant l'anomalia corresponent amb el NK. Per la taxa de RC, i per tal de facilitar la interpretació de l'OR, la categoria de referència és l'alteració en qüestió. Per tant, l'OR s'interpreta com la probabilitat d'assolir la RC dels pacients amb NK respecte dels que tenen l'alteració cromosòmica. Per exemple: per a l'alteració estructural del cromosoma 1, la probabilitat d'assolir la RC dels pacients amb NK és 5 vegades major que els que tenen l'alteració del 1 (Taula 26).

De les alteracions que s'han pogut analitzar, només les alteracions estructurals del cromosoma 1 i la monosomia 7 han presentat una taxa de RC significativament inferior ($p < 0.05$) que la del NK.

Taula 26: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la taxa de remissió completa (RC).

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	TAXA (%)	OR (IC95%)	p
--	Cariotip normal	614	79		
1	Monosomia	14	43	5,013 (1,709 ; 14,705)	0,003
	Alteració estructural				
2	Trisomia	11	64	2,148 (0,619 ; 7,452)	0,228
	Monosomia				
3	Alteració estructural	11	55	3,133 (0,941 ; 10,429)	0,063
	Monosomia inv(3)/t(3;3)				
	t(3;5)				
4	Altres	9	67	1,880 (0,464 ; 7,619)	0,377
	Trisomia				
5	Monosomia	13	85	0,684 (0,150 ; 3,123)	0,624
	del5q				
6	Altres	6	67	1,880 (0,341 ; 10,377)	0,469
	Trisomia				
	Monosomia del6q				
	t(6;9)				
7	Altres	19	79	1,003 (0,327 ; 3,072)	0,996
	Trisomia				
	Monosomia				
	Monosomia del7q				
8	Altres	14	79	1,025 (0,282 ; 3,730)	0,970
	Trisomia				
	Monosomia				
9	Altres	11	55	3,133 (0,941 ; 10,429)	0,063
	Trisomia				
	Monosomia				
10	Altres	9	78	1,074 (0,221 ; 5,233)	0,929
	Trisomia				
	Monosomia				
9	Altres	67	69	1,716 (0,989 ; 2,979)	0,055
	Trisomia				
	Monosomia del9q				
10	Altres	12	92	0,342 (0,044 ; 2,672)	0,306
	Trisomia				
	Monosomia				
10	Altres	5	40	5,640 (0,932 ; 34,107)	0,060
	Trisomia				
	Monosomia				
10	Altres	5	60	2,506 (0,414 ; 15,159)	0,317
	Trisomia				
10	Monosomia	8	75	1,253 (0,250 ; 6,282)	0,784
	Alteració estructural				
	Trisomia				

(continuació)

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	TAXA (%)	OR (IC95%)	p
11	Monosomia 11q23	6	83	0,752 (0,087 ; 6,493)	0,795
	del11q	7	100	0	0,999
	t(10;11)	6	100	0	0,999
	t(11;19)				
	t(6;11)				
	t(9;11)	8	63	2,256 (0,532 ; 9,564)	0,270
	Altres	17	59	2,632 (0,983 ; 7,049)	0,054
Trisomia	9	67	1,880 (0,464 ; 7,619)	0,377	
12	Monosomia	10	90	0,418 (0,052 ; 3,327)	0,41
	Reord 12p				
	Altres	6	83	0,752 (0,087 ; 6,493)	0,795
13	Trisomia	10	80	0,940 (0,197 ; 4,480)	0,938
	Monosomia del13q				
	Altres				
14	Trisomia	8	63	2,256 (0,532 ; 9,564)	0,270
	Monosomia				
	Alteració estructural				
15	Trisomia	11	91	0,376 (0,048 ; 2,964)	0,353
	Monosomia				
	Alteració estructural				
16	Trisomia	12	75	1,253 (0,334 ; 4,696)	0,738
	Monosomia				
	Reord 17/i17				
	Altres				
17	Trisomia	6	100	0	0,999
	Monosomia				
	Alteració estructural				
	Trisomia				
18	Monosomia	5	80	0,940 (0,104 ; 8,482)	0,956
	Alteració estructural				
	Trisomia				
19	Monosomia	6	100	0	0,999
	Alteració estructural				
	Trisomia				
20	Monosomia del20q	9	67	1,880 (0,464 ; 7,619)	0,377
	Altres				
	Trisomia				
21	Trisomia	13	62	2,350 (0,756 ; 7,304)	0,14
	Alteració estructural				
22	Monosomia	5	80	0,940 (0,104 ; 8,482)	0,956
	Alteració estructural				
	Trisomia				
X	Monosomia	6	83	0,752 (0,087 ; 6,493)	0,795
	Alteració estructural				
	Trisomia				
Y	Monosomia	9	67	1,880 (0,464 ; 7,619)	0,377
	Trisomia				

Impacte de les alteracions cromosòmiques en la OS

S'ha analitzat l'impacte de les alteracions citogenètiques comparat amb el NK sobre la probabilitat de OS. Les HR són donades comparant l'anomalia corresponent amb el NK. Per la OS la categoria de referència és el NK, per tant, la HR s'interpreta com el risc de morir del pacient amb l'alteració cromosòmica en qüestió respecte als pacients amb NK. Per exemple: per a l'alteració estructural del cromosoma 1, el risc de morir dels pacients amb l'alteració és gairebé dues vegades major que els que tenen NK (Taula 27).

De les alteracions que s'han pogut analitzar, han presentat una OS significativament inferior ($p < 0.05$) que la del NK les alteracions estructurals del cromosoma 1, anomalies del cromosoma 3 que no inclouen $inv(3)/t(3;3)$, la monosomia 7, anomalies del cromosoma 9 que no inclouen la $t(6;9)$ i la trisomia 9.

Taula 27: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la probabilitat de supervivència global (OS). ¹Dades a 1 any; ²dades als 3 anys.

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	OS ALS 4 ANYS, % (IC95%)	HR (IC95%)	P
--	Cariotip normal	615	41% (37% ; 45%)		
1	Monosomia	14	21% (0% ; 43%)	1,910 (1,047 ; 3,484)	0,035
	Alteració estructural				
2	Trisomia	12	42% (14% ; 70%)	1,598 (0,793 ; 3,223)	0,19
	Monosomia				
3	Monosomia	11	24% (0% ; 51%)	1,677 (0,832 ; 3,381)	0,148
	$inv(3)/t(3;3)$	10	10% (0% ; 29%)	2,498 (1,287 ; 4,848)	0,007
	Altres				
4	Trisomia				
	Monosomia				
5	Monosomia	13	9% (0% ; 26%)	1,271 (0,678 ; 2,385)	0,454
	del5q				
	Altres				
6	Trisomia	6	17% (0% ; 47%)	1,634 (0,676 ; 3,952)	0,276
	del6q	19	38% (14% ; 62%)	0,927 (0,494 ; 1,738)	0,813
	$t(6;9)$	5	60% (17% ; 100%)	0,969 (0,311 ; 3,020)	0,957
	Altres				
7	Monosomia	15	7% (0% ; 20%)	2,814 (1,646 ; 4,812)	<0,001
	del7q	14	39% (12% ; 66%)	1,094 (0,543 ; 2,205)	0,802
	Altres	11	24% (0% ; 51%)	1,225 (0,608 ; 2,468)	0,571
	Trisomia				
8	Monosomia	9	22% (0% ; 49%)	1,361 (0,644 ; 2,876)	0,419
	Altres	67	39% (27% ; 51%)	1,160 (0,837 ; 1,609)	0,372
9	Trisomia				
	Monosomia	12	58% (30% ; 86%)	0,540 (0,223 ; 1,305)	0,171
	del9q	5	20% (0% ; 55%)	2,783 (1,037 ; 7,465)	0,042
10	Altres	5	20% (0% ; 55%)¹	3,127 (1,163 ; 8,411)	0,024
	Trisomia	5			
10	Monosomia	8	38% (4% ; 72%)	0,991 (0,410 ; 2,397)	0,984
	Alteració estructural				
	Trisomia				

(continuació)

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	OS als 4 anys, % (IC95%)	HR (IC95%)	p
11	Monosomia 11q23	6	50% (0% ; 90%)	0,771 (0,247 ; 2,402)	0,653
	del11q t(10;11)	7	67% (29% ; 100%)	0,465 (0,116 ; 1,865)	0,28
	t(11;19)	6	80% (45% ; 100%)	0,232 (0,033 ; 1,650)	0,144
	t(6;11) t(9;11)	8	50% (15% ; 85%)	0,897 (0,335 ; 2,405)	0,829
	Altres	17	0% ²	1,471 (0,827 ; 2,618)	0,189
12	Trisomia	9	30% (0% ; 62%)	1,320 (0,589 ; 2,959)	0,5
	Monosomia	10	40% (10% ; 70%)	1,010 (0,478 ; 2,134)	0,98
	Reord 12p				
Altres	6	25% (0% ; 65%)	1,383 (0,516 ; 3,706)	0,52	
13	Trisomia	10	31% (0% ; 64%)	1,090 (0,486 ; 2,442)	0,835
	Monosomia del13q				
14	Altres	9	13% (0% ; 36%)	1,663 (0,787 ; 3,518)	0,183
	Trisomia				
15	Monosomia	9	13% (0% ; 36%)	1,663 (0,787 ; 3,518)	0,183
	Alteració estructural				
16	Trisomia	11	33% (4% ; 62%)	1,047 (0,496 ; 2,213)	0,904
	Monosomia				
17	Altres	12	33% (6% ; 60%)	1,278 (0,660 ; 2,477)	0,467
	Reord 17/i17				
	Trisomia				
18	Altres	6	50% (10% ; 90%)	0,708 (0,227 ; 2,208)	0,552
	Trisomia				
19	Monosomia	6	17% (0% ; 47%)	1,983 (0,820 ; 4,798)	0,129
	Alteració estructural				
20	Trisomia	10	33% (2% ; 64%)	1,035 (0,462 ; 2,318)	0,934
	Monosomia				
21	Alteració estructural	14	46% (19% ; 73%)	0,935 (0,442 ; 1,975)	0,859
	Trisomia	5	60% (17% ; 100%)	0,614 (0,153 ; 2,465)	0,491
22	Monosomia	5	60% (17% ; 100%)	0,614 (0,153 ; 2,465)	0,491
	Alteració estructural				
X	Trisomia	7	43% (6% ; 80%)	1,196 (0,446 ; 3,206)	0,722
	Alteració estructural				
Y	Monosomia	9	33% (2% ; 64%)	1,302 (0,581 ; 2,917)	0,522
	Trisomia				

Impacte de les alteracions cromosòmiques en la DFS

S'ha analitzat l'impacte de les alteracions citogenètiques comparat amb el NK sobre la DFS. Les HR són donades comparant l'anomalia corresponent amb el NK. Per a la DFS la categoria de referència és el NK, per tant, la HR s'interpreta com el risc de recaure o morir del pacient amb l'alteració cromosòmica en qüestió respecte als pacients amb NK. Per exemple: per a l'alteració del20q, el risc de recaure o morir dels pacients que tenen aquesta alteració és 3,3 vegades major que els que tenen NK (Taula 28).

De les alteracions que s'han pogut analitzar, només la deleció del braç llarg del cromosoma 20 (del20q) ha presentat una DFS significativament inferior ($p=0.009$) que la del NK.

Taula 28: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la supervivència lliure de malaltia (DFS). ¹ Dades als 3 anys; ² dades als 2 anys.

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	DFS ALS 4 ANYS, % (IC95%)	HR (IC95%)	P
--	Cariotip normal	485	44% (39% ; 49%)		
1	Monosomia	6	50% (10% ; 90%)	0,890 (0,285 ; 2,777)	0,841
	Alteració estructural				
2	Trisomia	7	36% (0% ; 88%)	0,755 (0,242 ; 2,355)	0,628
	Alteració estructural				
3	Monosomia	6	50% (10% ; 90%)	0,893 (0,286 ; 2,787)	0,846
	inv(3)/t(3;3)				
	t(3;5)				
4	Altres	6	17% (0% ; 47%)	2,176 (0,897 ; 5,279)	0,085
	Trisomia				
5	Monosomia	11	13% (0% ; 37%) ¹	1,882 (0,931 ; 3,807)	0,078
	Alteració estructural				
6	Trisomia	4	25% (0% ; 68%)	1,396 (0,447 ; 4,357)	0,566
	Monosomia del5q				
	Altres				
7	Trisomia	15	31% (7% ; 55%)	1,364 (0,725 ; 2,566)	0,336
	Monosomia del6q				
	t(6;9)				
8	Altres	5	40% (0% ; 83%)	1,234 (0,396 ; 3,852)	0,717
	Trisomia				
	Monosomia del7q				
9	Altres	6	17% (0% ; 47%)	2,116 (0,873 ; 5,127)	0,097
	Trisomia				
	Monosomia del7q				
10	Altres	6	41% (9% ; 73%)	1,129 (0,502 ; 2,535)	0,77
	Trisomia				
	Monosomia				
11	Altres	6	33% (0% ; 71%)	1,511 (0,563 ; 4,055)	0,413
	Trisomia				
	Monosomia				
12	Altres	7	29% (0% ; 63%)	1,230 (0,508 ; 2,979)	0,647
	Trisomia				
	Monosomia				
13	Altres	46	44% (29% ; 59%)	1,134 (0,758 ; 1,696)	0,541
	Trisomia				
	Monosomia del9q				
14	Altres	11	55% (26% ; 84%)	0,854 (0,380 ; 1,917)	0,702
	Trisomia				
	Monosomia				
15	Altres	2			
	Trisomia				
	Monosomia				
16	Altres	3			
	Trisomia				
	Monosomia				
17	Alteració estructural	6	50% (10% ; 90%)	0,705 (0,226 ; 2,200)	0,547
	Trisomia				
	Monosomia				

(continuació)

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	DFS als 4 anys, % (IC95%)	HR (IC95%)	p
11	Monosomia 11q23	5	60% (17% ; 100%)	0,566 (0,141 ; 2,276)	0,423
	del11q	7	67% (29% ; 100%)	0,451 (0,112 ; 1,811)	0,261
	t(10;11)	6	60% (17% ; 100%)	0,520 (0,129 ; 2,090)	0,357
	t(11;19)				
	t(6;11)				
	t(9;11)	5	80% (45% ; 100%)	0,263 (0,037 ; 1,873)	0,182
	Altres	10	36% (4% ; 68%) ²	1,568 (0,697 ; 3,526)	0,277
Trisomia	6	33% (0% ; 71%)	1,213 (0,452 ; 3,256)	0,702	
12	Monosomia	9	22% (0% ; 49%)	1,422 (0,671 ; 3,012)	0,358
	Reord 12p				
	Altres				
Trisomia	5	30% (0% ; 77%) ²	1,782 (0,663 ; 4,788)	0,252	
13	Monosomia del13q	8	47% (10% ; 84%)	1,033 (0,385 ; 2,773)	0,948
	Altres				
	Trisomia				
14	Monosomia	5	20% (0% ; 55%)	1,672 (0,623 ; 4,490)	0,308
	Alteració estructural				
	Trisomia				
15	Monosomia				
	Alteració estructural				
	Trisomia				
16	Monosomia	10	38% (6% ; 70%)	1,286 (0,607 ; 2,724)	0,511
	Altres				
	Trisomia				
17	Monosomia	9	33% (2% ; 64%)	1,270 (0,566 ; 2,853)	0,562
	Reord 17/i17				
	Altres				
18	Trisomia	6	50% (10% ; 90%)	0,853 (0,273 ; 2,662)	0,784
	Monosomia				
	Alteració estructural				
19	Monosomia				
	Alteració estructural				
	Trisomia				
20	Monosomia del20q	6	17% (0% ; 47%)	3,261 (1,343 ; 7,920)	0,009
	Altres				
	Trisomia				
21	Monosomia	6	50% (10% ; 90%)	0,640 (0,205 ; 1,999)	0,443
	Alteració estructural				
	Trisomia				
22	Monosomia	8	75% (45% ; 100%)	0,502 (0,161 ; 1,565)	0,235
	Alteració estructural				
	Trisomia				
X	Monosomia	4			
	Alteració estructural				
	Trisomia				
Y	Monosomia	5	60% (17% ; 100%)	0,729 (0,181 ; 2,929)	0,655
	Alteració estructural				
	Trisomia				
Y	Monosomia	6	50% (10% ; 90%)	0,857 (0,275 ; 2,676)	0,791
	Trisomia				

Impacte de les alteracions cromosòmiques en la CIR

Per últim, s'ha analitzat l'impacte de les alteracions citogenètiques comparat NK sobre la CIR. Les HR són donades comparant l'anomalia corresponent amb el NK. Per a la CIR la categoria de referència és el NK, per tant, la HR s'interpreta com el risc de recaure del pacient amb l'alteració cromosòmica en qüestió respecte als pacients amb NK. Per exemple: per a l'alteració del5q, el risc de recaure dels pacients que tenen aquesta alteració és 2,5 vegades major que els que tenen NK (Taula 29).

De les alteracions que s'han pogut analitzar, només la deleció del braç llarg del cromosoma 5 (del5q) ha presentat una CIR significativament inferior ($p=0.022$) que la del NK.

Taula 29: Impacte de les alteracions citogenètiques sobre la incidència acumulada de recaiguda (CIR). ¹Dades als 3 anys; ²dades als 2 anys

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	CIR ALS 4 ANYS, % (IC95%)	HR (IC95%)	P
--	Cariotip normal	485	41% (37% ; 46%)		
1	Monosomia	6	33% (3% ; 71%)	0,755 (0,202 ; 2,820)	0,680
	Alteració estructural				
2	Trisomia	7	50% (0% ; 92%)	0,650 (0,178 ; 2,379)	0,520
	Alteració estructural				
3	Monosomia	6	50% (8% ; 83%)	1,396 (0,450 ; 4,332)	0,560
	inv(3)/t(3;3)				
	t(3;5)				
4	Altres	6	50% (6% ; 85%)	1,321 (0,404 ; 4,320)	0,650
	Trisomia				
5	Monosomia	11	74% (20% ; 94%) ¹	2,467 (1,138 ; 5,348)	0,022
	Alteració estructural				
6	Trisomia	4	49% (20% ; 73%)	1,235 (0,589 ; 2,590)	0,580
	Monosomia del6q				
	t(6;9)				
7	Altres	5	20% (0% ; 65%)	0,385 (0,062 ; 2,416)	0,310
	Trisomia				
	Monosomia				
8	del7q	6	33% (3% ; 72%)	0,744 (0,180 ; 3,074)	0,680
	Altres				
	Trisomia				
9	del9q	11	50% (14% ; 78%)	1,324 (0,516 ; 3,396)	0,560
	Altres				
	Trisomia				
10	del10q	6	67% (12% ; 93%)	2,404 (0,747 ; 7,742)	0,140
	Altres				
	Trisomia				
11	Monosomia	7	43% (7% ; 77%)	0,961 (0,315 ; 2,934)	0,940
	Altres				
	Trisomia				
12	Monosomia	46	44% (30% ; 58%)	1,267 (0,784 ; 2,047)	0,330
	del12q				
	Altres				
13	del13q	11	36% (10% ; 64%)	1,020 (0,437 ; 2,383)	0,960
	Altres				
	Trisomia				
14	Monosomia	2			
	Alteració estructural				
15	Trisomia	3			
	Alteració estructural				

(continuació)

CROMOSOMA	ANOMALIA	N	CIR als 4 anys, % (IC95%)	HR (IC95%)	p
11	Monosomia 11q23	5	20% (0% ; 63%)	0,387 (0,056 ; 2,664)	0,330
	del11q t(10;11)	7	33% (3% ; 70%)	0,708 (0,184 ; 2,729)	0,620
	t(11;19)	6	20% (0% ; 63%)	0,366 (0,059 ; 2,263)	0,280
	t(6;11)				
	t(9;11)	5	0%	0	0
	Altres	10	54% (16% ; 81%) ²	1,676 (0,664 ; 4,229)	0,270
12	Trisomia	6	50% (8% ; 83%)	1,311 (0,420 ; 4,094)	0,640
	Monosomia				
	Reord 12p	9	67% (22% ; 90%)	1,765 (0,855 ; 3,643)	0,120
13	Altres	5	50% (0% ; 95%) ²	1,025 (0,257 ; 4,084)	0,970
	Trisomia				
14	Monosomia del13q	8	28% (3% ; 64%)	0,589 (0,150 ; 2,349)	0,450
	Altres				
15	Trisomia				
	Monosomia				
16	Alteració estructural	5	60% (7% ; 91%)	1,746 (0,515 ; 5,926)	0,370
	Trisomia				
17	Monosomia				
	Alteració estructural				
18	Trisomia				
	Monosomia				
	Alteració estructural				
19	Trisomia				
	Monosomia				
	Alteració estructural				
20	Trisomia				
	Monosomia del20q	6	50% (6% ; 85%)	1,538 (0,388 ; 6,099)	0,540
	Altres				
21	Trisomia				
	Monosomia				
	Alteració estructural	6	33% (3% ; 71%)	0,622 (0,176 ; 2,196)	0,460
22	Trisomia	8	13% (1% ; 45%)	0,493 (0,137 ; 1,769)	0,280
	Monosomia				
X	Alteració estructural	4			
	Trisomia				
Y	Monosomia	5	20% (0% ; 62%)	0,477 (0,055 ; 4,174)	0,500
	Trisomia	6	50% (8% ; 83%)	1,358 (0,392 ; 4,697)	0,630

5.3.6 Anàlisi multivariant

Per a l'anàlisi multivariant s'han tingut en compte les variables: edat, sexe, número de leucòcits, protocol CETLAM i Citogenètica. Només s'ha realitzat l'anàlisi per la OS, ja que es perdien massa pacients en intentar analitzar la DFS i la CIR.

La variable Citogenètica inclou les alteracions estadísticament significatives en l'anàlisi univariant de les que es disposa d'un número suficient de pacients (≥ 10). No ha estat possible realitzar un anàlisi multivariant amb totes les alteracions citogenètiques individuals que han estat significatives en l'univariant degut a un número insuficient de pacients en molts casos i finalment només ha estat possible analitzar-ne tres: les alteracions estructurals del cromosoma 1, la del(5q) i la monosomia 7. Després de les exclusions, han quedat 9 grups ben definits: el NK (grup de referència per a l'anàlisi), el CBF, els cariotips monosòmics no complexes, els complexes no monosòmics, els monosòmics i complexes, les alteracions estructurals del cromosoma 1, la del(5q), la monosomia 7 i tota la resta d'anomalies.

El resultat de l'anàlisi multivariant ha demostrat que l'edat, el nombre de leucòcits i les variables citogenètiques analitzades (excloent la del(5q) i el grup de la resta d'anomalies, que han perdut la seva significació estadística) són factors pronòstics independents per la OS. A més, també ha resultat que amb els protocols 94 i 99 s'assolia una OS inferior a la del protocol 03 (Taula 30).

Taula 30: Factors amb significat pronòstic independent per la supervivència global (OS) resultants de l'anàlisi multivariant.

FACTOR	HR (IC95%)	p
EDAT (CONTÍNUA)	1,026 (1,020 ; 1,033)	<0,001
LEUCÒCITS (CONTÍNUA)	1,003 (1,002 ; 1,004)	<0,001
PROTOCOL CETLAM-94	1,392 (1,105 ; 1,752)	0,005
PROTOCOL CETLAM-99	1,348 (1,126 ; 1,613)	0,001
CBF	0,542 (0,409 ; 0,718)	<0,001
MK & no CK	1,941 (1,318 ; 2,857)	0,001
no MK & CK	1,891 (1,144 ; 3,123)	0,013
MK & CK	3,628 (2,724 ; 4,831)	<0,001
ALT. ESTRUCT. Cr1	2,266 (1,118 ; 4,592)	0,023
MONOSOMIA 7	3,477 (1,892 ; 6,392)	<0,001

Amb les dades obtingudes de l'anàlisi multivariant s'han classificat tots els pacients de la sèrie en tres categories pronòstiques: risc favorable -casos amb t(8;21) o inv(16)/t(16;16)-, risc advers -casos amb CK, MK, alteracions estructurals del cromosoma 1 i monosomia 7- risc intermedi -casos alterats restants i NK-. L'anàlisi estadística confirma que hi ha

diferències estadísticament significatives tant per la taxa de RC com per la OS i la CIR entre els tres grups (Figura 33) [les dades es mostren en el punt 5.5 on es comparen amb MRC i CALGB].

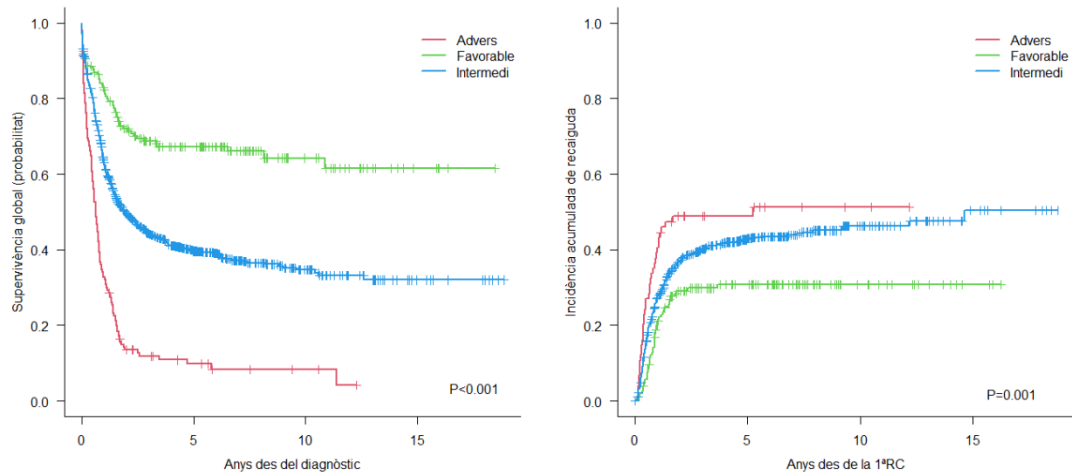


Figura 33: Probabilitat de supervivència global (OS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR) pels tres grups de risc proposats per CETLAM.

5.4 ESTUDI DE LES REORDENACIONS DEL GEN *KMT2A*

5.4.1 Característiques de la sèrie del pacients amb translocacions 11q23:

S'ha realitzat l'estudi retrospectiu de 107 pacients diagnosticats de LMA amb reordenació del gen *KMT2A* en 17 centres que pertanyen al GCECGH. S'han descrit les característiques clínico-biològiques i s'ha analitzat la resposta al tractament de 80 pacients (75%), tots ells inclosos en protocols de tractament comparables. El motiu d'exclusió dels 27 pacients restants va ser la quimioteràpia no intensiva (16 pacients) i un temps de seguiment insuficient (11 pacients). Per a l'anàlisi comparativa es va utilitzar un grup control consistent en 597 pacients amb LMA de cariotip normal procedents del registre CETLAM.

L'edat mediana dels pacients amb reordenació d'11q23 va ser de 45,5 anys (rangs, 18 a 68 anys) i 32 pacients (40%) eren homes. El recompte mitjà de leucòcits en el moment del diagnòstic va ser d' $11,7 \times 10^9 / L$ (rang, de 0,4 a $232 \times 10^9 / L$) i la LMA monoblàstica/monocítica va resultar ser el subtipus citològic més predominant (43%). L'anàlisi comparativa va mostrar que els pacients amb reordenació 11q23 eren més joves i

amb predomini femení que els pacients amb NK. A més, la incidència de leucèmia monoblàstica/monocítica aguda era més alta entre els pacients amb afectació 11q23 que en els cariotips normals (Taula 31).

Taula 31: Característiques clíniques i biològiques dels 80 pacients amb translocacions 11q23 inclosos en l'estudi i distribució dels pacients segons el tipus de LMA. Comparativa amb les LMA de cariotip normal (NK).

		t(11q23) (N=80)	NK (N=597)	p
EDAT, ANYS	Mediana [rangs]	45.5 [18 ; 68]	51 [18 ; 70]	0.003
SEXE	Masculí Femení	32 (40%) 48 (60%)	326 (55%) 271 (45%)	0.014
LEUCÒCITS (X10E9/L)	Mediana [rangs]	11.7 [0.4 ; 232]	18.1 [0.7 ; 400]	0.183
CLASSIFICACIÓ CITOLÒGICA SEGONS WHO	LMA amb mínima diferenciació	3 (4%)	33/371 (9%)	<0.001
	LMA sense maduració	5 (6%)	71/371 (19%)	
	LMA amb maduració	4 (5%)	51/371 (14%)	
	Leucèmia mielomonocítica aguda	10 (12%)	96/371 (26%)	
	Leucèmia monoblàstica/monocítica	34 (43%)	65/371 (18%)	
	Leucèmia eritroide	0	18/371 (5%)	
	Leucèmia megacarioblàstica	0	2/371 (1%)	
	LMA amb canvis relacionats amb displàsia	4 (5%)	30/371 (8%)	
LMA relacionada amb tractament	4 (5%)	0		
LMA no tipificada	16 (20%)	5/371 (1%)		

La translocació 11q23 va ser identificada per bandes G en 74 pacients (92,5%) i per FISH en els 6 pacients restants (4 casos amb cariotip normal i 2 casos sense metafases suficients). En 38 pacients (51,3%) la t(v;11q23) va ser l'única alteració cromosòmica. En els 36 casos restants, les alteracions citogenètiques acompanyants més freqüents van ser la trisomia 8 (14 casos) i la trisomia 21 (5 casos); i 10 casos (12,5%) van mostrar un cariotip complex amb 4 o més anomalies.

La distribució per freqüències de les diverses alteracions d'11q23 va ser la següent: 31 (38.7%) casos amb t(9;11), 16 (20%) amb t(11;19), 16 (20%) amb t(6;11), 5 (6.2%) amb t(10;11), 6 (7.5%) amb altres translocacions 11q23 no recurrents i 6 (7.5%) casos en els que no es va poder determinar el *partner*. No es van observar diferències estadísticament significatives pel que fa a les variables clínic-biològiques entre els tres subgrups 11q23 (Taula 32).

Taula 32: Comparativa de les característiques clíniques i biològiques dels diversos tipus de translocacions 11q23.

		t(9;11) (N=31)	t(11;19) (N=16)	t(6;11) (N=16)	p
EDAT, ANYS	Mediana [rangs]	43 [18 ; 68]	47.5 [21 ; 54]	45.5 [21 ; 68]	0.408
SEXE	Masculí Femení	11 (35%) 20 (65%)	6 (37%) 10 (63%)	7 (44%) 9 (56%)	0.857
LEUCÒCITS (X10E9/L)	Mediana [rangs]	56 [0.7 ; 220]	7.5 [0.4 ; 84.4]	15.7 [1.6 ; 232]	0.142
CLASSIFICACIÓ CITOLÒGICA SEGONS WHO	LMA amb mínima diferenciació	1 (3%)	0	1 (6%)	0.623
	LMA sense maduració	2 (6%)	1 (6%)	0	
	LMA amb maduració	1 (3%)	2 (12%)	0	
	Leucèmia mielomonocítica aguda	2 (6%)	3 (19%)	3 (19%)	
	Leucèmia monoblàstica/monocítica	16 (52%)	4 (25%)	8 (50%)	
	Leucèmia eritroide	-	-	-	
	Leucèmia megacarioblàstica	-	-	-	
	LMA amb canvis relacionats amb displàsia	1 (3%)	0	1 (6%)	
	LMA relacionada amb tractament	2 (6%)	2 (12%)	0	
LMA no tipificada	6 (19%)	4 (25%)	3 (19%)		

5.4.2 Anàlisi de supervivències de les translocacions 11q23:

Per a l'anàlisi de les variables de supervivència només s'han tingut en compte la t(9;11), la t(11;19), la t(6;11) i el NK (la resta s'han exclòs per número insuficient de pacients).

No s'han observat diferències estadísticament significatives en la taxa de RC en cap dels grups. Van assolir la RC 61 pacients (76%) amb LMA amb afectació 11q23 i 470 pacients (79%) amb NK ($p=0.613$). Les taxes de RC de les diferents translocacions 11q23 van ser del 88% per a t(11;19), el 81% per a t(6;11) i el 68% per a t(9;11) ($p=0,276$).

Després de la consolidació, 47 pacients amb LMA 11q23 (58,7%) van sotmetre's a un TPH, que va ser al·logènic en 38 (80,8%) i autòleg en els 9 pacients restants (19,1%). En el grup NK, 326 pacients (54,6%) van ser sotmesos a un TPH, que va ser al·logènic en 145 pacients (44,5%) i autòleg en 181 (55,5%).

La mediana del temps de seguiment dels pacients vius ha estat de 4,45 anys (extrems 0,40 i 13,52 anys) i la probabilitat de supervivència als 10 anys ha estat del 32% (IC del 95%, del 21% al 43%). En aquest cas s'ha avaluat la OS, la CRD i la DFS dels pacients que van assolir la RC ($n=61$). Cal destacar que 11 d'aquests pacients han sigut exclosos per no disposar de dades sobre la recaiguda. Els casos amb translocacions 11q23 no han mostrat diferències estadísticament significatives amb el grup de referència per a cap variable de resposta

(Taula 33). Per a les diferents reordenacions de 11q23, la OS, la CRD i la DFS tampoc han demostrat diferències entre els grups, tot i que la OS i la CRD mostren una tendència a la significació (Taula 34; Figura 34).

Taula 33: Impacte de les reordenacions 11q23 sobre la supervivència global (OS), la durada de la remissió completa (CRD) i la supervivència lliure de malaltia (DFS) als 3 anys.

VARIABLES	t(11q23) (N=80)	NK (N=597)	p
TAXA RC	61 (76%)	470 (79%)	0.613
OS, % (IC95%)	32% (21 ; 43)	45% (41 ; 49)	0.240
CRD, % (IC95%)	49% (33 ; 65)	56% (51 ; 61)	0.800
DFS, % (IC95%)	39% (25 ; 53)	46% (41 ; 51)	0.752

Taula 34: Impacte dels diversos tipus de translocacions 11q23 sobre la supervivència global (OS), la durada de la remissió completa (CRD) i la supervivència lliure de malaltia (DFS) als 3 anys.

VARIABLES	t(9;11) (N=31)	t(11;19) (N=16)	t(6;11) (N=16)	NK (N=597)	p
TAXA RC	21 (68%)	14 (88%)	13 (81%)	470 (79%)	0.622
OS, % (IC95%)	32% (16 ; 48)	52% (26 ; 78)	31% (8 ; 54)	45% (41 ; 49)	0.054
CRD, % (IC95%)	62% (36 ; 88)	58% (26 ; 90)	27% (0 ; 56)	56% (51 ; 61)	0.078
DFS, % (IC95%)	44% (20 ; 68)	46% (17 ; 75)	18% (0 ; 41)	46% (41 ; 51)	0.096

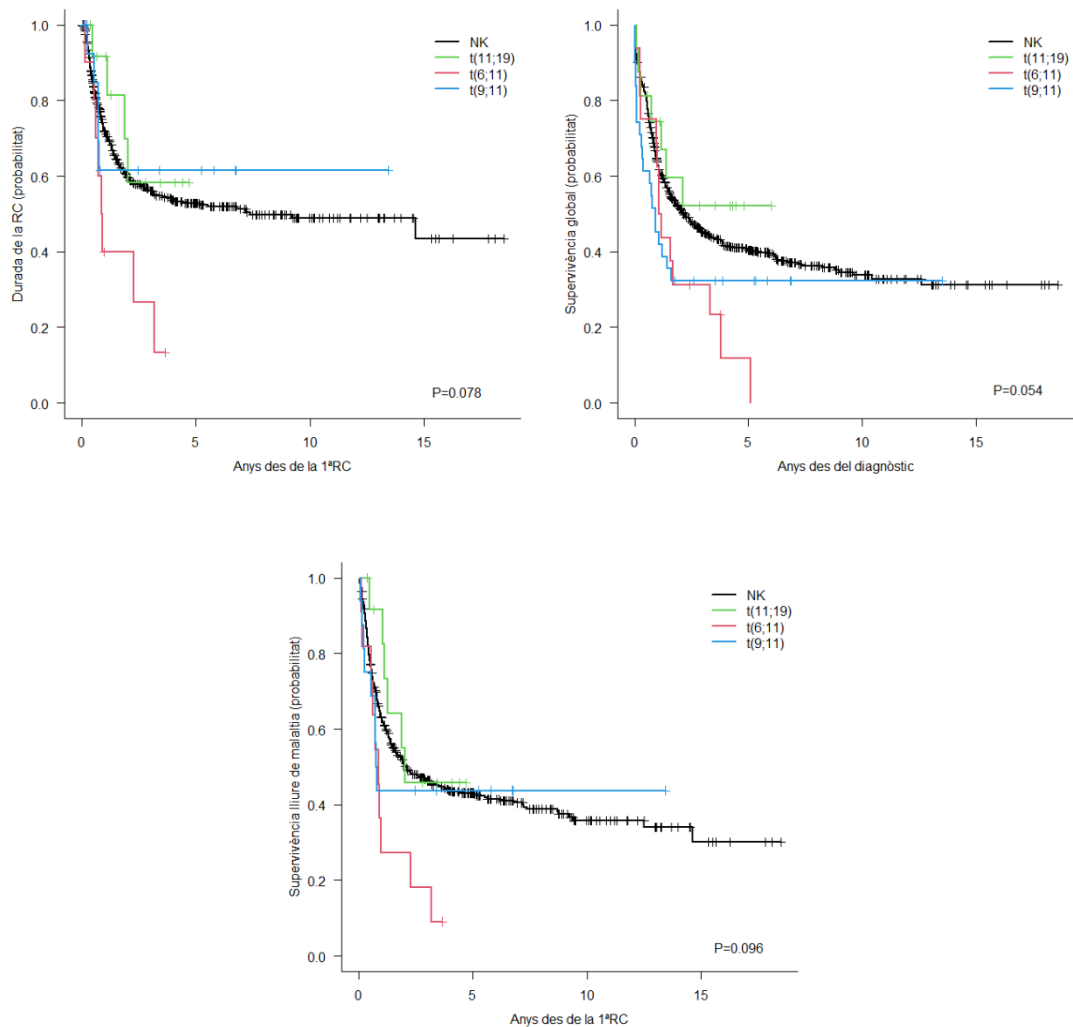


Figura 34: Gràfiques de la durada de la RC, la supervivència global i la supervivència lliure de malaltia de les diverses translocacions 11q23 i del cariotip normal.

Com a conseqüència d'aquests resultats, s'han agrupat els casos amb t(9;11) i t(11;19) i s'han tornat a analitzar les variables de resposta. En aquest escenari, la CRD mostra diferències significatives entre els grups (61%; IC 95%, 41% al 81%, $p=0,034$), la DFS és gairebé significativa (45%; 95% CI, 26% al 64%, $p=0,051$), però disminueix la tendència de la OS a la significació (39%; IC del 95%, del 25% al 53%, $p=0,096$) (Figura 35).

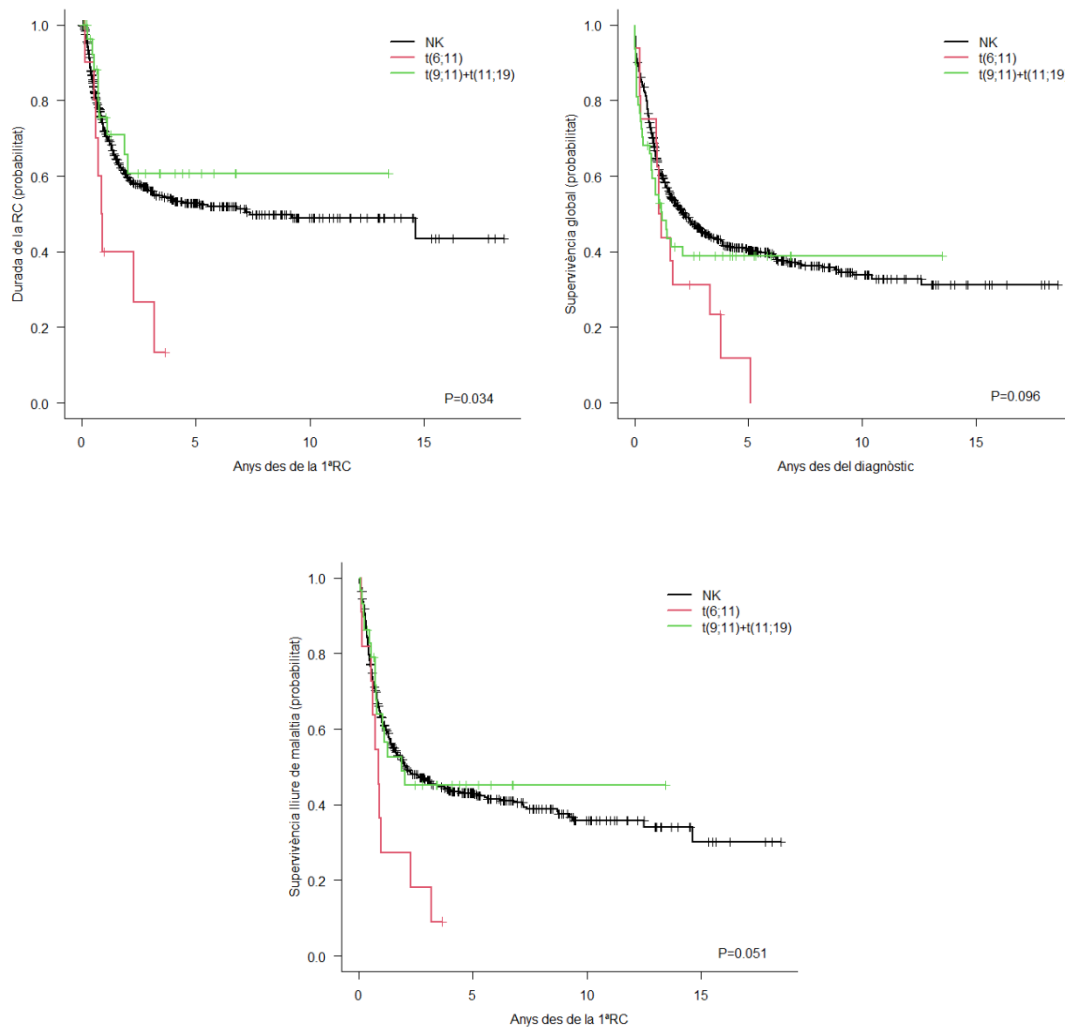


Figura 35: Gràfiques de la durada de la RC, la supervivència global i la supervivència lliure de malaltia dels pacients amb t(9;11) i t(11;19) agrupats comparat amb la t(6;11) i el cariotip normal.

5.5 VALIDACIÓ DELS SCORE MRC, CALGB I CETLAM

Els pacients CETLAM s'han classificat segons els grups de risc proposats per MRC i CALGB (Taula 10 Resultats). Cal tenir en compte que, dels 1235 pacients amb informació citogenètica suficient per a poder-los classificar correctament en un grup de risc, 111 pacients (9%) no s'han pogut classificar segons el sistema CALGB ja que presentaven alteracions citogenètiques no assignades específicament a cap grup de risc segons CALGB. Un altre tret diferencial entre ambdós sistemes de classificació és que el grup advers de CALGB engloba més pacients que MRC (21% vs 16%) (Figura 36).

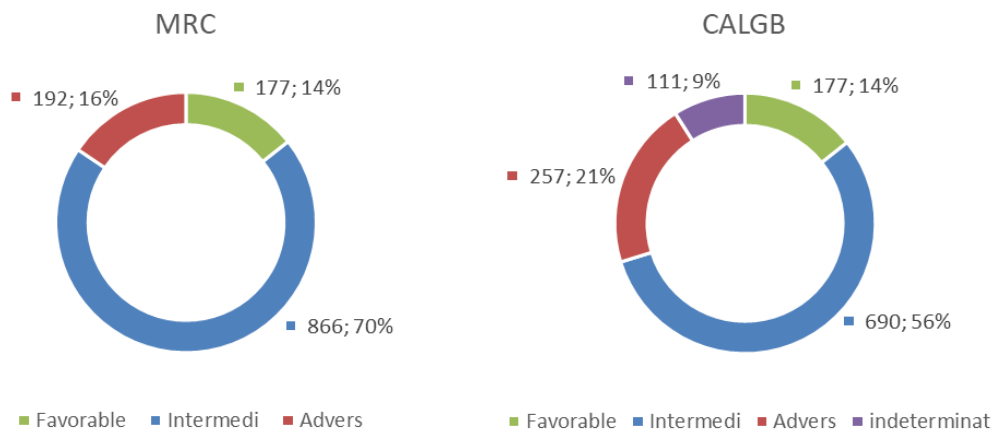


Figura 36: Distribució dels pacients de la sèrie segons els sistemes de classificació MRC i CALGB.

S'ha comprovat que les classificacions de MRC i CALGB permeten estratificar clarament i de manera estadísticament significativa els pacients d'aquesta sèrie en els tres grups de risc citogenètic definits, tant per la taxa de RC com per la OS i la CIR (Taula 35 i Figura 37). En termes de OR per l'assoliment de la RC també s'obtenen diferències estadísticament significatives entre els tres grups (Annex A.3).

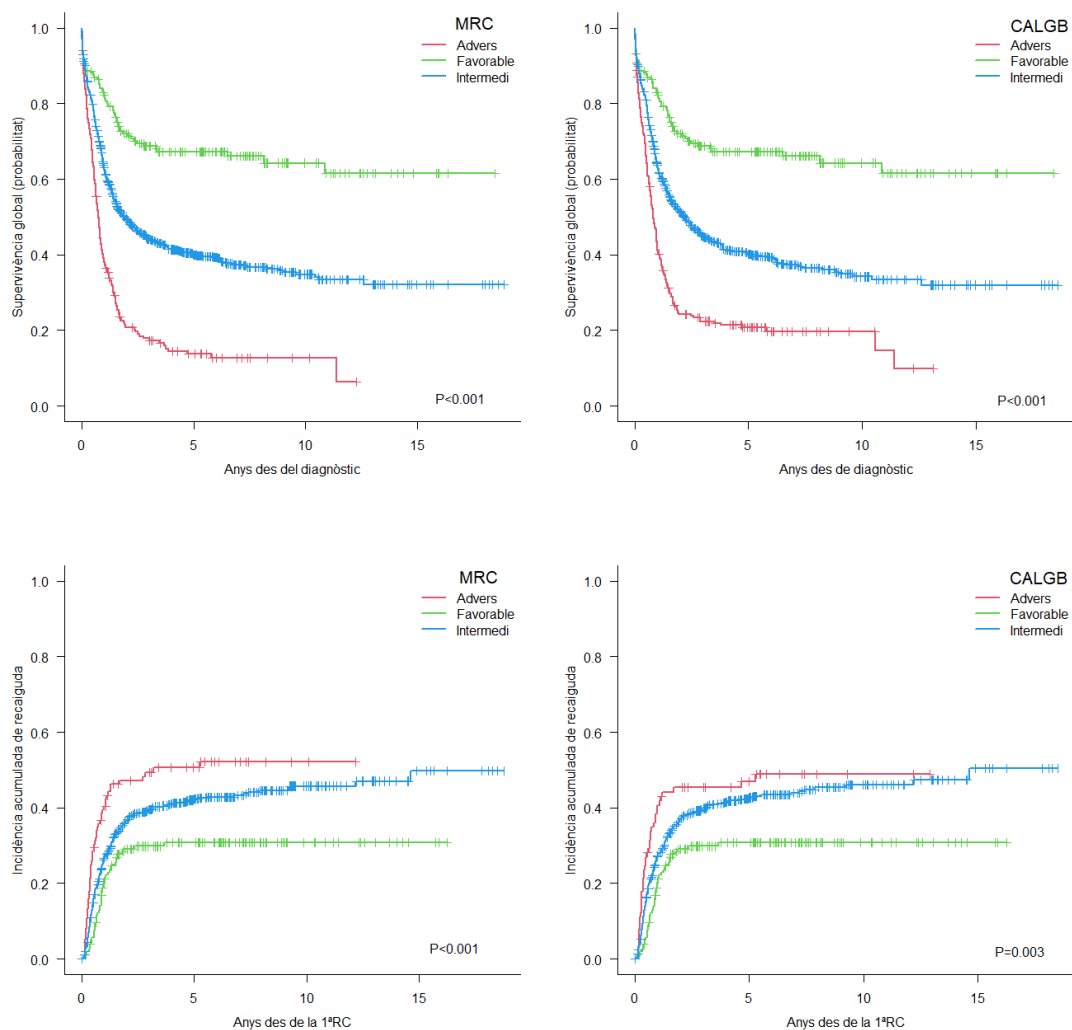


Figura 37: Probabilitat de supervivència global (OS) i incidència acumulada de recaiguda (CIR). Hi ha diferències estadísticament significatives entre els tres grups tant si són classificats segons MRC com per CALGB.

Quan es comparen les tres classificacions pronòstiques (MRC, CALGB i CETLAM) s'obtenen els mateixos resultats per la taxa de RC, la probabilitat de OS i la CIR en el grup de risc favorable, ja que les alteracions citogenètiques contemplades en aquest grup són les mateixes. Pel que fa al grup de risc intermedi, també són molt similars les dades obtingudes en els tres grups per les tres variables de supervivència. En canvi, es detecta una taxa de RC inferior en el grup de risc advers del CETLAM envers MRC i CALGB i una probabilitat de OS del grup advers diferent per a cadascuna de les classificacions. Pel que fa a la CIR, s'observa que és similar entre els mateixos grups de risc (Taula 35).

Taula 35: Mostra la comparativa entre les tres classificacions pronòstiques per la taxa de remissió completa (RC), la supervivència global (OS) als 8 anys i la incidència acumulada de recaiguda (CIR) als 8 anys.

	MRC	p	CALGB	p	CETLAM	p
RC (%)						
FAVORABLE	156/177 (88%)		156/177 (88%)		156/177 (89%)	
INTERMEDI	666/861 (77%)	<0.001	618/800 (77%)	<0.001	703/897 (78%)	<0.001
ADVERS	112/191 (59%)		90/158 (57%)		74/150 (49%)	
OS (IC 95%)						
FAVORABLE	66% (59% ; 73%)		66% (59% ; 73%)		66% (59% ; 73%)	
INTERMEDI	37% (33% ; 41%)	<0.001	36% (32% ; 40%)	<0.001	37% (33% ; 41%)	<0.001
ADVERS	13% (8% ; 18%)		20% (15% ; 25%)		8% (3% ; 13%)	
CIR (IC 95%)						
FAVORABLE	31% (24% ; 38%)		31% (24% ; 38%)		31% (24% ; 38%)	
INTERMEDI	45% (40% ; 49%)	<0.001	45% (41% ; 50%)	0.003	45% (41% ; 49%)	0.001
ADVERS	52% (42% ; 61%)		49% (38% ; 59%)		51% (39% ; 62%)	

6. DISCUSSIÓ

Les LMA són un conjunt heterogeni de malalties resultants de la transformació clonal de les cèl·lules progenitores hematopoètiques mitjançant l'adquisició de reordenaments cromosòmics i diverses mutacions gèniques.

Durant els darrers 20 anys l'anàlisi citogenètica en la LMA ha esdevingut una eina essencial que ha permès conèixer la biologia d'aquesta malaltia i, alhora, definir-ne el diagnòstic, el pronòstic i seleccionar-ne el tractament més adequat. Diversos grups cooperatius han proposat sistemes d'estratificació de risc citogenètic basats en l'anàlisi d'àmplies sèries de pacients. No obstant això, el valor pronòstic d'algunes alteracions recurrents segueix sent controvertit degut a resultats discordants entre sèries de pacients analitzades.

En aquest treball de Tesi Doctoral s'ha dut a terme l'anàlisi de les característiques i del valor pronòstic de les alteracions citogenètiques d'una sèrie històrica de 1417 pacients diagnosticats de LMA, tractats uniformement amb tres protocols consecutius del grup de tractament CETLAM i amb un seguiment màxim de gairebé 20 anys i de més de 5 anys de mediana. A més, s'ha realitzat una validació dels principals sistemes d'estratificació del pronòstic basats en alteracions citogenètiques en la LMA en una sèrie independent de pacients.

Característiques generals de la sèrie.

La sèrie ha estat constituïda per 1417 pacients adults diagnosticats de LMA *de novo* entre el 1994 i el 2012. En línies generals, les principals característiques clíniques i biològiques no difereixen de les d'altres sèries publicades tot i que pugui apreciar-se una certa heterogeneïtat en algunes variables degut als diferents criteris de reclutament dels pacients (període d'inclusió en els protocols, rangs d'edat o inclusió de LMA secundàries, per exemple).

L'edat mediana dels pacients d'aquesta sèrie ha estat de 50 anys (extrems: 15-70), comparable amb la d'altres sèries referents publicades com MRC el 2010 (44, extrems 16-59), CALGB el 2002 (52, extrems 15-86) o SWOG/ECOG el 2000 (39, extrems 16-55) (34-36). Cal tenir compte que el protocol CETLAM 03 va incloure pacients d'edat igual o inferior a 70 anys com a tret diferencial respecte els dos protocols anteriors que havien inclòs pacients de fins a 60 anys.

Pel que fa la classificació de les LMA, l'anàlisi s'ha realitzat amb el subgrup de LMA tractades dins el protocol LMA-03 (866 casos) ja que només s'havia recollit el tipus de LMA en aquest grup de pacients. Un total de 130 pacients (15%) ha presentat alteracions citogenètiques recurrents segons la classificació actual de la OMS, concretament t(8;21), inv(16) o t(16;16), t(9;11), t(6;9) i inv(3) o t(3;3). No hi ha hagut cap cas de t(1;22) ni t(9;22) en la sèrie de pacients estudiada; en el cas de la t(1;22) per tractar-se d'una alteració pràcticament només descrita en LMA infantil, i en el cas de la t(9;22) perquè es deuen tractar amb protocols de leucèmia mieloide crònica i no van incloure's al CETLAM. Cal remarcar que en el moment del diagnòstic d'aquests pacients no es realitzaven de manera sistemàtica els estudis de mutacions de *NPM1*, *CEBPA* ni *RUNX1* de manera que els pacients amb aquestes mutacions hauran estat distribuïts en altres grups de LMA. De la resta de pacients sense alteracions recurrents reconegudes per la OMS, 77 presentaven displàsia i podien classificar-se de LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia i 659 es van classificar com a LMA NOS, distribuïnt-se de manera bastant uniforme entre els diversos grups citològics (Taula 10 Resultats).

Pel que fa a l'estudi citogenètic, es van observar alteracions cromosòmiques en 638 pacients, que representen un 51% dels casos analitzats i amb resultat de cariotip valorable, mentre que 616 pacients (49%) van presentar un KN. Aquests percentatges coincideixen amb els publicats per altres sèries de pacients dels que es conclou que entre el 40 i 50% de les LMA presenten un NK en el moment del diagnòstic (34,35,94). A més, la incidència d'alteracions citogenètiques recurrents segons la classificació de la OMS en aquesta sèrie de pacients també és comparable a la reportada per altres sèries publicades (Taula 36). Aquestes dades validen la qualitat de l'anàlisi citogenètica realitzada pels diversos laboratoris de referència del grup CETLAM.

Taula 36: Comparativa entre diverses sèries de pacients de la freqüència de les alteracions citogenètiques recurrents reconegudes a la classificació de la OMS.

ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES	CETLAM	MRC 2010	CALGB 2002	Papaemmanuil et al. 2017
t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	7%	7%	7%	4%
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB::MYH11</i>	7%	5%	8%	5%
t(v;11q23); Reordenaments <i>KMT2A</i>	~4%	~4%	4.5%	3%
t(9;11)(p21;q23); <i>MLLT3::KMT2A</i>	1%	1%	2.2%	-
inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i>	2%	1%	1%	1%
t(6;9)(p23;q34); <i>DEK::NUP214</i>	2%	1%	0.7%	1%
t(1;22)(q13.3;q13.3); <i>RMB15::MKL1</i>	-	<0.5%	-	-
t(9;22)(q34;q11); <i>BCR::ABL1</i>	-	1%	-	-

Diversos estudis realitzats en sèries àmplies de pacients han permès estratificar els pacients, en funció de les alteracions cromosòmiques, en tres grups de risc citogenètic: favorable, intermedi i desfavorable (34–36,95). Per al present estudi s'han seleccionat la classificació revisada de l'MRC (34) i la de CALGB (35) com a referents per comprovar si la sèrie de pacients CETLAM s'ajusta a aquestes classificacions i per comparar-les amb els grups de risc propis definits en aquest treball. Així, segons la classificació de MRC, 177 pacients (14%) van presentar les alteracions considerades del grup de risc citogenètic favorable, 192 pacients (16%) van presentar alteracions catalogades com de risc desfavorable i 866 pacients (70%) presentaven un NK o anomalies diferents a les considerades de pronòstic desfavorable i, per tant, van ser classificats dins de el grup de risc intermedi. En canvi, segons la classificació de CALGB (per la OS) que presenta algunes diferències referents a la classificació en els grups intermedi i advers, 257 pacients (21%) van classificar-se en el grup de risc advers, 690 pacients (56%) en el grup de risc intermedi i 111 (9%) no es van poder catalogar per presentar una alteració cromosòmica de pronòstic no determinat per CALGB.

Alteracions cromosòmiques.

Amb l'anàlisi dels 638 casos que han presentat un cariotip alterat, s'han pogut identificar un total de 550 aneuploidies, el 56% de les quals han estat monosomies. Aquesta distribució fa pensar que existeix una tendència al predomini de les monosomies (més que les trisomies) en les LMA i, per tant, que la pèrdua de material genètic té un major efecte leucemogènic en la LMA.

S'han detectat trisomies de tots els cromosomes, tot i que algunes d'elles són extremadament infreqüents com són la +17 i la +Y (només 1 cas). En altres sèries de pacients publicades no es reporten casos de trisomia 17 (34,36,39,95,96), fet que sembla confirmar que es tracta d'una alteració extremadament rara en la LMA. Altres trisomies també presents en molt baixa freqüència són la +2, +5 i +15 (2 casos) o la +1, +7, +16 i +X (3 casos). Aquests cromosomes són precisament els que s'han trobat de manera més freqüent com a monosomia, confirmant així la funció leucemogènica de la pèrdua d'aquests cromosomes (per sobre del guany). Per altra banda, la trisomia més freqüent amb diferència ha estat la +8, representant un 39% de totes les trisomies i coincidint amb les publicacions.

Pel que fa a les monosomies, també s'han detectat en tots els cromosomes, sent les monosomies 1 i 14 les més infreqüents d'aquesta sèrie (2 casos). La monosomia del cromosoma 7 és la més freqüent amb diferència, representant un 18% de totes les monosomies, seguida de la pèrdua dels cromosomes 17 i 5 (8% i 6% respectivament). La pèrdua del cromosoma Y també ha estat freqüent (12%) tot i que s'ha de tenir en compte el fenomen natural de pèrdua d'aquest cromosoma deguda a l'edat. La freqüència de pèrdua de Y augmenta a mesura que avança l'edat i és significativament major en casos de SMD, NMP, LMA o malaltia limfoproliferativa que en casos sense evidència de malaltia hematològica (97). Per consens, es considera que si menys del 75% de les metafases són -Y, l'associació de la malaltia és incerta; mentre que si el 75-100% de les metafases són -Y, el cariotip probablement estigui associat a la malaltia, fins i tot en pacients d'edat avançada. En aquesta sèrie, 28 pacients (76% dels que presenten -Y) presentaven la pèrdua de la Y en un 75% o més de les metafases i, per tant, es considera una alteració adquirida de la LMA.

Cal esmentar en particular les aneuploidies del cromosoma 21, pel fet de poder observar-se tant trisomies com monosomies, a diferència de la majoria de cromosomes que tenen tendència a perdre's o guanyar-se de manera excloent. Quan s'analitza la seva relació amb la complexitat del cariotip, es pot observar que les monosomies del cromosoma 21 són pràcticament exclusives de CK i no hi ha cap cas en que es trobin soles o amb una anomalia acompanyant. En canvi la trisomia 21 sí que s'observa freqüentment com a com a anomalia única, fet que consolida el rol de la trisomia d'aquest cromosoma (per sobre de la monosomia) com a mecanisme patogènic (98,99).

Les alteracions estructurals detectades (921 entre els 638 casos de cariotips alterats) s'han dividit entre equilibrades i desequilibrades. Les primeres poden ser indicatives de formació de gens de fusió com a mecanisme patogènic mentre que en les desequilibrades, en canvi, el mecanisme patogènic pot ser degut a diferència de dosi (guany o pèrdua de material genètic). Les alteracions més freqüents han estat les equilibrades, degut bàsicament als casos de $t(8;21)$ i $inv(16)/t(16;16)$. Amb les alteracions desequilibrades s'ha produït majoritàriament pèrdua de material genètic (delecions o derivatius amb pèrdua) essent les delecions dels cromosomes 5q i 7q les més freqüents de la sèrie. Una vegada més, aquestes dades recolzen la teoria de que la pèrdua de material genètic té un major impacte en la leucemogènesi.

En referència al grau de complexitat dels cariotips, destaca que totes les monosomies tenen tendència a presentar-se acompanyades d'altres alteracions cromosòmiques. A excepció de la monosomia 7, que tant es pot trobar aïllada com acompanyada, la majoria de les

monosomies més freqüentment observades (4, 5, 12, 15, 17, 18 i 21) pràcticament només existeixen en context de complexitat citogenètica (≥ 4 alteracions). Aquest fet suggereix que probablement moltes d'aquestes monosomies són esdeveniments secundaris i un reflex de la inestabilitat cromosòmica conseqüència d'altres alteracions de caràcter primari. Les trisomies en canvi, bàsicament +8, +11 i +21, tant poden trobar-se aïllades com acompanyades per altres anomalies. No s'ha trobat cap cas de +19 ni +22 aïllades, fet que suggereix que són també alteracions secundàries i poc rellevants en la patogènia de la LMA.

Pel que fa a l'anàlisi de la complexitat amb alteracions estructurals, s'observa que les alteracions estructurals dels cromosomes 4, 5 (tant del(5q) com altres), 15, 16 (excloent CBF) i 19 són més freqüents en un context de complexitat cariotípica que com a alteracions úniques o amb 1 o 2 anomalies acompanyants. En canvi, les alteracions CBF es presenten majoritàriament com a alteració única. Poden trobar-se acompanyades d'una o dues alteracions però rarament es troben dins d'un CK. Cal destacar però, que la t(8;21) s'ha trobat acompanyada per altres anomalies més freqüentment que la inv(16), de manera estadísticament significativa ($p=0,010$). La complexitat en relació a les alteracions del cromosoma 11 també varia segons si es tracten de reordenaments 11q23 (afectació del gen *KMT2A*), que són més freqüents com a anomalia única, o bé són altres alteracions estructurals de l'11, que es presenten habitualment en un context més complex. Finalment destaca que la t(6;9) pràcticament només existeix com anomalia única aïllada.

En l'anàlisi de co-ocurrència de les diverses alteracions citogenètiques s'ha confirmat que la majoria dels reordenaments recurrents en la LMA segons la classificació de la OMS del 2017 (concretament t(8;21), t(6;9) i reordenaments 11q23) no mostren cap associació significativa amb altres alteracions cromosòmiques. Aquest fet reafirma que es tracta d'alteracions primàries de la leucemogènesi. N'és una excepció la inv(3)/t(3;3) que s'associa de manera significativa a la monosomia 7 ($p<0.001$). En 8 casos es va detectar concurrència d'aquestes dues alteracions, representant un 36,4% dels casos amb monosomia 7 i un 14,8% dels casos amb inv(3)/t(3;3). Per altra banda, tampoc es pot dubtar del caràcter primari de la inv(16)/t(16;16), tot i que presenti associació amb una alteració inespecífica com és la trisomia 22, i de la t(8;21), que s'associa a la pèrdua dels cromosomes sexuals. El mateix passa amb la trisomia 8, que s'associa de manera significativa a la trisomia 22. Pel que fa a les monosomies i delecions dels cromosomes 5, 7 i 17, s'observa que s'associen entre sí. Aquest fet s'explica perquè són alteracions que acostumen a formar part de CK i, per tant, ocorren alhora.

Per últim, en l'anàlisi de recurrència, s'han intentat identificar alteracions no descrites prèviament en LMA i que es poguessin catalogar de recurrents. El 18% de les translocacions detectades en aquesta sèrie de pacients no han estat descrites prèviament a la LMA però tampoc n'hi ha hagut cap detectada més d'una vegada, de manera que no es pot establir recurrència de cap de les translocacions descrites. Analitzant en detall les bandes cromosòmiques afectades es poden sospitar, en alguns casos, possibles gens candidats a haver estat reordenats i coneguts per la seva implicació en la patogènia de la LMA. Desafortunadament, no es disposa de material genètic guardat del moment del diagnòstic d'aquests pacients. Actualment, amb les tècniques diagnòstiques de nova generació (com els cariotips moleculars o la NGS) es podrien determinar amb exactitud els gens implicats i veure si poden ajudar en la classificació diagnòstica o pronòstica de la LMA en qüestió.

Validació de grups citogenètics referents de la sèrie.

Abans d'estudiar l'impacte pronòstic d'alteracions citogenètiques específiques, s'han analitzat el NK, el grup CBF, el CK i el MK per la seva coneguda rellevància sobre el pronòstic en la LMA.

El NK, definit com l'absència d'anomalies cromosòmiques clonals detectades en un mínim de 20 metafases completament analitzades, representa el subconjunt citogenètic més gran de pacients amb LMA i es classifica com a risc intermedi per a tots els grups cooperatius més importants (34-36,100). És un grup heterogeni caracteritzat per una notable variabilitat de resposta al tractament i assoliment de la RC, taxa de recaiguda, DFS i OS. Això és principalment degut a les alteracions moleculars concurrents amb el NK, com són les mutacions de *NPM1* i les *FLT3*-ITD. Per poder utilitzar el NK com a grup de referència per l'anàlisi estadística, s'ha validat el pronòstic intermedi del grup de pacients amb NK d'aquesta sèrie independentment de les alteracions moleculars. Així, s'ha confirmat que no hi ha diferències entre les variables pronòstiques del grup amb NK sense mutacions de *NPM1* ni *FLT3*-ITD i del grup amb NK i mutacions de *NPM1* i/o *FLT3*-ITD (es podria dir que l'efecte positiu sobre el pronòstic de les mutacions de *NPM1* compensa l'impacte negatiu de les *FLT3*-ITD, i viceversa).

Pel que fa al grup CBF, que inclou els casos de t(8;21) i inv(16)/t(16;16), tot i ser considerat unànimement de bon pronòstic, ha generat incertesa sobre l'impacte pronòstic de les anomalies citogenètiques addicionals. Els primers estudis suggerien que la presència de del(9q), -Y i el CK podien predir un pitjor pronòstic en els CBF (87,101). Posteriorment, amb

l'estudi més recent publicat al respecte, MRC no va trobar cap evidència de que les anomalies citogenètiques addicionals tinguessin un impacte negatiu en la LMA amb t(8;21), de fet, hi va haver una tendència a una millor resposta en els casos que s'acompanyaven de pèrdua del cromosoma Y (34). Per altra banda, en els pacients amb inv(16), la presència d'anomalies addicionals, en particular la trisomia 22, va predir un millor resultat, fet que reafirmava els estudis publicats anteriorment per CALGB i el grup alemany (87,88). En aquest treball, la complexitat del cariotip tampoc ha modificat el bon pronòstic del grup CBF. Tot i així, cal tenir en compte que els pacients de 3 i més alteracions s'han hagut d'agrupar i, per tant, no es pot assegurar que un CK de 5 o més anomalies no tingui cap efecte negatiu sobre el pronòstic dels CBF.

La definició de CK ve determinada pel pronòstic, per tant, la suma d'alteracions cromosòmiques que defineixen un CK varia en funció de la malaltia i inclús de cada sèrie de pacients estudiada. En aquesta sèrie de pacients s'ha observat que a partir de 5 alteracions el pronòstic és significativament pitjor al pronòstic del NK. Aquest resultat coincideix amb les primeres publicacions del MRC (39,95) però no concorda amb la seva última revisió vigent actualment, en la que es defineix CK a partir de 4 alteracions (34). Tampoc acaba coincidint amb la definició de CALGB (35) tot i la similitud de les dades obtingudes en la seva sèrie i aquesta. CALGB va demostrar que els pacients amb 3 i 4 anomalies tenien, de manera estadísticament significativa, millors OS i CIR que els pacients amb 5 o més anomalies, però alhora presentaven una taxa de RC i una OS significativament inferiors al grup amb NK. Per aquest motiu, van decidir agrupar-los tots en una única categoria de CK, definit per la presència de 3 o més alteracions. Una possible explicació a la discordança entre els resultats obtinguts i la resta de publicacions és que en la nostra sèrie hi ha pocs pacients en els grups de 3 i 4 anomalies (24 i 22 pacients respectivament) en comparació amb el grup de 5 o més anomalies (78 pacients), de manera que no arriben a la significació estadística. Una altra possible explicació és que hi poden haver diferències de criteris en el comptatge de les anomalies d'una fórmula citogenètica. En aquest anàlisi s'han tingut en compte totes les alteracions detectades en cada cas i s'han comptabilitzat com a una anomalia cadascuna d'elles. L'anàlisi de MRC, en canvi, comptabilitza un cromosoma derivatiu com a dues anomalies. El mètode de comptatge d'anomalies no es descriu en altres sèries publicades de manera que és difícil extreure'n conclusions més detallades.

Per últim, s'ha validat també el MK com a grup de mal pronòstic en la nostra sèrie. El MK és un cariotip que presenta dues monosomies (excloses les de cromosomes sexuals) o bé una monosomia acompanyada d'una o més alteracions estructurals (46). Aquesta definició

coincideix en moltes ocasions amb un CK, considerat per tots els sistemes d'estratificació pronòstica com a risc advers. És per això que en aquest treball s'ha analitzat el pronòstic diferenciant diversos grups segons si eren, o no, CK i MK. Els pacients amb MK "pur" (que no compleixen els criteris de CK) tenen un pronòstic similar als pacients amb CK i significativament pitjor als pacients amb NK, per tant cal classificar-los en el grup de risc advers. Si no es té en compte el concepte de MK, aquests pacients són classificats en risc intermedi i poden ser tractats d'una manera inadequada.

Impacte de les alteracions citogenètiques en el pronòstic.

L'anàlisi citogenètica en el moment del diagnòstic de la LMA és un dels factors pronòstics més importants en la predicció de la resposta al tractament dels pacients amb LMA. Generalment les LMA es classifiquen en tres grups pronòstics basats en l'estudi citogenètic: risc alt, intermedi i baix; que mostren diferències significatives entre ells pel que fa a la taxa de RC, la DFS i la OS (34–36). Els pacients amb citogenètica d'alt risc són candidats a rebre un alo-TPH, mentre que els pacients amb citogenètica de baix risc només rebran quimioteràpia estàndard. Queda per definir quin és el millor tractament per als pacients amb LMA de risc intermedi, en el que clàssicament s'hi agrupen les alteracions que no poden ser classificades en els altres dos grups. Per aquest motiu és molt important aconseguir una classificació acurada dels pacients. No obstant, encara hi ha alguna inconsistència en l'assignació del grup de risc d'algunes anomalies citogenètiques en particular si es comparen diversos esquemes d'estratificació de risc publicats (34,35,91). Probablement això es deu a diverses raons, com ara la mida relativament petita de les cohorts d'anàlisi, les variacions en el rang d'edat de les poblacions de l'estudi, així com diferències en els protocols de tractament entre els grups cooperatius. En particular, no hi ha un bon consens pel que fa a l'impacte pronòstic d'anomalies citogenètiques recurrents poc freqüents (incidència individual <2%), que juntes representen aproximadament el 10% de la LMA i que es consideren predictoros d'un pronòstic intermedi o advers (34–36,102). Les translocacions que involucren el cromosoma 11q23 i reordenen el gen *KMT2A* també generen controvèrsia pel que fa al seu pronòstic. Tot i que generalment es consideren de mal pronòstic, diversos estudis han suggerit que es tracta d'un grup heterogeni en que la importància sobre el pronòstic recau en el gen *partner* que es reordena amb *KMT2A* (103,104). Aquest fet només ha quedat ben establert en el cas de la t(9;11), que es classifica en el grup de risc intermedi, però no s'ha aconseguit un consens per a les altres translocacions de 11q23 (34,35,91).

Tenint en compte tot això i amb l'objectiu de perfeccionar la classificació citogenètica de la LMA del grup CETLAM, s'ha realitzat una primera anàlisi univariant de l'impacte de les alteracions citogenètiques recurrents sobre la taxa de RC, la OS, la DFS i la CIR dels pacients inclosos en CETLAM. S'han exclòs de l'anàlisi els pacients amb CK (>4 anomalies) i els MK que podrien condicionar el pronòstic de l'alteració específica analitzada. Les alteracions amb un resultat significativament pitjor per alguna de les variables de supervivència analitzades han estat: les alteracions estructurals del cromosoma 1, anomalies del cromosoma 3 que no inclouen inv(3)/t(3;3), les delecions de 5q, la monosomia 7, alteracions del cromosoma 9 que no inclouen t(6;9), la trisomia 9 i les delecions de 20q (Taula 37).

Degut a un número insuficient de pacients (<10 pacients) no s'han pogut analitzar totes aquestes anomalies significatives en l'anàlisi multivariant posterior i només s'ha pogut analitzar l'impacte pronòstic independent de les alteracions estructurals de l'1, la delecio de 5q i la monosomia 7. Per aquest motiu s'ha realitzat un anàlisi descriptiu d'altres característiques concurrents que podrien tenir un impacte en la supervivència i que no es tenen en compte en l'anàlisi univariant, com són el tipus d'alteracions cromosòmiques acompanyants, el subtipus citològic, el recompte leucocitari o la presència de *FLT3*-ITD. Aquesta anàlisi descriptiva s'ha dut a terme tant per les alteracions que han estat significatives en l'anàlisi univariant com per altres que no ho han estat però que, segons altres referents bibliogràfics, haurien de tenir impacte sobre el pronòstic (Taula 37).

Taula 37: Descripció de les característiques que presenten els casos amb alteracions cromosòmiques significatives i no significatives en l'anàlisi univariant. *núm casos total que s'inclouen a l'univariant, només cert per OS. **leucocitosi desfavorable >50-100. (a) Citologia desfavorable: LMA eritroide, LMA megacariocítica i LMA amb displàsia

ALTERACIÓ	Variable pronòstica	Núm. casos*	Braços / bandes afectats	Núm. alteracions acompanyants	Tipus alteracions acompanyants	Subtipus citològic	Mediana leucòcits*	FLT3-ITD		
Significatives en anàlisi univariant	Alt estruct 1	RC i OS	14	ambdós equitatiu	64% alteració única (transloc amb <i>partner</i>)	-	sense displàsia en 64% (la resta no se sap)	8,5 (1,9-193)	1/10 casos	
	Altres 3	OS	10	variats	única o bé 1 acompanyant	sense importància pronòstica	només un cas amb displàsia	21,3 (1,2-129)	2/9 casos	
	del5q	CIR	13	-	2 casos tenen 4 alteracions	diverses, sense importància pronòstica	3 casos amb displàsia multilínia, la resta variats	5,10 (1,3-99)	2/12 casos	
	Monosomia 7	RC i OS	15	-	80% és anomalia única	-	NR	19,5 (1-222)	1/9 casos	
	Altres 9	OS	5	-	variats	els 2 casos FLT3wt tenen: un <i>KMT2A</i> i l'altre 4 alteracions amb 5q-	-	58,6 (3,4-193)	2/4 casos	
	Trisomia 9	OS	5	-	tots els casos són hiperdiploïdies de 48-49 Cr.	trisomies	-	3,8 (1-20)	cap cas	
	del20q	DFS	6	-	única o bé 1 acompanyant	només 1 cas amb alteracions de mal pronòstic acompanyants	3/6 amb citologia desfavorable (a)	4,5 (1,6-38)	cap cas	
No significatives en anàlisi univariant	EVI	-	11	-	única o bé 1 acompanyant	-	3/11 amb citologia desfavorable (a)	11,4 (1,2-157,3)	3/10 casos	
	Monosomia 5	-	0	no existeix -5 com anomalia única en aquesta sèrie, tots els casos dins de CK						
	t(6;9)	-	19	-	tots (menys un) són alteració única	-	variats	11,4 (2,3-238)	50%	
	del7q	-	14	-	la majoria són alteració única (12/17)	-	variats	37,5 (1,2-143)	2/9 casos	
	Monosomia 17	-	0	no existeix -17 com anomalia única en aquesta sèrie, tots els casos dins de CK						
	Reord 17p/i17	-	12	-	2 casos amb 4 alteracions, la resta bastant senzill	sense importància pronòstica	variats	5,5 (1,5-146)	tots negatius	

Les alteracions estructurals del cromosoma 1, la del(5q) i la monosomia 7, tot i descriure's també a la taula, s'han pogut estudiar individualment en l'anàlisi multivariant i es comenten en l'apartat corresponent.

Les anomalies del cromosoma 3, que no inclouen inv(3)/t(3;3), han estat significatives per la OS. S'han analitzat en detall les fórmules cromosòmiques d'aquests casos i no s'identifica un braç o banda cromosòmica afectada de manera recurrent. Tampoc són casos amb una elevada complexitat cariotípica ni es presenten acompanyats d'alteracions de conegut impacte pronòstic. Així doncs, seria necessària una anàlisi detallada d'aquestes alteracions

amb un nombre més gran de pacients per acabar de determinar la significació d'aquestes anomalies citogenètiques.

Les alteracions del cromosoma 9, que no inclouen t(6;9), han estat significatives per la OS. Es tracta només de 5 casos que s'han mirat en detall per intentar explicar el resultat de l'anàlisi univariant. Dos dels cinc casos presentaven *FLT3*-ITD i un cas presentava un cariotip amb 4 anomalies i del(5q); característiques que podrien explicar el resultat negatiu d'aquest petit grup de pacients. Tot i així, amb només 5 casos analitzats no és possible treure una conclusió definitiva sobre l'impacte de les alteracions del cromosoma 9 i es considera més aviat una troballa accidental de l'anàlisi.

La trisomia 9, significativa per la OS en l'anàlisi univariant, també consta només de 5 pacients i tots ells en un context de cariotip hiperdiploide de 48-49 cromosomes sense alteracions estructurals. Tot i que la hiperdiploidia sense alteracions estructurals no és de les alteracions més freqüents en LMA (incidència <2%), alguns estudis n'han pogut analitzar el pronòstic presentant diversos resultats al respecte. F Stölzel *et al.* van demostrar en el seu estudi que el cariotip hiperdiploide de 49-80 cromosomes sense alteracions estructurals era un factor pronòstic independent i que la OS d'aquest grup no diferia de la del grup de risc advers definit per ELN i MRC (43). Aquest fet podria explicar el resultat obtingut per la trisomia 9 en l'anàlisi univariant.

Les delecions del braç llarg del cromosoma 20 han estat significatives per la DFS. Tot i que ha estat considerada una alteració relacionada a mala resposta al tractament i inferior supervivència (36,105), els estudis referents amb grans sèries de pacients publicats més recentment la consideren de pronòstic intermedi (34,35). Una possible explicació al resultat obtingut és que la meitat dels casos (3 de 6) presentaven displàsia en l'estudi citològic. Les LMA amb canvis relacionats amb mielodisplàsia s'associen a un pitjor pronòstic (106-108) tot i que no està clar si aquest fet és degut a la pròpia displàsia o bé a les alteracions citogenètiques i/o moleculars de mal pronòstic que acostumen a presentar-se en aquests casos. En la nostra sèrie, en absència d'alteracions citogenètiques amb reconegut impacte pronòstic acompanyants, la presència de mutacions de gens com *ASXL1* o *TP53* podria explicar la inferior DFS observada (109,110).

Per acabar, cal comentar algunes alteracions amb importància pronòstica ben definida en LMA que no han estat significatives en aquesta anàlisi:

La translocació t(6;9)(p23;q34), que produeix el reordenament dels gens *DEK::NUP214*, es troba en el 0,5-4% dels casos de LMA (34-36,111). Clàssicament s'ha associat a un curs

clínic molt pobre; amb una taxa de RC d'aproximadament el 50%, una supervivència mitjana d'1 any des del diagnòstic i una probabilitat d'OS que varia des d'un 0% a un 27% segons la sèrie (34,35,112). Tot i així, en les classificacions de risc de MRC i CALGB, la t(6;9) queda classificada de risc intermedi per no presentar diferències significatives respecte el NK, igual que en la nostra sèrie. L'opció terapèutica que sembla que permet millorar una mica la DFS i la OS és un alo-TPH (113). Tot i que aparentment sembla que la presència d'aquesta translocació és la responsable del mal pronòstic d'aquest subconjunt de pacients; alguns estudis han demostrat una prevalença elevada (70-85%) de mutació *FLT3*-ITD en els pacients amb LMA i t(6;9) (68,112,114). Aquesta característica fa difícil saber quina alteració és realment responsable del mal pronòstic d'aquests pacients. En aquesta sèrie de pacients CETLAM, de fet, es confirma també un elevat percentatge de casos que presenten *FLT3*-ITD (50%) però no tant elevat com cita la bibliografia. Aquest motiu podria explicar que l'alteració no hagi acabat sent significativa en l'anàlisi estadística.

Les inv(3)(q21;q26)/t(3;3)(q21;q26), que reordenen *MECOM*, es troben en aproximadament un 2,5-4% de les LMA (34-36,115). Els resultats clínics són molt pobres, amb una taxa de resposta baixa a la quimioteràpia d'inducció, una recaiguda precoç i una DFS i OS curtes inclús amb teràpies d'inducció agressives (115). S'acompanya freqüentment de la monosomia 7 (en un 66% dels casos segons bibliografia i en un 36% en aquesta sèrie) i en diversos estudis on s'analitza el pronòstic de la inv(3) no s'ha tingut en compte aquesta associació. En l'estudi publicat pels grups alemany, belga i austríac (HOVON/SAKK i AMLSG) en que s'analitza una sèrie de 6515 LMA amb 288 casos d'anomalies 3q, sí que demostren que els pacients amb inv(3)/t(3;3) i monosomia 7 addicional presenten una OS inferior als casos sense la monosomia 7. En la sèrie de pacients CETLAM estudiada, s'han analitzat els casos amb alteracions de 3q26 sense monosomia 7 i no s'ha detectat que presentin significativament un pitjor pronòstic que el grup de risc intermedi. L'explicació podria trobar-se en el tipus de tractament rebut, ja que els pacients amb aquestes anomalies passaven directament a ser candidats a alo-TPH, a diferència dels pacients amb NK amb qui se'ls compara en l'anàlisi estadística.

Les delecions del braç llarg del cromosoma 7 es troben, com a anomalia cromosòmica única, en aproximadament un 4-5% de la LMA de nou diagnòstic i representen el 33% dels casos de LMA amb alteracions del cromosoma 7 (113). Cal remarcar que no hi ha consens entre els grups cooperatius més importants per classificar les del(7q) dins del grup de risc citogenètic desfavorable. De fet, a la classificació de risc citogenètic proposada per Bloomfield i col·laboradors, els pacients amb LMA amb del(7q) en absència d'altres

alteracions cromosòmiques acompanyants es consideren pacients de risc intermedi (35,100).

En l'anàlisi univariant tampoc han estat significatives les alteracions del braç curt del cromosoma 17 (deleccions, isocromosomes 17q i altres reordenaments), concretament de la regió 17p13.1, on es localitza el gen *TP53*. Les alteracions de *TP53* s'associen a l'edat avançada dels pacients, a complexitat genòmica, a alteracions cromosòmiques específiques (com són la pèrdua i les deleccions dels cromosomes 5 i 7) i al MK (116,117). També es correlacionen amb una mala resposta als tractaments estàndards (taxes de RC de 20-40%) i amb una OS curta (medianes de supervivència de 4-9 mesos) (117,118). Una possible explicació al resultat contradictori d'aquest treball és la possibilitat de que *TP53* no estigui deletat en alguns casos, tot i l'aparent afectació cromosòmica de 17p13.1. És per això que sempre s'aconsella validar per FISH l'afectació del gen per a poder estratificar el pacient correctament. També cal tenir en compte la possibilitat de que les alteracions cromosòmiques de 17p13 no siguin un factor pronòstic independent. Per una banda, la majoria de publicacions que demostren l'associació de les alteracions de *TP53* a mal pronòstic s'han realitzat amb pacients que alhora presentaven altres factors de mal pronòstic com són els CK i els MK, mentre que en aquest treball els casos de CK i MK s'han exclòs. I per altra banda, cal recordar que *TP53* és un gen supressor tumoral i que, com a tal, pateix alteracions bial·lèliques (habitualment mutacions) com a mecanisme oncogènic que no han estat analitzades en aquest treball. Les implicacions clínic-biològiques de l'estat al·lèlic de *TP53* no estan ben estudiades en LMA. Només un estudi recent en SMD ha analitzat l'afectació bial·lèlica de *TP53* demostrant que la seva incidència és elevada (dos terços dels pacients estudiats) i que prediu risc de mort i transformació leucèmica de manera independentment. Alhora, i de manera sorprenent, la supervivència i la resposta al tractament dels pacients amb afectació monoal·lèlica de *TP53* no difereix de la dels pacients sense afectació de *TP53* (119). Així doncs, cal aprofundir encara en els mecanismes de leucemogènesi de *TP53* que ajudaran a definir el pronòstic i el tractament més adequat.

Finalment, cal comentar les translocacions de 11q23, que tampoc han mostrat un impacte significatiu sobre cap variable pronòstica en l'anàlisi univariant. Produeixen el reordenament del gen *KMT2A* i s'observen en aproximadament un 4-10% dels pacients amb LMA (34-36,120). Aquestes LMA, amb excepció dels casos amb t(9;11), en general es caracteritzen per un mal pronòstic, amb taxes de RC, OS i DFS baixes i, per tant, candidates també a un alo-TPH (113). No està ben definit encara si hi ha altres translocacions que, de la mateixa manera que la t(9;11), podrien tenir un pronòstic diferent. Diversos estudis han demostrat

que el pronòstic de la LMA amb reordenament de *KMT2A* depèn molt del *partner* de fusió (121–126) però aquesta importància pronòstica no està encara ben establerta a causa de la seva baixa freqüència i, per tant, a la manca de grans sèries de pacients estudiades. L'última classificació del MRC, en la que s'aconsegueix analitzar l'impacte pronòstic de les translocacions 11q23 diferenciant segons els cromosoma *partner* implicat, demostra que la t(11;19) no té un pronòstic desfavorable i l'inclou en el grup de risc intermedi (34). En la nostra sèrie de pacients s'ha intentat determinar si les diverses translocacions d'11q23 podien tenir un impacte diferenciat sobre el pronòstic però no ha estat possible. Per una banda, les translocacions t(6;11) i t(10;11) no s'han pogut analitzar perquè no es disposava d'un número suficient de pacients en cada cas. I per altra banda, ni les t(9;11) i t(11;19) ni els diversos reordenaments 11q23 restants, no han mostrat diferències estadísticament significatives pel que fa a les variables pronòstiques analitzades. De nou, l'explicació podria raure en la selecció d'aquests pacients com a candidats a rebre un alo-TPH, que implica un tractament més intensiu que els pacients amb NK amb qui se'ls compara en l'anàlisi univariant.

Amb l'objectiu d'aprofundir més en l'impacte de les diverses translocacions 11q23 sobre el pronòstic de la LMA, s'ha realitzat un anàlisi en paral·lel amb una sèrie més gran de pacients. Els resultats es discuteixen més endavant.

Anàlisi multivariant.

L'anàlisi multivariant s'ha realitzat només per la OS, ja que es perdien massa pacients en intentar analitzar les altres variables de supervivència. Les variables clínic-biològiques amb un valor pronòstic independent sobre la OS han estat l'edat (HR: 1,026 per any; $p < 0.001$), la xifra de leucòcits (HR: 1,003 per unitat d'increment; $p < 0.001$) i el tipus de protocol (HR: 1,923; $p = 0.005$ per CETLAM-94 i HR: 1,348; $p = 0.001$ per CETLAM-99). Pel que fa a la variable Citogenètica, s'ha demostrat que el grup CBF (HR: 0,542; $p < 0,001$), la monosomia 7 (HR: 3,477; $p < 0,001$) i les alteracions estructurals del cromosoma 1 (HR: 2,266; $p = 0.023$) retenen el seu efecte independent sobre el pronòstic. També s'ha demostrat que el MK i el CK tenen impacte pronòstic independent, tant si es presenten de manera combinada com individual (HR: 1,941; $p = 0.001$ per MK no complex, HR: 1,891; $p = 0.013$ per CK no monosòmic i HR: 3,628; $p < 0.001$ per MK i CK), confirmant així la importància complementària de la informació proporcionada per les dues variables.

L'edat, la xifra de leucòcits i el tipus de protocol de tractament rebut són les variables que influeixen sobre el pronòstic de manera independent per tots els estudis publicats (34–36). L'edat biològica és una variable pronòstica que afecta negativament tant l'assoliment de la RC, com la OS i el risc de recaiguda. Això és un reflex de l'augment de les comorbiditats amb l'edat, dels tipus de tractaments utilitzats (acostumen a ser de menor intensitat en el pacient d'edat més avançada), de la pitjor tolerància a la quimioteràpia (que fa augmentar significativament el risc de mort durant la inducció) i de característiques de la pròpia leucèmia (com són el tipus i freqüència d'alteracions citogenètiques presents, que varia segons el grup d'edat) (127). En aquest sentit, s'ha observat una incidència més elevada de cariotips de risc advers, com CK i alteracions dels cromosomes 5 i 7, en pacients d'edat més avançada (≥ 55 -60 anys); mentre que en pacients menors de 55 anys són més freqüents els cariotips de risc favorable, com la t(8;21) i la inv(16) (34,39,95). Pel que fa a la xifra de leucòcits, en aquest treball s'ha analitzat com a variable contínua (igual que l'edat) per poder tenir dades directament comparables amb els estudis referents de MRC i CALGB en els que aquesta variable era analitzada com a contínua. És cert però que en la pràctica clínica pot ser més útil conèixer el punt de tall a partir del qual es poden discriminar els pacients en pronòstics diferents. És per això que l'anàlisi multivariant es va repetir amb les mateixes dades clíniques i citogenètiques però tractant la xifra de leucòcits com a variable categòrica (Annex A.4). Amb aquesta anàlisi es demostra que una leucocitosi $>50 \times 10^9/L$ es correlaciona amb un pitjor pronòstic de manera estadísticament significativa. Per últim, també s'ha evidenciat que amb el protocol LMA-03 s'assoleix una millor OS, fins i tot incloent pacients fins els 70 anys, a diferència dels dos protocols més antics en que l'edat màxima d'inclusió eren els 60 anys. Tenint en compte que els règims quimioteràpics eren molt similars entre els tres protocols, el més probable és que la diferència de resposta al tractament sigui deguda als criteris d'estratificació del risc. En el protocol LMA-03, com a gran novetat respecte els anteriors protocols, per primera vegada s'estratifiquen els pacients segons l'índex leucocitari i les mutacions de *FLT3*, entre d'altres, de manera que un subgrup de pacients pot tractar-se de forma més específica fent millorar la OS.

La monosomia 7, tant com a alteració acompanyada com aïllada, té un impacte pronòstic negatiu en tots els estudis publicats, i aquest no n'ha estat l'excepció. Els pacients amb LMA amb alteracions del cromosoma 7 es caracteritzen per displàsia multilínia a la MO i pitjor curs clínic, amb una taxa de RC, una DFS i una OS baixes; particularment en pacients en el context d'un cariotip complex o monosòmic. Per aquest motiu, en aquest treball s'ha analitzat l'impacte de la monosomia 7 aïllada i s'ha revalidat el seu pronòstic advers.

El cas de les alteracions estructurals del cromosoma 1 i el seu valor pronòstic no està tan clar. La freqüència d'alteracions del cromosoma 1 en malalties hematològiques es força elevada, especialment en NMP (13% a 70% de les alteracions detectades segons la sèrie de pacients seleccionada) i en mielomes (fins un 50%). En canvi en la LMA és inferior, representant menys del 5% de les alteracions detectades (128). S'han descrit múltiples tipus d'alteracions que impliquen el cromosoma 1 en LMA, però en cap cas s'han pogut relacionar amb el pronòstic. Per aquest motiu, i tenint en compte les limitacions descrites en aquest treball, aquest resultat hauria de ser validat en una sèrie més àmplia i homogènia de pacients.

Per últim i com era d'esperar, s'ha demostrat la importància pronòstica com a variable independent del CK i del MK. Tots els estudis previs publicats coincideixen en atorgar a aquestes dues entitats un valor pronòstic advers independent per a la OS (34,43,46,48,49,129) i la sèrie analitzada en aquest treball no ha estat l'excepció.

Impacte de les translocacions 11q23 en el pronòstic.

Les anomalies cromosòmiques que afecten 11q23 són majoritàriament translocacions recíproques i equilibrades que condueixen a una reordenació del gen *KMT2A*, típicament conegut com *MLL*, amb una gran varietat de gens *partner*. Fins ara, s'han identificat i caracteritzat més de 90 gens *partner* diferents (38), cosa que explica la gran heterogeneïtat d'aquest grup de LMA. La translocació més freqüent és la t(9;11)(p23;q23), que produeix el reordenament *MLLT3::KMT2A*, i és l'única que la classificació de l'OMS reconeix com a categoria específica (26). Les translocacions 11q23 restants, com ara la t(6;11)(q27;q23) / *AFDN::KMT2A*, la t(10;11)(p12;q23) / *MLLT10::KMT2A* o la t(11;19)(q23;p13.1) / *ELL::KMT2A*, són menys freqüents i menys caracteritzades.

L'objectiu d'aquest estudi ha estat caracteritzar les principals característiques clíniques i biològiques d'una gran sèrie més àmplia de pacients amb LMA amb translocació 11q23 i avaluar el seu pronòstic. S'ha aconseguit recollir un total de 80 pacients amb reordenaments 11q23 i que havien estat tractats amb protocols de quimioteràpia intensiva comparables.

La freqüència i distribució d'aquestes translocacions va ser similar a l'observada en estudis anteriors (104,130,131), sent la t(9;11) la translocació identificada amb més freqüència en més d'un terç dels pacients (38,7%), seguida de t(6;11), t(11;19) i t(10;11). Es van detectar

altres anomalies cromosòmiques addicionals a la translocació 11q23 en el 45% dels casos. Aquesta freqüència també és comparable amb les dades reportades en altres sèries (130).

Pel que fa a la citomorfologia, les dades d'aquest treball confirmen la correlació de les translocacions 11q23 amb la LMA de llinatge monoblàstic/monocític descrita anteriorment (130). No obstant això, també es van detectar casos en altres subtipus citològics, en una proporció menor. Es pot suposar que aquesta correlació es deu a la pròpia reorganització 11q23, ja que no s'ha observat una correlació distintiva entre el cromosoma *partner* i el subtipus citològic.

En aquest estudi, l'anàlisi de supervivència també ha mostrat que els pacients amb LMA amb reordenaments 11q23 tenen un resultat similar al dels pacients amb KN. Això es podria explicar per la diferent proporció de casos sotmesos a un alo-TPH entre aquests dos subgrups citogenètics. Diversos estudis han confirmat l'efecte beneficiós de l'alo-TPH en la LMA amb reordenament 11q23 (131,132). En la present sèrie, el grup 11q23 té un percentatge més elevat d'alo-TPH que podria comportar una supervivència similar a la del grup de referència. La taxa de RC d'aquesta sèrie coincideix amb la d'altres publicacions (68-87%) (104,131,132), però la resta de variables pronòstiques difereixen. La OS ha estat similar a la reportada per l'estudi del grup alemany (19,6 mesos) (104), però superior a la de les sèries de C. Schoch i Y. Chen (8,9 i 8,5 mesos respectivament) (130,131). Aquesta diferència es pot explicar per una major proporció de LMA relacionada amb el tractament en aquests dos darrers estudis (130) [14.Chen Y] en comparació amb la sèrie estudiada en aquest treball (20 i 40% contra 5%). D'altra banda, A. Pigneux va reportar una millor OS i DFS (56% i 51% als 2 anys respectivament). Això es deu probablement a que tota la seva cohort de pacients havia estat sotmesa a alo-TPH (132) mentre que, en la present sèrie, només al 47,5% dels pacients se'ls va fer alo-TPH.

Quan s'han analitzat les variables de supervivència dels diferents *partners* d'aquesta sèrie, no s'han observat diferències estadísticament significatives entre elles, però sí una tendència a un pitjor pronòstic dels casos amb t(6;11). Per confirmar-ho, s'ha repetit l'anàlisi estadística agrupant els casos amb t(9;11) i t(11;19). Tot i que això no ha evidenciat diferències significatives en la OS, el grup de pacients amb aquestes dues translocacions sí tenen una DRC i una DFS més llargues que els pacients amb t(6;11). El pronòstic advers de la t(6;11) també s'ha demostrat en altres publicacions (104,121). A més, les dades obtingudes coincideixen amb la classificació en subgrups de risc citogenètic proposada per MRC en que la t(9;11) i la t(11;19) es classifiquen en categoria de pronòstic intermedi (34).

Grups de risc citogenètic.

Tot i que hi ha algunes diferències en la classificació del risc citogenètic entre els diversos grups cooperatius internacionals, els pacients amb LMA generalment es classifiquen en tres grups de risc: alt, intermedi i baix. El grup de risc favorable, que inclou els pacients amb t(8;21) i inv(16)/t(16;16), quan es tracta amb quimioteràpia estàndard té taxes de RC que varien entre el 85 i el 90% i una OS a 5 anys del 50 al 60%. El grup més nombrós és el grup de risc intermedi que representa fins al 50% de les LMA i inclou els casos de NK, t(9;11), pèrdua del cromosoma Y, trisomia 8 i del(20q) entre d'altres. Els pacients amb LMA amb citogenètica de risc intermedi presenten taxes de RC significativament pitjors, d'entre el 65 i el 75%, i una OS a 5 anys del 35 al 45%. I en tercer lloc, el grup de risc desfavorable, que inclou els CK, MK, inv(3)/t(3;3), t(6;9), t(6;11), t(11;19), del(5q) i monosomies dels cromosomes 5 o 7. Els pacients amb LMA amb citogenètica de risc desfavorable presenten taxes de RC molt més baixes, que varien entre el 45 i el 55%, i una supervivència a 5 anys de només un 10 a un 20% (34,35,40,43,46,91).

Dos dels diversos grups multicèntrics referents en aquest camp han estat clàssicament MRC i CALGB, ja que van demostrar la importància de l'anàlisi citogenètica sobre el pronòstic dels pacients amb LMA i van validar l'estratificació dels pacients en els tres grups de risc citogenètic (34,35).

Dels 1417 pacients de la sèrie presentada en aquest treball, s'ha disposat d'informació citogenètica suficient en 1235 per poder-los classificar d'acord als sistemes d'estratificació en grups de risc del MRC i CALGB. Tot i així, un 9% d'aquests pacients no han pogut ser classificats d'acord al sistema de CALGB, ja que hi ha alteracions no assignades a cap grup d'aquest sistema, a diferència del MRC que assigna per defecte al grup intermedi les alteracions citogenètiques sense pronòstic ben definit. Pel que fa a la distribució dels pacients en els tres grups de risc, destaca que tant MRC com CALGB classifiquen en el grup intermedi un gran gruix de pacients (70% i 56% respectivament). Aquest fet suposa una limitació a la pràctica clínica, ja que es tracta d'un gran grup de pacients molt heterogeni que es tractaran de la mateixa manera.

Pel que fa a l'anàlisi de supervivència, els dos sistemes analitzats han demostrat de manera estadísticament significativa que estratifiquen els pacients CETLAM en els tres grups de risc ben definits, tant per la taxa de RC com per la OS i la CIR. Alhora, quan els pacients es classifiquen segons els resultats de l'anàlisi multivariant d'aquest treball, també s'obtenen tres grups de risc ben definits estadísticament (Taula 35 Resultats).

Tot i aquests resultats, s'han observat diferències en les variables de supervivència entre les diferents classificacions. La taxa de RC i la probabilitat de OS del grup de risc advers del CETLAM han estat inferiors a les obtingudes amb les altres dues classificacions (49% vs. 59% i 57%; i 8% vs. 13% i 20%, respectivament). Aquestes diferències són degudes als diversos tipus d'alteracions citogenètiques que es tenen en compte en cada cas. En la classificació proposada per CETLAM, degut a les limitacions de l'anàlisi multivariant anteriorment comentades, només s'han pogut englobar dins del risc advers el CK, el MK, la monosomia 7 i les alteracions estructurals del cromosoma 1. A excepció d'aquesta última, es tracta d'un subgrup d'alteracions de molt mal pronòstic. Diversos estudis han publicat resultats en els que demostren que el CK (especialment si té més de 5 alteracions), el MK i la monosomia 7 són alteracions que inclús empitjoren el pronòstic del grup de risc advers (43,46,133). Aquest fet explicaria els pobres resultats obtinguts en el grup de risc advers del CETLAM.

Amb tots els resultats obtinguts en aquest treball de Tesi Doctoral, es demostra que les alteracions cromosòmiques i els sistemes de classificació en grups de risc citogenètic són clau per a l'estratificació del risc i, per tant, en la decisió terapèutica de la LMA. Tot i així, la combinació d'aquestes alteracions citogenètiques amb altres dades, com són les alteracions moleculars, és necessària per poder definir els grups de risc amb més precisió.

Limitacions de l'estudi.

En primer lloc cal tenir en compte que es tracta d'un estudi retrospectiu, de manera que només es disposa de les dades recollides en la base de dades, fet que pot limitar l'anàlisi en certs aspectes. N'és un exemple l'ECOG, que no es va recollir en la majoria de pacients i per tant no es va poder tenir en compte en l'anàlisi multivariant. De totes maneres, un estudi d'aquesta magnitud i amb aquest número de pacients necessari per aconseguir significança estadística, només és possible amb anàlisis retrospectives com succeeix amb la majoria de grans sèries publicades d'estudis multicèntrics.

Cal comentar també que es tracta d'un estudi multicèntric basat en esquemes de tractament molt similars però amb petites variacions entre protocols que acaben comportant diferències en el resultat del tractament, com evidencia l'anàlisi multivariant. Aquest fet pot constituir un biaix en la interpretació dels resultats de l'anàlisi de supervivència, de la mateixa manera que succeeix en la majoria d'estudis publicats.

Una altra debilitat metodològica de l'estudi és el que es coneix com *multiplicitat*, inherent a les anàlisis estadístiques amb un gran número de dades i que pot induir a la significació estadística d'alguna variable per atzar. Tot i així, en aquesta cohort de pacients s'ha mantingut el valor de les principals variables pronòstiques ben establertes en la literatura, com edat, cariotip i mutacions de *FLT3* i *NPM1*. Aquest fet confereix fiabilitat als resultats obtinguts.

Per últim, també cal tenir en compte que l'anàlisi citogenètica no va ser centralitzada si no que es va dur a terme en cadascun dels laboratoris de referència de cada centre; i posteriorment els resultats citogenètics i moleculars s'anaven transcrivint a la base de dades. Aquest mètode pot comportar errors de transcripció de les fórmules cromosòmiques, manca d'algunes dades o, fins i tot, informació incorrecta en algun cas. És per això que després de l'exhaustiva revisió de totes les dades recopilades, alguns pacients van ser descartats i alguna anàlisi no s'ha pogut dur a terme per manca d'informació.

7. CONCLUSIONS

1. Sobre la incidència i característiques de les alteracions citogenètiques

a. La monosomia, i en general la pèrdua de material genètic, és més freqüent que la trisomia o el guany. La trisomia més freqüent és la del cromosoma 8. Per altra banda, la monosomia més freqüent és la del cromosoma 7.

b. En global, la majoria d'alteracions numèriques es donen en context de complexitat, mentre que les alteracions estructurals es poden trobar soles o acompanyades d'una o més alteracions.

c. La t(8;21) i la inv(16) s'observen majoritàriament com alteracions aïllades o bé acompanyades per una anomalia. Les alteracions que s'hi associen són les pèrdues dels cromosomes X o Y i la trisomia 22 en la inv(16).

d. Cap dels reordenaments recurrents més freqüents [t(8;21), inv(16), t(6;9) o t(v;11q23)] mostren associació significativa amb altres alteracions específiques, confirmant el caràcter primari d'aquestes alteracions en la leucemogènesi. Per altra banda, les alteracions dels cromosomes 5, 7 i 17 s'associen estadísticament entre sí i són les monosomies més freqüents en context de complexitat.

2. Sobre el valor pronòstic de les alteracions citogenètiques

a. La t(8;21) i la inv(16) són alteracions cromosòmiques de bon pronòstic, independentment de la presència d'anomalies citogenètiques addicionals.

b. En aquesta sèrie de pacients, el CK ve definit per la presència de més de 4 alteracions cromosòmiques.

c. El MK, el CK, la monosomia del cromosoma 7 i les alteracions estructurals del cromosoma 1 són les alteracions de mal pronòstic .

3. Sobre les característiques i el valor pronòstic dels reordenaments del gen *KMT2A*:

a. Les reordenacions 11q23 es correlacionen amb la citologia monoblàstica/monocítica i la t(9;11) és la translocació més freqüent.

b. L'alo-TPH pot ser una estratègia de tractament avantatjosa en la LMA amb reordenament 11q23.

c. El mals resultats en l'anàlisi de supervivència dels casos amb t(6;11) fan necessari trobar nous enfoc terapèutics per a aquest subgrup de pacients.

4. Sobre l'aplicabilitat clínica dels sistemes d'estratificació del risc citogenètic

a. Els tres sistemes d'estratificació del risc analitzats (MRC, CALGB i CETLAM) han demostrat ser vàlids per classificar els pacients en tres grups pronòstic ben definits.

b. Els resultats d'aquest treball consoliden la importància pronòstica de les alteracions citogenètiques en la LMA.

8. LÍNIES DE FUTUR

Les línies de futur que es desprenen d'aquest treball són:

- Analitzar amb profunditat l'impacte de les alteracions de *TP53* sobre el pronòstic de la LMA. La intenció és utilitzar els pacients de l'actual protocol CETLAM (LMA-12) com a cohort de validació dels resultats obtinguts en aquest treball (protocols LMA-94, LMA-99 i LMA-03) amb especial atenció a l'impacte pronòstic de les alteracions del cromosoma 17p13 (afectació de *TP53*). Amb els pacients dels que es disposi de material guardat (cèl·lules fixades del cultiu citogenètic o DNA dels estudis moleculars) es podria analitzar l'estat al·lèlic de *TP53* i determinar, si és el cas, les diferències de pronòstic de l'afectació bial·lèlica vs. monoal·lèlica d'aquest gen.
- Amb una cohort més gran de pacients, analitzar el pronòstic independent de les alteracions significatives en l'anàlisi univariant que, per un número insuficient de pacients, no han pogut analitzar-se en l'anàlisi multivariant. A més, també seria interessant revalidar el significat pronòstic de les alteracions estructurals del cromosoma 1 en una sèrie diferent de pacients.
- Per últim, utilitzar les noves tecnologies d'anàlisi citogenètica recentment desenvolupades. Tenim al nostre abast l'*Optical Genome Mapping* (Bionano) que permet l'estudi de guanys i pèrdues de material genètic, així com reordenaments cromosòmics a una resolució molt més gran que l'anàlisi convencional del cariotip. Alhora, també detecta reordenaments críptics per les tècniques de tinció de bandes convencionals. L'anàlisi de les LMA amb aquest sistema podria permetre identificar noves alteracions i avançar encara més en el coneixement de la patogènia de la LMA.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadié M, Simonetti A, Lutz JM BFHWG. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724–34.
2. Gemma Osca-Gelis, Montserrat Puig-Vives, Marc Saez, David Gallardo, Natalia Lloveras RM-G. Population-based incidence of myeloid malignancies: fifteen years of epidemiological data in the province of Girona, Spain. *Haematologica*. 2013;98(8):e95–7.
3. O Visser , A Trama, M Maynadié, C Stiller, R Marcos-Gragera, R De Angelis, S Mallone, C Tereanu, C Allemani, U Ricardi, H C Schouten RWG. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European Journal of Cancer*. 2012;48(17):3257–66.
4. National Cancer Institute. Cancer stat facts: leukemia—acute myeloid leukemia (AML) [Internet]. 2017. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
5. Parkin D, Whelan S, Ferlay J, Teppo L, Thomas D, editors. *Cancer Incidence in Five Continents Volume VIII*. Vol. 155. IARC Publications; 2005.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016;127(20):2391–405. Available from: <http://www.ukm.my/geografia>
7. Rafael Marcos-Gragera, Alberto Ameijide, Marta Solans, Arantza Sanvisens, Visitación de Castro, M^a Dolores Chirlaque, José Ramón Quirós-García, Montse Puigdemont, Leire Gil, M^a Dolores Rojas Martin, Jaume Galceran, Maria José Sánchez, M^a Araceli Alemán He on behalf of R. Incidence and trends of haematological malignancies in Spain, 2002-2013. REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer). 2021.
8. McNerney ME, Godley LA, le Beau MM. Therapy-Related Myeloid Neoplasms: When Genetics and Environment Collide. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(9):513–27.
9. Lagunas-Rangel F, Chávez-Valencia V, Gómez-Guijosa M, Cortes-Penagos C. Acute Myeloid Leukemia — Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*. 2017;11(4):328–39.
10. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* [Internet]. 2018;392(10147):593–606. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31041-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31041-9)
11. Hartmann L, Metzeler KH. Clonal hematopoiesis and preleukemia—Genetics, biology, and clinical implications. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2019;
12. Kelly L, Gilliland D. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003;3:179–98.

13. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*. 2011;4:1–11.
14. Chen SJ, Shen Y, Chen Z. A panoramic view of acute myeloid leukemia. *Nature Genetics* [Internet]. 2013;45(6):586–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2651>
15. Ishikawa Y, Kiyoi H, Tsujimura A, Miyawaki S, Miyazaki Y, Kuriyama K, et al. Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*. 2009;83(2):90–8.
16. 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(8):1539–41.
17. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2008;22(2):240–8.
18. Network TCGAR. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(22):2059–74.
19. Thiede C. Mutant DNMT3A: teaming up to transform. *Blood*. 2012;119(24):5615–7.
20. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):451–8.
21. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, et al. Revised criteria for the classification of acute myeloid leukaemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals Intern Medicine*. 1985;103(4):620–5.
22. Bennett J, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton D, Gralnick H, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *British Journal of Haematology*. 1991;78:325–9.
23. Harris N, Jaffe E, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink H, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Annals of Oncology*. 1999;10(12):1419–32.
24. Vardiman J, Harris N, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292–302.
25. Vardiman J, Thiele J, Arber DA, Brunning R, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–51.

26. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Vol. 2. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH; 2017.
27. Haferlach T, Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2020;188(1):36–48.
28. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 1971;2(7731):971–2.
29. Rowley J, Golomb H, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*. 1977;1(8010):549–50.
30. Rowley J. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genetics*. 1973;16(2):109–12.
31. Stirewalt D, Radich J. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(9):650–65.
32. Verhaak R, Goudswaard C, van Putten W. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): Association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747–54.
33. Leroy H, Roumier C, Huyghe P. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*. 2005;19(3):329–34.
34. Grimwade D, Hills RK, Moorman A v., Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354–65.
35. Byrd J, Mrózek K, Dodge R, Carroll A. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* [Internet]. 2002;100(13):4325–36. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/100/13/4325.short>
36. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: A Southwest oncology group/Eastern cooperative oncology group study. *Blood*. 2000;96(13):4075–83.
37. Espirito Santo A, Chacim S, Ferreira I, Leite L, Moreira C, Pereira D, et al. Southwestern Oncology Group pretreatment risk criteria as predictive or prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Molecular and Clinical Oncology*. 2017;6(3):384–8.

38. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour G, Fechina L, Renneville A, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;
39. Grimwade D, Walker H, Harrison C. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patient entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98:1312–20.
40. Mrożek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol*. 2008;35:365–77.
41. Bloomfield CD, Goldman A, Hassfeld D, de la Chapelle A. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1984;11(3):332–50.
42. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453–74.
43. Stölzel F, Mohr B, Kramer M, Oelschlägel U, Bochtler T, Berdel WE, et al. Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*. 2016;6(1):7–10.
44. Orozco J, Appelbaum F. Unfavorable, complex, and monosomal karyotypes: the most challenging forms of acute myeloid leukemia. *Oncology*. 2012;26(8):706–12.
45. Middeke JM, Beelen D, Stadler M, Göhring G, Schlegelberger B, Baurmann H, et al. Outcome of high-risk acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation: Negative impact of *abn(17p)* and *-5/5q-*. *Blood*. 2012;120(12):2521–8.
46. Breems DA, van Putten WLJ, de Greef GE, van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KBJ, Mellink CHM, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: A better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(29):4791–7.
47. Haferlach C, Alpermann T, Schnittger S, Kern W, Chromik J, Schmid C, et al. Prognostic value of monosomal karyotype in comparison to complex aberrant karyotype in acute myeloid leukemia: A study on 824 cases with aberrant karyotype. *Blood*. 2012;119(9):2122–5.
48. Kayser S, Zucknick M, Döhner K, Krauter J, Köhne CH, Horst HA, et al. Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: Prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood*. 2012;119(2):551–8.

49. Medeiros BC, Othus M, Fang M, Roulston D, Appelbaum FR. Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: The Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Blood*. 2010;116(13):2224–8.
50. Fang M, Storer B, Estey E, Othus M, Zhang L, Sandmaier BM, et al. Outcome of patients with acute myeloid leukemia with monosomal karyotype who undergo hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2011;118(6):1490–4.
51. Oran B, Dolan M, Cao Q, Brunstein C, Warlick E, Weisdorf D. Monosomal Karyotype Provides Better Prognostic Prediction after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2011;17(3):356–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.05.012>
52. Kearney L. NUP98 (nucleoporin 98 kDa). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2002;6(3):193–6.
53. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci M. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood*. 2000;96(4):1297–308.
54. Grimwade D. Screening for core binding factor gene rearrangements in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002;16(5):964–9.
55. Mrózek K, Prior T, Edwards C. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(9):2482–92.
56. Martelli M, Sportoletti P, Tiacci E. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: Biological and clinical implications. *Blood Reviews*. 2013;27(1):13–22.
57. Patel J, Gonen M, Figueroa M. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2012;366:1079–89.
58. Rosnet O, Buhring H, Marchetto S. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*. 1996;10:238–48.
59. Lyman S, Jacobsen S. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*. 1998;91:1101–34.
60. Nakao M, Yokota S, Iwai T. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10:1911–8.
61. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. 2002;21:2555–63.

62. Whitman S, Archer K, Feng L. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Research*. 2001;61:7233–9.
63. Stirewalt D, Kopecky K, Meshinchi S. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3724–6.
64. Reindl C, Bagrintseva K, Vempati S. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*. 2006;107(9):3700–7.
65. Kottaridis P, Gale R, Frew M. 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 King. *Blood*. 2001;98:1752–9.
66. Gale R, Geen C, Allen C, Mead A, Burnett A, Hills R. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776–84.
67. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776–84.
68. Thiede C, Steudel C, Mohr B. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99:4326–35.
69. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001;97:2434–9.
70. Gale R, Hills R, Kottaridis P. 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;106:3658–65.
71. Heidel F, Solem F, Breitenbuecher F. 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(1):293–300.
72. Bornhäuser M, Illmer T, Schaich M. AML SHG 96 study group. Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML. *Blood*. 2007;109(5):2264–5.
73. Chen W, Rassidakis G, Medeiros L. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *ArchPatholLab Med*. 2006;130:1687–92.

74. Fernández-Mercado M, Yip B, Pellagatti A, Davies C, Larrayoz M, Kondo T. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *PLoS One*. 2012;7(8):e42334.
75. Falini B, Mecucci C, Tiacci E. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *New England Journal of Medicine*. 2005;352:254–66.
76. Falini B, Nicoletti I, Martelli M, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109:874–85.
77. Thiede C, Koch S, Creutzig E. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107:4011–20.
78. Gregory T, Wald D, Y C. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Journal of Hematology and Oncology*. 2009;2:23.
79. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009 Oct;114(14):3024–32.
80. Angenendt L, Röllig C, Montesinos P, Martínez-Cuadrón D, Barragan E, García R, et al. Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2019 Aug 20;37(29):2632–42. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00416>
81. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004 Feb;22(4):624–33.
82. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CAJ, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011 Feb;117(8):2469–75.
83. Lin L-I, Chen C-Y, Lin D-T, Tsay W, Tang J-L, Yeh Y-C, et al. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005 Feb;11(4):1372–9.
84. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, van Putten WLJ, Valk PJM, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a

- subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009 Mar;113(13):3088–91.
85. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010 Feb;28(4):570–7.
 86. Grimwade D, Mrózek K. Diagnostic and Prognostic Value of Cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2011;25(6):1135–61.
 87. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, Buchner 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004 Sep;22(18):3741–50.
 88. Marcucci G, Mrozek K, Ruppert AS, Maharry K, Koltz JE, Moore JO, et al. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005 Aug;23(24):5705–17.
 89. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109(2):431–48.
 90. Marcucci G, Haferlach T, Dohner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011 Feb;29(5):475–86.
 91. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan;129(4):424–47.
 92. Tallman MS, Wang ES, Altman JK, Appelbaum FR. Acute Myeloid Leukemia. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2019;17(6):721–49.
 93. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia [Internet]*. 2019;33(8):1851–67. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0378-z>
 94. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification

- of the European leukemianet recommendations: Evaluation of the proposed reporting system. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(20):2758–65.
95. 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* [Internet]. 1998;92(7):2322–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V92.7.2322>
 96. Visani G, Bernasconi P, Boni M, Castoldi GL, Ciolli S, Clavio M, et al. The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia - Analysis of 848 patients. *Leukemia*. 2001;15(6):903–9.
 97. van Dyke DL. Y loss in leukemia. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2001;5(1):56–7.
 98. Fonatsch C. The Role of Chromosome 21 in Hematology and Oncology. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2010;49(6):497–508.
 99. Antonarakis SE, Lyle R, Deutsch S, Reymond A. Chromosome 21: A small land of fascinating disorders with unknown pathophysiology. *International Journal of Developmental Biology*. 2002;46(1):89–96.
 100. Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2006;169–77.
 101. Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, Slovak ML, Gundacker HM, Kim HT, et al. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *British Journal of Haematology*. 2006;135(2):165–73.
 102. Haferlach T, Kern W, Schoch C, Schnittger S, Sauerland MC, Heinecke A, et al. A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *Haematologica*. 2004 Apr;89(4):408–18.
 103. Balgobind B v, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. 2009 Sep;114(12):2489–96.
 104. Krauter J, Wagner K, Schäfer I, Marschalek R, Meyer C, Heil G, et al. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(18):3000–6.

105. Bilhou-Nabera C. del(20q) in myeloid malignancies. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2001;5(1):33-4.
106. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *American Journal of Clinical Pathology*. 2003;119(5):672-80.
107. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD, et al. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1906-8.
108. Gahn B, Haase D, Unterhalt M, Drescher M, Schoch C, Fonatsch C, et al. De novo AML with dysplastic hematopoiesis: cytogenetic and prognostic significance. *Leukemia*. 1996;10(6):946-51.
109. Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, Demur C, Murati A, Corre J, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Apr 10;6(10):8388-96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25860933>
110. Devillier R, Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Carbuccioni N, Murati A, Vey N, et al. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes are characterized by a specific molecular pattern with high frequency of ASXL1 mutations. *American Journal of Hematology*. 2012;87(7):659-62.
111. Chi Y, Lindgren V, Quigley S, Gaitonde S. Acute myelogenous leukemia with t(6;9)(p23;q34) and marrow basophilia: an overview. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008 Nov;132(11):1835-7.
112. Slovak ML, Gundacker H, Bloomfield CD, Dewald G, Appelbaum FR, Larson RA, et al. 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. *Vol. 20, Leukemia*. England; 2006. p. 1295-7.
113. Marchesi F, Annibali O, Cerchiara E, Tirindelli MC, Avvisati G. Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: A concise review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* [Internet]. 2011;80(3):331-46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.11.006>
114. Oyarzo MP, Lin P, Glassman A, Bueso-Ramos CE, Luthra R, Medeiros LJ. Acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) is associated with dysplasia and a high frequency of FLT3 gene mutations. *American journal of clinical pathology*. 2004 Sep;122(3):348-58.
115. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, Kayser S, Valk PJM, van Zelderen-Bhola SL, et al. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(24):3890-8.

116. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012;119(9):2114–21.
117. Welch JS. Patterns of mutations in TP53 mutated AML. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. 2018;31(4):379–83.
118. Hunter AM, Sallman DA. Current status and new treatment approaches in TP53 mutated AML. *Best Practice and Research: Clinical Haematology* [Internet]. 2019;32(2):134–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.05.004>
119. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, Devlin SM, Tuechler H, Medina-Martinez JS, Yoshizato T, Shiozawa Y, Saiki R, Malcovati L, Levine MF, Arango JE, Zhou Y, Solé F, Cargo CA, Haase D, Creignou M, Germing U, Zhang Y, Gundem G, Sarian A, van de Loosdrecht AA PE. Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nature Medicine*. 2020;26(10):1549–56.
120. Cox MC, Panetta P, Lo-Coco F, del Poeta G, Venditti A, Maurillo L, et al. Chromosomal aberration of the 11q23 locus in acute leukemia and frequency of MLL gene translocation: Results in 378 adult patients. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004;
121. Blum W, Mrózek K, Ruppert AS, Carroll AJ, Rao KW, Pettenati MJ, et al. 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.
122. Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru PRK, Rao KW, et al. Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9;11)(p22;q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 1997;
123. Swansbury GJ, Slater R, Bain BJ, Moorman a v, Secker-Walker LM. Hematological malignancies with t(9;11)(p21-22;q23)--a laboratory and clinical study of 125 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 1998;
124. Martineau M, Berger R, Lillington DM, Moorman a v, Secker-Walker LM. The t(6;11)(q27;q23) translocation in acute leukemia: a laboratory and clinical study of 30 cases. EU Concerted Action 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. 1998;
125. Lillington DM, Young BD, Berger R, Martineau M, Moorman a v, Secker-Walker LM. The t(10;11)(p12;q23) translocation in acute leukaemia: a cytogenetic and clinical study of 20 patients. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. 1998;
126. Moorman A v, Hagemeijer A, Charrin C, Rieder H, Secker-Walker LM. The translocations, t(11;19)(q23;p13.1) and t(11;19)(q23;p13.3): a cytogenetic and clinical profile of 53 patients. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. 1998;

127. Smith ML, Hills RK, Grimwade D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. *Blood Reviews* [Internet]. 2011;25(1):39–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2010.10.002>
128. Caramazza D, Hussein K, Siragusa S, Pardanani A, Knudson RA, Ketterling RP, et al. Chromosome 1 abnormalities in myeloid malignancies: a literature survey and karyotype-phenotype associations. *European Journal of Haematology*. 2010;84(3):191–200.
129. Perrot A, Luquet I, Pigneux A, Mugneret F, Delaunay J, Harousseau JL, et al. Dismal prognostic value of monosomal karyotype in elderly patients with acute myeloid leukemia: A GOELAMS study of 186 patients with unfavorable cytogenetic abnormalities. *Blood*. 2011;118(3):679–85.
130. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann 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 cases. *Blood*. 2003;
131. Chen Y, Kantarjian H, Pierce S, Faderl S, O'Brien S, Qiao W, et al. Prognostic significance of 11q23 aberrations in adult acute myeloid leukemia and the role of allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013;
132. Pigneux A, Labopin M, Maertens J, Cordonnier C, Volin L, Socié G, et al. Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for adult patients with AML and 11q23/MLL rearrangement (MLL-r AML). *Leukemia*. 2015;
133. Daneshbod Y, Kohan L, Taghadosi V, Weinberg OK, Arber DA. Prognostic Significance of Complex Karyotypes in Acute Myeloid Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*. 2019;20(2).

10. ANNEXES

Annexa 1. Participació dels hospitals en els protocols CETLAM.

HOSPITAL	NÚM. PACIENTS	LMA-94	LMA-99	LMA-03
CLÍNIC, BARCELONA	183	42	48	93
SANT PAU, BARCELONA	149	24	45	80
DURAN I REYNALS, BELLVITGE	126	29	44	53
HUGTIP, BADALONA	125	20	31	74
LA FE, VALÈNCIA	120	-	19	101
VALL D'HEBRON, BARCELONA	107	26	28	53
JOAN XXII, TARRAGONA	93	8	18	67
SON ESPASES, MALLORCA	71	18	16	37
MÁLAGA	68	-	20	48
SON LLÀTZER, MALLORCA	44	-	1	43
JOSEP TRUETA, GIRONA	88	11	20	57
TERRASSA	43	15	3	25
ARNAU DE VILANOVA, LLEIDA	43	6	10	27
MAR, BARCELONA	39	-	10	29
GALÍCIA	36	0	22	14
MÚRCIA	32	-	5	27
VERGE DE LA CINTA, TORTOSA	20	1	6	13
SEVILLA	11	-	-	11
LA PAZ	10	-	-	10
TEKNON, BARCELONA	8	-	4	4
VALLADOLID	1	-	1	-

Annexa 2. Taules per l'anàlisi de la complexitat en termes d'OR per a l'assoliment de la RC i de HR per a l'OS i la DFS.

	OR (95% CI)	p
1 ANOMALIA	2.43 (1.42 ; 4.16)	0.001
2 ANOMALIES	1.28 (0.67 ; 2.45)	0.459
3 ANOMALIES	1.36 (0.53 ; 3.47)	0.524
4 ANOMALIES	1.74 (0.64 ; 4.75)	0.277
≥5 ANOMALIES	-	-

	OS HR (95% CI)	P	DFS HR (95% CI)	P
1 ANOMALIA	-	-	-	-
2 ANOMALIES	1.31 (0.95 ; 1.81)	0.097	1.08 (0.70 ; 1.66)	0.742
3 ANOMALIES	1.30 (0.77 ; 2.18)	0.327	1.33 (0.67 ; 2.63)	0.421
4 ANOMALIES	1.41 (0.84 ; 2.37)	0.196	1.32 (0.67 ; 2.62)	0.428
≥5 ANOMALIES	2.80 (2.10 ; 3.74)	<0.001	2.82 (1.93 ; 4.10)	<0.001

Annexa 3. Taula per la validació dels sistemes d'estratificació MRC, CALGB i CETLAM en termes d'OR per a l'assoliment de la RC.

	MRC OR (IC 95%)	p	CALGB OR (IC 95%)	p	CETLAM OR (IC 95%)	p
Favorable*	5,240 (3,057 ; 8,982)	<0,001	5,613 (3,226 ; 9,766)	<0,001	7,629 (4,372 ; 13,314)	<0,001
Intermedi*	2,409 (1,733 ; 3,348)	<0,001	2,566 (1,798 ; 3,661)	<0,001	3,722 (2,603 ; 5,320)	<0,001

*Categoria de referència: Advers

Annexa 4. Resultat de l'anàlisi multivariant per a la OS amb la xifra de leucòcits com a variable categòrica.

FACTOR	HR (IC95%)	p
EDAT (CONTÍNUA)	1,025 (1,019 ; 1,032)	<0,001
LEUCÒCITS >50X10 ⁹ /L	1,422 (1,211 ; 1,670)	<0,001
PROTOCOL CETLAM-94	1,366 (1,084 ; 1,722)	0,008
PROTOCOL CETLAM-99	1,349 (1,127 ; 1,614)	0,001
CBF	0,528 (0,398 ; 0,699)	<0,001
MK & no CK	1,837 (1,248 ; 2,703)	0,002
no MK & CK	1,879 (1,137 ; 3,104)	0,014
MK & CK	3,393 (2,551 ; 4,514)	<0,001
ALT. ESTRUCT. Cr1	2,250 (1,109 ; 4,566)	0,025
MONOSOMIA 7	3,270 (1,777 ; 6,017)	<0,001

Annexa 5. Comunicació oral de l'estudi dels reordenaments del gen *KMT2A* al congrés nacional de la SEHH de 2016.

N Ruiz-Xivillé, M Morgades, M.L Martín Ramos, T González Martínez, A Blanco, I Buño, M Atance, B Esquivel, M Moya, I Vallcorba, A Sanz, M.J Larrayoz, R Collado, E Triviño, A Aventin, S Brunet, M Arnan, D Gallardo, M Cervera, S Vives, E Feliu, F Solé, J.M Ribera, I Granada. **Significado pronóstico de los reordenamientos del gen *KMT2A* (*MLL*) en leucemia mieloide aguda (*LAM*).** Estudio colaborativo del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica (GCECGH). LVIII Congreso Nacional de la SEHH i XXXII Congreso Nacional de la SETH. Santiago Compostela, octubre de 2016 (CO-002).

