

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA:

Utilidad clínica del perfil molecular en el
diagnóstico, pronóstico y monitorización
terapéutica.

María Isabel Prieto Conde

TESIS DOCTORAL

Salamanca 2018



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



TESIS DOCTORAL

**Caracterización genómica de la Leucemia
Mieloblástica Aguda: Utilidad clínica del perfil
molecular en el diagnóstico, pronóstico y
monitorización terapéutica.**

María Isabel Prieto Conde

Salamanca, 2018

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización genómica de la Leucemia
Mieloblástica Aguda: Utilidad clínica del perfil
molecular en el diagnóstico, pronóstico y
monitorización terapéutica.**

María Isabel Prieto Conde

Directores: Marcos González Díaz y M^a Carmen Chillón Santos

D. MARCOS GONZÁLEZ DÍAZ, Doctor en Medicina, Catedrático de Universidad, Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

D^a. M. CARMEN CHILLÓN SANTOS, Doctora en Medicina, Investigadora del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

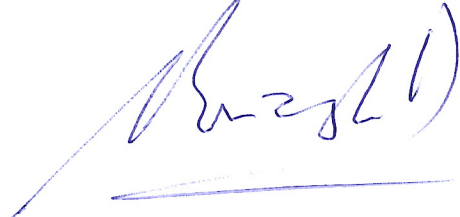
CERTIFICAN:

Que el presente trabajado titulado **“Caracterización genómica de la Leucemia Mieloblástica Aguda: Utilidad clínica del perfil molecular en el diagnóstico, pronóstico y monitorización terapéutica.”** y realizado por D.^a María Isabel Prieto Conde bajo su dirección en el Departamento de Medicina, reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad científica requeridas para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado

En Salamanca, a 1 de junio de 2018

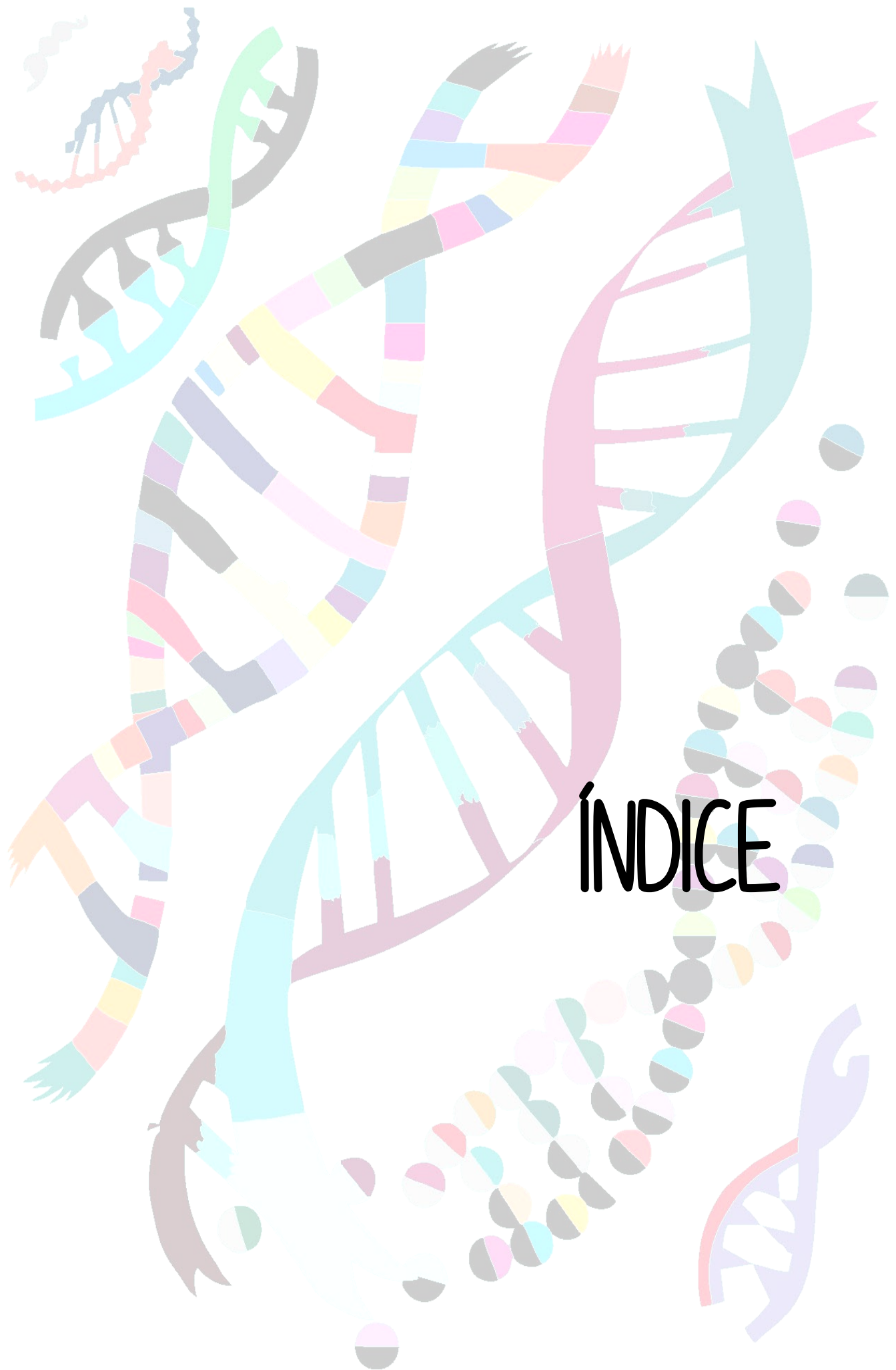
Prof. D. Marcos González Díaz



Dra. M^a Carmen Chillón Santos



A mis padres,
A mi hermano,



ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Generalidades sobre las leucemias mieloblásticas agudas (LMA)	7
1.1 Definición de LMA:	7
1.2 Epidemiología, etiología y etiopatogenia:	7
1.3 Diagnóstico y clasificación de las LMA: FAB y OMS	9
2. Principales alteraciones genéticas con utilidad diagnóstica en las LMA	10
2.1 Alteraciones genéticas recurrentes	11
2.1.1 Traslocaciones e inversiones cromosómicas (alteraciones balanceadas).....	11
2.1.2 Mutaciones en NPM1, CEBPA y RUNX1.....	12
2.2 Alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia	13
2.3 Alteraciones moleculares asociadas con predisposición familiar en LMA.....	14
2.3.1 Mutaciones de línea germinal vs. mutaciones somáticas	14
2.3.2 Mutaciones germinales en LMA.....	14
2.3.3 Identificación de casos familiares de LMA: indicios clínicos y test genéticos	15
3. Principales alteraciones genéticas con valor pronóstico en las LMA	16
3.1 Alteraciones citogenéticas.	17
3.2 Alteraciones moleculares	20
3.2.1 Mutaciones somáticas.....	21
3.2.2 Expresión génica aberrante.....	23
3.2.3 Alteraciones epigenéticas	24
3.3 Clasificación pronóstica de la European LeukemiaNet.	28
4. Espectro mutacional de la LMA: nuevas alteraciones	30
4.1 Estudios de genoma, exoma y paneles de NGS dirigidos en LMA.....	30
4.2 Heterogeneidad clonal y patrones de evolución clonal.....	33
4.3 Clones preleucémicos y hematopoyesis clonal de potencial indeterminado.....	34
5. Nuevas técnicas de estudio: Secuenciación de nueva generación (NGS)	36
5.1 Aspectos técnicos generales de la NGS	36
5.1.1 Paneles de genes: secuenciación dirigida mediante “amplicones” o “captura”	36
5.1.2 Detección de variantes estructurales mediante NGS.....	37
5.1.3 Análisis de los datos de NGS: herramientas bioinformáticas.....	37
5.1.4 Recomendaciones para el análisis de NGS en el ámbito clínico	38
5.2 Nuevas estrategias de NGS aplicadas a LMA	39
5.2.1 Técnicas convencionales para la caracterización de LMA	39
5.2.2 Técnicas de estudio genómico en LMA: WGS, WES y paneles de genes	40
6. Enfermedad mínima residual en LMA	43
6.1. Definición de EMR.....	43

6.2. Técnicas de estudio de EMR	44
6.2.1. Citometría de Flujo. Inmunofenotipo	44
6.2.2. Biología molecular. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR).....	45
6.2.3 Nuevas técnicas de detección de EMR: Secuenciación masiva y PCR digital.....	47
6.3. Marcadores moleculares para el seguimiento de la EMR en LMA	49
6.3.1. Transcritos de fusión	49
6.3.2. Mutaciones somáticas cuantificables	50
6.3.3. Expresión de genes aberrantes.....	52
7. Bibliografía	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO	63
OBJETIVOS.....	67
MATERIAL & MÉTODOS	71
RESULTADOS.....	115
CAPÍTULO 1- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA DE BAJO RIESGO GENÉTICO. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS ASOCIADAS CON RECAÍDA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) Y RQ-PCR.....	117
CAPÍTULO 2- NUEVA ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL ESTUDIO SIMULTÁNEO DE MUTACIONES Y REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA.....	165
CAPÍTULO 3- ANÁLISIS GENÓMICO DE VARIANTES GERMINALES Y SOMÁTICAS EN UN CASO DE LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA FAMILIAR	195
CAPÍTULO 4- UTILIDAD DE LOS GENES WT1, PRAME Y BAALC COMO MARCADORES DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA.	213
CONCLUSIONES.....	75
SUMMARY-RESUMEN EN INGLÉS (Doctorado Internacional).....	261
I. FIRST PROJECT.....	263
II. SECOND PROJECT.....	267
III. THIRD PROJECT.....	270
IV. FOURTH PROJECT.....	273
V. CONCLUSIONS.....	276

The image features a vibrant, abstract representation of DNA. Several double helix structures are shown in various colors, including shades of teal, pink, purple, yellow, and grey. The helices are intertwined and vary in size and orientation. In the lower right quadrant, a vertical sequence of nucleotides is depicted as a series of colored spheres (pink, grey, yellow, cyan, red, purple, green, blue, orange, black) arranged in a slightly curved line. The word "ABREVIATURAS" is written in a bold, black, sans-serif font across the center of the image, overlapping the DNA structures and the nucleotide sequence.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxiribonucleico
ADNc: Ácido desoxiribonucleico complementario
ARN: Ácido ribonucleico
ATRA: Ácido todo trans-retinoico
CBF: Core-binding factor
CD: Grupo ("cluster") de diferenciación
ddPCR: PCR digital
dNTP: Desoxinucleótido
ELN: European LeukemiaNet
FAB: Franco-Americano-Británico
FISH: Fluorescence in situ hybridization
ITD: Duplicación interna en tándem
Kb: Kilobase
LMA: Leucemia mieloblástica aguda
LMC: Leucemia mieloide crónica
LPA: Leucemia promielocítica aguda
Mb: Megabase
mL: Mililitro
mM: Milimolar
MO: Médula ósea
Ng: Nanogramo
NGS: Next Generation Sequencing (secuenciación masiva)
OMS: Organización Mundial de la Salud
pb: Pares de bases
PCR: Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
RC: Remisión completa
RQ-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa inversa
SG: Supervivencia global
SLE: Supervivencia libre de enfermedad
SLR: Supervivencia libre de recaída
SMD: Síndrome mielodisplásico

Abreviaturas

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido)

SP: Sangre periférica

STR: Short tandem repeat (repetición corta en tándem)

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

µg: Microgramo

µL: Microlitro

µM: Micromolar

Ara-C: Arabinósido de citosina (citarabina)

Ida: Idarrubicina

pM: Picomolar



INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre las leucemias mieloblásticas agudas (LMA)

1.1 Definición de LMA:

La LMA es un grupo heterogéneo de neoplasias resultantes de la expansión clonal de células mieloides inmaduras. Estas células acumulan una variedad de alteraciones genéticas que afectan a mecanismos de auto-renovación, proliferación y diferenciación. Inicialmente, las células tumorales infiltran la médula ósea (MO) desplazando al resto de células hematopoyéticas normales, lo que se traduce en pancitopenias. Después, infiltra también la sangre periférica (SP) y otros tejidos, produciendo alteraciones en su función (1).

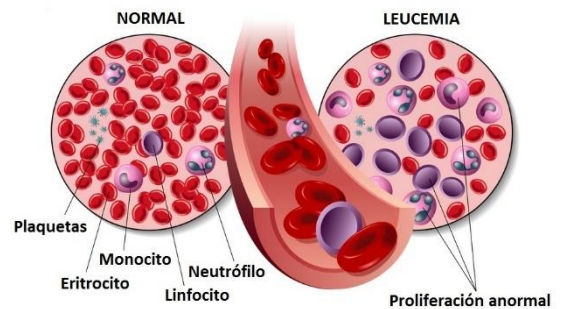


Figura 1. SP sana vs. SP de LMA.

1.2 Epidemiología, etiología y etiopatogenia:

▪ Epidemiología

En los países occidentales, la LMA tiene una incidencia de 3,8 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año, con un incremento progresivo con la edad, hasta alcanzar un pico de 17,9 por 100.000 habitantes/año en pacientes mayores de 65 años. Esta enfermedad, que representa el tipo de leucemia más común en adultos y neonatos, supone el 80% de las leucemias agudas adultas y el 15-20% de las pediátricas. La mediana de edad al diagnóstico se sitúa en torno a los 70 años. A pesar de ser una enfermedad relativamente infrecuente, es la causante de aproximadamente el 2% de la mortalidad global por cáncer en el mundo occidental, y se espera un aumento de su incidencia a medida que la población envejezca (1,2)(Base de datos SEER 'Surveillance, Epidemiology, and End Result'; último acceso: abril de 2018)

▪ Etiología

La causa de la LMA se desconoce en la gran mayoría de los casos. Sin embargo, se sabe que hay diversos factores que predisponen a sufrir esta hemopatía maligna. Entre ellos, destacan los factores genéticos, exposición a ciertos factores ambientales, virus o radiación y el tratamiento previo con quimioterapia. Entre los niños, los defectos genéticos constitucionales son factores de riesgo importantes asociados con la LMA (3). Los niños con síndrome de Down tienen una probabilidad aumentada de 10 a 20 veces de desarrollar leucemia aguda (4). Otras enfermedades hereditarias asociadas son los síndromes de Klinefelter y de Li-Fraumeni (2). La exposición crónica a ciertos productos químicos, como el benceno, muestra claramente un mayor riesgo de desarrollar LMA (5). Se ha sugerido que el parvovirus B19 podría desempeñar un papel en

la patogénesis (6). Sin embargo, no se ha demostrado que la infección sea la causa final. La exposición a la radiación ionizante también se ha relacionado con la LMA, observándose que la radiación terapéutica aumenta el riesgo de sufrir esta enfermedad (2). Además, algunos agentes quimioterápicos utilizados para el tratamiento de otros tumores, como los agentes alquilantes o los fármacos que actúan sobre la topoisomerasa-II, aumentan el riesgo de desarrollar una LMA. En el caso de los pacientes tratados con mitoxantrone (inhibidor de la topoisomerasa II) se ha demostrado que producen con mayor frecuencia traslocaciones balanceadas tipo t(15;17), dando lugar al desarrollo de una leucemia promielocítica aguda (LPA) secundaria a tratamiento (7). Aun así, la mayoría de los casos de LMA surgen *de novo*, sin exposición leucemogénica objetivable.

- **Etiopatogenia: mecanismo de leucemogénesis**

La leucemogénesis es un proceso complejo que consta de múltiples pasos aún no definidos completamente, basado en la acumulación de alteraciones genéticas que modifican en algún punto el funcionamiento normal de la célula. La LMA resulta de la transformación clonal de precursores hematopoyéticos (células madre hematopoyéticas o progenitores mieloides)(8) que pueden adquirir tanto reordenamientos cromosómicos como mutaciones génicas que confieren a la célula una ventaja en cuanto a proliferación y supervivencia, perjudicando la diferenciación hematopoyética (9). Estas alteraciones genéticas clave, a menudo incluyen mutaciones de oncogenes y / o pérdida de genes supresores de tumores. Los eventos genéticos específicos en el proceso de leucemogénesis no se conocen bien en la actualidad, aunque tradicionalmente se ha sugerido que se requieren al menos dos mutaciones, según el modelo de “doble hit” propuesto por Gilliland y Griffin en 2002 (10). Este modelo hipotetiza que la LMA es consecuencia de una colaboración entre, al menos, dos amplias clases de mutaciones: Clase I, que confieren ventajas proliferativas y de supervivencia, que ocurrirían en genes involucrados en distintas vías de señalización celular (FLT3, KIT, RAS) y Clase II, que afectan a los procesos de diferenciación y apoptosis, y tendrían lugar en genes implicados en transcripción (PML-RAR α , CBF β -MYH11, RUNX1T1-RUNX1, NPM1). Sin embargo, los recientes avances en el conocimiento de la genómica de las LMA, paralelos al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, han identificado nuevos genes afectados que no se ubican en ninguna de las dos clases y escapan por tanto al tradicional modelo de doble *hit*. Estas alteraciones, que serán detalladas en los próximos apartados del presente trabajo de tesis doctoral, corresponden a distintos procesos celulares, siendo uno de los principales las modificaciones epigenéticas (11) (Figura 2).

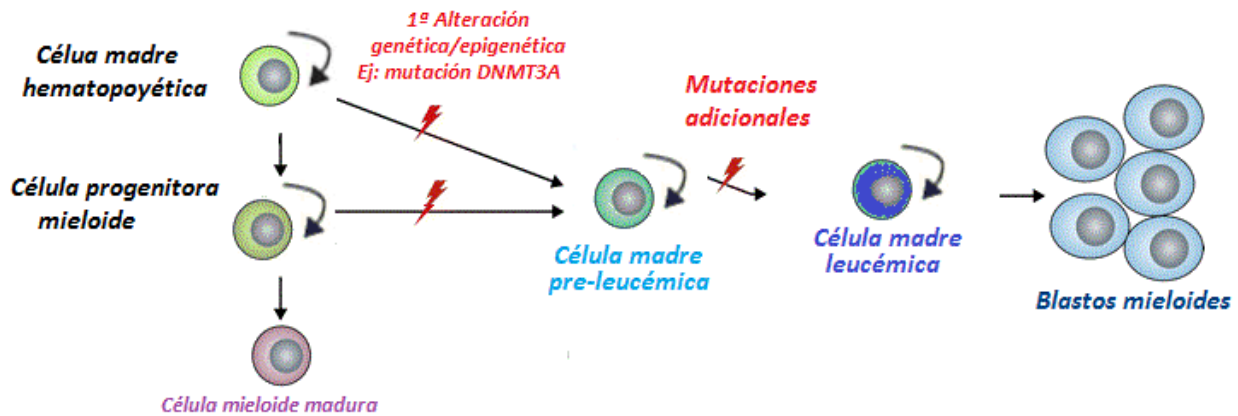


Figura 2. Esquema del proceso de leucemogénesis.

1.3 Diagnóstico y clasificación de las LMA: FAB y OMS

Para el diagnóstico básico de la LMA son fundamentales los estudios morfológicos, requiriéndose la presencia de al menos un 20% de blastos en médula ósea para establecerlo (12). Basada en criterios morfológicos y citoquímicos, surge la primera clasificación de las LMA con amplia difusión: la clasificación Franco-Americana-Británica (FAB)(13), que divide las LMA en 8 subtipos, desde el M0 al M7, según la línea mieloide afectada y su grado de diferenciación celular. Sin embargo, la baja reproducibilidad de esta clasificación y los avances en el conocimiento biológico de los últimos años han puesto de manifiesto la escasa utilidad clínica y significación pronóstica de este sistema de clasificación.

Hoy en día es bien conocido que las LMA presentan una gran variedad de alteraciones genéticas (14), distintas pero recurrentes, que se emplean cada vez más para personalizar el tratamiento y mejorar el pronóstico de los pacientes (15). Ante estas evidencias y en respuesta a las carencias de la clasificación FAB, surge en el año 1999, la primera clasificación de las neoplasias mieloides de la Organización Mundial de la Salud (16), que incorpora ya algunas anomalías genéticas asociadas con los distintos subtipos de LMA, integrando la morfología, la citogenética y las alteraciones moleculares, no solo como herramientas útiles en el diagnóstico, sino también en el pronóstico y la selección de tratamiento. En dicha clasificación, varias entidades de LMA se definen por la presencia de traslocaciones e inversiones cromosómicas recurrentes que resultan en la fusión de genes. En sus versiones más actuales (17,18) se han añadido además nuevas categorías basadas en el impacto pronóstico de mutaciones en genes críticos como *NPM1*, *CEBPα* y *RUNX1*.

En la última actualización (OMS 2016), se ha incorporado además una categoría de “**Neoplasias Mieloides con predisposición germinal**”, donde se incluyen las LMA/síndromes mielodisplásicos (SMD) hereditarios asociados a mutaciones germinales.

2. Principales alteraciones genéticas con utilidad diagnóstica en las LMA

La actual clasificación de las LMA según la OMS (19) incluye cuatro categorías fundamentales: (i) LMA con alteraciones genéticas recurrentes (citogenéticas y moleculares); (ii) LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, que comprende las LMA con ciertas alteraciones citogenéticas y ausencia de otras moleculares; (iii) neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento y (iv) LMA no especificadas. Además, como se ha comentado previamente, la versión más actual incluye la nueva categoría de (v) Neoplasias mieloides con predisposición germinal o familiar. Como puede deducirse, las alteraciones genéticas son la firma de algunas de estas categorías (concretamente de (i), (ii) y (v)). A continuación, se detalla la naturaleza e implicaciones clínicas de dichas alteraciones, cada vez más numerosas, y útiles para establecer un diagnóstico preciso (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución de las versiones de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud para LMA
(v1: Harris et al.; 1999 | v2: Vardiman et al., 2008 | v3-actual: Arber et al., 2016).

OMS 2001	OMS 2008	OMS 2016
● LMA con alteraciones genéticas recurrentes	● LMA con alteraciones genéticas recurrentes	● LMA con alteraciones genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)/ <i>AML1-ETO</i>	LMA con t(8;21)/ <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	LMA con t(8;21)/ <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA con inv(16) o t(16;16)/ <i>CBF6-MYH11</i>	LMA con inv(16) o t(16;16)/ <i>CBF6-MYH11</i>	LMA con inv(16) o t(16;16)/ <i>CBF6-MYH11</i>
LPA con t(15;17)/ <i>PML-RARα</i> y variantes	LPA con t(15;17)/ <i>PML-RARα</i>	LPA con <i>PML-RARα</i>
LMA con anomalías de 11q23 (<i>MLL</i>)	LMA con t(9;11)/ <i>MLLT3-MLL</i>	LMA con t(9;11)/ <i>MLLT3-KMT2A</i>
● LMA con displasia multilínea	LMA con t(6;9)/ <i>DEK-NUP214</i>	LMA con t(6;9)/ <i>DEK-NUP214</i>
● LMA/SMD secundaria a tratamiento	LMA con inv(3) o t(3;3)/ <i>RPN1-EVI1</i>	LMA con inv(3) o t(3;3)/ <i>GATA2, MECOM</i>
● LMA no clasificada	LMA con t(1;22)/ <i>RBM15-MKL1</i>	LMA con t(1;22)/ <i>RBM15-MKL1</i>
	<i>Entidad provisional: LMA con NPM1 mutado</i>	<i>Entidad provisional: LMA con BCR-ABL1</i>
	<i>Entidad provisional: LMA con CEBPA mutado</i>	LMA con <i>NPM1</i> mutado
	● LMA con cambios relacionados con mielodisplasia	LMA con mutaciones bialélicas en <i>CEBPA</i>
	● LMA/SMD secundaria a tratamiento	<i>Entidad provisional: LMA con RUNX1 mutado</i>
	● LMA no especificada (NOS)	● LMA con cambios relacionados con mielodisplasia
		● LMA/SMD secundaria a tratamiento
		● LMA no especificada (NOS)
		● Incluye: Neoplasias mieloides con predisposición germinal

2.1 Alteraciones genéticas recurrentes

2.1.1 Traslocaciones e inversiones cromosómicas (alteraciones balanceadas)

En la categoría “LMA con alteraciones genéticas recurrentes” se incluyen ocho traslocaciones e inversiones equilibradas y sus variantes. Entre ellas se encuentran, de forma destacable, las LMA con PML-RAR α (también denominada LPA) o las LMA *core-binding factor* (LMA-CBF): LMA con t(8;21) /RUNX1-RUNX1T1 y LMA con inv(16)/CBF β -MYH11. Cada una de estas traslocaciones/inversiones define o se asocia a una entidad homogénea de LMA con características morfológicas, clínicas y patogénicas específicas (20). Sin embargo, estudios recientes basados en NGS apuntan a una amplia heterogeneidad dentro de cada una de estas clases, como ponen de manifiesto, por ejemplo, algunos trabajos de secuenciación masiva sobre las diferencias entre las LMA-CBF (21,22).

Como se ha descrito previamente, de forma tradicional, se ha considerado el modelo de leucemogénesis del “doble *hit*”, según el cual para desencadenar el proceso leucémico serían necesarios dos eventos: en primer lugar, la interrupción del trabajo de un factor de transcripción, que perjudicaría la diferenciación (ej: RUNX1 o CBF β en LMA-CBF y RAR α en LPA) y, en segundo lugar, la ocurrencia de mutaciones activadoras que aumentarían la proliferación. Aunque este modelo resulta de gran interés y valor biológico, es imposible ignorar la multitud de aberraciones genéticas y epigenéticas que se han descrito recientemente en las LMA gracias a las nuevas tecnologías (23). Por otra parte, en el caso de las LMA-CBF, se ha demostrado en modelos murinos que la anulación de los genes del complejo CBF (RUNX1 y CBF β) mediante la generación de las fusiones aberrantes RUNX1-RUNX1T1 o CBF β -MYH11 no es suficiente para el desarrollo definitivo de la leucemia. Si bien la disrupción de estos factores de transcripción afectaría a la expresión de genes necesarios para una hematopoyesis normal, se precisarían eventos adicionales para completar el proceso de tumorigénesis (24–26). De acuerdo con esto, se han llegado a identificar células preleucémicas portadoras de los genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 o CBF β -MYH11 años antes del desarrollo clínico de la LMA, así como en pacientes que permanecen en remisión a largo plazo (27,28). Un caso similar es el de las LPA, en cuyo desarrollo es imprescindible la aparición de la fusión anómala PML-RAR α , y sin embargo, su expresión en ratones se ha asociado con una latencia prolongada de aparición de la enfermedad y una penetrancia variable (29,30). Esto sugiere que existen anomalías genéticas secundarias que estarían contribuyendo a la patogénesis de las LMA-CBF o las LPA. Estas anomalías adicionales, podrían afectar a otras funciones celulares además de a las tradicionalmente descritas en el modelo de doble *hit* (transcripción y señalización celular), como la metilación del ADN, los modificadores de la cromatina o los factores de *splicing*.

Además de los 8 reordenamientos equilibrados contemplados por la OMS, se han descrito casos de LMA con otros muchos que, aunque se consideran cambios que inician la leucemia, actualmente no definen formalmente una entidad como tal, principalmente porque son infrecuentes y su impacto clínico aún no ha sido firmemente establecido (20).

2.1.2 Mutaciones en NPM1, CEBPA y RUNX1

Conviene recalcar que, según el análisis citogenético, alrededor del 40-50% de las LMA muestran un cariotipo normal. En este subgrupo de LMA las alteraciones moleculares pueden presentar una especial relevancia clínica (31–33). En la actualidad, la OMS reconoce tres mutaciones con valor diagnóstico en LMA: NPM1, CEBP α bialélicas y RUNX1 (18). Como se explicará en el siguiente apartado, tanto NPM1 como CEBP α confieren además un valor pronóstico favorable, al contrario que RUNX1, cuya mutación es un factor adverso (12,20).

La LMA con cariotipo normal y **NPM1** mutada define la entidad más numerosa, con una incidencia de aproximadamente el 30% de todos los pacientes con LMA. Aunque es un evento bastante tardío en la leucemogénesis, emerge como una entidad distinta de LMA. Se asocia con mutaciones en otros genes, como DNMT3A (aproximadamente el 50%) y FLT3-ITD (aproximadamente el 40%), cuya presencia condicionará el buen pronóstico conferido por NPM1 (20,34,35).

Las mutaciones en el factor de transcripción **CEBP α** definen una entidad de LMA en caso de ser bialélicas, es decir, una mutación afecta a la región amino-terminal de un alelo y la otra a la región carboxi-terminal del segundo alelo. Su frecuencia disminuye con la edad, siendo de aproximadamente el 1-2% en pacientes >60 años. En esta entidad, no se ha observado una asociación con mutaciones de mal pronóstico, como FLT3-ITD (20,36).

Finalmente, la LMA con **RUNX1** mutado ha sido la última en ser incluida como entidad provisional en la clasificación de la OMS. Su frecuencia, al contrario que en el caso de CEBP α , aumenta con la edad, siendo del 5-10% en menores de 60 años y del 10-20% en mayores. Se asocia con LMA secundaria a SMD y, en concordancia, con alteraciones relacionadas con displasia, como pérdidas de 7/7q o mutaciones en SRSF2 (aprox. 25%) y ASXL1 (aprox. 20%)(37).

Se ha observado que estas tres mutaciones con valor diagnóstico en LMA son mutuamente excluyentes con los genes de fusión que afectan a factores de transcripción, como los anteriormente comentados (RUNX1-RUNX1T1, CBF β -MYH11, PML-RAR α), lo que apoya la idea de que estas mutaciones constituyen eventos iniciadores de leucemia al igual que los genes de fusión (11,20). Por último, más recientemente se han identificado nuevos genes mutados en LMA, como se muestra en la Figura 3, aunque aún no se les ha otorgado una relación causal exclusiva con la patogénesis y por tanto un valor diagnóstico. Las implicaciones de dichos genes serán detalladas más adelante.

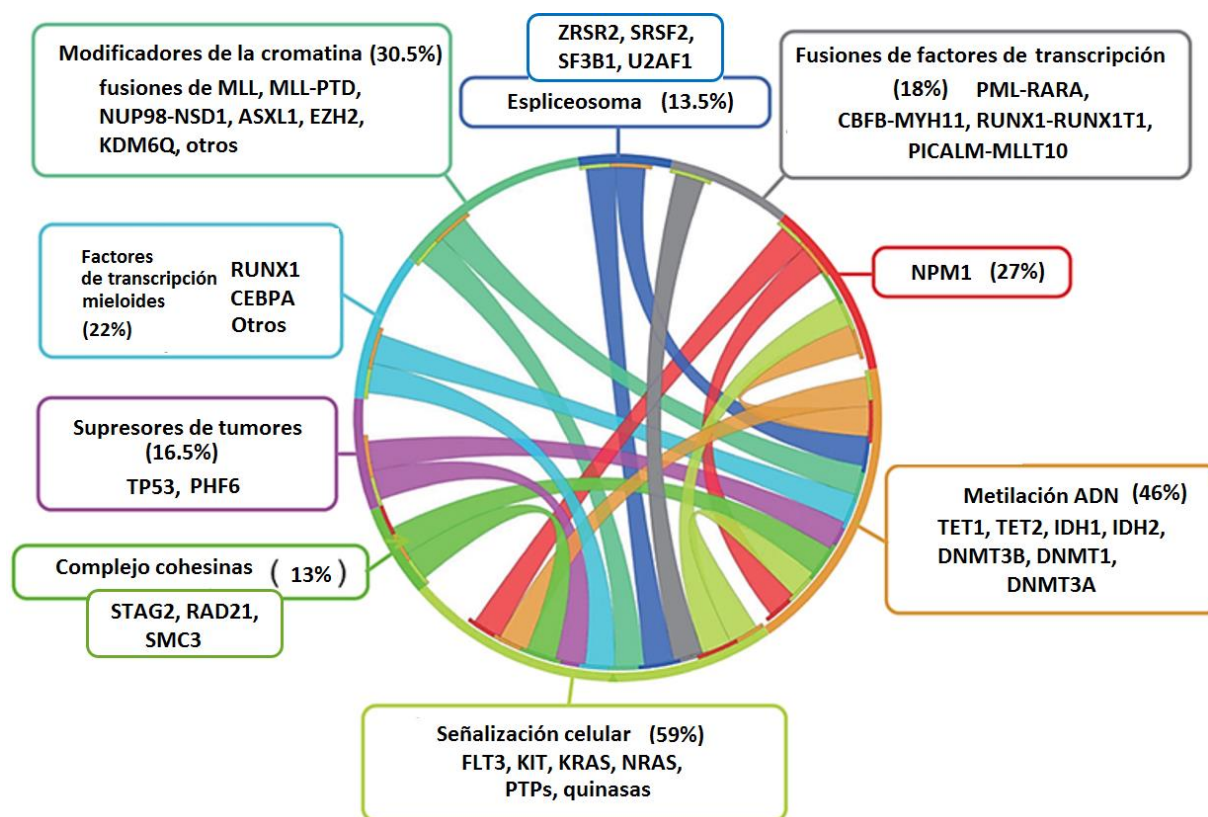


Figura 3. Diagrama de cuerdas (“circos plot”) que muestra una visión panorámica de los eventos genéticos que conducen a la patogénesis de la LMA. Adaptada Chen S. et al, *Nature Genetics* 2013; 45(6) 586–587. Se han identificado nueve categorías funcionales para genes mutados que muestran patrones complejos de cooperación y exclusividad mutua que serán detallados más adelante. Cada paciente puede tener varias mutaciones genéticas en diferentes categorías funcionales. Las cintas que conectan distintas categorías de anomalías génicas dentro de este gráfico reflejan las asociaciones entre mutaciones en diferentes vías. Las alteraciones mutuamente excluyentes se encuentran en áreas que no están conectadas, como ocurre en el caso de los genes de fusión y las mutaciones en *NPM1*, *CEBPα* y *RUNX1*, todas ellas alteraciones con valor diagnóstico en LMA. PTP, proteínas tirosina fosfatasa; *MLL-PTD*, duplicación parcial en tándem del gen *MLL*.

2.2 Alteraciones citogenéticas relacionadas con mielodisplasia

El grupo de “LMA con cambios relacionados con mielodisplasia” incluye aquellas LMA con ciertas características que entrañan un pronóstico adverso. Estas características son: (i) historia previa de SMD; (ii) detección morfológica de displasia multilínea (definida como la presencia de displasia en $\geq 50\%$ de las células en ≥ 2 líneas celulares) en ausencia de mutaciones en *CEBPα* o *NPM1* o (iii) ciertas alteraciones citogenéticas, incluido el cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones cromosómicas), alteraciones no balanceadas como $-7/\text{del}(7q)$ o $-5/\text{del}(5q)$, o alteraciones balanceadas como las traslocaciones $t(11;16)(q23;p13.3)$ o $t(1;3)(p36.3;q21.1)$.

Por lo tanto, para establecer el diagnóstico de este subgrupo de LMA, no es suficiente con observar la presencia de displasia, sino que se necesita una combinación de técnicas morfológicas, citogenéticas y moleculares.

2.3 Alteraciones moleculares asociadas con predisposición familiar en LMA

2.3.1 Mutaciones de línea germinal vs. mutaciones somáticas

El desarrollo de neoplasias malignas hematológicas, al igual que otros tipos de cáncer, está motivado por mutaciones que pueden ser además de somáticas, como las comentadas previamente, de línea germinal. Estas mutaciones germinales se heredan en todas las células de un individuo. En contraste, las mutaciones somáticas pueden impulsar el desarrollo del cáncer y la adquisición de mutaciones, pero solo están presentes en la población celular tumoral de forma específica. Por lo tanto, las mutaciones adquiridas frente a las heredadas, tienen implicaciones clínicas distintas para el paciente y sus familiares (38).

2.3.2 Mutaciones germinales en LMA

El papel de las mutaciones germinales en niños y adultos con tumores malignos hematológicos fue, en un principio, subestimado. Concretamente en las LMA, a pesar del creciente conocimiento sobre las alteraciones genéticas adquiridas, como las comentadas previamente (36), la comprensión a fondo del papel de la genética heredada se ha visto obstaculizada por varios factores. Algunos de estos factores son la dificultad de acceso a tejidos germinales no contaminados con células tumorales, el desconocimiento de qué genes contribuyen a la predisposición a LMA, y una resistencia general a la idea que la genética heredada podría desempeñar un papel en el desarrollo de una neoplasia mielóide, fuera del contexto del conocido síndrome de insuficiencia medular hereditaria (39).

A medida que aumenta el número de genes identificados como causantes de formas hereditarias de LMA, esta resistencia comienza a ser reemplazada por un interés cada vez mayor y un ritmo acelerado de hallazgos en este campo. Este rápido descubrimiento, ha venido de la mano del desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, que permiten analizar simultáneamente un alto número de genes (40). Actualmente, las estimaciones sugieren que entre el 4%-10% de niños y adultos jóvenes con LMA/SMD (41–43) y el 4% de adultos con LMA (44) son portadores de mutaciones dañinas hereditarias en los genes de susceptibilidad a cáncer. Los genes implicados son diversos, incluidos los conocidos factores de transcripción hematopoyéticos tales como CEBP α , GATA2 y RUNX1, de los cuales se han descrito también alteraciones somáticas en LMA; así como los genes BRCA1 y MSH6, más tradicionalmente considerados de riesgo de tumores sólidos (40). Los genes identificados más recientemente, DDX41, SAMD9 y SAMD9L, están revelando nuevas vías implicadas en la leucemogénesis y profundizando nuestra comprensión de la biología básica de las neoplasias mieloides (45–47). En reconocimiento del impacto cada vez mayor de este campo en la atención clínica, la OMS y los grupos cooperativos tanto europeo (*European LeukemiaNet*) como americano (*National Comprehensive Cancer Network*) han incorporado recientemente en sus guías la consideración de los síndromes de predisposición germinal a LMA/SMD, incluyendo su clasificación y las recomendaciones

para su manejo clínico, lo que hace esencial el reconocimiento de estos síndromes hereditarios por parte de los clínicos (12,19,48). Dentro de la clasificación de la OMS, las neoplasias mieloides con predisposición genética germinal se dividen en tres grupos: (i) aquellas sin ningún trastorno o disfunción orgánica preexistente (con mutaciones en CEBPA o DDX41); (ii) aquellas con trastornos plaquetarios preexistentes (con mutaciones en RUNX1, ANKRD26 o ETV6); y (iii) las neoplasias mieloides con otras disfunciones orgánicas (con mutaciones en GATA2 u otros como el síndrome de Down o el síndrome de Noonan). En los casos con mutaciones en ANKRD26 y ETV6 la trombopenia constituye una constante, sin embargo, en el caso de RUNX1, los defectos en las plaquetas, así como las manifestaciones clínicas derivadas de ello, son más heterogéneos (49).

2.3.3 Identificación de casos familiares de LMA: indicios clínicos y test genéticos

El diagnóstico de una predisposición hereditaria a neoplasia mieloides es de gran importancia a la hora de tomar decisiones clínicas como la elección del tratamiento o la selección de donantes para el trasplante de células madre hematopoyéticas. El reconocimiento de que los síndromes hematológicos malignos heredados pueden presentarse sin estigmas clínicos clásicos o antecedentes familiares sospechosos ha conducido a una mayor dependencia de las pruebas genéticas. Estas pruebas son un campo en evolución, con un número cada vez mayor de opciones, pero que aún deben ser optimizadas (39). Para ello, es necesario un esfuerzo multidisciplinar, que integre los resultados clínicos y los genéticos de forma dinámica.

En cuanto a los test genéticos, la secuenciación de Sanger es una estrategia razonable cuando el fenotipo clínico es muy evidente, así como en el caso de que una mutación haya sido identificada previamente en uno de los miembros de la familia que ha desarrollado la enfermedad y quiera analizarse en el resto de los familiares. Sin embargo, este enfoque resulta complicado, ya que muchas familias no tienen una mutación de predisposición a cáncer que haya sido previamente diagnosticada, las características fenotípicas a menudo se superponen entre múltiples síndromes diferentes, los trastornos genéticos exhiben una amplia variabilidad de fenotipo y penetrancia, y es frecuente la ausencia de hallazgos clínicos o familiares que ayuden a emitir un diagnóstico. En este contexto, las nuevas técnicas de secuenciación masiva son el enfoque más atractivo (50). La NGS permite un análisis múltiple, rentable y eficaz de numerosos genes de predisposición a cáncer. La secuenciación de exoma completo (WES) es una herramienta poderosa para la evaluación de pacientes en los que no se han identificado mutaciones en los genes de diagnóstico conocidos. Además, esta estrategia genómica ha aumentado nuestra comprensión de la patogénesis de muchas neoplasias hereditarias. Sin embargo, al realizar WES, algunas regiones del genoma quedan poco cubiertas y pueden perderse zonas de interés. Por otra parte, resulta una técnica compleja que arroja una cantidad de datos difícil de gestionar hoy en día en un laboratorio clínico (51). Una solución son los paneles de genes basados en NGS, que permiten realizar un *screening* genético más rápido, amplio y factible que en el caso de la secuenciación Sanger, pero disminuyendo la complejidad analítica con respecto al WES. Por ello,

representan la opción más atractiva ante un caso de sospecha de LMA familiar. Una vez identificadas las variantes es importante contar con expertos que puedan interpretar el valor clínico de las mismas para emitir un consejo genético adecuado (38,39,52,53).

Para complicar aún más el diagnóstico de una LMA familiar, en algunos genes se han identificado tanto mutaciones somáticas en células hematopoyéticas como mutaciones en la línea germinal. Algunos ejemplos de genes mieloides en los que esto es posible son RUNX1, TP53, CEBP α , GATA2 y genes de la vía de RAS. Aunque una alta frecuencia alélica de la variante (VAF, *variant allele frequency*) puede ser sugerente de un trastorno de la línea germinal, esta consideración es insuficiente y puede dar lugar a error. Para distinguir de forma fiable si una variante de estos genes encontrada en un paciente es adquirida o heredada, es necesario realizar un análisis genético en paralelo con una muestra de tejido germinal, como células de la mucosa bucal o una línea celular de fibroblastos establecida a partir de una biopsia de piel del paciente (38).

Por otra parte, cabe destacar que, desde una perspectiva de investigación, las LMA/SMD familiares ofrecen una oportunidad única para analizar las etapas sucesivas que componen la leucemogénesis, partiendo desde una sola mutación de predisposición heredada, hasta llegar al desarrollo de la enfermedad manifiesta (39).

En conclusión, los síndromes de predisposición hereditaria a LMA/SMD son más comunes de lo que se reconocía anteriormente y su identificación en tiempo real tiene un gran impacto en la atención clínica de los pacientes y sus familias. Las nuevas técnicas genómicas de alto rendimiento tienen mucho que aportar en este punto.

3. Principales alteraciones genéticas con valor pronóstico en las LMA

Tradicionalmente se han utilizado como variables pronósticas las características del propio paciente (edad, estado general), algunos datos biológicos básicos (leucocitos, porcentaje de blastos) o la respuesta al tratamiento. Sin embargo, al igual que otras enfermedades malignas, la LMA es el resultado de una adquisición de lesiones genéticas somáticas (aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, alteraciones en el número de copias, pequeñas inserciones y deleciones y variantes de un único nucleótido) que se acumulan en las células madre leucémicas y, consecuentemente, están presentes también en su progenie. Adicionalmente, los cambios epigenéticos y transcripcionales contribuyen al proceso de leucemogénesis (54). La incorporación de los marcadores citogenéticos y moleculares derivados de estas alteraciones ha revolucionado la estratificación pronóstica de la LMA, facilitando el desarrollo de estrategias de tratamiento adaptado al riesgo de recaída. Por lo tanto, el actual sistema de estratificación de riesgo de las LMA no solo informa del pronóstico, sino que también dirige el abordaje terapéutico que se llevará a cabo

con cada paciente. Por ejemplo, las pautas tanto del grupo europeo (ELN) como del americano (NCCN) recomiendan la quimioterapia de inducción estándar seguida de la consolidación con citarabina en dosis altas para los pacientes del grupo de riesgo favorable (excepto LPA), mientras que en los casos de riesgo intermedio y adverso debe ser considerado el trasplante de células madre hematopoyéticas, si es posible, en primera remisión (12,55).

3.1 Alteraciones citogenéticas.

Los reordenamientos cromosómicos recurrentes en las LMA fueron el primer indicador de que las alteraciones adquiridas en el genoma tienen un papel esencial en la patogénesis (56). Estas alteraciones citogenéticas, además de relacionarse directamente con la patogenia de la enfermedad, lo que les confiere un **valor diagnóstico**, permiten clasificar (OMS) (18) y estratificar a los pacientes (grupos de riesgo) (57). Dicha clasificación proporciona una poderosa **información pronóstica**, muy útil para la selección del tratamiento más adecuado. Las anomalías citogenéticas permiten además identificar directamente pacientes adecuados para **terapia dirigida** (Ej.: ácido trans-retinoico (ATRA) y trióxido de arsénico (ATO) en la LMA con t(15;17))(Figura 4).

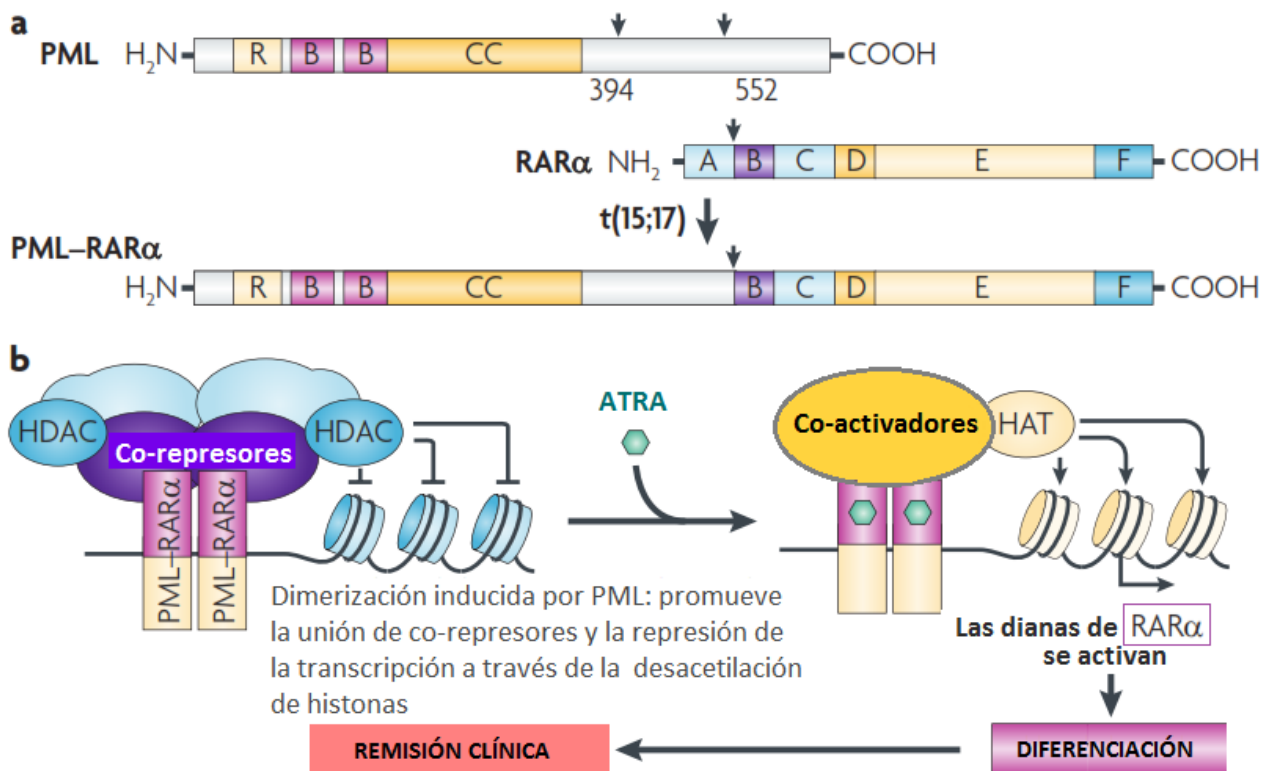


Figura 4. Esquema del modelo clásico de leucemogénesis en la leucemia Promielocítica aguda (LPA). Adaptado de H. de Thè, *Nat Rev Cancer* 2010; 10(11):775-83. | **a.** Estructura de las proteínas PML, RARα y la fusión aberrante PML-RARα, resultado de la t(15;17). **b.** Los homodímeros de PML-RARα se unen y reprimen los *targets* de RARα a través del reclutamiento de co-represores. El ATRA convierte a PML-RARα en un activador y restablece la diferenciación, produciendo remisiones clínicas. HAT, histona acetiltransferasa; HDAC, histona desacetilasa. Puesto que la eficacia de la terapia con agentes diferenciadores (ATRA o ATO y sus derivados) está ligada a la presencia del gen de fusión *PML-RARα* en las células leucémicas, la confirmación genética de esta lesión específica es necesaria en todos los casos.

Son varios los estudios que demuestran que estas alteraciones tienen una marcada influencia en la presentación y evolución de la LMA (15,58–61). Por ello, en la actualidad, el análisis citogenético al diagnóstico es considerado como el factor pronóstico más establecido y utilizado. Los hallazgos a nivel del cariotipo tienen un gran valor predictivo sobre las tasas de remisión completa (RC), la supervivencia libre de enfermedad (SLE), el riesgo de recaída y la supervivencia global (SG). El estudio citogenético, mediante cariotipo y/o FISH, se ha convertido en una herramienta necesaria para el manejo de la LMA y permite diferenciar tres grupos con pronóstico diferente: riesgo citogenético favorable, intermedio y alto (57).

- **Alteraciones citogenéticas que confieren pronóstico favorable:**

El subtipo con mejor pronóstico es la leucemia promielocítica aguda (LPA), una LMA portadora del gen de fusión PML-RAR α , el cual se produce como resultado de la traslocación **t(15;17)**. Esta traslocación, dado que afecta al receptor alfa del ácido retinoico (RAR α), conduce al bloqueo de la diferenciación de las células hematopoyéticas granulocíticas. El pronóstico de los pacientes con LPA ha mejorado drásticamente en las dos últimas décadas, debido a la incorporación de agentes diferenciadores como el ácido trans-retinoico (ATRA) y el trióxido de arsénico (ATO), que han permitido lograr tasas de curación de hasta el 80% (62). Aproximadamente el 5% de los pacientes catalogados como LPA mediante técnicas citomorfológicas carecen de la t(15;17) clásica, presentando otras variantes, como la t(11;17)(q23q21)PLZF-RAR α , o transcritos PML-RAR α que resultan de inserciones citogenéticas crípticas o de reordenamientos más complejos. Es muy importante reconocer estas variantes poco comunes, ya que difieren en su sensibilidad al ATRA y al ATO, y por tanto presentan distinto pronóstico (14). A su vez, dentro del grupo de las LPA, se han descrito una serie de factores que podrían tener una influencia en el pronóstico de estos pacientes, como la edad, puesto que los pacientes >60 años parecen tener una peor evolución (63). Además de la edad, existe consenso internacional en considerar al número de leucocitos y plaquetas al diagnóstico para establecer una clasificación de las LPA en tres grupos de riesgo, que recibirán tratamiento más o menos intensivo en base a ello. Según el *score* definido por Sanz et al. en el año 2000, los pacientes con cifras de leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ y plaquetas $> 40 \times 10^9/L$ se consideraron de bajo riesgo y aquellos con leucocitos $> 10 \times 10^9/L$ de alto riesgo, incluyendo al resto de LPA en el grupo de riesgo intermedio (64). Otra característica con valor pronóstico en las LPA es la expresión de la molécula de adhesión CD56 en la superficie de los promielocitos leucémicos. Se trata de un marcador propio de las células NK, que, sin embargo, se expresa de forma aberrante en los blastos de la LPA en un 10% de los casos. La expresión de dicho antígeno ha sido propuesta como factor pronóstico desfavorable en cuanto al riesgo de recaída por diversos grupos, gracias a estudios realizados en series amplias de pacientes (65).

Además de la leucemia promielocítica aguda (LPA), sólo dos alteraciones citogenéticas se asocian con un pronóstico favorable: la **t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1** y la **inv(16)/CBFb-MYH11**. Las LMA con estas alteraciones son consideradas como una entidad única denominada LMA “*core binding factor*” (LMA-CBF), dado que

tienen en común que resultan en dos transcritos que contienen dos genes que codifican los heterodímeros del factor de transcripción core-binding factor, CBF α (o RUNX1) y CBF β (66,67). Los pacientes con LMA-CBF tienen un riesgo de recaída menor al observado en los grupos de riesgo intermedio y alto y parece que se benefician especialmente del tratamiento con altas dosis de citarabina durante la consolidación. La presencia de anomalías cromosómicas adicionales no parece empeorar el pronóstico de estos pacientes (68). Sin embargo, a pesar de tratarse de un grupo de buen pronóstico en líneas generales, existen diferencias en cuanto a SLR y SG en los pacientes con LMA-CBF. Como se ha comentado previamente, por modelos murinos, se sabe que las traslocaciones que dan nombre a las LMA-CBF, aunque están implicadas en la patogénesis, no son suficientes para desarrollar la LMA. Un reciente estudio, ha revelado que estos pacientes poseen habitualmente mutaciones adicionales en genes implicados en vías de señalización celular (FLT3, N/KRAS, c-KIT, CBL, PTPN11), modificadores de la cromatina (ASXL1, EZH2) y genes del complejo cohesinas (RAD21, STAG2), lo que podría explicar las diferencias en el pronóstico observadas. Estos resultados aún deben ser confirmados (69).

- **Alteraciones citogenéticas que confieren pronóstico desfavorable:**

En el extremo opuesto, se sitúan los pacientes con cariotipo de alto riesgo, portadores de alteraciones etiquetadas como de mal pronóstico, como las pérdidas de 5/5q o 7/7q o el cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones cromosómicas). Estos pacientes muestran un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción con una elevada probabilidad de recidiva y en consecuencia una baja SG (5-14% a los 5 años) (59–61).

- **Alteraciones citogenéticas de riesgo intermedio:**

Aunque el cariotipo constituye el principal factor pronóstico en la LMA, el 40-60% de los pacientes presentan un cariotipo normal (LMA-CN), es decir, sus genomas carecen de alteraciones estructurales, incluso si se estudian las pérdidas y ganancias de material genético por técnicas más sensibles como los *arrays* de alta densidad (56). Estos pacientes, o aquellos portadores de alteraciones no clasificables en los grupos de riesgo favorable o alto, constituyen lo que se conoce como grupo de riesgo citogenético intermedio (LMA-CI). Se trata de un grupo heterogéneo en el cual, si bien la SLR es mejor que la observada en el grupo de mal pronóstico, existe una amplia variabilidad en la evolución clínica de estos pacientes. Por ello, se hace especialmente útil el refinamiento del pronóstico de este subgrupo mediante el empleo de marcadores moleculares específicos, que serán detallados a continuación.

3.2 Alteraciones moleculares

La patogénesis molecular de la LMA se ha estudiado mediante técnicas citogenéticas desde hace más de tres décadas. Sin embargo, dado que aproximadamente el 50% de los pacientes tienen un **cariotipo normal**, se han descrito alteraciones moleculares que aportan más información a la proporcionada por los datos clínicos, biológicos y citogenéticos (56). En la actualidad, ninguna alteración molecular se emplea para reclasificar a los pacientes de citogenética favorable o adversa en grupos de riesgo más o menos agresivos respectivamente. Sin embargo, además del grupo de cariotipo intermedio, los pacientes con LMA favorable también podrían beneficiarse de los nuevos hallazgos sobre alteraciones moleculares adicionales. Profundizar en el conocimiento de dichas alteraciones en el grupo de pacientes de **bajo riesgo** es uno de los propósitos la presente tesis doctoral, como se expondrá más adelante (**RESULTADOS: CAPÍTULO 1**). El interés principal de este estudio reside en el hecho de que no todos los pacientes con LMA de bajo riesgo citogenético/molecular presentan buen pronóstico. De hecho, hasta un 40% de los pacientes con LMA core binding factor (CBF) termina recayendo (70–73), la mitad de los pacientes con mutaciones en NPM1 sufren una recaída durante los 3 primeros años (35), y las mutaciones bialélicas de CEBPA (biCEBPA) aunque son de buen pronóstico, no evitan una tasa de recaída del 44% (74). Sin embargo, aún no se han definido con claridad las mutaciones responsables del comportamiento más agresivo de la enfermedad en estos subgrupos de bajo riesgo. Incluso en las LMA con t(15;17) (LPA), pese a las notables mejorías gracias a su tratamiento dirigido, aún aparecen una serie de casos (75–79) que presentan resistencia o recaídas.

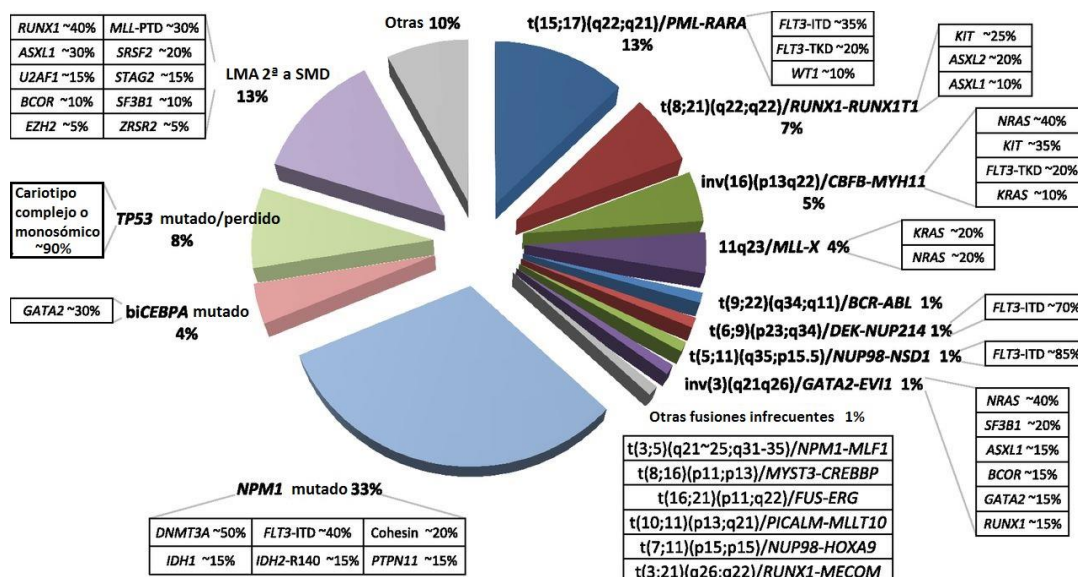


Figura 5. Distribución de subconjuntos de LMA definidos citogenética y molecularmente en adultos jóvenes. Adaptado de Grimwade, Ivey & Huntly, 2016; 127(1):29-42.

La mayoría de los casos de LMA se pueden segregar en una serie de subgrupos biológicos y pronósticos distintos. En aproximadamente un tercio de los casos, la LMA se caracteriza por la presencia de reordenamientos cromosómicos equilibrados conducentes a la generación de oncoproteínas quiméricas, que se consideran eventos iniciadores en la patogénesis de la enfermedad. Estas anomalías cromosómicas son mutuamente excluyentes de las mutaciones en el gen nucleofosmina (NPM1) y en las mutaciones bialélicas de CEBPA (biCEBPA), que se reconocen como anomalías genéticas recurrentes que definen la LMA y se asocian con un cariotipo normal. Estudios recientes han establecido una estrecha correlación entre el cariotipo complejo / cariotipo monosómico y

la mutación del gen TP53, que define un subgrupo biológico con un pronóstico muy precario (80). Se distingue un perfil mutacional que implica alteraciones en genes como ASXL1 y componentes espliceosoma asociados con LMA secundaria a mielodisplasia (SMD)(81). Para cada subconjunto de LMA citogenéticamente y genéticamente indicado en el gráfico circular, las mutaciones colaboradoras más frecuentes se muestran en los recuadros respectivos. Las frecuencias mutacionales se derivan de la integración de datos de estudios previos (revisado por *Grimwade, Ivey & Huntly, 2016*).

3.2.1 Mutaciones somáticas

En los pacientes con LMA-CN, las técnicas de secuenciación convencional (Sanger) han permitido detectar alteraciones a nivel molecular, algunas de ellas de especial relevancia tanto en la patogenia de la enfermedad como en el pronóstico. Mutaciones en FLT3, NPM1 y CEBP α han sido ampliamente estudiadas e incorporadas en las clasificaciones pronósticas desde las recomendaciones de 2010 del grupo ELN (82) y en la actualidad su estudio al diagnóstico es imprescindible para el manejo clínico de este grupo de enfermos (83). Algunos datos recientes han llevado a varios cambios en estas recomendaciones, como la inclusión de las mutaciones en RUNX1, ASXL1 y TP53, todas ellas de mal pronóstico, especialmente TP53 (12) (Figura 5). La presencia o ausencia de estas alteraciones moleculares al diagnóstico condiciona de manera importante el pronóstico de los pacientes con cariotipo normal, y su estudio permite diferenciar distintos subgrupos en cuanto al riesgo estimado de recaída y la supervivencia libre de enfermedad (83).

- **Mutaciones que confieren pronóstico adverso:**

Las mutaciones FLT3-ITD, localizadas en el dominio yuxtamenbrana del gen, se observan en la LMA no promielocítica con una prevalencia entre el 20 y 27% (84–88). Aunque existen algunas discrepancias, casi todos los estudios publicados hasta la fecha coinciden en otorgarles un papel pronóstico adverso (84,88,89). Algunos trabajos sugieren que una relación o ratio más alta entre la cantidad de alelo mutado y el alelo no mutado se asocia con un peor pronóstico (34,84,85,90,91). Sin embargo, otros trabajos recientes no han encontrado esta asociación (92). El otro tipo de alteraciones encontradas son las mutaciones puntuales en el aminoácido Asp835 (D835), que afectan al dominio tirosina quinasa de FLT3. Estas suceden con una frecuencia en torno al 7% en los pacientes con LMA (84) y su relación con el pronóstico está mucho más cuestionada (93). Mención aparte requieren las mutaciones de FLT3 en las LPA. En ellas, observan mutados aproximadamente el 30% de los casos (25% con FLT3-ITD y 5% con FLT3-D835). Sin embargo, aunque se asocian a un mayor recuento de leucocitos en sangre periférica al diagnóstico, no parecen aportar información pronóstica adicional (94). Además del valor pronóstico de su presencia al diagnóstico, FLT3 representa una diana para tratamiento dirigido con el fármaco midostaurín, recientemente aprobado por la FDA (*Food and Drugs Administration*) (95).

Como se ha comentado previamente, las mutaciones cuyo valor pronóstico ha sido reconocido de forma más reciente son aquellas en los genes RUNX1, ASXL1 y TP53. Las alteraciones de estos tres genes fueron incluidas en la última versión de la guía de recomendaciones de la *European LeukemiaNet* y todas ellas confieren un

pronóstico desfavorable a los pacientes que las presentan. En el caso de RUNX1, aunque las mutaciones suelen producirse en un contexto de otras características de mal pronóstico, como edad avanzada o antecedentes de mielodisplasia, permiten identificar pacientes con una evolución peor (96). Del mismo modo, las mutaciones de ASXL1, más comunes en pacientes mayores, se asocian con una tasa de supervivencia inferior (97,98). En el caso de TP53, sus mutaciones se asocian con cariotipo complejo o monosómico y aneuploidías específicas (-5/5q-; -7/7q-), y son predictivas de un pronóstico especialmente desfavorable con valor independiente (99). De hecho, la combinación de mutaciones en TP53 y cariotipo complejo, permite seleccionar un grupo de pacientes con el peor pronóstico de todos (12).

- **Mutaciones que confieren pronóstico favorable:**

Otras alteraciones moleculares con un marcado papel en la evolución de la LMA son las mutaciones en NPM1 y CEBP α . Además de su valor diagnóstico, previamente comentado, la gran mayoría de trabajos otorgan a dichas alteraciones un papel favorable en el pronóstico de los pacientes (34,83,90,100–102).

En el caso de **NPM1**, este pronóstico favorable se observa fundamentalmente en los pacientes sin mutaciones FLT3-ITD, en los que se alcanzan tasas de remisión en torno al 85%, una SLE entre el 50 y 60% y una SG en torno al 50% (34,84,101,103). Por lo tanto, las mutaciones de NPM1 definirían un grupo de mejor pronóstico dentro de los pacientes con LMA-CN, siempre que no se asocien a mutaciones de FLT3, constituyendo uno de los grupos más numerosos de LMA. La incidencia de mutaciones en NPM1 en LMA-CN oscila entre el 45 y el 60% de los pacientes y, de ellos, el 60% no presentan mutaciones FLT3-ITD (34) (35). A pesar de tratarse de un grupo de buen pronóstico, los casos NPM1 positivos tienen una evolución heterogénea, experimentando recaída aproximadamente el 50% de los pacientes. Estas diferencias en cuanto a evolución clínica, concuerdan con el controvertido papel biológico de la NPM1, al tratarse de una proteína multifuncional sin un rol único y definido en la célula. Adicionalmente, se ha descrito que las mutaciones en NPM1 no siempre se mantienen en la recaída (35). Esto señala la importancia de detectar alteraciones en genes adicionales presentes en el clon responsable de la recaída, que podrían acompañar a NPM1 ya en el momento del diagnóstico y que aún no han sido identificadas con certeza. Por último, un reciente estudio ha sugerido que el efecto de NPM1 mutada podría estar influenciado por la cantidad relativa de alelo mutado, de modo que una carga alélica alta, detectada mediante NGS, sería indicativo de mal pronóstico. De confirmarse estos datos, la forma de estudiar e interpretar las mutaciones de este gen al diagnóstico podría cambiar drásticamente (104). Además de con FLT3-ITD, se ha descrito una fuerte asociación entre las mutaciones en NPM1 y DNMT3A (11). Sin embargo, el valor clínico de las alteraciones en DNMT3A ha sido puesto en duda recientemente, debido a su presencia tanto en sujetos sanos como en pacientes en remisión (105), por lo que es necesario investigar más a fondo sobre las

alteraciones acompañantes y qué funciones de la célula comprometen, en los casos con NPM1 mutada al diagnóstico.

En segundo lugar, las alteraciones de **CEBPA**, especialmente las bialélicas, parecen relacionarse también con un mejor pronóstico en los pacientes con cariotipo normal (83,101,105,106). Cabe destacar que las mutaciones CEBPA son relativamente poco frecuentes (5-10%), pero se hallan casi exclusivamente en pacientes con cariotipo normal y son casi excluyentes en presencia concomitante de mutaciones de FLT3 o de NPM1. Esto le otorga un papel relevante en la estratificación pronóstica de muchos pacientes con LMA-CN sin mutaciones FLT3-ITD o NPM1 (74,107).

Además de las seis mutaciones anteriores (FLT3, NPM1, CEBPA, RUNX1, ASXL1, TP53), establecidas en clínica, se han descrito mutaciones somáticas en múltiples genes (cKIT, WT1, NRAS, KRAS, MLL, DNMT3A, TET2, IDH1/2, entre otros) que pueden estar implicadas en la patogenia de las LMA (36,56) y cuyo papel en el desarrollo (valor diagnóstico) y evolución (valor pronóstico) de la enfermedad aún está siendo investigado, y por tanto no se encuentran en la clasificación de la OMS ni en las guías sobre estratificación pronóstica actuales. Los más importantes se muestran en la Tabla 2. Adicionalmente, muchos pacientes no presentan mutaciones en ninguno de los genes principales descritos (56). La secuenciación masiva ha permitido identificar nuevos genes, como los implicados en *splicing* y el complejo de las cohesinas que se detallarán más adelante. Su influencia en el curso de la enfermedad aún debe ser estudiada a fondo.

Por último, cabe señalar que, aunque la presencia de un marcador genético por sí sola puede no tener valor pronóstico, sí puede proporcionar una **diana para nuevos tratamientos dirigidos** a reguladores epigenéticos como es el caso de IDH1 e IDH2. Del mismo modo, un reciente estudio en cultivos celulares humanos primarios ha identificado que la coocurrencia de mutaciones en CEBPA y CSFR3, el cual participa en la vía JAK-STAT, es indicador de respuesta al tratamiento con inhibidores de JAK (108).

3.2.2 Expresión génica aberrante

Además de las alteraciones genéticas (traslocaciones, mutaciones, etc.), se ha demostrado una asociación significativa entre el nivel de expresión, anormalmente incrementado o disminuido, de genes específicos con la respuesta al tratamiento y la supervivencia en determinados subgrupos de LMA, permitiendo discriminar pacientes con diferente riesgo de recaída dentro de un mismo grupo citogenético. Por ejemplo, dentro de los grupos de riesgo intermedio y alto, el gen EVI1 (MECOM), localizado en 3q26, está sobreexpresado como resultado de las alteraciones inv(3) y t(3;3) y se asocia con pronóstico adverso (109). Igualmente, niveles elevados de BAALC, ERG y MN1 también se han relacionado con una mala evolución de la enfermedad (110). Por el contrario, una expresión alta del gen PRAME al diagnóstico parece definir un mejor pronóstico en las LMA con traslocaciones t(8;21) y t(15;17) (111). De hecho, se ha publicado un *score* molecular dependiendo de los niveles de expresión de los genes ERG, EVI1 y PRAME que permite estratificar a los pacientes con

cariotipo normal en cuatro categorías de riesgo, independientemente de otras características clínico-biológicas (112). Por otra parte, la infraexpresión del gen TET2, también ha sido propuesta recientemente como factor de mal pronóstico en LMA-CN (113).

Aunque los cambios en la expresión de genes individuales han aportado información pronóstica, la aplicación de nuevas metodologías como los *microarrays* de expresión y la proteómica han permitido analizar el valor de la expresión génica global como herramienta pronóstica, identificando diferentes grupos de riesgo, particularmente en la LMA-CN (114). Por ejemplo, se ha demostrado que el perfil de expresión asociado a las mutaciones FLT3-ITD en la LMA-CN es un marcador más potente para el pronóstico y clasificación de riesgo que el estado mutacional por sí mismo (115). La utilidad clínica del perfil de expresión génica mediante *microarrays* se ha validado en varios trabajos, entre ellos, destaca un proyecto internacional que incluyó más de 3000 pacientes procedentes de 11 laboratorios, demostrándose que es una tecnología robusta y precisa en el diagnóstico y clasificación de las leucemias (116). Sin embargo, dada la enorme cantidad de genes que analizan estas técnicas y su elevado coste, son necesarias otras metodologías más sencillas y económicas, aplicables al laboratorio clínico, como la PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR), que permitan seleccionar y validar números reducidos de genes que realmente tengan repercusión en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades.

3.2.3 Alteraciones epigenéticas

3.2.3.1 Concepto de regulación epigenética

Como se detallará más adelante, la aplicación de las nuevas técnicas de NGS al estudio de las LMA ha permitido identificar nuevos genes y rutas potencialmente implicadas en la patogenia de la enfermedad (117,118). Uno de los principales grupos de genes afectados es el constituido por los reguladores epigenéticos, un grupo de factores que regulan la transcripción génica, y con ello modifican el perfil proteico de una célula sin producir cambios en la secuencia de ADN (119). Estos reguladores son fundamentalmente enzimas u otras proteínas de apoyo, que modifican bien el ADN (opción 1) o bien las histonas asociadas con el ADN (opción 2) (120).

Tabla 2. Mutaciones recurrentes en LMA.

Principales referencias: Marcucci et al., 2011 (*J Clin Oncol.* 2011;29(5):475-86); Walker et al., 2011 (*Haematologica.* 2011 May;96(5):640-3), Khwaja et al., 2016 (*Nat Rev Dis Primers.* 2016 Mar 10;2:16010).

Gen	Categoría funcional	Función de la proteína normal	Principales mutaciones y consecuencia	Frecuencia de mutación	Implicación clínica
ASXL1	Epigenética (modif. cromatina)	Represión transcripcional (metilación de histonas)	. Proteínas truncadas en C-terminal; . SNV de valor desconocido	7-25% LMA <i>de novo</i> 53% LMA trisomía 8	. Asociadas con peor SG . Grupo riesgo adverso ELN
CEBPA	Factor de transcripción	Regulador clave de la hematopoyesis	. 2 <i>hotspots</i> : N- y C-terminal. . Pérdida de función (generalmente)	5-10% LMA (predominan en LMA-CN)	. Sólo bialélicas (dobles mutantes): buen pronóstico . Monoalélicas germinales: LMA familiar . Grupo riesgo favorable ELN/Entidad LMA OMS
DNMT3A	Epigenética (metilación ADN)	Metilación <i>de novo</i> del ADN (CpG)	. Más frecuente: R882 (dominio metil-transferasa) . Pérdida de función (hipometilación de CpG)	22% LMA-CN	Aunque se asocian con SG más corta en LMA-CN, su impacto pronóstico no está claro. Los pacientes pueden beneficiarse de altas dosis de daunorubicina.
EZH2	Epigenética (modif. cromatina)	Histona metil-transferasa (metila a H3K27 → represión transcripcional). Oncogen y supr.tumor	Principalmente ganancia de función (aumenta la represión transcripcional); también pérdida	2% LMA <i>de novo</i>	Valor pronóstico no está claro
FLT3	Señalización celular (proliferación)	Receptor tirosina quinasa	. ITD: dominio yuxtamembrana . Puntuales en dominio TK . Activación constitutiva	. ITD: 20-27% LMA . TKD: 7% LMA	. ITD: mal pronóstico . TK: valor clínico dudoso . Fármaco dirigido: midostaurín. (Pan-nhibidor TK). FLT3-ITD ^{alto} : grupo riesgo adverso ELN
IDH1	Epigenética (metilación ADN)	. Enzima ciclo de Krebs citoplasmático (conversión de isocitrato a α -cetoglutarato)	. Mutación R132 (dominio catalítico) . Actividad neomórfica: producción de 2-HG (inhibe enzimas de metilación)	14% LMA-CN	. Generalmente no asociación con pronóstico . Probable mal pronóstico en LMA NPM1 <i>wild-type</i> . . Fármaco dirigido: AG-120/ivosidenib. (Inhibidor de IDH1 mutante).
IDH2	Epigenética (metilación ADN)	. Enzima ciclo de Krebs mitocondrial (conversión de isocitrato a α -cetoglutarato)	. Mutaciones R140 y R172 dominio catalítico) . Actividad neomórfica: producción de 2-HG (inhibe enzimas de metilación)	19% LMA-CN	. Muy variable entre estudios: Favorable, adverso, no valor. . Podría depender de la mutación: R140 favorable.; R172 adverso. . Fármaco dirigido: AG-221/enasidenib. (Inhibidor IDH2 mutante).
KIT	Señalización celular (proliferación)	Receptor tirosina quinasa	. 3 <i>hotspots</i> : dominios TK, extracelular y transmembrana. . Activación constitutiva	25-30% LMA-CBF	. Asociadas con mal pronóstico en LMA-CBF. . Ensayos clínicos evaluando los inhibidores de KIT.
MLL	Epigenética (modif. cromatina)	. Histona metil-transferasa (metilación de H3K4 produciendo activación transcripcional)	Aumento de activación transcripcional: . MLL-PTD: aumento de la metilación de H3K4 . MLL-traslocación: reemplazo del dominio metil-transferasa y cambio de sustrato por H3K79	. MLL-PTD: 4-7% . MLL-traslocación: 10-15%	MLL-PTD: asociada con menor SLR y SG. No factor pronóstico independiente. MLL-traslocación: mal pronóstico, excepto t(9;11).
NPM1	Multifuncional (regul. transcripción)	Biogénesis de ribosomas, remodelado de la cromatina, replicación y reparación ADN y otras.	Inserción de 4 pb en el extremo C-terminal. Pérdida de localización nuclear y localización citoplasmática anómala.	30% de LMA	Las mutaciones de NPM1 sin FLT3-ITD se asocian con mayores tasas de RC y mejor SLR y SG. No hay beneficio con alo-TPH. . Sin FLT3-ITD ^{alto} : grupo riesgo favorable ELN . Entidad LMA OMS
NRAS y KRAS	Señalización celular (proliferación)	Vía de señalización RAS-MAP-quinasas (proliferación, diferenciación y supervivencia).	. Mutaciones <i>missense</i> de ganancia de función (G12, G13, Q61) . Señalización <i>downstream</i> aberrante	LMA: 12% NRAS; 5% KRAS LMA-CBF: >40% NRAS; 5-17% KRAS.	No se han asociado con ningún factor pronóstico. Papel controvertido en LMA-CBF
RUNX1	Factor de transcripción	Regulador clave de la hematopoyesis	. <i>Missense</i> y codones de en todo el gen . Disrupción del dominio de unión al ADN	10% (más frecuentes en >60 años)	. Somáticas: peores SG y respuesta a inducción . Grupo riesgo adverso ELN/ Entidad LMA OMS Germinales: asociadas con LMA familiar
TET2	Epigenética (metilación ADN)	Regula la desmetilación del ADN (dependiente de α -cetoglutarato)	. Hipermetilación generalizada del ADN	7-23% LMA	. Sin valor pronóstico o adverso (limitado a las LMA-CN)
TP53	Supresor de tumores	Ciclo celular, apoptosis, metabolismo, reparación ADN y otras	. Mutaciones en todo el gen . Pérdida de función	. 6% LMA . 56-76% LMA cariotipo complejo	. Mal pronóstico . Grupo riesgo adverso ELN
WT1	Factor de transcripción	Vía de WNT (diferenciación, proliferación y muerte)	. <i>Indels</i> y <i>missense</i> en dominio dedos de zinc (unión ADN)	. 10-13% LMA-CN	. Impacto pronóstico generalmente adverso, aunque no está claro.

En cuanto a la primera estrategia, la principal modificación que sufre el ADN para regular su expresión es la metilación, la cual se produce en las islas CpG de los promotores génicos, provocando que un gen quede silenciado. Por tanto, las responsables del dinamismo de este proceso son las enzimas metilasas y desmetilasas. La segunda opción es llevada a cabo por los modificadores de histonas, que regulan la estructura de la cromatina, haciendo que los genes queden más o menos accesibles para su transcripción. Para ello, se establece un equilibrio entre distintos tipos de modificaciones histónicas post-traduccionales, siendo las principales la acetilación/desacetilación y la metilación/desmetilación. Principalmente, las modificaciones en las histonas H3 y H4 tienen una función importante en la producción de los cambios estructurales en la cromatina que regulan la actividad génica (121–123). La estructura abierta de la cromatina (transcripcionalmente activa) presenta altos niveles de acetilación de histonas (ej. en H3K9), dirigida por histonas-acetilinas (HAC), y una trimetilación enriquecida de residuos de lisina histónicas H3K4, H3K36 o H3K79. Por el contrario, la cromatina reprimida transcripcionalmente es rica en H3K9, H3K27 y H4K20 metiladas, y tiene una acetilación reducida, mediada por la actividad de histonas desacetilasas (HDAC) (124). Estos procesos epigenéticos son reversibles, y se van modificando según las necesidades de la célula en un momento determinado o en un tejido específico. En caso de que los genes que codifican estos reguladores estén mutados, se generarán patrones de metilación aberrantes, incluyendo la pérdida de ésta en secuencias normalmente metiladas (hipometilación) y la metilación aberrante de secuencias usualmente no metiladas (hipermetilación) (125,126). En distintos tumores, se ha observado que la metilación aberrante del ADN está asociada fundamentalmente con el silenciamiento de genes supresores de tumores, o bien con la activación de genes que deberían estar reprimidos durante la adultez, como los genes HOXA de desarrollo embrionario, y se cree que contribuye a la progresión de la enfermedad y a un peor pronóstico (127–129).

3.2.3.2 Regulación epigenética en la LMA

Estudios de NGS dirigidos han demostrado que ciertos modificadores de histonas (EZH2, MLL, ASXL1) y enzimas involucradas en la metilación del ADN (DNMT3A, IDH1/2, TET2,) se encuentran mutados en las LMA (130) (Figura 6). **EZH2** y **MLL** son histonas metil-transferasas, cuya mutación puede alterar el grado de enrollamiento de la cromatina, dando lugar a una represión transcripcional (131). Mientras que las mutaciones en EZH2 se encuentran en el 2% de las LMA *de novo* con un valor pronóstico desconocido (132), las fusiones de MLL aparecen en un 5-10% y confieren un pronóstico desfavorable (133). Del mismo modo, las mutaciones en **ASXL1**, que resultan en una disminución de la metilación histónica, son frecuentes (53%) en LMA con trisomía del cromosoma 8 y se asocian con un pronóstico desfavorable (97). El gen más estudiado de este grupo es el de la enzima metil-transferasa del ADN 3A, **DNMT3A**, a cuyas mutaciones se les otorga un papel pronóstico adverso y se encuentran presentes en el 22% de los pacientes con LMA-CN. La mutación más frecuente en DNMT3A es la R882 y se ha demostrado que reduce de manera significativa su actividad enzimática, lo que provoca una hipometilación de islas CpG específicas características de este grupo de LMA

(134). Por otra parte, Marcucci et al. (2010) demostraron que las mutaciones en los dominios catalíticos de las enzimas del ciclo de Krebs IDH1 (mutación R132) e IDH2 (mutación R140 y R172) también eran recurrentes en LMA-CN (135). **IDH1** mutado no se asocia generalmente con ningún pronóstico (136), aunque, según Mardis et al. podría conferir mal pronóstico en las LMA sin mutaciones en NPM1 (118). En cuanto a **IDH2**, los resultados sobre su valor pronóstico difieren entre los distintos estudios (136). Estas enzimas catalizan la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato, pero cuando están mutadas adquieren una función neomórfica y generan 2-hidroxiglutarato, un oncometabolito que inhibe enzimas implicadas en metilación (como TET2), lo que a su vez provoca un marcado cambio del perfil epigenético en la célula (137). En cuanto a los pacientes con mutaciones en **TET2** (ADN desmetilasa), se ha observado que presentan un perfil epigenético caracterizado por la hipermetilación generalizada del ADN. TET2 regula la desmetilación del ADN oxidando los grupos metilo de las citosinas y lo hace de forma dependiente de α -cetoglutarato, producto de la reacción catalizada por IDHs en su estado normal, por lo que las mutaciones en IDHs también afectan a la actividad catalítica de TET2. Sus mutaciones se han asociado con un peor pronóstico en LMA-CN (120).

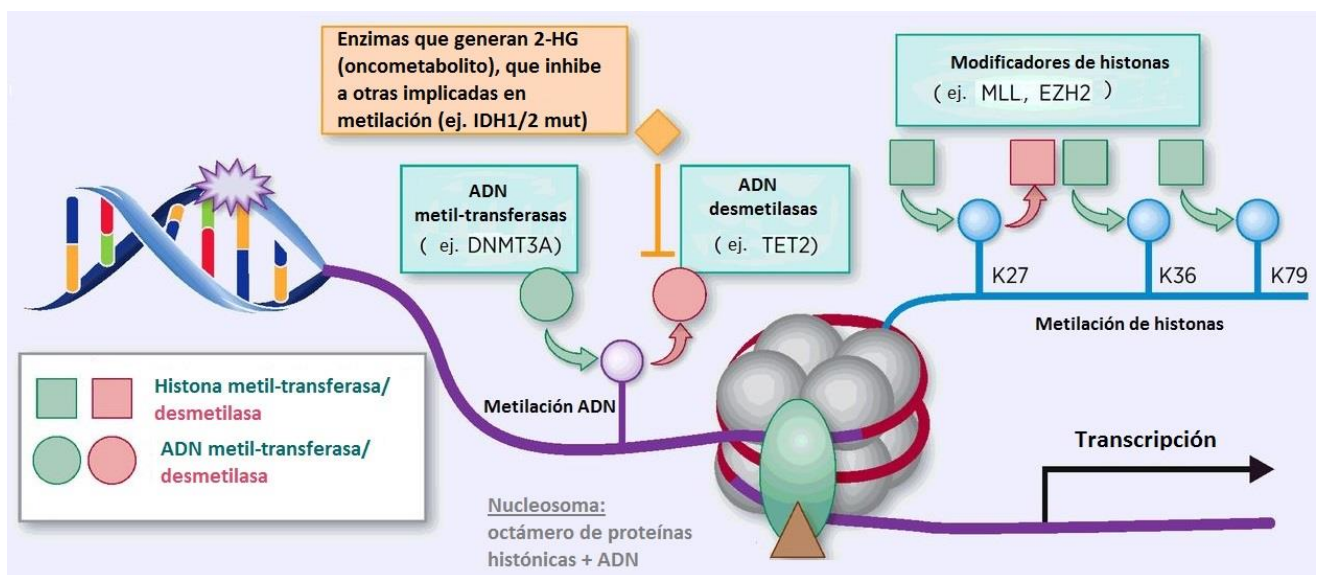


Figura 6. Principales reguladores epigenéticos afectados en LMA.

La alta frecuencia de alteraciones descritas en genes implicados en epigenética, además de la importancia clínica de los inhibidores de metiltransferasas del ADN en los pacientes con LMA, ha despertado un gran interés en el desarrollo de nuevas terapias epigenéticas dirigidas. Es el caso de las mutaciones en DNMT3A, IDH1 o IDH2, que pueden conferir sensibilidad a agentes desmetilantes (azacitidina, decitabina). Además, se ha observado que los pacientes con mutaciones en DNMT3A pueden beneficiarse del uso de altas dosis de daunorubicina (138). Cabe destacar que la detección de mutaciones de IDH2 está cobrando especial relevancia en la práctica clínica debido a la reciente aprobación (2017) por la FDA de un nuevo fármaco que inhibe de forma específica a la enzima mutada (AG-221; enasidenib). Este inhibidor alostérico de IDH2, suprime la producción de 2-hidroxiglutarato, liberando a los blastos mieloides del bloqueo diferenciativo

(95,139,140). Sin embargo, la mayoría de los estudios farmacológicos todavía se encuentran en sus fases iniciales y se desconocen los efectos adversos a largo plazo y los posibles mecanismos de resistencia al tratamiento (141).

3.3 Clasificación pronóstica de la *European LeukemiaNet (ELN)*.

En el año 2010, un grupo de expertos internacional, en el seno de la ELN, elaboraron la primera guía sobre recomendaciones para el diagnóstico y manejo de las LMA (82). Tras la exitosa aceptación de dicho trabajo, de forma paralela a la nueva clasificación de la OMS (2016) y dados los enormes avances genómicos de los últimos años, una nueva versión de esta guía fue publicada en 2017 y se encuentra vigente en la actualidad. Esta guía contempla los factores pronósticos pretratamiento, incluyendo aquellos asociados al paciente y los relacionados con el clon leucémico, así como factores post-tratamiento, esto es, el estudio de enfermedad mínima residual (EMR), del cual se hablará más adelante. El objetivo de esta estratificación de riesgo es elegir un tratamiento adaptado a cada caso, distinguiendo entre aquellos pacientes que se beneficiarían de estrategias terapéuticas más intensivas, como el trasplante alogénico, y aquellos que no (12). En cuanto a los factores asociados al paciente, el más importante sigue siendo la edad avanzada, asociada con un peor pronóstico. Sin embargo, se destaca la importancia de no considerarlo como único factor determinante para tomar decisiones sobre el tratamiento. En cuanto a los factores asociados a la LMA, como se muestra en la Tabla 3, en esta guía se recoge una clasificación de los pacientes en tres grupos con distinto riesgo de recaída según sus características genéticas al diagnóstico, combinando alteraciones citogenéticas y moleculares.

En el grupo de riesgo favorable, se incluyen las LMA-CBF [LMA con t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 y LMA con inv(16)/CBFb-MYH11], sin tener en cuenta ninguna mutación adicional. La presencia de mutaciones en c-KIT en las LMA-CBF parece estar asociada con un peor pronóstico, particularmente en LMA con t(8;21), en especial en caso de niveles altos de carga mutacional (142,143). Sin embargo, según la ELN, la alteración de c-KIT no debe asignar a un paciente una categoría de riesgo genético diferente; sino que más bien, en estos pacientes debe seguirse más de cerca el estudio de EMR, cuya ausencia se ha demostrado que anula el efecto de c-KIT (72). En el grupo de buen pronóstico, además de las LMA-CBF, se incluyen las LMA con cariotipo normal y mutaciones en NPM1 en ausencia de FLT3-ITD, o con una ratio ≤ 0.5 de dicha alteración, y también las LMA con cariotipo normal y mutaciones bialélicas en CEBP α . En ninguno de estos casos la presencia de anomalías cromosómicas coexistentes parece modificar el pronóstico favorable.

En contraste, las LMA con mutaciones FLT3-ITD (ratio ≥ 0.5) en ausencia de NPM1 presentan el peor pronóstico. Sin embargo, el curso natural de la LMA con mutaciones en FLT3 podría cambiar próximamente gracias al uso de los inhibidores de FLT3 recientemente aprobados. Como novedad, también se han incluido en el grupo de alto riesgo las mutaciones en *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53*, en reconocimiento a los numerosos estudios que han señalado su valor pronóstico independiente, como se ha comentado previamente. Otras

alteraciones de mal pronóstico reconocidas por el ELN son las pérdidas de 5/5q o 7/7q, los reordenamientos de KMT2A (MLL), excepto en el caso de la t(9;11)/MLLT3-KMT2A, que se clasifica en el grupo intermedio, y otros reordenamientos que ya se incluían en la versión anterior (82).

Finalmente, en el grupo de riesgo intermedio, se clasifican el resto de las combinaciones genéticas, detalladas en la Tabla 3, y aquellos pacientes sin alteraciones favorables o adversas.

Estudios recientes han explorado la contribución relativa de las variables genéticas y clínicas en la predicción de SLE y SG (8,36,130,144). Estas anomalías genómicas representan aproximadamente dos tercios de la variabilidad, y el otro tercio correspondería a variables demográficas, clínicas y de tratamiento. Sin embargo, los modelos que incorporan todos estos factores y que pretenden predecir si un paciente con un conjunto dado de covariables tendrá una remisión o una esperanza de vida más larga que otro con diferentes covariables, son correctos solo en el 75-80% de los casos (12). Por lo tanto, ninguno de los esquemas actuales de clasificación es completamente preciso, lo que enfatiza la necesidad, no solo de identificar otros factores pronósticos pre-tratamiento (punto 4: “Espectro mutacional de la LMA: nuevas alteraciones”), sino también de centrarse en los factores post-tratamiento, en particular en el estudio de EMR (punto 6: “EMR en LMA”), con el objetivo de mejorar la clasificación de riesgo y como consecuencia los enfoques terapéuticos (56).

Tabla 3. Clasificación de riesgo según características citogenéticas/moleculares. (ELN 2017)

<i>Clasificación pronóstica de la ELN 2017</i>	
GRUPOS PRONÓSTICO	ALTERACIONES CITOGENÉTICAS/MOLECULARES
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> ^{bajo} * (cariotipo normal) <i>CEBPA</i> mutaciones bialélicas (cariotipo normal)
Intermedio	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITD</i> ^{alto} * (cariotipo normal) <i>NPM1</i> no mutado y sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITD</i> ^{bajo} * (cariotipo normal) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Alteraciones citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
Desfavorable	inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); reordenamientos de <i>KMT2A(MLL)</i> t(9;22) (q34.1;q11.2); BCR-ABL1 -5/del(5q); -7; abn(17p); Cariotipo complejo; cariotipo monosómico** <i>NPM1</i> no mutado y <i>FLT3-ITD</i> ^{alto} * <i>RUNX1</i> mutado; <i>ASXL1</i> mutado o <i>TP53</i> mutado

* Ratio *FLT3-ITD* con respecto a *FLT3 wild-type*. Bajo: <0.5. Alto ≥0.5. ** Excluyendo translocaciones o inversiones recurrentes

4. Espectro mutacional de la LMA: nuevas alteraciones

Al igual que la mayoría de las neoplasias humanas, la LMA es una enfermedad compleja y dinámica, caracterizada por múltiples mutaciones conductoras adquiridas somáticamente, clones competitivos coexistentes y evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo. La llegada de las técnicas de secuenciación masiva ha permitido profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de las LMA más allá de los genes con reconocido valor diagnóstico (NPM1, CEBPA y RUNX1) (18) y pronóstico (FLT3, NPM1 y CEBPA, y más recientemente, RUNX1, ASXL1, TP53) (12). Estas nuevas tecnologías han permitido descubrir aberraciones recurrentes previamente desconocidas en la LMA y han revelado que, aunque los genomas de los pacientes con LMA contienen un promedio de varios cientos de mutaciones, un reducido número de ellas tienen consecuencias en la traducción. Este número de mutaciones es sustancialmente menor que en la mayoría de los genomas de tumores sólidos y otros tumores hematológicos, como el mieloma múltiple(118,145–147).

En el año 2008, el grupo liderado por el Dr. Timothy Ley de la Universidad de Washington, publicó el primer caso de LMA cuyo genoma fue secuenciado mediante NGS. Dada la gran heterogeneidad del grupo de riesgo citogenético intermedio, no resulta sorprendente que el mencionado genoma fuese el de un paciente con cariotipo normal. Este estudio pionero demostró que la LMA-CN podía presentar, además de las mutaciones conocidas en FLT3, NPM1 y CEBPA, alteraciones adicionales en genes con actividad oncogénica previamente descritos en otros tumores (PTPRT, CDH24, PCLKC y SLC15A1). Aunque los genes que se encontraron mutados en este primer estudio no han resultado ser recurrentes en LMA-CN o útiles como marcadores pronósticos, quedó demostrado que las técnicas de alto rendimiento podían aportar información muy valiosa sobre esta enfermedad. Desde entonces, la NGS ha sido determinante para identificar nuevas mutaciones relevantes en la patogénesis de las LMA (117).

4.1 Estudios de genoma, exoma y paneles de NGS dirigidos en LMA

Los primeros estudios de NGS aplicaron *whole genome sequencing* (WGS) y *whole exome sequencing* (WES) a series reducidas de pacientes y dieron a conocer mutaciones en genes previamente desconocidos. Mardis et al. (2009) describieron mediante WGS y por primera vez mutaciones en DNMT3A e IDH1 en LMA-CN (118). Las mutaciones en el represor transcripcional BCOR también fueron identificadas en LMA-CN mediante WES. Aunque este gen no es uno de los más frecuentemente mutados en LMA, se ha sugerido que su alteración confiere un pronóstico desfavorable (148).

Más adelante, la secuenciación masiva dirigida a marcadores específicos en series más amplias de pacientes permitió comenzar a contrastar las recurrencias y a evaluar el valor pronóstico de los nuevos genes, fase en la que se encuentra actualmente este proceso. El uso de datos genéticos para la clasificación de la enfermedad y para la práctica clínica es un campo activo de investigación (12). De muchas de las variantes encontradas se desconoce su valor diagnóstico y/o pronóstico, que aún está siendo evaluado. Previsiblemente, las guías clínicas se actualizarán a medida que avance la investigación sobre el valor de los hallazgos moleculares, para lo cual se requiere un esfuerzo de integración de resultados que constituye uno de los retos actuales. Los estudios más relevantes en este sentido se comentan a continuación.

En 2013, se publicó la secuenciación masiva de 200 adultos con LMA (50 WGS y 150 WES) dentro del proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (<http://tcga-data-nci.nih.gov/tcg>) (56). Según este estudio, un total de 23 genes se encontraban significativamente mutados en LMA y otros 237 estaban mutados en dos o más casos. Los genes mutados se clasificaron en nueve categorías funcionales: factores de transcripción implicados en genes de fusión (*PML-RAR α* , *CBFb-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*), factores de transcripción mieloides (*RUNX1*, *CEBP α*), el gen *NPM1*, supresores tumorales (*TP53*), genes relacionados con la metilación del ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*, etc), genes de señalización celular (*FLT3*, *KIT*, *RAS*, etc), genes modificadores de la cromatina (*MLL*, *ASXL1*, *EZH2*, etc), genes del complejo de las cohesinas (*STAG2*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*) y genes de la maquinaria del espliceosoma (*SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, etc.) (Figura 7). Trabajos posteriores han consolidado el valor de estas categorías funcionales en LMA, con sutiles modificaciones (20,149,150) y, además, han revelado que parece existir bien cooperación o bien exclusión entre los distintos grupos de mutaciones. Por ejemplo, se observa una fuerte asociación entre las mutaciones en *FLT3*, *NPM1* y *DNMT3A*, lo que sugiere que este grupo de genes podría caracterizar a un subtipo determinado de LMA. En cambio, los genes de fusión, *NPM1*, *RUNX1*, *TP53* y *CEBPA* son excluyentes entre sí, lo que indica que las mutaciones en estas vías serían conductoras o *drivers*, es decir, promoverían el desarrollo de la LMA (11). Las categorías más novedosas que se observaron recurrentemente alteradas en las LMA gracias a estos trabajos pioneros de NGS, fueron el complejo de las cohesinas y los genes de *splicing*:

Mutaciones en componentes del complejo de las cohesinas (*STAG2*, *RAD21*): Este complejo regula la segregación cromosómica durante la meiosis y la mitosis, por lo que resulta esencial durante la división celular. Estudios posteriores, que emplearon también técnicas de NGS, han demostrado que estas mutaciones son más frecuentes en los pacientes con LMA-CN, se asocian con *NPM1* y son mutuamente excluyentes entre sí. Aunque su función indica que podrían participar en el proceso de leucemogénesis, el valor pronóstico de estas mutaciones queda por esclarecer (151).

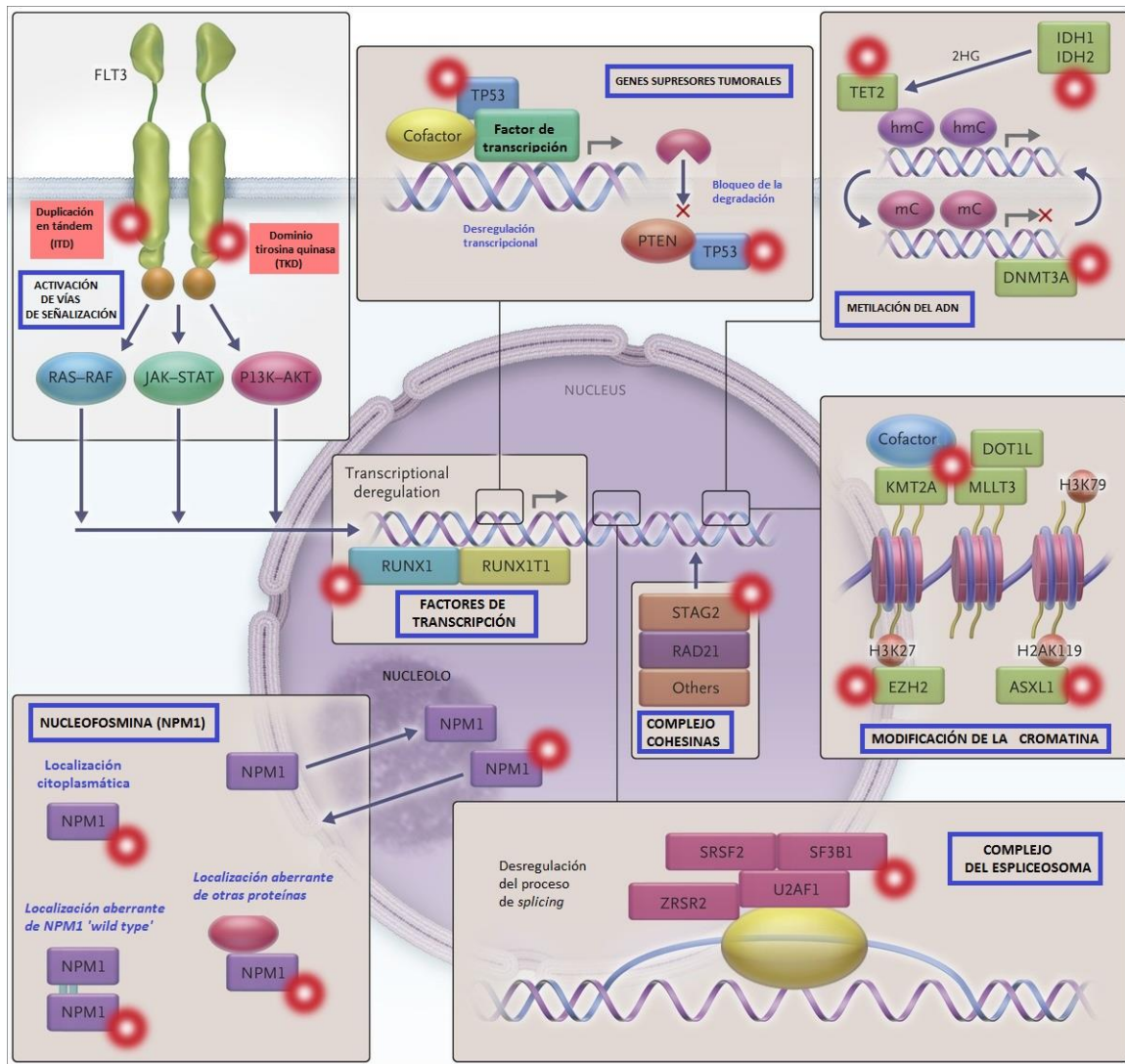


Figura 7. Representación de ocho categorías funcionales de genes comúnmente mutados en LMA.
Adaptado de Döhner et al. N Engl J Med 2015;373:1136-52.

Las mutaciones en genes de señalización como FLT3 o los genes RAS confieren una ventaja proliferativa a través de las vías RAS-RAF, JAK-STAT y PI3K-AKT (cuadro superior izquierdo). Las mutaciones en los factores de transcripción mieloides como RUNX1 y las fusiones de éstos por reordenamientos cromosómicos, como t(8; 21); RUNX1-RUNX1T1, conducen a la desregulación transcripcional y la diferenciación hematopoyética alterada (recuadro central izquierdo). En el gen de la nucleofosmina (NPM1), que codifica una proteína multifuncional de transporte núcleo-citoplasma, las mutaciones dan como resultado la localización citoplásmica aberrante de las proteínas que interactúan con NPM1 y NPM1 (cuadro inferior izquierdo). Las mutaciones de los genes del espliceosoma, como SRSF2, SF3B1, U2AF1 y ZRSR2, desregulan el procesamiento del ARN (casilla inferior derecha). Las mutaciones del complejo de las cohesinas, como STAG2 y RAD21, pueden perjudicar la segregación cromosómica y la regulación transcripcional (casilla central). Las mutaciones de los genes implicados en la homeostasis epigenética de las células, como ASXL1 y EZH2, conducen a la desregulación de la modificación de la cromatina (ej. Metilación de las histonas H3). Las fusiones aberrantes del gen KMT2A(MLL) pueden dañar a otras metiltransferasas, como DOT1L (metiltransferasa de histona H3K79 tipo DOT1) (casilla central derecha). Las mutaciones DNMT3A y TET2, así como las mutaciones IDH1 e IDH2, que actúan a través de la producción de 2-hidroxiglutarato (2HG), pueden conducir a la desregulación de la metilación del ADN (recuadro superior derecho). En genes supresores de tumores como TP53 y PTEN, las mutaciones pueden producir una desregulación transcripcional y una degradación alterada. (caja media superior). Los datos sobre las categorías funcionales provienen de las vías de señalización de la Red de Investigación TCGA.

Mutaciones en los componentes del espliceosoma (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*): En el estudio del TCGA se identificaron mutaciones recurrentes en el factor de splicing U2AF1 en LMA, pero también se han descrito mutaciones en otros genes de este complejo en los SMDs. Aunque U2AF1 no parece ser muy relevante en la LMA-CN, su valor en otros grupos aún no ha sido establecido. Además, es importante destacar que actualmente se están desarrollando fármacos inhibidores del espliceosoma y podría plantearse su uso como tratamiento específico en los pacientes con LMA que tienen mutaciones en estos genes (152).

Más recientemente, en el trabajo de Papaemanuil et al. sobre NGS dirigida (panel de 111 genes) en 1540 pacientes con LMA, se propusieron incluso nuevas categorías de LMA basadas en el perfil mutacional y la evolución clínica: LMA con mutaciones en genes de *splicing* y cromatina, LMA con mutaciones en TP53 y/o aneuploidías y LMA con mutaciones R172 en IDH2. Los autores de este trabajo proponen la incorporación a corto plazo de mutaciones en nuevos genes (*SRSF2*, *DNMT3A* e *IDH2*) en las guías pronósticas, debido a la frecuencia de estas alteraciones y a su fuerte influencia en el curso clínico de la LMA (36).

4.2 Heterogeneidad clonal y patrones de evolución clonal

Los estudios de secuenciación masiva han revelado que los pacientes con LMA presentan frecuentemente **múltiples subclones** (heterogeneidad clonal), y que la población celular neoplásica puede sufrir **evolución clonal** durante el tratamiento, persistiendo unos clones u otros a lo largo de la enfermedad. Estos descubrimientos han sido posibles gracias a un aspecto innovador que permite la técnica de NGS, que es el estudio de las frecuencias alélicas de las mutaciones (*VAF*, *variant allele frequency*). Dichas fracciones de alelo mutante permiten estimar el tamaño de las distintas poblaciones clonales tumorales presentes en una muestra de LMA, por lo que dan idea de la presencia y composición mutacional de los distintos subclones y pueden usarse para inferir la línea temporal en la que se producen las mutaciones durante el desarrollo de la leucemia (12,146).

La mayoría de los pacientes con LMA mueren debido a una progresión de la enfermedad después de una recaída, la cual parece asociarse con una evolución clonal a nivel citogenético. Para investigar los cambios genéticos asociados con la recaída, Ding et al. en 2012 (146) secuenciaron los genomas de 8 pacientes en el momento del diagnóstico y en la recaída. Encontraron **dos patrones de evolución clonal durante la recaída**: (i) el clon fundador en el tumor primario había adquirido mutaciones y había dado lugar al clon de la recaída, o (ii) un subclon del clon fundador que había sobrevivido a la quimioterapia inicial, adquirió mutaciones y se expandió en la recaída. En los clones fundadores al diagnóstico y en la recaída se identificaron mutaciones en genes como *NPM1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *KIT*, *IDH1* e *IDH2*, lo que indica que serían eventos iniciadores de la enfermedad, mientras que en los subclones se encontraron mutaciones en *FLT3*, *CEBPA*, *WT1*, *NRAS*, *TET2* y *ETV6* lo que sugiere que son eventos cooperantes, implicados sobre todo en la progresión de la enfermedad. En ningún caso la quimioterapia había erradicado al clon fundador, lo que indica que ese clon acaba siendo finalmente el responsable de la recaída (Figura 8).

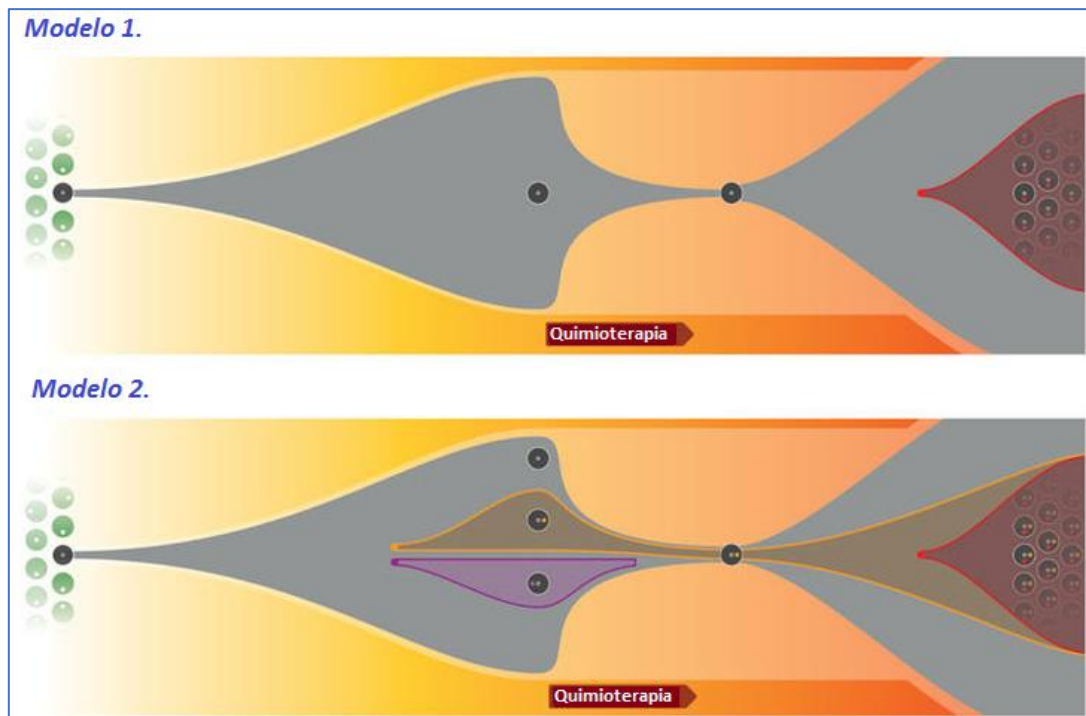


Figura 8. Representación esquemática de los dos principales patrones de evolución tumoral en la LMA. Adaptado de Ding L., *Nature* 2012; 481: 506–510. El modelo 1 muestra un clon dominante en el tumor primario, que evoluciona hacia el clon de la recaída al obtener mutaciones específicas de la recaída. El modelo 2 muestra un clon que era minoritario al diagnóstico, portador de la gran mayoría de las mutaciones tumorales primarias, que sobrevive y se expande en la recaída.

4.3 Clones preleucémicos y hematopoyesis clonal de potencial indeterminado

En un primer momento, los estudios de evolución clonal en pacientes y modelos de xenoinjertos derivados de pacientes indicaron que las mutaciones en los genes que regulan la epigenética, como DNMT3A, TET2 y ASXL1, a menudo están presentes en las células progenitoras **preleucémicas** y ocurren de forma precoz en la leucemogénesis (Figura 9). Además, se observó que estas mutaciones, presentes en células inmaduras, podían persistir después del tratamiento con quimioterapia y conducir a la expansión clonal durante la remisión, por lo que se pensó que serían las causantes de enfermedad recurrente (153–156). Posteriormente, estudios basados en la secuenciación de exoma en grandes cohortes poblacionales identificaron en **individuos aparentemente sanos**, especialmente en ancianos, mutaciones somáticas recurrentes en los reguladores epigenéticos mencionados previamente (mutaciones “DTA”: DNMT3A, ASXL1, TET2) y, con menor frecuencia, en genes de factores de *splicing* (SF3B1, SRSF2). Se observó que la presencia de estas mutaciones se asociaba habitualmente con una hematopoyesis clonal, por lo que este fenómeno, que parece estar asociado con un mayor riesgo de sufrir neoplasias hematológicas, fue denominado “**Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado**” (CHIP, *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*) o hematopoyesis clonal asociada a la edad. La mayoría de los estudios concluyen que estas mutaciones pueden

representar eventos tempranos en el desarrollo de los cánceres hematológicos y que pueden estar presentes varios años antes de que aparezca la clínica (157). Los datos preliminares indican que la tasa de progresión del estado de CHIP a la enfermedad hematológica puede ser similar a la tasa de progresión de otros estados premalignos, como la gammapatía monoclonal de significado incierto para el mieloma múltiple (158–163). Sin embargo, el último trabajo publicado sobre este aspecto (105), que analiza el valor de estas mutaciones como marcadores de EMR, concluye que la persistencia de las mutaciones más comúnmente asociadas con hematopoyesis clonal relacionada con la edad (mutaciones DTA) durante la remisión completa no contribuye a un aumento del riesgo de recaída en adultos con LMA. Esto parece ser cierto independientemente de la frecuencia alélica a la que se encuentren dichas mutaciones. El hecho de que las células portadoras de mutaciones DTA persistan con alta frecuencia en pacientes en RC, podría deberse a la ventaja proliferativa que confieren estas mutaciones con respecto a las células madre normales a la hora de repoblar la médula ósea tras el tratamiento de inducción (155,164,165). No obstante, el seguimiento de los pacientes de este innovador trabajo se limitó a 40 meses, por lo que no se descarta la posibilidad de que la persistencia del clon DTA aumente el riesgo de sufrir una recaída a largo plazo (105). Estos hallazgos ponen de manifiesto una vez más la necesidad de profundizar en el estudio de los nuevos genes descubiertos mediante NGS, los cuales están restringidos a estudios de investigación y cuya posible implicación clínica aún debe ser descifrada (136,166,167).

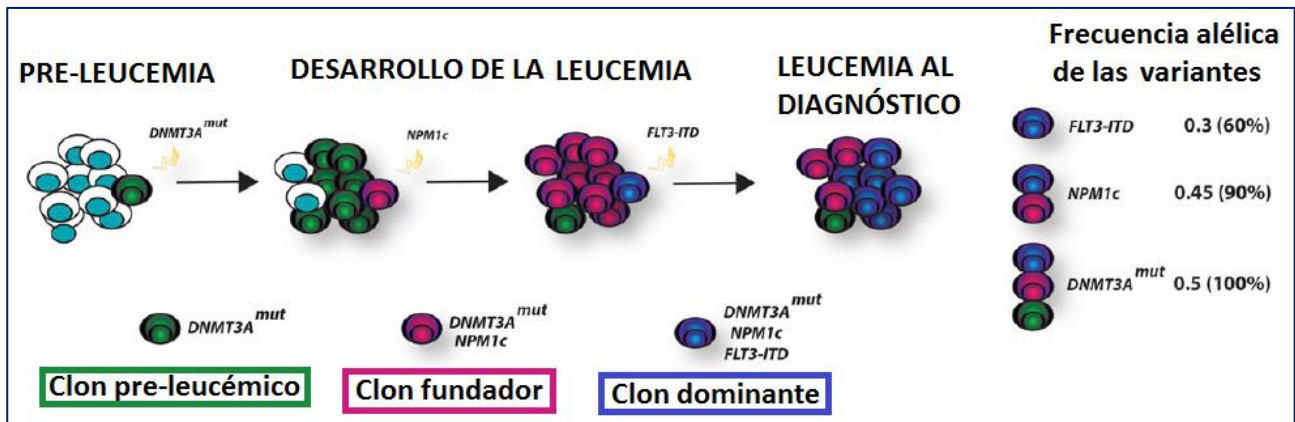


Figura 9. Evolución clonal y heterogeneidad clonal en LMA. Adaptado de Grimwade, Ivey & Huntly, 2016; 127(1):29-42. Evolución de la LMA en un paciente hipotético cuyo tumor presenta mutaciones cooperadoras en DNMT3A, NPM1 y FLT3-ITD. La mutación de DNMT3A sería el evento más temprano, y aunque facilita la expansión clonal, ocurre antes del desarrollo manifiesto de la enfermedad. Posteriormente, aparecería NPM1 como la mutación que define la enfermedad en el clon fundador, con la posterior adquisición de una mutación FLT3-ITD en un clon hiperproliferativo durante la expansión de la leucemia, que se convierte en el clon dominante del momento del diagnóstico. La cuantificación de la frecuencia alélica (VAF) de cada mutación permite demostrar la adquisición temporal de mutaciones y la jerarquía clonal del tumor. Por simplicidad, se muestra un patrón evolutivo lineal, aunque se puede dar una evolución ramificada. NPM1c: nucleofosmina mutada (citoplasmática).

5. Nuevas técnicas de estudio: Secuenciación de nueva generación (NGS)

5.1 Aspectos técnicos generales de la NGS

La tecnología de secuenciación masiva, también conocida como ultrasecuenciación o secuenciación de nueva generación (NGS, *next generation sequencing*), permite conocer información de múltiples genes de forma simultánea. Se trata de un conjunto de métodos bioquímicos mediante los cuales se puede analizar de forma eficiente el genoma humano, incluida la secuenciación de genoma completo, exoma y transcriptoma. Sin embargo, los paneles específicos, basados en la secuenciación dirigida de alteraciones genéticas informativas, resultan más prácticos en el entorno clínico.

5.1.1 Paneles de genes: secuenciación dirigida mediante “amplicones” o “captura”

En general, los métodos de NGS dirigidos incluyen cuatro pasos principales: preparación de la muestra, preparación de la librería de material genético, secuenciación y análisis de datos (168). La **preparación de la librería** es el proceso de generar fragmentos de ADN o ADNc de un rango de tamaños específico. Para el estudio de NGS dirigida de pacientes en oncohematología se utilizan dos enfoques principales: (i) hibridación con sondas complementarias a las regiones de interés (captura) y (ii) amplificación por PCR multiplex de dichas regiones (amplicones). Cada una de estas tecnologías presenta ventajas e inconvenientes. Una de las principales fortalezas de la metodología basada en captura es que las sondas son significativamente más largas que los *primers* de PCR y, por lo tanto, pueden tolerar la presencia de varios *mismatches* en el sitio de unión de la sonda sin interferir con la hibridación en la región deseada. La captura, además, permite analizar regiones flanqueantes de la zona donde hibrida la sonda, lo cual puede suponer un beneficio, si se trata de fragmentos difíciles de aislar de otro modo, o un inconveniente, si la fracción de ADN *off-target* es desproporcionada, en perjuicio de la región *on-target* (169). Además, la captura es sensible a la composición nucleotídica de la muestra, de modo que las secuencias ricas en adenina-timina (A-T) pueden perderse debido a una hibridación pobre, mientras que las regiones con alto contenido en guanina-citosina (G-C) pueden ser obviadas debido a la formación de estructuras secundarias (170). En general, el proceso de preparación de las librerías mediante amplicones es más corto que los protocolos de captura. Sin embargo, es más probable que se produzcan fallos en el funcionamiento en el caso de genes con alto contenido en G-C (ej. CEBP α) (171) o secuencias altamente repetitivas. Además, la preparación de librerías basada en amplificación puede impedir la detección de *indels* si el *indel* elimina la región de unión del *primer*, o si cambia suficientemente el tamaño del amplicón.

En cuanto a las **plataformas de secuenciación**, las disponibles actualmente se basan en dos enfoques químicos distintos: (i) secuenciación por síntesis (plataformas Illumina) y (ii) secuenciación basada en iones semiconductores (sistemas Ion ThermoFisher). Una serie de estudios han examinado el rendimiento de ambos sistemas en diversas aplicaciones, concluyendo que los secuenciadores Illumina e Ion Torrent producen resultados comparables (172–175).

5.1.2 Detección de variantes estructurales mediante NGS

Las variantes estructurales, como las traslocaciones e inversiones, se han identificado en muchos tipos de tumores malignos humanos, como las ya comentadas en LMA. En todos ellos sirven como marcadores importantes para el diagnóstico del cáncer, el pronóstico del paciente y la selección de terapias dirigidas. Para su estudio mediante NGS existen dos enfoques principales. Uno de ellos consiste en secuenciar el ADN utilizando el método de captura y el segundo en secuenciar los transcritos de fusión de ARN (ADNc) mediante métodos basados en la amplificación (176,177). En caso de estudiar los reordenamientos a nivel de ADN, hay que tener en cuenta que la mayoría de los *breakpoints* se producen en regiones no codificantes (intrones), que incluyen frecuentemente zonas nucleotídicas altamente repetitivas. Por tanto, es necesario incluir dichas regiones en el diseño, lo cual supone un reto tanto para el proceso de captura como para el alineamiento con el genoma de referencia. Sin embargo, de otro modo, no se detectarían aquellos reordenamientos que no se traducen en genes de fusión o cuyo punto de corte es desconocido (178,179).

5.1.3 Análisis de los datos de NGS: herramientas bioinformáticas

Aunque la obtención de datos de NGS es hoy en día relativamente sencilla, el análisis de dichos datos puede resultar extremadamente complejo y tedioso debido no sólo al volumen de información obtenido (normalmente >100 GB/carrera), sino también a las dificultades computacionales que surgen en general a la hora de alinear las secuencias leídas. Estas dificultades se acentúan cuando la naturaleza de las alteraciones en estudio implica grandes regiones de ADN o requiere la identificación de cambios dramáticos de posición de secuencias de unos cromosomas a otros, como es el caso de los reordenamientos de las LMA (traslocaciones e inversiones)(180).

El flujo de análisis de datos de NGS se puede dividir en cuatro operaciones principales: llamada de bases (*base calling*), alineamiento de las lecturas con el genoma de referencia, identificación de variantes y anotación de estas (181). Actualmente, existen numerosas herramientas bioinformáticas para dichos análisis, incluyendo tanto opciones libres como comerciales. La mayoría de ellas, se basan en *pipelines* compuestos por múltiples algoritmos separados que se agrupan usando programas adicionales de modo que los datos fluyan de unos a otros para ser tratados y analizados en sus distintas características de forma seriada o paralela. El flujo de trabajo de estos *pipelines* incluye diferentes pasos: demultiplexado (para separar y asignar las lecturas de secuencia de cada paciente), ensamblaje y alineamiento de las secuencias leídas con el genoma de referencia, *variant callers* (para identificar las variantes) y otras muchas posibles opciones. Es

importante destacar que cada uno de los cuatro tipos de variantes que pueden encontrarse en una secuencia (variantes de un solo nucleótido, indels, variaciones del número de copias-CNV y variantes estructurales) requiere un enfoque computacional distinto para ser identificado de forma sensible y específica. Por ello, resulta imprescindible tener en cuenta la finalidad de cada tipo de *software* según el diseño empleado (182,183). Además de los programas que analizan cambios en un solo nucleótido o pequeños *indels*, en los últimos años se han desarrollado herramientas de análisis para detectar CNV y **alteraciones estructurales** como las traslocaciones e inversiones. La mayoría de estas herramientas se basan en métodos de parejas de secuencias discordantes ("*discordant mate-pair*") o de división de lecturas ("*split-reads*") (184–187). Todas ellas deben ser aún validadas para su aplicación en casos clínicos. Para elegir una herramienta u otra, las recomendaciones se basan en evaluar múltiples opciones para determinar cual resulta óptima para cada ensayo particular, ya que, dependiendo del diseño de captura concreto y la secuencia específica de la región de interés, las diferentes herramientas de detección de variantes estructurales difieren en su sensibilidad y especificidad (169). Este trabajo requiere un gran esfuerzo bioinformático y la necesidad de expertos técnicos, además del coste de los software y equipos potentes, lo que representa una consideración crítica a tener en cuenta cuando se desarrolla un panel de NGS que pretende ser implantado en el laboratorio clínico, y debe considerarse desde el inicio del diseño (188).

5.1.4 Recomendaciones para el análisis de NGS en el ámbito clínico

Dada la gran aplicación de estas nuevas tecnologías en la práctica clínica, recientemente se ha publicado la primera versión de una guía que recoge recomendaciones para el manejo de paneles de NGS aplicados en oncohematología [*Guidelines for Validation of NGS-Based Oncology Panels* (169)].

Una de las principales cuestiones que deben considerarse al analizar los resultados de NGS, es el **umbral de VAF** por debajo del cual no se tendrá en cuenta una variante. Aunque pueden emplearse herramientas bioinformáticas optimizadas para la detección altamente sensible de clases específicas de variantes en los datos de NGS, en la práctica, el límite inferior de detección dependerá de cada caso y debe ser establecido a medida que aumenta la experiencia con un ensayo de NGS en particular. Entre los laboratorios que realizan NGS de muestras tumorales para guiar la terapia dirigida, el límite inferior de VAF que parece tener utilidad clínica, generalmente está en torno al 5%. En cambio, en el contexto de un estudio de EMR, aún en fase de investigación como se explicará en el apartado siguiente (punto 6: "EMR en LMA"), podría ser necesario disminuir la frecuencia por debajo del 1% (189).

Otro aspecto técnico de gran relevancia es la profundidad de secuenciación o profundidad de cobertura, que se define como el número de lecturas alineadas que contienen una posición (nucleótido) determinada. Al igual que en el caso de la VAF, el **umbral de profundidad** depende de cada tipo de ensayo de NGS y su finalidad. En general, se acepta una profundidad de cobertura menor para test constitucionales, donde las alteraciones de la línea germinal se identifican más fácilmente, porque están en un estado bien

heterocigótico o bien homocigótico. Una profundidad mínima de 30x suele ser suficiente en caso de variantes germinales (190,191). En contraste, se necesitan profundidades de lectura mucho más altas para identificar de forma fiable variantes somáticas en muestras tumorales, debido a la heterogeneidad tisular (células malignas, células de soporte, células inflamatorias y tejido no afectado) e intratumoral (subclones tumorales). En estos casos, según las recomendaciones actuales, puede ser necesaria una cobertura media de 1000x (192,193).

Una vez superadas las etapas previamente descritas, el último paso será la interpretación de las variantes identificadas. Cabe señalar que el genoma humano de referencia con el que se compararán las secuencias obtenidas, consiste en una compilación de genomas de distintos individuos sanos y que, tras esta comparación, es necesario diferenciar las variantes benignas o no patogénicas. Este concepto resulta difícil de definir y varía según el uso previsto de cada panel de NGS. Debido a que nuestra comprensión de las correlaciones genotipo-fenotipo aún está lejos de ser completa, se requiere un gran trabajo de interpretación por parte de expertos, apoyado en bases de datos de variantes (ExAC, COSMIC, etc), datos sobre la estructura génica y proteica, así como en todos los trabajos previamente publicados sobre las variantes de un gen (169).

5.2 Nuevas estrategias de NGS aplicadas a LMA

Dado que muchos de los cambios genéticos de las LMA, comentados previamente, influyen en el pronóstico del paciente y/o predicen la respuesta al tratamiento, su rápida detección en el momento del diagnóstico representa una necesidad clínica de gran relevancia. Una correcta identificación de las traslocaciones y sus variantes, así como de una lista cada vez más amplia de defectos génicos, es necesaria para la clasificación precisa de la leucemia, y decidir así la estrategia terapéutica más adecuada en cada caso, identificando de forma precisa los pacientes que podrían beneficiarse de un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

5.2.1 Técnicas convencionales para la caracterización de LMA

Aunque el número de genes y traslocaciones que requieren ser evaluados en las LMA aumenta a medida que lo hace el conocimiento sobre la patogénesis de la leucemia, los métodos por los cuales se obtiene esta información han cambiado poco en los últimos 10-20 años. Las guías internacionales actuales (12) recomiendan, además del estudio morfológico, el cariotipo convencional, FISH y análisis moleculares de un limitado número de mutaciones. En el laboratorio clínico, las **mutaciones** se han estudiado tradicionalmente mediante PCR (y sus variantes) en ADN o ARN y secuenciación Sanger. Aunque estos métodos son relativamente sencillos de implementar, el tiempo requerido para optimizar cada ensayo para un nuevo gen ralentiza el proceso. Dado que cada vez son más los genes identificados con valor diagnóstico y pronóstico en LMA, se incrementa aún más el tiempo a la vez que los costes. Aunque las mutaciones en los genes más comunes que afectan al pronóstico de las LMA, como NPM1 y FLT3, tienden a presentar un espectro limitado

de variantes, haciendo posible su estudio por PCR, el amplio rango de mutaciones en genes como CEBPA, DNMT3A, TET2, o KIT necesitan el uso de secuenciación directa, aumentando el gasto y el tiempo de respuesta de los resultados (194). Por otra parte, a pesar de que cada paciente con LMA presenta un pequeño número de mutaciones conductoras o *drivers*, hoy en día el catálogo de los genes recurrentemente mutados en general en las LMA asciende a más de cincuenta (195). Debido a ello, cada vez son más los laboratorios que recurren al uso de paneles de genes basados en NGS para el estudio de mutaciones génicas.

Por otra parte, las **traslocaciones** balanceadas recurrentes en las LMA, críticas para emitir un pronóstico acertado, generalmente se estudian mediante técnicas citogenéticas de bandeo-G y FISH, basadas en la visualización directa del ADN. Sin embargo, existen ciertas limitaciones en el uso del análisis citogenético, como la imposibilidad de obtener mitosis en todos los casos, la presencia de reordenamientos crípticos invisibles y sobre todo el hecho de que un 50% de los pacientes presentan citogenética normal. Por definición, la citogenética no puede identificar fusiones génicas crípticas, como NUP98-NSD1 o MNX1-ETV6, cuya presencia es indicador de mal pronóstico en las LMA pediátricas (57) (196). Además, como se ha comentado previamente, aproximadamente el 5% de las leucemias promielocíticas agudas con PML-RAR α carecen de la traslocación clásica t(15;17) y el gen de fusión se forma en estos casos mediante reordenamientos más complejos (197). También se han descrito reordenamientos crípticos invisibles para la citogenética en los genes de fusión formados con CBF o MLL (57). Es muy importante la correcta identificación de estos casos, ya que pueden ser asignados al grupo de riesgo erróneo, lo que supondría ser tratados de forma inapropiada. El estudio citogenético tiene también limitaciones en cuanto a la resolución. Esto puede suponer un problema en el caso de que los puntos de corte de los genes de fusión se produzcan en zonas demasiado cercanas entre sí. Un ejemplo de esta situación es el gen MLL, que puede recombinarse con cinco genes diferentes que se encuentran todos en la región cromosómica 19p13 (198). Aunque el FISH mejora la sensibilidad frente a la citogenética convencional, la identificación de nuevos genes implicados en traslocaciones, como los diferentes posibles *partners* que se traslocan con el gen MLL, o variantes en los puntos de corte, suponen un problema: requieren el uso de múltiples sondas, aumentando el coste, el tiempo y la complejidad del estudio, y pueden llevar a la pérdida de información relevante. A diferencia del caso de las mutaciones génicas, que pueden ser analizadas de forma más sencilla mediante paneles de NGS, el estudio de las traslocaciones por NGS aún no se ha desarrollado lo suficiente (14).

5.2.2 Técnicas de estudio genómico en LMA: WGS, WES y paneles de genes

En este contexto de gran variedad y número de alteraciones a estudiar para una correcta caracterización de la LMA, la secuenciación del genoma (WGS) o exoma (WES) completos pueden parecer a priori una opción atractiva, ya que son tecnologías que permiten el estudio de la gran mayoría de mutaciones diana. Sin embargo, tanto la WGS como la WES, presentan limitaciones hoy en día insalvables para su incorporación en la práctica clínica rutinaria: ambas siguen teniendo un alto coste, requieren de un potente análisis

informático y, en sus formas estándar, son incapaces de detectar traslocaciones y CNV. Además, pueden fallar en la detección de mutaciones de baja carga alélica (subclonales) con significado clínico, como las de TP53 (51). Con el objetivo de simplificar estas limitaciones de la secuenciación masiva de genomas/exomas, surgieron los paneles de genes, que permiten una secuenciación multiplex más barata, de un mayor número de pacientes simultáneamente y moderan la complejidad del análisis de los datos obtenidos (169). Recientemente, se han descrito varios paneles de NGS para LMA/SMD (mieloides), que algunos centros están comenzando a implantar para analizar los genes recurrentemente mutados y refinar el pronóstico de cada paciente. Estos paneles, basados tanto en la tecnología de amplicones como en la de captura, están diseñados para estudiar mutaciones somáticas en el conjunto de genes más relevantes en LMA, siendo el criterio de selección de dichos genes variable entre los distintos trabajos o casas comerciales (200, 201). En cualquier caso, la gran mayoría de estos paneles, se centran únicamente en el estudio de mutaciones puntuales, incluyendo sustituciones nucleotídicas y pequeñas inserciones y deleciones.

Hoy en día, existe un creciente interés en detectar en un único test de NGS toda la variedad de alteraciones con valor pronóstico en las LMA (mutaciones, traslocaciones y CNV) (Figura 10). Sin embargo, son pocos los trabajos que estudian además de mutaciones génicas, el resto de las alteraciones de las LMA. Todavía existen limitaciones técnicas para la detección de reordenamientos, por lo que los métodos convencionales continúan siendo imprescindibles. Para poder aplicar la técnica de la NGS al estudio de estas alteraciones cromosómicas es necesario mejorar el diseño de los paneles y sobre todo simplificar el análisis informático de modo que pueda incorporarse a la práctica rutinaria del laboratorio clínico. Una de estas aproximaciones es el trabajo de Bolli et al. (195), donde se presenta un panel de NGS que estudia simultáneamente mutaciones somáticas y variaciones pequeñas en el número de copias, basándose únicamente en la profundidad de lectura de los genes incluidos en el panel y correlacionando la cobertura normalizada de cada gen con el estatus de CNV. El interés pronóstico de estos pequeños cambios en el número de copias es sin embargo menor que el de los grandes cambios estructurales, lo que sigue siendo un reto. Por otra parte, este diseño, excluye el gen TP53, una importante diana de estudio en todos los tipos de cáncer, cuyo estado mutacional es de especial interés en las LMA, como se ha comentado previamente.

Quizá el estudio más completo en esta línea, es la plataforma Karyogene (180), un panel de NGS que pretende estudiar simultáneamente mutaciones somáticas, traslocaciones y CNV. Este diseño, mejora el estudio del CNV con respecto al trabajo de Bolli et al. con una aproximación más precisa, aunque muy dependiente de la tecnología y cuya utilidad clínica debe ser validada en series más amplias de pacientes que incluyan una variedad de alteraciones contrastadas por técnicas convencionales. Esta plataforma requiere el uso de múltiples algoritmos bioinformáticos de gran complejidad, lo que representa un problema fundamental para su implantación en la práctica clínica rutinaria. Cabe destacar además, que el diseño de Karyogene, a pesar de tratarse de un panel de gran tamaño (2,3 Mbp), lo cual aumenta los costes

significativamente, no incluye el estudio de traslocaciones fundamentales en el diagnóstico y pronóstico de las LMA, como las $inv(3)/t(3;3)/GATA2-EVI1$, la traslocación $t(6;9)/DEK-CAN$ ni la $t(9;22)/BCR-ABL1$. La LMA con esta última alteración cromosómica, aunque infrecuente, ha sido incluida como entidad provisional en la nueva clasificación de la OMS (18), debido a la gran importancia de reconocer a los pacientes que pudieran beneficiarse del tratamiento con fármacos inhibidores de tirosina-quinasas para los que BCR-ABL1 es diana. Otra limitación clave de este enfoque, es el alto nivel de experiencia bioinformática que requiere, lo cual probablemente esté por encima de lo disponible en la actualidad en muchos laboratorios de diagnóstico (201).

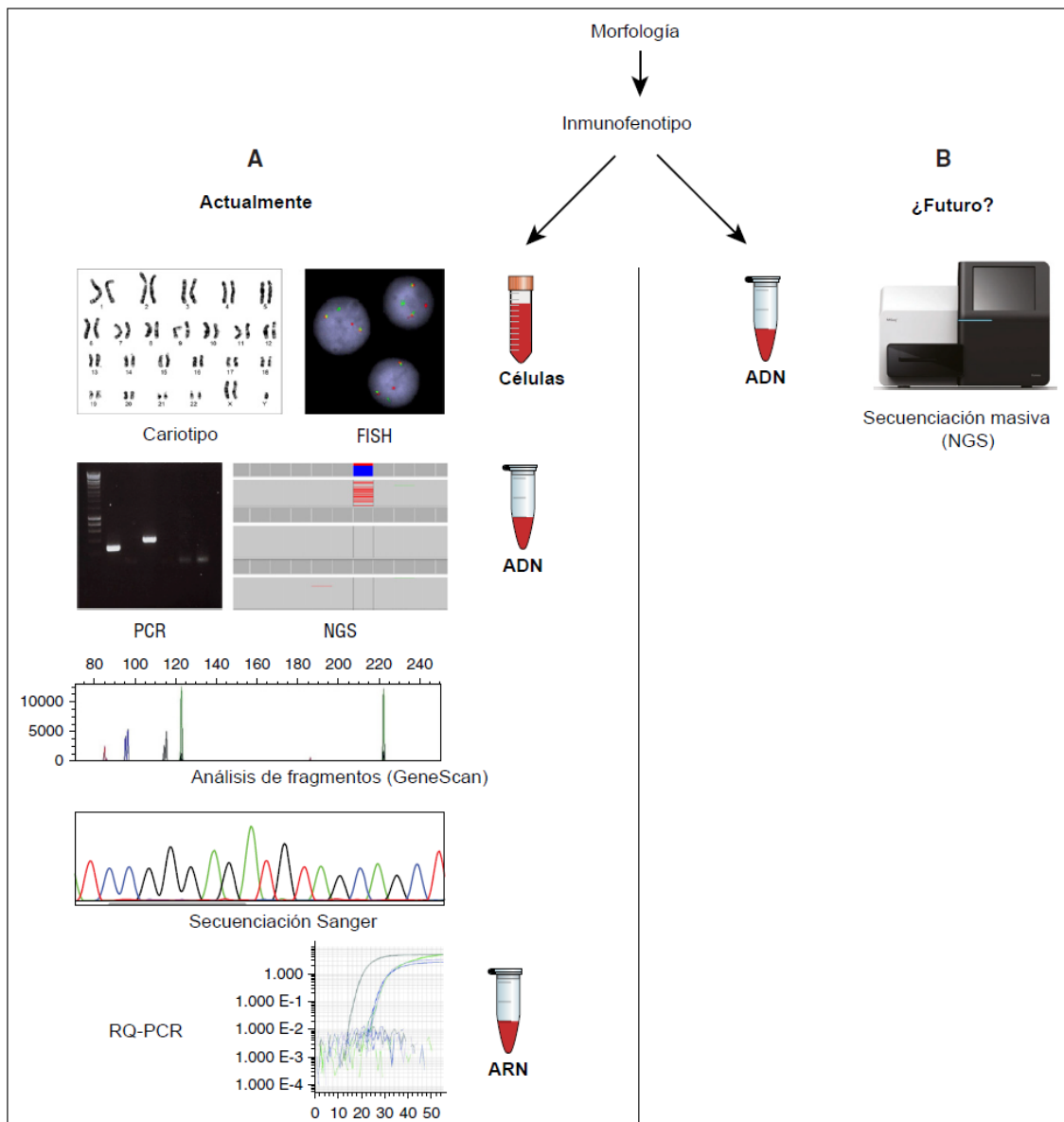


Figura 10. Adaptado de Dillon & Grimwade, *Blood* 2016 ;128(1):8-10. "Just one test to diagnose AML?!". La batería estándar de ensayos requeridos en el momento del diagnóstico para la LMA (A) pronto podría ser reemplazada por una única prueba basada en NGS (B).

Debido a las dificultades mencionadas, a pesar de los avances metodológicos y analíticos en NGS, las técnicas de diagnóstico tradicionales como el cariotipo, FISH y RQ-PCR siguen siendo imprescindibles para una completa caracterización de la LMA al diagnóstico. Además, ninguna de las plataformas mieloides de NGS disponibles actualmente de forma comercial está diseñada para analizar las traslocaciones cromosómicas, eventos frecuentes y fundamentales por su valor diagnóstico y pronóstico en las LMA. Estos desafíos son, sin duda, superables y, los resultados previos ofrecen una visión de cómo las neoplasias hematológicas podrían ser diagnosticadas en el futuro. La NGS apunta ser una de las principales tecnologías que cambiará el paradigma actual. Sin embargo, a pesar del creciente interés en la NGS, resulta fundamental asegurar la obtención de muestras de ARN (además de ADN) en el momento del diagnóstico, para permitir la monitorización molecular de la EMR, la cual constituye una herramienta de gran importancia para refinar el pronóstico de los pacientes con LMA (201).

6. Enfermedad mínima residual en LMA

6.1. Definición de EMR

Durante más de 50 años, la remisión completa (RC) en LMA se ha definido por la recuperación de la función medular y los recuentos de sangre periférica después de completar la quimioterapia y por un examen morfológico de la médula ósea que revele <5% de mieloblastos (202). Con tal umbral, es posible que un paciente en RC citomorfológica albergue en su médula ósea células leucémicas que no están siendo detectadas, lo que sugiere que la definición de RC caracteriza de manera inadecuada un rango enormemente heterogéneo de carga leucémica (203). La enfermedad mínima residual (EMR) es la existencia de un pequeño número de células malignas que no son detectadas con las técnicas clásicas de estudio de la morfología celular, es decir, no se detectan en pacientes en remisión completa morfológica. La EMR denota la presencia de células leucémicas a niveles de entre una en diez mil leucocitos totales y una en un millón, comparado con la sensibilidad de una en 20 de las técnicas morfológicas clásicas (204). Su estudio permite distinguir de forma más precisa entre pacientes que necesitarán un tratamiento intensivo, y aquellos que no. Diferentes trabajos han demostrado que la monitorización de la EMR en la LMA es relevante para predecir la respuesta al tratamiento y la detección precoz de recaídas, que ocurren en el 50-60% de los pacientes con LMA de cariotipo normal que alcanzan RC (205). Por tanto, puede evaluarse la EMR en un paciente con LMA con dos objetivos: (i) en momentos tempranos, para valorar la respuesta al tratamiento y determinar la cinética de desaparición de la enfermedad, por ejemplo, tras el tratamiento de inducción o consolidación; y (ii) secuencialmente en momentos posteriores al tratamiento de consolidación para predecir una recaída morfológica (12).

Las decisiones clínicas con respecto al tratamiento de consolidación o el trasplante de células madre hematopoyéticas una vez que se logra RC, han dependido de los factores biológicos pretratamiento más que de la evaluación directa de la EMR. Sin embargo, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto que los algoritmos pronósticos no pueden basarse únicamente en información relativa al diagnóstico inicial, sino que es necesaria una valoración integrada que incluya la evaluación de la enfermedad a lo largo de su desarrollo mediante la monitorización de la EMR (206). Como reflejo de la importancia de la evaluación de la EMR en la atención de pacientes con LMA, las recomendaciones de 2017 de la ELN proponen ya una nueva categoría de respuesta: RC con EMR negativa. Si bien los criterios de respuesta más actuales para LMA implican la realización de un estudio de EMR, no hay una técnica estándar única para llevar a cabo esta detección de alta sensibilidad (12).

6.2. Técnicas de estudio de EMR

Como resultado de la heterogeneidad genética y molecular inherente a la LMA, no existe un método o protocolo uniforme para la medición de la EMR que abarque todos los casos. Actualmente, existen dos técnicas bien establecidas para determinar y cuantificar la EMR, cada una con sus propias fortalezas y debilidades: (i) estudio de inmunofenotipos asociados a leucemia mediante citometría de flujo multiparamétrica y (ii) identificación de aberraciones citogenéticas y moleculares recurrentes por PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR). Además de estas dos técnicas, empleadas hoy en día en el laboratorio clínico, recientemente han surgido nuevos enfoques basados en tecnologías más modernas, como la cuantificación de transcritos o mutaciones por PCR digital y el seguimiento de moléculas individuales de ADN o ARN en plataformas de secuenciación masiva (NGS). Estas nuevas metodologías se encuentran en la actualidad en vías en desarrollo (206) y por el momento, sólo se emplean a nivel de investigación. Cada metodología difiere del resto en la proporción de pacientes a la que puede aplicarse y en su sensibilidad para detectar células tumorales residuales (12).

6.2.1. Citometría de Flujo. Inmunofenotipo

El uso de la citometría de flujo para detección de EMR se basa en la identificación y monitorización de la población celular leucémica, distinguiéndola de su contrapartida normal y de células reactivas, aun cuando las primeras están presentes en una muestra en baja frecuencia (207,208). Clásicamente, se reconoce que, en las LMA, las células tumorales expresan fenotipos aberrantes, conocidos también como fenotipos asociados a leucemia o LAIPs (*LAIPs-leukemia-associated immuno phenotypes*), ausentes en células normales, que permiten su discriminación de estas últimas de forma específica y sensible. Dichos fenotipos incluyen: (i) asincronismos madurativos; (ii) expresión anormalmente elevada o baja de un antígeno; (iii) alteraciones del tamaño y/o la complejidad celular y (iv) expresión de antígenos asociados a otras líneas hematopoyéticas (209,210). Para la detección de estos fenotipos aberrantes se emplean combinaciones de

anticuerpos específicos. Actualmente, para el estudio de EMR en LMA se utilizan anticuerpos dirigidos a marcadores tempranos, como CD34 y CD117, marcadores asociados al linaje mieloide y antígenos de diferenciación como CD2, CD7, CD19 o CD56 (204).

Este método es aplicable a la mayoría de las LMA (~90%), y ha demostrado ser un factor que permite predecir el pronóstico de forma más precisa que la evaluación del estatus de remisión convencional, basada en técnicas morfológicas (204). Sin embargo, la citometría de flujo constituye una herramienta muy exigente desde el punto de vista técnico y su estandarización no ha sido desarrollada completamente; además, resulta muy dependiente de una precisa y correcta caracterización antigénica en el momento del diagnóstico. Actualmente, el análisis debe llevarse a cabo en laboratorios especializados que cuenten con amplia experiencia (12,211–213).

Además de este enfoque clásico basado en la definición de fenotipos leucémicos al diagnóstico y su rastreo en muestras de seguimiento, más recientemente, se ha desarrollado un segundo enfoque, denominado "different from normal" (DfN), que se basa en la identificación de perfiles aberrantes de diferenciación / maduración en el seguimiento. El enfoque DfN puede aplicarse si la información del diagnóstico no está disponible, y elude los problemas de falsos negativos debidos a cambios inmunofenotípicos y subclones emergentes derivados de la selección clonal (204,214–216). Esto se consigue mediante el uso de un panel de anticuerpos fijo y un análisis que establece perfiles inmunofenotípicos para distinguir las células leucémicas anormales (incluidas las subpoblaciones más maduras) de las células normales, independientemente del inmunofenotipo leucémico de diagnóstico. La denominación "diferente de lo normal", tal vez resulta confusa, ya que los LAIP del diagnóstico comentados previamente también son diferentes de los fenotipos normales. En esencia, los LAIP son anomalías de DfN en la gran mayoría de los casos, y es probable que la diferencia entre estos 2 enfoques desaparezca si se consigue un panel de anticuerpos adecuado, suficientemente grande. Algunos expertos, recomiendan ya combinar ambos enfoques para definir mejor la carga de EMR, lo que permitiría la detección de nuevas aberraciones que surgen durante el seguimiento, y monitorizar a los pacientes cuando no hay información de diagnóstico, aunque estos avances aún están en desarrollo y no han sido implantados en la rutina clínica, de modo que la forma más empleada sigue siendo el estudio de los fenotipos leucémicos al diagnóstico y su búsqueda, cuando es posible, en las muestras postratamiento (204).

6.2.2. Biología molecular. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR)

En general, la RQ-PCR es considerada como la técnica más sensible para detección de EMR, alcanzando valores de sensibilidad que oscilan entre 10^{-3} y 10^{-6-7} dependiendo de la diana molecular de estudio (12). Las dianas empleadas actualmente en el laboratorio clínico incluyen fundamentalmente transcritos de fusión quiméricos (PML-RAR α , RUNX1-RUNX1T1, CBFMBYH11, MLL-AF9, etc) y mutaciones cuantificables (NPM1) por medio de primers alelo-específicos. En los últimos años, se han analizado otros marcadores tumorales como posibles dianas de estudio para EMR mediante RQ-PCR, como la detección de transcritos

sobreexpresados en los blastos tumorales de las LMA con respecto a los niveles de expresión en células de sangre periférica y médula ósea sanas (217).

El marcador guía para el estudio de EMR en LMA más empleado ha sido el análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) de las **traslocaciones** cromosómicas más frecuentes -PML-RAR α /t(15;17), RUNX1-RUNX1T1/t(8;21), CBF β -MYH11/(inv(16))/t(16;16), DEK-CAN (NUP214)/t(6;9), t(11q23,v)/fusiones de MLL y BCR-ABL/t(9;22) , o **mutaciones en el gen NPM1** (nucleofosmina). En conjunto, estas alteraciones monitorizables están presentes en el 60% de las LMA de niños y adultos jóvenes. Para llevar a cabo estos ensayos, se parte de ARN, que se retrotranscribe para generar ADN complementario (ADNc) previo al paso de cuantificación mediante PCR. Esto permite contar con un conjunto relativamente limitado de ensayos estandarizados, con diseños optimizados, eludiendo la necesidad de caracterizar los puntos de corte de las traslocaciones a nivel de ADN genómico, lo cual resultaría un reto con una aplicación poco realista en los laboratorios de rutina (211). Un hito en la estandarización de esta metodología para lograr su implementación en la clínica fue el programa de Europa contra el cáncer (*Europe Against Cancer-EAC*). Este programa estableció un marco para la evaluación y selección de ensayos óptimos de RQ-PCR a través de una valoración paralela en una red internacional de laboratorios expertos (218). Este diseño implica el uso de un *primer* común y una sonda TaqMan para cada diana de EMR (ej. gen de fusión), que se combinarán con diferentes *primers* específicos para cubrir las isoformas de transcritos más comunes halladas en pacientes con LMA. La sensibilidad de estos ensayos depende de la expresión relativa de cada tipo de transcrito en los blastos leucémicos comparada con la expresión de genes control y varía según la diana, así como entre distintos pacientes para una misma diana. Así, los ensayos para MLLT3-KMT2A, transcrito de la t(9;11), son los menos sensibles (1 en 10³) debido a los bajos niveles de expresión relativa de dicho gen de fusión, mientras que los ensayos para NPM1 mutada alcanzan sensibilidades de hasta 1 en 10⁶⁻⁷ gracias a los elevados niveles de expresión en la célula del alelo mutado. Numerosos estudios han demostrado que la cinética de respuesta a tratamiento de primera línea depende del marcador molecular analizado. Por ejemplo, la reducción de RUNX1-RUNX1T1 es más lenta que el descenso de los niveles de transcrito de NPM1 (211).

Considerando que aproximadamente el 40% de los pacientes con LMA carecen de un marcador molecular específico de leucemia (genes de fusión o gen *NPM1* mutado) para seguimiento de EMR, así como los exigentes requerimientos técnicos de la citometría, en los últimos años se han analizado otros marcadores tumorales como posibles dianas de estudio de EMR mediante RQ-PCR. Una de estas aproximaciones es la detección de **transcritos sobreexpresados** en los blastos tumorales de las LMA con respecto a los niveles de expresión en células de SP y MO sanas. La característica fundamental que debe cumplir una diana de este tipo para emplearse como marcador de EMR, es una expresión alta en células malignas comparado con su expresión en células normales (219). Algunos genes cuya expresión se ha visto desregulada en LMA, han sido

propuestos como posibles dianas de seguimiento de EMR. Principalmente, se trata de la expresión aberrante de genes implicados en proliferación, supervivencia y diferenciación celulares, como WT1, BAALC, ERG, MN1, PRAME y EVI1 (220). El más estudiado de ellos ha sido WT1; sin embargo, aún existen datos contradictorios sobre su valor como marcador de EMR (211).

6.2.3 Nuevas técnicas de detección de EMR: Secuenciación masiva y PCR digital

Gracias a las nuevas técnicas de secuenciación genómica de alto rendimiento aplicadas a la LMA, se ha ampliado el alcance de los métodos moleculares para la detección de EMR. De este modo, ha surgido un prometedor paradigma según el cual casi todos los pacientes podrían contar con un potencial marcador molecular de EMR (20). La identificación al diagnóstico de mutaciones mediante NGS nos permite su utilización como marcadores moleculares para el seguimiento, con la ventaja que supone poder analizar el estado mutacional de múltiples dianas simultáneamente. Estas mutaciones, presentes en los blastos leucémicos, pueden ser monitorizadas mediante el enfoque clásico basado en RQ-PCR, o empleando dos novedosas tecnologías que se explicarán a continuación, ambas aún en desarrollo: la secuenciación masiva y la PCR digital en muestras postratamiento.

- **NGS para seguimiento de EMR:**

Aunque en el caso de tratarse de mutaciones puntuales es posible diseñar ensayos de RQ-PCR, esta estrategia supone todo un reto, debido a problemas con la amplificación de fondo del alelo normal. Además, debido a la marcada heterogeneidad de las mutaciones ya descritas en la LMA, desarrollar un catálogo de ensayos estandarizados para cubrir a cada paciente sería completamente irreal. Debido a esta situación, varios grupos han comenzado a explorar la utilidad de la NGS como plataforma de estudio de EMR y no solo para la detección al diagnóstico de las mutaciones potencialmente monitorizables (20). La NGS es una técnica flexible en cuanto al aumento o disminución de la sensibilidad, que puede conseguirse simplemente modificando el número de lecturas, lo que la convierte en una herramienta adaptable y aplicable para el estudio de EMR. Además, su capacidad de detectar simultáneamente gran cantidad de aberraciones permite no solo el seguimiento clásico de la EMR, sino también la monitorización de cambios potencialmente importantes a nivel subclonal (221).

A pesar de su prometedora utilidad, hoy en día la detección de EMR basada en NGS presenta ciertas limitaciones. Sin duda, las más importantes son las derivadas de la falta de conocimiento acerca del valor clínico de la gran variedad de mutaciones que puedan detectarse. En particular, la persistencia de hematopoyesis clonal residual no leucémica, la presencia de diferentes subclones con distinto potencial quimiorresistente y la falta de información en cuanto al valor de cada alteración en la predicción de recaídas, son cuestiones que aún necesitan ser investigadas a fondo (206). Otros inconvenientes son inherentes a la propia tecnología. Concretamente, a pesar de su flexibilidad y constante evolución, la tasa de error basal significa que el nivel de sensibilidad actual de la NGS se sitúa entre 10^{-2} y 10^{-3} (222,223,224), lo cual no puede

competir con ninguna de las técnicas de medición de EMR mencionadas anteriormente, como la RQ-PCR (10^{-6}) o la citometría (10^{-5}) (225). Además, estas tasas de sensibilidad y error son inherentes a cada plataforma de NGS disponible en el mercado (Illumina o Ion-Torrent) y pueden variar notablemente en base a ellas, lo que resulta especialmente peligroso en el caso de informar variantes de baja frecuencia, como las presumiblemente detectadas en estudios de EMR (226). Para mejorar este error inherente a los múltiples pasos de PCR y al propio proceso de secuenciación, se están desarrollando nuevas mejoras en la preparación de librerías de ADN, como la incorporación de códigos de secuencia aleatorios o índices moleculares únicos (UMIs, *unique molecular indexes*), que se unen a cada molécula diana antes de la amplificación por PCR. De este modo, los amplicones procedentes de una única molécula diana se puede identificar alineando UMIs comunes. Este método permite una medición digital de cada molécula objetivo, eliminando así el sesgo introducido por la amplificación mediante PCR y permitiendo la cuantificación más precisa, un factor imprescindible en el estudio de EMR (227,228). Por otra parte, para minimizar la tasa de error, deben reducirse las inconsistencias entre los diferentes algoritmos de análisis de secuencias, para lo que se están desarrollando varias herramientas bioinformáticas (229). Cuando todos estos esfuerzos tengan éxito, el estudio de EMR en LMA basado en NGS podría ser una herramienta muy poderosa (221).

- **PCR DIGITAL para seguimiento de EMR:**

La PCR digital (ddPCR) es otra novedosa técnica prometedora para la detección de alteraciones genéticas con alta sensibilidad que merece ser investigada. Se basa en la distribución de la muestra de ADN o ADNc de manera aleatoria en un número elevado de particiones (gotas o chips nanofluídicos, dependiendo de la plataforma elegida) que contienen el resto de los componentes de la PCR. Esto permite que se lleven a cabo numerosas PCRs individuales en paralelo. En cada una de esas PCR se amplifican una o varias copias del alelo salvaje o el alelo mutante, ambos alelos o ninguno de ellos. El empleo de sondas diferentes permite distinguir entre las copias del alelo salvaje y las del mutante. La lectura fluorescente de cada pocillo/ gota se mide individualmente, lo que permite calcular el porcentaje de copias del alelo mutado en la muestra original (211).

Al igual que con la PCR cuantitativa, mediante PCR digital es posible cuantificar tanto mutaciones puntuales como transcritos de fusión aberrantes (206), con la ventaja de que no necesita estándares de plásmidos que sí son necesarios para la RQ-PCR (211,230).

La sensibilidad de la PCR digital es comparable a la de la RQ-PCR(230) y quizá su mayor fortaleza para seguimiento de EMR se basa en que resulta especialmente prometedora para detectar variaciones de un solo nucleótido. Esto es debido a su mayor capacidad para diferenciar el alelo mutante frente al normal en ausencia de alelo normal competidor en cada partición (231). En comparación con la NGS, la PCR digital es más rápida (tras el desarrollo inicial del ensayo), más sensible y con una menor tasa de error, por lo que resulta de gran interés para la detección de alelos mutantes a frecuencias bajas. No obstante, su valor

multiplex es limitado, en cualquier caso inferior al de la NGS, que seguiría siendo la técnica de elección a la hora de realizar un screening de mutaciones inicial para la búsqueda de posibles dianas de EMR (206,232).

Si bien los datos para la aplicación de la PCR digital en LMA aún están comenzando a surgir, los primeros resultados que demuestran la viabilidad de dicho enfoque son prometedores (206). Brambati y colaboradores diseñaron ensayos de ddPCR para la detección de mutaciones puntuales en DNMT3A, IDH1 e IDH2, genes comúnmente mutados en LMA, observando que su detección era posible en muestras post-trasplante, resultando un indicador precoz de recaída (232). Más recientemente, Mencia-Trinchant et al. demostraron la utilidad de un enfoque multiplex de ddPCR para rastrear EMR centrándose en las distintas mutaciones de NPM1 (233). Además, existen datos preliminares que indican que la PCR digital podría mejorar la detección de la EMR comparado con los métodos estándar basados en RQ-PCR en leucemia mieloide crónica (234).

6.3. Marcadores moleculares para el seguimiento de la EMR en LMA

Para que un marcador genético sea útil como diana para seguimiento de EMR, debe cumplir ciertos requisitos indispensables. Estas dianas idealmente deben ser específicas, con una expresión alta en células tumorales y expresión baja o nula en células sanas, además de incrementar su nivel antes de la aparición de la recaída hematológica y tener una estabilidad molecular a lo largo de todo el seguimiento del paciente (235).

A continuación, se detallan los diferentes marcadores moleculares utilizados en LMA y su implicación en el pronóstico de los pacientes.

6.3.1. Tránscrios de fusión

Los genes de fusión, generados como resultado de reordenamientos cromosómicos aberrantes producidos en las células leucémicas, constituyen dianas moleculares altamente específicas y sensibles. La sensibilidad varía según el número de tránscrios de fusión expresados por célula, pero suele alcanzar 10^{-5-6} (211,218,225). Sin embargo, estas fusiones quiméricas solo están presentes en aproximadamente un 30% de los adultos jóvenes con LMA y en una proporción aún menor entre los pacientes mayores de 60 años. En el caso de las LMA pediátricas, donde son más frecuentes los reordenamientos de MLL y también las LMA-CBF, cerca del 50% de los pacientes cuentan con un gen de fusión (211) (Figura 11).

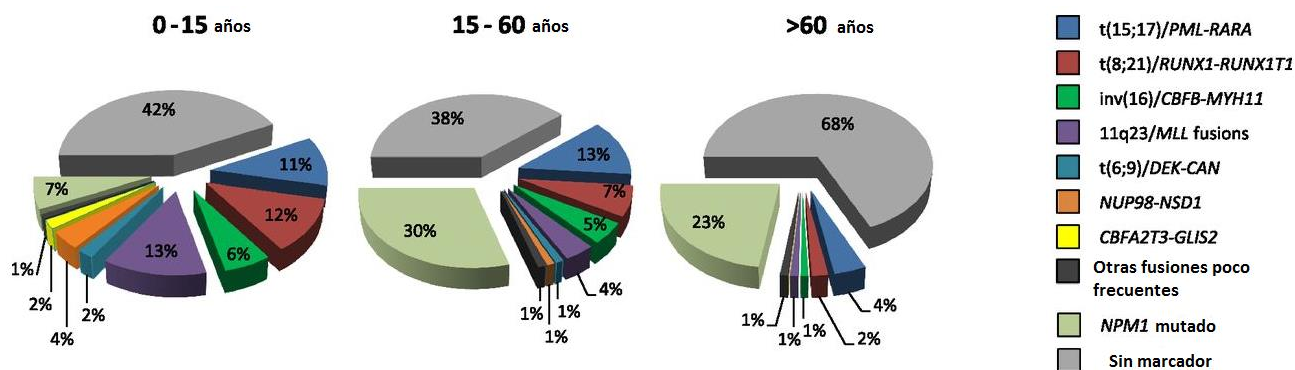


Figura 11. Marcadores para seguimiento de EMR en LMA. Adaptado de Grimwade & Freeman, *Blood*. 2014;124(23):3345-55.

La utilidad de la monitorización de EMR en la toma de decisiones clínicas tiene quizá su mejor ejemplo en el caso de la leucemia promielocítica aguda (LPA), entidad en la cual está bien definido que la remisión molecular en MO (ausencia de transcritos **PML-RAR α**) es un pre-requisito para la cura de la enfermedad, constituyendo uno de los criterios estándar de respuesta en este subtipo de LMA (202). En cuanto a la utilidad del estatus de EMR en el caso de las **LMA-CBF** (LMA con RUNX1-RUNX1T1 o CBFB-MYH11), diversos estudios han observado que el estatus de EMR en los primeros momentos postratamiento, permite distinguir pacientes con un riesgo de recaída significativamente más alto. Incluso, se ha demostrado que se trata de un factor pronóstico con más peso que la presencia de mutaciones cooperadoras en cKIT y FLT3-ITD (72), datos que apoyan la utilidad del estudio molecular de EMR para ayudar a decidir sobre la realización de un trasplante en primera remisión.

6.3.2. Mutaciones somáticas cuantificables

La ausencia de transcritos de fusión en más de la mitad de las LMA, pone de manifiesto la importancia de encontrar nuevas dianas de EMR. Una opción atractiva son las mutaciones génicas cuantificables específicas de tumor. Dada la falta de otro marcador específico, el subgrupo de LMA en el que resulta de mayor interés el empleo de este tipo de marcadores son las LMA con cariotipo de riesgo intermedio (la mayoría de las cuales presentan un cariotipo normal), que afecta aproximadamente al 50% de los pacientes adultos más jóvenes (236).

La monitorización de mutaciones para seguimiento de EMR se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante **RQ-PCR** con *primers* y sonda específicos del alelo mutado, siendo las mutaciones en el exón 12 del gen NPM1 el marcador de este tipo más empleado hasta el momento y en el que se tiene mayor experiencia. Las mutaciones de NPM1 están presentes en aproximadamente un tercio de todas las LMA, incluyendo al menos el 50% de las LMA de cariotipo normal (57). La mayoría de los autores apoyan el hecho de que la presencia de transcritos mutados de NPM1 en muestras de SP o MO de los pacientes tras la quimioterapia es un factor discriminatorio que permite la predicción de recaídas (82,236). En el trabajo de Ivey y colaboradores, quizá

el más amplio sobre NPM1 hasta la fecha, observaron que la persistencia de transcritos de NPM1 mutada, detectados en SP mediante RQ-PCR tras el segundo ciclo de quimioterapia, era un factor con valor pronóstico negativo independiente. Además de redefinir el riesgo de una LMA, los autores de este trabajo proponen el empleo de NPM1 mutada como marcador para monitorización secuencial de EMR, cuya presencia permitiría anticipar una recaída inminente (236). Sin embargo, otros estudios han cuestionado la idoneidad del marcador NPM1 mutada para el control de la EMR, ya que esta mutación puede surgir en el contexto de un clon preleucémico caracterizado por mutaciones en los genes de regulación epigenética (ej. DNMT3A e IDH1/2), los cuales serían los responsables de la aparición de una recaída. Esta hipótesis implicaría que, aunque la quimioterapia pueda dirigirse eficazmente al clon NPM1 mutado, las poblaciones mutantes coexistentes de DNMT3A R882H serían resistentes y solo podrían eliminarse mediante el trasplante de progenitores hematopoyéticos (155,156,236,237). Esta teoría ha sido de nuevo puesta en duda al observarse la presencia de mutaciones en DNMT3A en muestras de seguimiento de pacientes en remisión a muy largo plazo, lo que indica que la eliminación del clon DNMT3A puede no ser esencial para la curación (105,238). Además de la monitorización mediante RQ-PCR, el empleo de mutaciones como dianas de EMR presenta una potencial aplicabilidad más amplia que los transcritos de fusión, ya que gracias al desarrollo de nuevas técnicas como la NGS, en teoría podría detectarse algún tipo de mutación en prácticamente todas las LMA. Este avance ha abierto la puerta a la monitorización de EMR mediante **NGS o PCR digital** (12,211). En el caso de la RQ PCR y PCR digital las mutaciones deben encontrarse en regiones concretas o *hotspots*, mientras que la NGS podría emplearse en los casos de mutaciones heterogéneas que implican grandes genes, como es el caso de TET2 o RUNX1, o para el seguimiento de múltiples o nuevas mutaciones (223). En cuanto al estudio de EMR mediante NGS en pacientes con LMA, como ejemplos, destaca el trabajo de Heuser et al. (239) en el que detectan satisfactoriamente FLT3-ITD y mutaciones en NPM1 en muestras en remisión y realizan un seguimiento de la enfermedad con el fin de predecir recaídas. Este trabajo fue ampliado por Kohlman et al, que se centraron en el estudio de RUNX1, y señalaron el potencial de las estrategias basadas en NGS para la detección de enfermedad antes de su manifestación clínica en pacientes con LMA carentes de un marcador molecular clásico (gen de fusión o NPM1 mutada)(223). Sin embargo, como se comentó anteriormente, existen varios aspectos técnicos que solucionar antes de escalar estos pequeños estudios y de permitir su aplicación en el laboratorio clínico. Además, sería necesario llevar a cabo una labor de estandarización para disminuir la variabilidad intra e inter-laboratorio (211).

A pesar de estos avances, en la actualidad, no todas las mutaciones que puedan detectarse al diagnóstico resultan válidas para seguimiento de EMR. En primer lugar, solo algunos genes presentan regiones frecuentes de mutación (*hotspots*) que permiten la detección del alelo mutado sin la necesidad de diseñar *primers* y sonda específicos para cada paciente. La detección de mutaciones personalizadas en estos genes solo podría monitorizarse mediante NGS, una estrategia que aún se encuentra en desarrollo para alcanzar las sensibilidades requeridas por un estudio de EMR, como se ha comentado previamente (221). Por otra parte,

algunas mutaciones, como la duplicación en tándem que aparece en FLT3, son marcadores inestables, de modo que pueden no aparecer en la recaída. Esto ocurre de forma más frecuente en el caso de mutaciones que se producen de forma tardía en el proceso de leucemogénesis, sin embargo, se ha demostrado que también es posible que ocurra en el caso de mutaciones fundadoras o tempranas como NPM1 (35). Por último, independientemente de la técnica empleada, la ausencia de dichos obstáculos no asegura que una mutación sea útil para seguimiento de EMR. El valor tumoral de la mayoría de las mutaciones se desconoce o no hay evidencias suficientes. Es el caso de la mutación R882 en DNMT3A, comentado previamente. Por tanto, se necesitan más estudios que permitan definir qué mutaciones son indicativos fiables de la presencia de un clon leucémico asociado con mayor riesgo de recaída y distinguirlas de aquellas que pueden permanecer de forma inocua, sin dar lugar a la progresión de la enfermedad, las cuales pueden pertenecer a clones pre-leucémicos, como DNMT3A e IDH1/2, y no predecir recaídas aun persistiendo a altos niveles tras el tratamiento y durante la remisión (12,20).

En cualquier caso, el seguimiento de mutaciones mediante las nuevas tecnologías (NGS y PCR digital) aún se encuentra en investigación, por lo que la técnica molecular vigente en el laboratorio clínico en la actualidad continúa siendo la RQ-PCR.

6.3.3. Expresión de genes aberrantes

Los genes de fusión o las mutaciones cuantificables no se encuentran presentes en todas las LMA, especialmente en los pacientes pediátricos, en los que las mutaciones en NPM1 son infrecuentes (211). Debido a ello, se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar ensayos adicionales que incluyan a los pacientes que no tienen marcador actualmente. Esta necesidad se acentúa por el hecho de que los transcritos de fusión más comunes, RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, así como NPM1 mutada, confieren un pronóstico favorable a los pacientes, lo que significa que la enfermedad recurrente o resistente en realidad es más común precisamente en los pacientes que carecen de marcador de seguimiento, los cuales necesitarían una mayor de vigilancia (221).

Debido al estatus aberrante de la célula leucémica, es posible que varias transcritos de ARNm se expresen en mayor medida que en las células hematopoyéticas sanas. En muestras de diagnóstico de pacientes con LMA, la expresión de uno o varios de estos genes será varias veces mayor que en la MO o SP sana, lo que conduce al concepto de sobreexpresión. La RQ-PCR permite monitorizar estos cambios aberrantes en la expresión génica (221). La desventaja de usar genes sobreexpresados como marcadores de EMR es que también se debe tener en cuenta el nivel de expresión del marcador en la hematopoyesis sana. Por lo tanto, incluso para un marcador que se sobreexpresase en prácticamente todos los casos de LMA, la necesidad de que esta diferencia de expresión sea lo suficientemente alta como para obtener suficiente sensibilidad, da como resultado una restricción en el número de pacientes que pueden evaluarse por este método. El ejemplo clásico es el del gen WT1 que, aunque se sobreexpresa en hasta el 70-90% de los pacientes, tanto en SP como

en MO (240,217), solo presenta una regulación positiva de 100 veces más en el 23% de los pacientes adultos (205). Ante esta situación, lo ideal sería establecer un umbral seguro por encima del cual no se observe expresión en los tejidos sanos (241). Su expresión en células hematopoyéticas normales (donantes sanos) es muy baja y además se limita prácticamente a la población de células progenitoras CD34+(242). WT1 es un factor transcripcional que regula la expresión de un amplio conjunto de genes involucrados fundamentalmente en proliferación y diferenciación celular (243) y ha llegado a ser propuesto incluso como marcador molecular universal en LMA (244). Sin embargo, la falta de consenso sobre su utilidad en la predicción de recaídas, así como la necesidad de definir unos umbrales de sobreexpresión validados clínicamente, han frenado su implantación en el laboratorio clínico (219).

Otros genes que resultan atractivos como marcadores de EMR son *PRAME* (*PReferentially expressed Antigen in MElanoma*) y *BAALC* (*Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic*), cuya expresión en células hematopoyéticas sanas es muy reducida, de modo que en un principio incluso se pensó que era nula. Más adelante, se observó que esta expresión era especialmente baja en el caso de *PRAME* (245), y exclusiva de las células inmaduras (CD34+) en el caso de *BAALC*, al igual que ocurría con WT1 (220,246). Aunque los resultados obtenidos en estudios de muestras secuenciales con estos marcadores son prometedores (220,247,248) se han realizado en casos individuales o series de pacientes reducidas, y son especialmente escasos en momentos posteriores al trasplante. Su capacidad como factores predictores de la recaída, aún necesita ser evaluada.

Además, se han realizado algunos diseños basados en la combinación de varios marcadores simultáneamente. Los mejores resultados se han obtenido con combinaciones que incluían tanto WT1 como *PRAME*, además de otros genes adicionales. Concretamente, con el conjunto de 5 genes (WT1, *PRAME*, *PRTN3*, *MSLN* y *CCNA*) propuesto por Goswami et al.(249) y el análisis de 7 genes (WT1, *PRAME*, *CCL23*, *GAGED2*, *MSLN*, *SPAG6* y *ST18*) de Steinbach et al. (250). Estas estrategias *multiplex* para el estudio de EMR cuentan con el inconveniente de la dificultad en la interpretación y estandarización de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368(9550):1894-907.
2. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-107.
3. Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med*. 1995;332(24):1618-30.
4. Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1987;28(1):55-76.
5. Savitz DA, Andrews KW. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am J Ind Med*. 1997;31(3):287-95.
6. Kerr JR, Barah F, Cunniffe VS, Smith J, Vallely PJ, Will AM, et al. Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. *J Clin Pathol*. 2003;56(11):873-5.
7. Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, Mason A, Reiter A, Cassinat B, et al. DNA Topoisomerase II in Therapy-Related Acute Promyelocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(15):1529-38.
8. Walter RB, Appelbaum FR, Estey EH, Bernstein ID. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*. junio de 2012;119(26):6198-208.
9. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. febrero de 2010;24(1):35-63.
10. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. septiembre de 2002;100(5):1532-42.
11. Chen S-J, Shen Y, Chen Z. A panoramic view of acute myeloid leukemia. Vol. 45, *Nature genetics*. United States; 2013. p. 586-7.
12. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Vol. 129, *Blood*. 2017. 424-447 p.
13. Bennett JM. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia : A report of the french-american-british cooperative group. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):620-5.
14. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-42.
15. Grimwade D, Hills RK, Moorman a V, Walker H, Chatters S, Goldstone a H, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials. *Br J Haematol*. 2010;116(5):354-65.
16. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. 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. Vol. 17, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. United States; 1999. p. 3835-49.
17. Vardiman JW, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2008;114(5):937-52.
18. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-406.
19. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-406.
20. Bullinger L, Döhner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-46.
21. Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, Boggs K, Cheng J, Ma J, et al. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat Genet*. diciembre de 2016;48(12):1551-6.
22. Micol J-B, Duployez N, Boissel N, Petit A, Geoffroy S, Nibourel O, et al. Frequent ASXL2 mutations in acute myeloid leukemia patients with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 chromosomal translocations. *Blood*. agosto de 2014;124(9):1445-9.
23. Madan V, Shyamsunder P, Han L, Mayakonda A, Nagata Y, Sundaresan J, et al. Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. agosto de 2016;30(8):1672-81.
24. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. mayo de 2008;22(5):915-31.
25. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. julio de 2002;2(7):502-13.
26. Downing JR. The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. *Curr Opin Genet Dev*. febrero de 2003;13(1):48-54.
27. Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T, et al. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood*. junio de 1996;87(11):4789-96.
28. Wiemels JL, Xiao Z, Buffer PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM, et al. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. mayo de 2002;99(10):3801-5.
29. Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, et al. A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. marzo de 1997;94(6):2551-6.
30. Westervelt P, Lane AA, Pollock JL, Oldfather K, Holt MS, Zimonjic DB, et al. High-penetrance mouse model of acute promyelocytic leukemia with very low levels of PML-RARalpha expression. *Blood*. septiembre de 2003;102(5):1857-65.
31. Bullinger L, Kronke J, Schon C, Radtke I, Urbauer K, Botzenhardt U, et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia*. febrero de 2010;24(2):438-49.
32. Suela J, Alvarez S, Cigudosa JC. DNA profiling by arrayCGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet Genome Res*. 2007;118(2-4):304-9.
33. Walter MJ, Payton JE, Ries RE, Shannon WD, Deshmukh H, Zhao Y, et al. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. agosto de 2009;106(31):12950-5.
34. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-21.
35. Kronke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschurtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. julio de 2011;29(19):2709-

- 16.
36. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209-21.
37. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia.* noviembre de 2016;30(11):2160-8.
38. Furutani E, Shimamura A. Germline Genetic Predisposition to Hematologic Malignancy. *J Clin Oncol.* marzo de 2017;35(9):1018-28.
39. Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* diciembre de 2017;30(4):287-9.
40. The University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood.* octubre de 2016;128(14):1800-13.
41. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet.* febrero de 2015;47(2):180-5.
42. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, Stary J, Hasle H, Masetti R, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood.* marzo de 2016;127(11):1387-97; quiz 1518.
43. Zhang J, Walsh MF, Wu G, Edmonson MN, Gruber TA, Easton J, et al. Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N Engl J Med.* diciembre de 2015;373(24):2336-46.
44. Lu C, Xie M, Wendl MC, Wang J, McLellan MD, Leiserson MDM, et al. Patterns and functional implications of rare germline variants across 12 cancer types. *Nat Commun.* diciembre de 2015;6:10086.
45. Buonocore F, Kuhnen P, Suntharalingham JP, Del Valle I, Digweed M, Stachelscheid H, et al. Somatic mutations and progressive monosomy modify SAMD9-related phenotypes in humans. *J Clin Invest.* mayo de 2017;127(5):1700-13.
46. Chen D-H, Below JE, Shimamura A, Keel SB, Matsushita M, Wolff J, et al. Ataxia-Pancytopenia Syndrome Is Caused by Missense Mutations in SAMD9L. *Am J Hum Genet.* junio de 2016;98(6):1146-58.
47. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell.* mayo de 2015;27(5):658-70.
48. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, et al. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* enero de 2017;15(1):60-87.
49. Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Nancy Lee-Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, Jürgen Thiele, Daniel A. Arber, Robert P. Hasserjian, Michelle M. Le Beau, Attilio Orazi RS. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ISBN:9789283244943). Vol. 4th, Lyon: IARC. 2016.
50. Drazer MW, Kadri S, Sukhanova M, Patil SA, West AH, Feurstein S, et al. Prognostic tumor sequencing panels frequently identify germ line variants associated with hereditary hematopoietic malignancies. *Blood Adv.* enero de 2018;2(2):146-50.
51. Wong, Terrence N., Giridharan Ramsingh#2, Andrew L. Young#3, Christopher A. Miller#4, Waseem Touma#1, John S. Welch#1,5, Tamara L. Lamprecht#1, Dong Shen#6, Jasreet Hundal#4, Robert S. Fulton#4, Sharon Heath#1, Jack D. Baty#7, Jeffery M. Kloco#8, Li Ding#1,5, Elaine TA, Graubert#1, 5, Timothy J. Ley#1, 5, Todd Druley#3, Daniel C. Link#1, 5 and RKW. The Role of TP53 Mutations in the Origin and Evolution of Therapy-Related AML. *Nature.* 2015;171(9):969-78.
52. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood.* abril de 2017;129(15):2070-82.
53. Feurstein S, Drazer MW, Godley LA. Genetic predisposition to leukemia and other hematologic malignancies. *Semin Oncol.* octubre de 2016;43(5):598-608.
54. Hackl H, Astanina K, Wieser R. Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* febrero de 2017;10(1):51.
55. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* julio de 2017;15(7):926-57.
56. Cancer T, Atlas G. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia The Cancer Genome Atlas Research Network. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-74.
57. Grimwade D, Mrozek K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* diciembre de 2011;25(6):1135-61, vii.
58. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* octubre de 1998;92(7):2322-33.
59. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood.* septiembre de 2001;98(5):1312-20.
60. 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.* diciembre de 2000;96(13):4075-83.
61. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* diciembre de 2002;100(13):4325-36.
62. Lo-Coco F, Cicconi L, Breccia M. Current standard treatment of adult acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol.* marzo de 2016;172(6):841-54.
63. Sanz MA, Vellenga E, Rayon C, Diaz-Mediavilla J, Rivas C, Amutio E, et al. All-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for the treatment of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* diciembre de 2004;104(12):3490-3.
64. Sanz MA, Coco F Lo, Marti G, Avvisati G, Rayo C, Fioritoni G, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood.* 2000;96(4):1247-54.
65. Montesinos P, Rayon C, Vellenga E, Brunet S, Gonzalez J, Gonzalez M, et al. Clinical significance of CD56 expression in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based regimens. *Blood.* febrero de 2011;117(6):1799-805.
66. Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F, et al. Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood.* julio de 2003;102(2):462-9.

67. Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, et al. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood*. mayo de 2002;99(10):3517-23.
68. 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*. julio de 2010;116(3):354-65.
69. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. mayo de 2016;127(20):2451-9.
70. 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. *Br J Haematol*. octubre de 2006;135(2):165-73.
71. Marcucci G, Mrozek K, Ruppert AS, Maharry K, Kolitz 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. *J Clin Oncol*. agosto de 2005;23(24):5705-17.
72. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. marzo de 2013;121(12):2213-23.
73. 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. *J Clin Oncol*. septiembre de 2004;22(18):3741-50.
74. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. junio de 2010;28(16):2739-47.
75. Mathews V, George B, Chendamarai E, Lakshmi KM, Desire S, Balasubramanian P, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J Clin Oncol*. agosto de 2010;28(24):3866-71.
76. Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghaffari SH, Jahani M, Iravani M, et al. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. julio de 2011;29(20):2753-7.
77. Zhou J, Zhang Y, Li J, Li X, Hou J, Zhao Y, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of children with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. marzo de 2010;115(9):1697-702.
78. Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. febrero de 2011;29(5):495-503.
79. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*. junio de 2013;97(6):717-25.
80. 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*. marzo de 2012;119(9):2114-21.
81. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman P V, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-77.
82. Dohner H, Estey EHE, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett A, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. enero de 2010;115(3):453-74.
83. Schlenk RF, Dohner H, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. mayo de 2008;358(18):1909-18.
84. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Scha U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326-36.
85. Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. diciembre de 2002;100(13):4372-80.
86. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom. *Blood*. septiembre de 2001;98(6):1752-9.
87. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, Srirangan S, Wheatley K, Burnett AK, et al. 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*. noviembre de 2005;106(10):3658-65.
88. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. mayo de 1999;93(9):3074-80.
89. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*. 2009;113(19):4505-11.
90. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. diciembre de 2005;106(12):3733-9.
91. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*. octubre de 2001;61(19):7233-9.
92. Straube J, Ling VY, Hill GR, Lane SW. The impact of age, NPM1(mut), and FLT3(ITD) allelic ratio in patients with acute myeloid leukemia. Vol. 131, *Blood*. United States; 2018. p. 1148-53.
93. Pratz KW, Levis M. How I treat FLT3-mutated AML. *Blood*. febrero de 2017;129(5):565-71.
94. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. febrero de 2009;113(9):1875-91.
95. Wei AH, Tiong IS. Midostaurin, enasidenib, CPX-351, gemtuzumab ozogamicin, and venetoclax bring new hope to AML. *Blood*. diciembre de 2017;130(23):2469-74.
96. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Rock J, Paschka P, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol*. abril de 2011;29(10):1364-72.
97. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan a, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2012;27(1):82-91.

98. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*. marzo de 2015;100(3):324-30.
99. 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*. agosto de 2008;22(8):1539-41.
100. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. octubre de 2005;106(8):2854-61.
101. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela J-M, Tigaud I, de Botton S, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. octubre de 2002;100(8):2717-23.
102. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. diciembre de 2005;106(12):3747-54.
103. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. diciembre de 2005;106(12):3740-6.
104. Patel SS, Kuo FC, Gibson CJ, Steensma DP, Soiffer RJ, Alyea EP 3rd, et al. High NPM1 mutant allele burden at diagnosis predicts unfavorable outcomes in de novo AML. *Blood*. mayo de 2018;
105. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Kavelaars FG, Al Hinai ASA, Zeilemaker A, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Prospective Molecular MRD Detection By NGS: A Powerful Independent Predictor for Relapse and Survival in Adults with Newly Diagnosed AML. *Blood*. 7 de diciembre de 2017;130(Suppl 1):LBA-5 LP-LBA-5.
106. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer*. abril de 2009;100(8):1343-6.
107. 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. *J Clin Oncol*. febrero de 2010;28(4):570-7.
108. Lavalley V-P, Krosil J, Lemieux S, Boucher G, Gendron P, Pabst C, et al. Chemo-genomic interrogation of CEBPA mutated AML reveals recurrent CSF3R mutations and subgroup sensitivity to JAK inhibitors. *Blood*. junio de 2016;127(24):3054-61.
109. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CAJ, Valk PJM, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*. abril de 2008;111(8):4329-37.
110. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. enero de 2007;109(2):431-48.
111. Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, et al. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. diciembre de 2008;93(12):1797-805.
112. Santamaria CM, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Perez C, Caballero MD, Ramos F, et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. julio de 2009;114(1):148-52.
113. Zhang T-J, Zhou J-D, Yang D-Q, Wang Y-X, Wen X-M, Guo H, et al. TET2 expression is a potential prognostic and predictive biomarker in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Cell Physiol*. agosto de 2018;233(8):5838-46.
114. Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. abril de 2004;350(16):1605-16.
115. Bullinger L, Dohner K, Kranz R, Stirmer C, Frohling S, Scholl C, et al. An FLT3 gene-expression signature predicts clinical outcome in normal karyotype AML. *Blood*. mayo de 2008;111(9):4490-5.
116. Haferlach T, Kohlmann A, Wieczorek L, Basso G, Kronnie G Te, Bene M-C, et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. mayo de 2010;28(15):2529-37.
117. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. noviembre de 2008;456(7218):66-72.
118. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. septiembre de 2009;361(11):1058-66.
119. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol*. 2014;2014:103175.
120. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. septiembre de 2012;12(9):599-612.
121. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*. octubre de 2001;278(1-2):25-31.
122. Richards EJ, Elgin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*. febrero de 2002;108(4):489-500.
123. Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J*. mayo de 2001;356(Pt 1):1-10.
124. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T, Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, et al. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Nat Rev Genet*. 2014;33(11):2548-53.
125. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet*. mayo de 2001;38(5):285-303.
126. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. junio de 2002;3(6):415-28.
127. Abdel-wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*. mayo de 2013;121(18):3563-72.
128. Greenblatt SM, Nimer SD. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia*. 2014;28(7):1396-406.
129. Yan X-J, Xu J, Gu Z-H, Pan C-M, Lu G, Shen Y, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. marzo de 2011;43(4):309-15.
130. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute

- myeloid leukemia. *N Engl J Med.* marzo de 2012;366(12):1079-89.
131. Lund K, Adams PD, Copland M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia.* 2014;28(1):44-9.
 132. Wang X, Dai H, Wang Q, Wang Q, Xu Y, Wang Y, et al. EZH2 mutations are related to low blast percentage in bone marrow and -7/del(7q) in de novo acute myeloid leukemia. *PLoS One.* 2013;8(4):e61341.
 133. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia.* mayo de 2000;14(5):796-804.
 134. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* diciembre de 2010;363(25):2424-33.
 135. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2348-55.
 136. Khwaja A, Björkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Prim.* marzo de 2016;2:16010.
 137. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell.* marzo de 2013;153(1):17-37.
 138. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi a, Johnson DE, et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia.* septiembre de 2014;28(April):1-10.
 139. Amatangelo MD, Quek L, Shih A, Stein EM, Roshal M, David MD, et al. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood.* agosto de 2017;130(6):732-41.
 140. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* agosto de 2017;130(6):722-31.
 141. Castelli G, Pelosi E, Testa U. Targeting histone methyltransferase and demethylase in acute myeloid leukemia therapy. *Onco Targets Ther.* 2018;11:131-55.
 142. Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG). *Blood.* enero de 2013;121(1):170-7.
 143. Allen C, Hills RK, Lamb K, Evans C, Tinsley S, Sellar R, et al. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia.* septiembre de 2013;27(9):1891-901.
 144. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Gorlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* agosto de 2016;128(5):686-98.
 145. Welch J, Ley T, Link D, Miller C. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012;150(2):264-78.
 146. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012;481(7382):506-10.
 147. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin A V, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* agosto de 2013;500(7463):415-21.
 148. Grossmann V, Tiacci E, Holmes AB, Kohlmann A, Martelli MP, Kern W, et al. Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood.* diciembre de 2011;118(23):6153-63.
 149. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014;28(2):241-7.
 150. Hartmut Döhner, M.D., Daniel J. Weisdorf, M.D., and Clara D. Bloomfield MD, Döhner H, Hartmut Döhner, M.D., Daniel J. Weisdorf, M.D., and Clara D. Bloomfield MD, Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* septiembre de 2015;373(11):635-8.
 151. Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, Walter C, Dugas M, Suchanek KJ, et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *Blood.* febrero de 2014;123(6):914-20.
 152. Lee SC-W, Dvinge H, Kim E, Cho H, Micol J-B, Chung YR, et al. Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med.* junio de 2016;22(6):672-8.
 153. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* agosto de 2012;4(149):149ra118.
 154. Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschurtz F, Gaidzik VI, Kuhn MWM, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood.* julio de 2013;122(1):100-8.
 155. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* febrero de 2014;506(7488):328-33.
 156. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* febrero de 2014;111(7):2548-53.
 157. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* diciembre de 2014;371(26):2477-87.
 158. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet.* noviembre de 2012;44(11):1179-81.
 159. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* December. 2014;25(37126):2488-98.
 160. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related cancer mutations associated with clonal hematopoietic expansion. *Nat Med.* 2014;20(12):1472-8.
 161. Genovese G, Jaiswal S, Ebert BL, McCarroll SA. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk. Vol. 372, *The New England journal of medicine.* United States; 2015. p. 1071-2.
 162. McKerrill T, Park N, Moreno T, Grove CS, Ponstingl H, Stephens J, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep.* marzo de 2015;10(8):1239-45.
 163. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasslerjan RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* julio de 2015;126(1):9-16.
 164. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet.* diciembre de 2011;44(1):23-31.
 165. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell

- self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. julio de 2011;20(1):11-24.
166. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson AG, et al. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. mayo de 2013;368(22):2059-74.
167. Brinda B, Khan I, Parkin B, Konig H. The rocky road to personalized medicine in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med*. marzo de 2018;22(3):1411-27.
168. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Nucleic Acid Sequencing Methods in Diagnostic Laboratory Medicine; Approved Guideline—Second Edition (MM09-A2)*. 2014;(February).
169. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. mayo de 2017;19(3):341-65.
170. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*. 2010;7(2):111-8.
171. Yan B, Hu Y, Ng C, Ban KHK, Tan TW, Huan PT, et al. Coverage analysis in a targeted amplicon-based next-generation sequencing panel for myeloid neoplasms. *J Clin Pathol*. septiembre de 2016;69(9):801-4.
172. Loman NJ, Misra R V, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. mayo de 2012;30(5):434-9.
173. Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. julio de 2012;13:341.
174. Boland JF, Chung CC, Roberson D, Mitchell J, Zhang X, Im KM, et al. The new sequencer on the block: comparison of Life Technology's Proton sequencer to an Illumina HiSeq for whole-exome sequencing. *Hum Genet*. octubre de 2013;132(10):1153-63.
175. Chen S, Li S, Xie W, Li X, Zhang C, Jiang H, et al. Performance comparison between rapid sequencing platforms for ultra-low coverage sequencing strategy. *PLoS One*. 2014;9(3):e92192.
176. Beadling C, Wald AI, Warrick A, Neff TL, Zhong S, Nikiforov YE, et al. A Multiplexed Amplicon Approach for Detecting Gene Fusions by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. marzo de 2016;18(2):165-75.
177. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn*. mayo de 2015;17(3):251-64.
178. Nambiar M, Raghavan SC. How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucleic Acids Res*. agosto de 2011;39(14):5813-25.
179. Roukos V, Misteli T. The biogenesis of chromosome translocations. *Nat Cell Biol*. abril de 2014;16(4):293-300.
180. McKerrell T, Moreno T, Pongstingl H, Bolli N, Dias JML, Tischler G, et al. Development and validation of a comprehensive genomic diagnostic tool for myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(1):E1-9.
181. Gargis AS, Kalman L, Bick DP, da Silva C, Dimmock DP, Funke BH, et al. Good laboratory practice for clinical next-generation sequencing informatics pipelines. Vol. 33, *Nature biotechnology*. United States; 2015. p. 689-93.
182. Spencer DH, Tyagi M, Vallania F, Bredemeyer AJ, Pfeifer JD, Mitra RD, et al. Performance of common analysis methods for detecting low-frequency single nucleotide variants in targeted next-generation sequence data. *J Mol Diagn*. enero de 2014;16(1):75-88.
183. Vallania FLM, Druley TE, Ramos E, Wang J, Borecki I, Province M, et al. High-throughput discovery of rare insertions and deletions in large cohorts. *Genome Res*. diciembre de 2010;20(12):1711-8.
184. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. marzo de 2010;26(5):589-95.
185. Wang J, Mullighan CG, Easton J, Roberts S, Heatley SL, Ma J, et al. CREST maps somatic structural variation in cancer genomes with base-pair resolution. *Nat Methods*. junio de 2011;8(8):652-4.
186. Suzuki S, Yasuda T, Shiraishi Y, Miyano S, Nagasaki M. ClipCrop: a tool for detecting structural variations with single-base resolution using soft-clipping information. *BMC Bioinformatics*. diciembre de 2011;12 Suppl 1:S7.
187. Fan X, Abbott TE, Larson D, Chen K. BreakDancer – Identification of Genomic Structural Variation from Paired-End Read Mapping. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014;1-13.
188. Konnick EQ, Wu D. *Precision Molecular Pathology of Myeloid Neoplasms*. Vol. 12. 2018. 369-412 p.
189. Ben Lassoued A, Nivaggioni V, Gabert J. Minimal residual disease testing in hematologic malignancies and solid cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. julio de 2014;14(6):699-712.
190. Asan, Xu Y, Jiang H, Tyler-Smith C, Xue Y, Jiang T, et al. Comprehensive comparison of three commercial human whole-exome capture platforms. *Genome Biol*. septiembre de 2011;12(9):R95.
191. Parla JS, Iossifov I, Grabill I, Spector MS, Kramer M, McCombie WR. A comparative analysis of exome capture. *Genome Biol*. septiembre de 2011;12(9):R97.
192. Cui H, Li F, Chen D, Wang G, Truong CK, Enns GM, et al. Comprehensive next-generation sequence analyses of the entire mitochondrial genome reveal new insights into the molecular diagnosis of mitochondrial DNA disorders. *Genet Med*. mayo de 2013;15(5):388-94.
193. Dames S, Chou L-S, Xiao Y, Wayman T, Stocks J, Singleton M, et al. The development of next-generation sequencing assays for the mitochondrial genome and 108 nuclear genes associated with mitochondrial disorders. *J Mol Diagn*. julio de 2013;15(4):526-34.
194. Duncavage EJ, Al E. Targeted next generation sequencing of clinically significant gene mutations and translocations in leukemia. *Mod Pathol*. 2012;25(6):795-804.
195. Bolli N, Manes N, McKerrell T, Chi J, Park N, Gundem G, et al. Characterization of gene mutations and copy number changes in acute myeloid leukemia using a rapid target enrichment protocol. *Haematologica*. 2015;100(2):214-22.
196. Beverloo HB, Panagopoulos I, Isaksson M, van Wering E, van Drunen E, de Klein A, et al. Fusion of the homeobox gene HLXB9 and the ETV6 gene in infant acute myeloid leukemias with the t(7;12)(q36;p13). *Cancer Res*. julio de 2001;61(14):5374-7.
197. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOME. *Blood*. agosto de 2000;96(4):1297-308.
198. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Groger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. noviembre de 2013;27(11):2165-76.
199. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, Haghshenas V, Routbort MJ, Harmon MA, et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: Applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica*. marzo de 2014;99(3):465-73.

200. Kuo FC, Dong F. Next-Generation Sequencing-Based Panel Testing for Myeloid Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep.* 2015;10(2):104-11.
201. Richard Dillon and David Grimwade. Just 1 test to diagnose AML?!! *Blood.* 2016;128(1):7-8.
202. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2003;21(24):4642-9.
203. Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol.* agosto de 2013;10(8):460-71.
204. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Bene M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* marzo de 2018;131(12):1275-91.
205. Hokland P, Ommen HB, Nyvold CG, Roug AS. Sensitivity of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia in first remission--methodologies in relation to their clinical situation. *Br J Haematol.* septiembre de 2012;158(5):569-80.
206. Roloff GW, Lai C, Hourigan CS, Dillon LW. Technical Advances in the Measurement of Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* septiembre de 2017;6(9).
207. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem.* octubre de 1999;45(10):1708-17.
208. Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Pract Res Clin Haematol.* diciembre de 2003;16(4):599-612.
209. Lewis RE, Cruse JM, Sanders CM, Webb RN, Suggs JL. Aberrant expression of T-cell markers in acute myeloid leukemia. *Exp Mol Pathol.* diciembre de 2007;83(3):462-3.
210. Bahia DM, Yamamoto M, Chauffaille M de L, Kimura EY, Bordin JO, Filgueiras MA, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. *Haematologica.* agosto de 2001;86(8):801-6.
211. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for «prime time»? *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* diciembre de 2014;2014(1):222-33.
212. Johansson U, Macey M. Pitfalls in the use of multicolour flow cytometry in haematology. *J Clin Pathol.* julio de 2011;64(7):561-3.
213. Basso G, Buldini B, De Zen L, Orfao A. New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. *Haematologica.* julio de 2001;86(7):675-92.
214. Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a «moving target» for detection of residual disease. *Cytometry B Clin Cytom.* enero de 2014;86(1):3-14.
215. Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev.* marzo de 2017;31(2):63-75.
216. Ho T-C, LaMere M, Stevens BM, Ashton JM, Myers JR, O'Dwyer KM, et al. Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. *Blood.* septiembre de 2016;128(13):1671-8.
217. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic J V., et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5195-201.
218. Gabert J, Beillard E, Velden VHJ Van Der, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia.* 2003;17(12):2318-57.
219. Rossi G, Minervini MM, Carella AM, Melillo L, Cascavilla N. Wilms' Tumor Gene (WT1) Expression and Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. En: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. Brisbane (AU); 2016.
220. Weber S, Alpermann T, Dicker F, Jeromin S, Nadarajah N, Eder C, et al. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* enero de 2014;4:e173.
221. Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Ther Adv Hematol.* febrero de 2016;7(1):3-16.
222. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, Haghshenas V, Routbort MJ, Harmon MA, et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: Applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica.* 2014;99(3):465-73.
223. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, Grossmann V, Schindela S, Dicker F, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia.* enero de 2014;28(1):129-37.
224. Pulte D, Jansen L, Castro FA, Krilaviciute A, Katalinic A, Barnes B, et al. Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int J cancer.* septiembre de 2016;139(6):1289-96.
225. Cruz NM, Mencia-Trinchant N, Hassane DC, Guzman ML. Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *Int J Lab Hematol.* mayo de 2017;39 Suppl 1:53-60.
226. Kuderer NM, Burton KA, Blau S, Rose AL, Parker S, Lyman GH, et al. Comparison of 2 Commercially Available Next-Generation Sequencing Platforms in Oncology. *JAMA Oncol.* julio de 2017;3(7):996-8.
227. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* junio de 2011;108(23):9530-5.
228. Kivioja T, Vaharautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S, et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods.* noviembre de 2011;9(1):72-4.
229. Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, Song YS. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet.* junio de 2011;12(6):443-51.
230. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood.* 2016;124(23):222-33.
231. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods.* octubre de 2013;10(10):1003-5.
232. Brambati C, Galbiati S, Xue E, Toffalori C, Crucitti L, Greco R, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Vol. 101, *Haematologica.* Italy; 2016. p. e157-61.
233. Mencia-Trinchant N, Hu Y, Alas MA, Ali F, Wouters BJ, Lee S, et al. Minimal Residual Disease Monitoring of Acute Myeloid Leukemia by

- Massively Multiplex Digital PCR in Patients with NPM1 Mutations. *J Mol Diagn.* julio de 2017;19(4):537-48.
234. Jennings LJ, George D, Czech J, Yu M, Joseph L. Detection and quantification of BCR-ABL1 fusion transcripts by droplet digital PCR. *J Mol Diagn.* marzo de 2014;16(2):174-9.
235. Kern W. Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer.* 2008;112(1):4-16.
236. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic J V, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med.* febrero de 2016;374(5):422-33.
237. Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschurtz F, Gaidzik VI, Kuhn MWM, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood.* julio de 2013;122(1):100-8.
238. Ploen GG, Nederby L, Guldborg P, Hansen M, Ebbesen LH, Jensen UB, et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML. *Br J Haematol.* noviembre de 2014;167(4):478-86.
239. Thol F, Kolking B, Damm F, Reinhardt K, Klusmann J-H, Reinhardt D, et al. Next-generation sequencing for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients with FLT3-ITD or NPM1 mutations. *Genes Chromosomes Cancer.* julio de 2012;51(7):689-95.
240. Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol.* junio de 2004;125(5):590-600.
241. Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol.* 2004;112(1-2):79-84.
242. Hosen N, Sonoda Y, Oji Y, Kimura T, Minamiguchi H, Tamaki H, et al. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2002;116(2):409-20.
243. Roberts SGE. Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev.* octubre de 2005;15(5):542-7.
244. Nomdedeu JF, Hoyos M, Carricondo M, Bussaglia E, Estivill C, Esteve J, et al. Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leukemia.* noviembre de 2013;27(11):2157-64.
245. Qin Y, Zhu H, Jiang B, Li J, Lu X, Li L, et al. Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease. *Leuk Res.* marzo de 2009;33(3):384-90.
246. Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt DF, Liyanarachchi S, Choi C, Caligiuri MA, et al. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* noviembre de 2003;31(11):1051-6.
247. Steinbach D, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;138(1):89-91.
248. Ding K, Wang X-M, Fu R, Ruan E-B, Liu H, Shao Z-H. PRAME Gene Expression in Acute Leukemia and Its Clinical Significance. *Cancer Biol Med.* 2012;9(1):73-6.
249. Goswami M, McGowan KS, Lu K, Jain N, Candia J, Hensel NF, et al. A multigene array for measurable residual disease detection in AML patients undergoing SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(5):642-51.
250. Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A, et al. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* abril de 2006;12(8):2434-41.
251. National Cancer Institute. Acute myeloid leukemia. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>. Último acceso: abril 2018.



HIPÓTESIS DE
TRABAJO

El desarrollo de la leucemia mieloblástica aguda (LMA) implica la adquisición secuencial de varias lesiones genéticas que afectan a los mecanismos normales de crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Los hallazgos citogenéticos y moleculares han servido como marcadores diagnósticos para diversos subtipos de LMA dentro de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como para establecer grupos de bajo, intermedio y alto riesgo (*European LeukemiaNet*), con claras diferencias a nivel de tasas de remisión completa, riesgo de recaída y supervivencia libre de enfermedad y global.

Sin embargo, a pesar de cumplir los criterios recomendados para la categorización y el tratamiento de la LMA, los pacientes de un mismo subgrupo pueden tener una evolución clínica completamente diferente. Este es el caso de la LMA de riesgo favorable, en la que no todos los pacientes presentan realmente un buen pronóstico. De hecho, hasta un 40% de los pacientes con LMA-CBF termina recayendo, la mitad de los pacientes con mutaciones en NPM1 sufren recaída durante los 4 primeros años y las mutaciones bialélicas en CEBPa no evitan una tasa de recaída del 44%. En cuanto a las LPA, pese a las notables mejorías gracias a su tratamiento dirigido, aún aparecen casos que presentan resistencia o recaídas y, aunque se han encontrado mutaciones en los genes implicados en la fusión (PML y RAR α) en casos de progresión, el perfil de aberraciones genéticas asociado a los tres subgrupos de LPA con distinto riesgo (score basado en cifras de plaquetas y leucocitos) aún no ha sido definido.

Hoy en día, existe un creciente interés en detectar en un único test de secuenciación masiva (NGS) toda la variedad de alteraciones con valor diagnóstico y pronóstico en las LMA (mutaciones, traslocaciones/inversiones y variaciones en el número de copias). Sin embargo, son pocos los trabajos que estudian además de mutaciones génicas, el resto de alteraciones de las LMA, ya que todavía existen limitaciones técnicas para la detección de reordenamientos, por lo que los métodos convencionales continúan siendo imprescindibles. Para poder aplicar la técnica de NGS al estudio de estas alteraciones cromosómicas es necesario mejorar el diseño de los paneles y sobre todo simplificar el análisis informático de modo que pueda incorporarse a la práctica rutinaria del laboratorio clínico.

Por otra parte, las mutaciones encontradas en las LMA no son solo adquiridas o somáticas, sino que también pueden presentarse en la línea germinal, dando lugar a casos de LMA familiares. Gracias al uso creciente de las nuevas tecnologías de NGS, se van descubriendo cada vez más hemopatías malignas heredables y genes responsables de ello, habiéndose descrito varios síndromes de predisposición familiar. De hecho, estos hallazgos clínico-genéticos se recogen ya en la última clasificación de la OMS (2016), donde se ha incorporado una nueva categoría diagnóstica provisional que engloba los tumores mieloides hereditarios. No obstante, la investigación sobre LMA familiar a nivel molecular sigue siendo

limitada. Aunque se han descrito casos con mutaciones en CEBP α o GATA2 y casos de trastorno plaquetario familiar con predisposición a LMA con mutaciones en RUNX1, es difícil una caracterización molecular completa con las técnicas convencionales, así como la monitorización correcta de los familiares sanos.

Por último, la detección de enfermedad mínima residual (EMR) constituye uno de los factores pronósticos post-tratamiento más importantes a la hora de tomar decisiones terapéuticas, ya que la ausencia de EMR aún no se ha traducido en la predicción inequívoca de curación de la enfermedad. Hay que destacar que solo el 40-60% de los pacientes con LMA tienen un marcador de EMR robusto cuantificable por PCR, por lo que existe un número importante de pacientes en los cuales es imposible la monitorización molecular de la enfermedad.

En este contexto, nos proponemos confirmar las siguientes hipótesis:

- 1.** La variabilidad en la evolución de la LMA de bajo riesgo genético se debe a las características biológicas del clon tumoral: presencia de mutaciones o de expresión anómala de diferentes genes. Un estudio genómico y de expresión génica de la LMA, permitirá esclarecer las posibles alteraciones responsables del comportamiento más agresivo de la enfermedad en dicho subgrupo.
- 2.** El análisis genómico para la detección simultánea de reordenamientos cromosómicos y mutaciones somáticas de las LMA mediante un único panel de secuenciación masiva, permitirá demostrar sus ventajas sobre las técnicas citogenéticas y moleculares convencionales. Su implementación en el laboratorio clínico constituirá una estrategia innovadora para mejorar el manejo de los pacientes.
- 3.** El empleo de paneles de NGS dirigidos es útil para analizar las mutaciones en genes relacionados con predisposición genética en los casos de LMA familiar, permitiendo la identificación de miembros en riesgo o afectados dentro de una familia. Además, se podrá determinar el origen germinal de la enfermedad y así plantear una estrategia terapéutica adaptada en la que se elimine la opción de trasplante alogénico emparentado.
- 4.** El estudio de la sobreexpresión de los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* en la monitorización de EMR resultará útil en los pacientes en los que no se dispone de un marcador fiable para seguimiento.

The image features a vibrant, abstract representation of DNA. Several double helix structures are depicted in various colors, including shades of green, blue, pink, and purple. These structures are intertwined and layered, creating a sense of depth and complexity. In the lower right quadrant, a sequence of small, colored spheres (representing nucleotides) is arranged in a curved path, mirroring the structure of a DNA strand. The overall composition is dynamic and visually engaging, set against a plain white background.

OBJETIVOS

Mediante el presente trabajo doctoral, pretendemos mejorar nuestro conocimiento acerca de la leucemia mieloblástica aguda (LMA), y con esta premisa, nos planteamos los siguientes objetivos:

1) PRIMER TRABAJO: CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA DE BAJO RIESGO GENÉTICO. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS ASOCIADAS CON RECAÍDA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) Y RQ-PCR

- Comprender los mecanismos responsables del comportamiento más agresivo de la enfermedad en pacientes con LMA de riesgo citogenético/molecular favorable, mediante el estudio de mutaciones y expresión de genes.
 - Comparar los perfiles mutacionales obtenidos mediante NGS, de los distintos subgrupos genéticos que conforman el colectivo de LMA de bajo riesgo (LMA-CBF, LMA-NPM1, LMA-biCEBP α y leucemia promielocítica aguda-LPA) y desvelar las funciones celulares que resultan más afectadas en cada uno de ellos.
 - Investigar en el momento del diagnóstico, la existencia de mutaciones génicas asociadas con mal pronóstico, comparando pacientes que recaen con aquellos que permanecen en primera remisión.
 - En los pacientes con LPA, definir la firma mutacional de los tres subgrupos de riesgo según las cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico, así como de los pacientes CD56 positivos.
 - Identificar patrones de expresión génica mediante tarjetas microfluídicas basadas en RQ-PCR en pacientes con LMA de bajo riesgo y analizar las diferencias que existen entre los distintos subgrupos.
 - Comparar el perfil de expresión de los pacientes con LMA de bajo riesgo que, a pesar de su buen pronóstico terminan cayendo, con el de los que no recaen.

2) SEGUNDO TRABAJO: DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE REORDENAMIENTOS Y MUTACIONES GÉNICAS EN LMA

- Desarrollo y validación de un panel de secuenciación masiva basada en la tecnología de captura que estudia simultáneamente alteraciones citogenéticas y moleculares con valor diagnóstico y/o pronóstico que afectan recurrentemente a las LMA.
 - Diseño de un panel de NGS que permita el estudio integrado de los distintos tipos de alteraciones genéticas (sustituciones, inserciones/delecciones y traslocaciones e inversiones) en LMA.
 - Validar y optimizar la implementación de este panel en la práctica de diagnóstico clínico en una serie de pacientes positivos ya conocidos comparando su utilidad con la de las metodologías convencionales (cariotipo/FISH, RQ-PCR y secuenciación Sanger).
 - Evaluar la aplicabilidad en el laboratorio clínico de un método sencillo de análisis basado en dos softwares de fácil manejo, *VariantStudio (Illumina)* para mutaciones y *Enrichment (Illumina)* para reordenamientos.
 - Validación del diseño con un pipeline bioinformático propio y comparación de la utilidad de tres herramientas distintas de análisis de variantes estructurales en datos de NGS (Lumpy, GASV y DELLY2).

3) TERCER TRABAJO: ANÁLISIS GENÓMICO DE VARIANTES GERMINALES Y SOMÁTICAS EN UN CASO DE LMA FAMILIAR

- Estudio molecular de un caso de LMA familiar mediante secuenciación masiva para identificar genes implicados en la transformación maligna que ayuden a entender los mecanismos de susceptibilidad y progresión a neoplasias mieloides (SMD/LMA).
 - Empleo de un panel de NGS dirigida para caracterizar y detectar las mutaciones asociadas con predisposición familiar en una familia de ocho hermanos con cuatro casos de LMA.
 - Identificar las mutaciones responsables del desarrollo de LMA en los pacientes afectados.
 - Confirmación del origen germinal de las variantes detectadas en muestras no tumorales de los pacientes y hermanos sanos.

4) CUARTO TRABAJO: ESTUDIO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR) MEDIANTE LA EXPRESIÓN DESREGULADA DE LOS GENES WT1, PRAME y BAALC

- Cuantificar la EMR en una serie de pacientes con LMA no promielocítica, mediante el estudio de transcritos de fusión, mutaciones somáticas cuantificables y nivel de expresión de los genes WT1, PRAME y BAALC a lo largo de la enfermedad.
 - Definir umbrales de sobreexpresión mediante el estudio de WT1, PRAME y BAALC en una serie de donantes de médula ósea y sangre periférica.
 - Cuantificar los niveles de expresión de AML1-ETO, CBFβ-MYH11, NPM1 mutada, WT1, PRAME y BAALC mediante RQ-PCR en las distintas etapas del tratamiento: diagnóstico, post-inducción, post-consolidación, y en su caso, en pre- y post-trasplante, y así definir en qué momentos estos estudios proporcionan más información.
 - Evaluar la capacidad de la sobreexpresión de WT1, PRAME y BAALC en la predicción de recaídas comparando con los genes de fusión.
 - Analizar la cinética de reducción de WT1, PRAME y BAALC en los distintos momentos post-tratamiento.



MATERIAL & MÉTODOS

1. Sujetos de estudio

Pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA): Se incluyeron un total de 300 pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) para los diferentes estudios que conforman el presente trabajo de tesis doctoral. La mayoría de las muestras (n=220) corresponden a pacientes de la Comunidad de Castilla y León que fueron remitidos al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca para estudios inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares entre junio de 2003 y septiembre de 2016. El resto de los casos estudiados (n=80) son muestras procedentes de otros hospitales españoles enviadas para realizar estudios específicos.

Tipos de muestras: Se analizaron 300 muestras tumorales al diagnóstico: 278 de médula ósea (MO) y 22 de sangre periférica (SP). Para el estudio de enfermedad mínima residual (EMR) se analizaron además 452 muestras de seguimiento (MO o SP) pertenecientes a 118 pacientes.

Características de los pacientes (Tabla 1): Del total de casos, 143 eran mujeres y 157 varones, con edades comprendidas entre 2 y 89 años (mediana: 53 años). El diagnóstico fue establecido mediante estudios morfológicos y citoquímicos convencionales y de acuerdo con los criterios de la clasificación FAB (1) y la clasificación de la OMS (2). Adicionalmente, se estableció una clasificación en función del análisis citogenético, llevado a cabo mediante técnicas de bandedo cromosómico (cariotipo) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La distribución de los pacientes en los distintos grupos según el riesgo citogenético (favorable, intermedio, desfavorable) se realizó de acuerdo con los criterios del *Medical Research Council* (3). De los 300 pacientes, 163 fueron clasificados en el subgrupo de riesgo favorable, 109 en el de riesgo intermedio y 28 con riesgo desfavorable. Además, se tuvieron en cuenta las principales alteraciones moleculares (mutaciones en *NPM1*, *FLT3-ITD* y *CEBPa* bialélicas) y fueron todos reclasificados (riesgo global), siguiendo las recomendaciones del *European LeukemiaNet* (4)(5). No se tuvo en cuenta la ratio alélica de la mutación *FLT3-ITD*, sino únicamente su presencia o ausencia.

Se trata de una serie de pacientes con una mayor representación de casos con características citogenéticas y moleculares de buen pronóstico, debido a la naturaleza de los estudios en los que se centra la presente tesis doctoral. De hecho, 128 de los pacientes correspondían a LMA con traslocación t(15;17) o leucemia promielocítica aguda (LPA), el subtipo de leucemia con mejor pronóstico, debido a su respuesta al tratamiento con ATRA.

Del total de 300 pacientes con LMA, 264 recibieron tratamiento con intención curativa, incluido el trasplante de progenitores hematopoyéticos (n=112), alcanzando remisión completa el 92,8% (245/264). El 34,3% de los pacientes sufrió recaída, siendo la mediana de seguimiento de 3 años (2 días-19 años).

Tabla 1: Características clínicas y biológicas de los 300 pacientes con LMA.

Variable		Pacientes totales (n=300)	
Sexo(M/F)		157/143	
Edad (años)		50,4 ± 17,5	
Leucocitos (x10⁹/L)		32,3 ± 48,6	
Blastos MO (%)		65,1 ± 24,3	
Plaquetas (x10⁹/L)		60,4 ± 78,3	
Hemoglobina (g/dL)		9,5 ± 2,4	
FAB, n (%)			
M0	8(2,7)	M4eo	15(5,0)
M1	25(8,3)	M5	20 (6,7)
M2	32(10,7)	M6	4(1,3)
M3	123(41,0)	Otros	2(0,7)
M4	22(7,3)	No clasificada	17 (15,7)
Citogenética (cariotipo/FISH)			
t(8;21)	12 (4)	t(9;22)	3 (1)
inv(16)	23 (7,7)	11q23 reord	5 (1,7)
t(15;17)	128 (42,7)	del (5q)/del(7/7q)	11 (3,7)
t(9;11)	1 (0,3)	Cariotipo Intermedio	96 (32)
t(6;11)	1 (0,3)	Cariotipo Complejo	6 (2)
t(6;9)	1 (0,3)	Otros cariotipos	13 (4,3)
Mutaciones			
FLT3-ITD, n(%)		61/300(20,3)	
NPM1, n(%)		67/300 (22,3)	
biCEBPα, n(%)		7 /300 (2,3)	
Riesgo citogenético		Riesgo genético global	
Favorable	163/300 (54,3)	Favorable	209/300 (69,7)
Intermedio	109/300 (36,3)	Intermedio	55/300 (18,3)
Desfavorable	28/300 (9,3)	Desfavorable	36/300 (12,0)
Variable		Pacientes tratados y con datos clínicos (n=264)	
Tasa RC, N(%)		245/264 (92,8)	
Tasa Recaída, N(%)		84/245 (34,3)	
Trasplante (TPH)		112/264 (42,4)	
Autólogo		24	
Alogénico		88	

La distribución de pacientes en los distintos trabajos que componen la tesis, fue la siguiente:

**Pacientes con LMA
riesgo favorable
n=198**

CAPÍTULO 1: Caracterización genómica mediante secuenciación masiva y expresión génica de alteraciones implicadas en recaída en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) de bajo riesgo genético.

**Pacientes con LMA
(todos los cariotipos)
n=30**

CAPÍTULO 2: Nueva estrategia de secuenciación masiva para el estudio simultáneo de mutaciones y reordenamientos cromosómicos en pacientes con LMA.

**Hermanos sanos (n=4)
y con LMA (n=2)
de una misma familia**

CAPÍTULO 3: Análisis genómico de variantes germinales y somáticas en un caso de LMA familiar.

**Pacientes con LMA
(todos los cariotipos)
n=118**

CAPÍTULO 4: Utilidad de los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* como marcadores de enfermedad mínima residual en LMA.

Donantes: Finalmente, se incluyeron muestras de MO (n=14) y SP (n=15) de donantes sanos para utilizarlas como controles en las distintas técnicas.

Adicionalmente, se desarrollará una caracterización más detallada de los pacientes y donantes estudiados en cada capítulo al inicio de cada uno de ellos.

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca y todos los sujetos de estudio firmaron el consentimiento informado siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki.

2. Protocolo de tratamiento

2.1 Pacientes con LMA

Todos los pacientes fueron tratados según el protocolo español PETHEMA LMA vigente en cada momento: LMA99, LMA2007 o LMA2010. La mayoría de ellos fueron diagnosticados a partir de 2010, por lo que el protocolo de tratamiento predominante fue PETHEMA LMA 2010. Todos los protocolos contemplaban un esquema inicial de quimioterapia de inducción que incluía idarubicina (Ida) más citarabina (Ara-C). La terapia post-remisión, adaptada al riesgo, consistió en 1 ó 2 ciclos de quimioterapia de consolidación con dosis intermedias/altas de citarabina, seguido de trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogo (n=24) o alogénico (n=88) cuando fue posible.

Los pacientes **≥65 años** (n=54) recibieron el ciclo de inducción con Ida y ARA-C en esquema 2+5 (12 mg/m²/día durante 2 días y ARA-C, 200 mg/m²/día durante 5 días), consolidación e intensificación con ARA-C 100 mg/m².

Los pacientes **<65 años** (n=210) recibieron un ciclo de inducción o dos (reinducción), hasta obtener la remisión completa (RC), en esquema 3+7. La terapia post-remisión de estos pacientes, que sigue un modelo de terapia adaptada al riesgo, consistió en uno o dos ciclos de quimioterapia de consolidación con dosis intermedias/altas de ARA-C, seguido de TPH autólogo o alogénico. Los pacientes se estratificaron fundamentalmente en base a las características al diagnóstico (citogenética y marcadores moleculares) y la respuesta al tratamiento de inducción. El estudio de marcadores moleculares (*FLT3-ITD* y *NPM1*) fue especialmente importante en el grupo de pacientes con cariotipo normal. Según el grupo de riesgo, fueron tratados de diferente forma como se indica a continuación:

2.1.1 Pacientes con LMA de Bajo Riesgo

Los pacientes con alteraciones citogenéticas de pronóstico favorable como la inv(16) o la t(8;21) y aquellos de cariotipo normal que presentaban mutaciones de *NPM1* en ausencia de *FLT3-ITD* eran candidatos a tratamiento de primera línea exclusivamente con quimioterapia intensiva que incluye ARA-C a dosis elevadas. Estos pacientes recibieron dos ciclos de intensificación con ARA-C (3 g/m² los días 1, 3 y 5 de cada ciclo). Se recolectaron progenitores de sangre periférica (PSP) tras la primera intensificación y se realizó trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) previo acondicionamiento con esquema BEA (Busulfán, Etopósido, ARA-C). En este grupo, no se recomienda trasplante alogénico en primera línea.

2.1.2 Pacientes con LMA de Riesgo Intermedio

El grupo de cariotipo de riesgo intermedio, *NPM1* negativo y *FLT3-ITD* negativo recibió una consolidación con Ida y ARA-C exactamente igual que la inducción. Tras la consolidación, se realizó alotrasplante (alo-TPH) si se disponía de donante emparentado HLA-idéntico. En caso contrario, se recolectaron PSP tras la consolidación y se administró intensificación con ARA-C a altas dosis (3 g/m² los días 1, 3 y 5) seguida de TASPE con esquema BEA.

2.1.3 Pacientes con LMA de Riesgo Adverso

Los pacientes con alteraciones citogenéticas desfavorables, como la pérdida de 7q, o con mutaciones en *FLT3*, entre otros, eran candidatos a un alo-TPH en primera remisión completa. Recibieron una consolidación con Ida y ARA-C (igual que la inducción). Tras ello, se realizó alo-TPH de donante emparentado o no emparentado HLA-idéntico. En caso de no disponer de donante, se recolectaron PSP y se administró intensificación con ARA-C a altas dosis (3 g/m² los días 1, 3 y 5) seguida de TASPE con esquema BEA.

2.2 Pacientes con LPA (LMA-M3)

Los pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA) fueron tratados según los esquemas de PETHEMA LPA vigentes en la fecha de su diagnóstico (PETHEMA LPA 99/2005/2012). Así, todos los pacientes diagnosticados antes de noviembre de 2005 recibieron el protocolo PETHEMA-LPA99 (6), los posteriores a esta fecha se trataron con el protocolo PETHEMA-LPA2005 y , a partir de 2012, con el protocolo actualizado vigente en la actualidad PETHEMA-LPA2012. Los tres esquemas incluían una fase de inducción con ácido todo-trans retinoico (ATRA) más idarubicina y un tratamiento de consolidación adaptado al riesgo. La clasificación en tres grupos de riesgo se basó en el recuento de leucocitos y plaquetas (7). Los pacientes con cifras de leucocitos $\leq 10 \times 10^9/L$ y plaquetas $> 40 \times 10^9/L$ se consideraron de bajo riesgo y aquellos con leucocitos $> 10 \times 10^9/L$ de alto riesgo, incluyendo al resto de LPA en el grupo de riesgo intermedio (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación de las LPA en distintos grupos de riesgo según las cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico.

Riesgo LPA	Leucocitos ($\times 10^9/L$)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)
Bajo	≤ 10	> 40
Intermedio	≤ 10	≤ 40
Alto	> 10	

En el protocolo LPA99, el tratamiento de consolidación incluía tres ciclos de idarubicina-mitoxantrone-idarubicina, seguido de una fase de mantenimiento con ATRA, metotrexato y mercaptopurina durante dos años. En los pacientes con riesgo intermedio y alto de recaída se administraba ATRA, además de dosis altas de idarubicina. El protocolo LPA 2005 modificaba la fase de consolidación, introduciendo el ATRA también en el grupo de pacientes de bajo riesgo e incorporando ARA-C sólo en los pacientes de alto riesgo. Esta incorporación del ARA-C se hizo extensiva también al grupo de riesgo intermedio con el protocolo LPA2012 (Tabla 3).

Tabla 3: Representación esquemática de los sucesivos protocolos de tratamiento de LPA adaptados al riesgo

LPA 99			LPA 2005			LPA 2012		
Bajo	Intermedio	Alto	Bajo	Intermedio	Alto	Bajo	Intermedio	Alto
IDA	IDA ATRA		IDA ATRA	IDA ATRA ARA-C		IDA ATRA	IDA ATRA ARA-C	

3. Remisión y recaída hematológica y molecular

3.1 Remisión y recaída hematológica (morfológica): LMA y LPA

La **remisión completa hematológica** (RC) fue definida como la detección en un aspirado de médula ósea (MO) de <5% de células leucémicas sobre la celularidad nucleada, junto con una normalización de los recuentos hematopoyéticos en SP, lo que implicaba un recuento absoluto de neutrófilos $> 1.000/\mu\text{L}$ y de plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{L}$ (8). El resto de respuestas posibles al tratamiento de inducción, que incluyen la remisión con recuperación hematopoyética incompleta, la remisión sin recuperación de plaquetas, la respuesta parcial o la refractariedad, fueron consideradas en un grupo único como “no alcanza remisión completa (RC)”. Por tanto, en términos de medición de la eficacia del tratamiento de inducción, sólo se ha considerado como respuesta válida la remisión completa.

La **recaída hematológica** se consideraba cuando en MO se encontraba $\geq 5\%$ de células tumorales (8)(9). Este término hace referencia a la reaparición de la enfermedad después de haberse alcanzado RC. Los criterios diagnósticos son los mismos que se utilizan en el debut de la enfermedad.

3.2 Respuesta y recaída molecular

a) Respuesta y recaída molecular en LMA:

La **respuesta molecular** completa se define como la ausencia de amplificación del gen de estudio (gen de fusión o NPM1 mutada) en muestras valorables. Una muestra es valorable para estudio de EMR si los genes control ABL o GUS son suficientemente amplificados en la RT-PCR (Ct, *cycle threshold* o ciclo umbral, de ABL:21.9-29.3; Ct GUS: 20.8-28.0) (10).

Se considera como **recaída molecular** el momento en el que la RT-PCR se hace positiva, sin evidencia hematológica de enfermedad (11). Sin embargo, no hay una definición estándar más precisa de este concepto, sino que depende de cada marcador molecular (4). A continuación, se exponen las especificaciones concretas de cada marcador de seguimiento, definidas por el grupo PETHEMA para establecer la recaída molecular (Guía Asistencial grupo PETHEMA 2016 para LMA-CBF y 2017 para LMA-NPM1):

- ✓ **LMA-CBF: genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 y CBFβ-MYH11.** Ratio (gen fusión/gen control) $\times 10^4 > 1$ en SP en al menos 2 muestras consecutivas (separadas ≥ 4 semanas) y con aumento de ≥ 1 logaritmo respecto a la primera positiva.

- ✓ **LMA con NPM1 mutada.** Ratio (NPM1/gen control) $\times 10^5 \geq 1$ en SP en al menos 2 muestras consecutivas (separadas $\geq 2-4$ semanas) y con aumento respecto a la primera positiva. Para confirmar una recaída molecular siempre se debe acompañar la nueva muestra en SP de una de MO concomitante.

b) Respuesta y recaída molecular en LPA:

En LPA, la **remisión molecular** se define como la detección de menos de una copia del gen de fusión normalizada respecto al gen control *ABL* (<1 NCN) (12). Una **recaída molecular** fue establecida con la reaparición de un resultado positivo por cualquier método molecular, en dos muestras consecutivas de MO, analizadas posteriormente al tratamiento de consolidación (Sanz *et al*, 2000). Un falso-positivo se considera un resultado positivo por cualquiera de las técnicas moleculares aparece en un paciente que, sin recibir ningún tratamiento quimioterápico, no desarrolla una recaída molecular en los 6 meses posteriores a la realización de dicha prueba.

TÉCNICAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

4. Técnicas citogenéticas: Cariotipo y FISH

Se realizó el estudio citogenético convencional al diagnóstico de todos los pacientes. Este estudio incluye técnicas de bandeo cromosómico (cariotipo) e hibridación *in situ* fluorescente con sondas para la detección de la delección de 5q, delección de 7q, trisomía 8 y 11q23. Además, en las LMA con morfología M2 se estudió la traslocación t(8;21) mediante FISH y en las LMA M4, la inv(16).

5. Extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN) y síntesis de ADNc

Origen y preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de sangre medular (MO), sangre periférica (SP) y mucosa bucal (ADN germinal de control) de sujetos que habían aprobado su utilización con fines clínicos y científicos.

Las muestras de SP, previamente desplaquetizadas mediante centrifugación, y de MO fueron sometidas a un choque hipotónico con cloruro amónico para lisar los hematíes durante 20 minutos a 4°C. El botón celular se recuperó posteriormente mediante centrifugación a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Los leucocitos obtenidos se lavaron con una solución salina de Hanks' (GibcoBRL, Life Technologies) para eliminar restos celulares y cationes divalentes (Ca²⁺ y Mg²⁺), necesarios para la actividad nucleasa, y se precipitaron mediante centrifugación a 1500 r.p.m durante 5 minutos.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de los leucocitos totales de SP o MO de acuerdo con el protocolo estándar de extracción con DNAzol® (Molecular Research Center, Inc.), un reactivo que contiene detergente y guanidina que hidroliza y promueve la precipitación selectiva del ADN (13). En el caso de las muestras germinales de mucosa bucal, obtenidas mediante hisopos se empleó el kit NucleoSpin Tissue XS (Machery-Nagel, Düren, Alemania) para extraer el ADN de las células.

Control de calidad y cantidad del ADN para técnicas de secuenciación masiva: La pureza del ADN se determinó con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) mediante las ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, para determinar el grado de contaminación proteica y de solventes orgánicos, considerándose valores óptimos entre 1.8-2.0 y 1.6-2.4 respectivamente. La concentración del ADN fue medida mediante cuantificación fluorimétrica con el Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies) empleando el kit Qubit dsDNA Broad Range (Invitrogen, Life Technologies), que permite cuantificar con alta precisión y especificidad el ADN de doble cadena.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc (complementario)

La extracción de ARN se realizó con el método de fenol-cloroformo (14). La transcripción reversa para la síntesis de ADNc a partir de ARN se llevó a cabo con el kit comercial *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Se agregó un microgramo (µg) de ARN total a una mezcla de 20 µL de volumen final que contenía nonúmeros randomizados y 50 U (unidades) de *MultiScribe Reverse Transcriptase*. Se incubó a 25°C 10 minutos, seguido de 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. El ADN y ADNc fueron almacenados a -20°C y los alícuotas sobrantes de ARN a -80°C para posteriores análisis.

6. Análisis de fragmentos (GeneScan)

Esta técnica consiste en la realización de una electroforesis capilar que permite separar fragmentos de ADN conforme a su tamaño. De este modo, se pueden detectar cambios en el tamaño de una región génica concreta producidos por inserción o delección.

Para llevar a cabo esta técnica, se requiere la realización de una PCR previa para amplificar el fragmento del gen de interés utilizando uno de los cebadores marcado con fluorescencia y la posterior separación de los productos de PCR mediante un sistema de electroforesis capilar. Para ello, 1 microlitro (μL) del producto de PCR se mezcló con 0,3 μL de marcador de peso molecular (Internal Lane Standard 600, Promega) y 10 μL de formamida desionizada, que permite la separación por desnaturalización del ADN en cadenas simples. La electroforesis se llevó a cabo en los secuenciadores de capilares ABIPrism 3100 y 3500 XL Genetic Analyzers (Applied Biosystems). El análisis y visualización se realizó con el software GeneMapper v3.5 (Applied Biosystems).

6.1 Detección de mutaciones FLT3-ITD al diagnóstico

La presencia de la duplicación en tándem del gen FLT3 (FLT3-ITD, *internal tandem duplication*) se analizó en todos los pacientes en el momento del diagnóstico. Esta mutación fue estudiada en el ADN mediante amplificación de los exones 11 y 12 del gen *FLT3* (regiones donde se producen las ITDs), empleando un *primer forward* marcado con un fluorocromo (6-FAM) en la posición 5' y un *primer reverse* no marcado. La reacción contenía una concentración de 0,5 μM de cada *primer*, 1U de la enzima *FastStartTaq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) y 1 μL de ADN que se amplificó en un volumen total de 50 μL . Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis capilar para determinar su tamaño, así como la ratio ITD-mutado/salvaje (*wild type*). Los amplicones de 328 pb correspondían al *FLT3* salvaje y los fragmentos de tamaños mayores de 328 pb y múltiplos de 3 a partir de este número serían *FLT3*-ITD (15). La ratio alélica de FLT3-ITD se calculó como la relación entre las áreas bajo la curva establecidas por el *software* para el pico correspondiente al alelo portador de ITD y para el pico correspondiente al alelo salvaje.

6.2 Detección de mutaciones en NPM1 al diagnóstico

Las mutaciones en el gen de la nucleofosmina (*NPM1*) se determinaron en todos los pacientes con LMA no M3. Estas mutaciones se localizan en el exón 12 de dicho gen y consisten en inserciones de 4 pb. Para su detección, se realizó, en primer lugar, una PCR convencional con uno de los *primers* marcado con fluorescencia (6-FAM), siguiendo el protocolo propuesto por Falini (16). Los productos de PCR fueron analizados por *GeneScan* en las mismas condiciones descritas previamente. La presencia de un producto de PCR 4pb mayor que el *NPM1* normal

(*wild type*) se identificó como *NPM1* mutada (17). Los casos positivos fueron secuenciados para determinar el tipo de mutación y poder estudiarla mediante RQ-PCR como marcador de enfermedad mínima residual.

6.3 Detección de mutaciones en CEBP α al diagnóstico

Las mutaciones en el gen CEBP α son duplicaciones, inserciones y deleciones de tamaño variable que confieren un pronóstico favorable cuando son dobles mutaciones y bialélicas (N-terminal en un alelo y C-terminal en el otro). Fueron analizadas en todas las LMA no M3, al igual que las de *NPM1*. Para su estudio, se llevó a cabo un *screening* previo mediante análisis de fragmentos (Genescan) y posterior secuenciación de los casos positivos según lo descrito por Benthaus et al (18). En resumen, se amplificó toda la región codificante del gen (consiste en un único exón) empleando cuatro parejas de *primers* distintas en dos PCRs multiplex. Los cebadores *forward* estaban marcados en 5' con 6-FAM o HEX y los alelos mutados se detectaron como cambios en el tamaño de fragmento respecto al esperado en el *wild type*.

7. RT-PCR cuantitativa (RQ-PCR) en tiempo real

Pacientes analizados mediante RQ-PCR (no tarjetas):

. Capítulo 4: pacientes correspondientes al estudio de enfermedad mínima residual al diagnóstico (n=118) y sus muestras de seguimiento (n=452)

7.1 Aspectos generales

La RQ-PCR es una variante de la técnica de PCR convencional basada en la amplificación y cuantificación simultánea del producto amplificado. Para los estudios de expresión génica es recomendable el empleo de sondas de hidrólisis Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA), que están unidas a dos fluorocromos. Estas sondas hibridan en la zona intermedia entre dos cebadores o *primers*, y debido a la degradación de la sonda mediante la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN-polimerasa se produce una emisión de fluorescencia durante la amplificación que es detectada y cuantificada por los equipos de PCR en cada ciclo de reacción, lo que permite monitorizar en tiempo real la amplificación de los productos. Un parámetro fundamental en la RQ-PCR es el ciclo umbral o *Threshold Cycle* (Ct), definido como el ciclo a partir del cual la fluorescencia de la muestra supera un determinado umbral, por lo que determina el ciclo inicial de amplificación.

a) Métodos de cuantificación:

Existen dos métodos:

a.1) Cuantificación absoluta mediante curvas estándar. Este método relaciona la señal de fluorescencia obtenida en la RQ-PCR con un número de copias fijo de una secuencia estándar, utilizando una curva patrón que se genera a partir de diluciones seriadas conocidas de plásmidos portadores del gen de estudio. En todos los casos se construyeron curvas estándar empleando 5 diluciones de los transcritos correspondientes (rango: 10-100000 copias). Se representan los respectivos Ct (eje y) correspondientes a las diluciones frente al logaritmo de las concentraciones de las mismas (número de copias, eje x). Los parámetros de la curva patrón son la pendiente y el *y-intercept*. La pendiente da una medida de la eficiencia de amplificación, y el *y-intercept* (punto de corte con el eje y) corresponde al límite teórico de detección de la reacción, es decir, el ciclo máximo para detectar una molécula diana en la muestra bajo unas condiciones de reacción dadas. Por tanto, el *y-intercept* predice cuántos ciclos serán necesarios para asegurarse de la ausencia del gen diana. El número de copias de la muestra problema se calcula a partir de la regresión lineal de la curva estándar de la siguiente manera:

$$\text{Log}_{10} \text{ N}^{\circ} \text{ de copias} = \text{Ct} - \text{y-intercept} / \text{pendiente}$$

Este método ha sido empleado para la cuantificación de **transcritos de fusión**, del **gen *NPM1* mutado** y la sobreexpresión del **gen *WT1***.

a.2) Cuantificación relativa: método comparativo del Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Se emplea para determinar el cambio de expresión del gen diana en una muestra determinada respecto a la expresión de dicho gen en una muestra de referencia (calibrador). El calibrador puede ser una muestra sana, no tratada, un tejido de referencia, etc. No requiere estándares con concentraciones determinadas, y expresa la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del calibrador por medio de la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct calibrador})}$$

donde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gen en estudio}} - \text{Ct}_{\text{gen control}}$ y después se comparan los ΔCt de cada muestra problema con el ΔCt de la muestra calibrador ($\Delta\Delta\text{Ct}$) (19).

Este método ha sido empleado para el estudio de sobreexpresión de los genes ***PRAME* y *BAALC***.

b) Calidad de la muestra: Gen control:

Todos los estudios se realizaron en muestras de ADN complementario (ADNc) obtenidas del ARN mediante retrotranscripción. Para considerar una muestra valorable para el estudio de cuantificación, se analizó de forma paralela a los genes diana la expresión de genes constitutivos (*housekeeping*), cuya expresión es estable en la

célula. Con este fin, se amplificaron los genes *ABL1* (Abelson) o *GUS* (β -glucuronidasa) en cada muestra. Se aceptaron para el estudio valores de Ct entre 21.9 y 29.0 para el gen *ABL1*, y valores entre 20.8 y 28.0 en el caso de *GUS* (10) (12).

c) Controles de la RQ-PCR:

Todas las muestras se analizaron por triplicado y se incluyeron en cada experimento controles positivos (ADNc de un paciente con la alteración analizada previamente) y controles negativos (ADNc de un donante sano y agua destilada)

d) Resultado positivo de RQ-PCR:

Un resultado positivo fue definido como la amplificación sigmoide (en escala logarítmica) con un valor de Ct por encima de un umbral de cambio de fluorescencia (ΔR_n) y por debajo del valor del y -intercept de la curva patrón menos 1.

7.2 RQ-PCR para genes de fusión

La cuantificación de los diferentes transcritos de fusión, fruto de las traslocaciones recurrentes en LMA (*PML-RAR* α , *AML1-ETO* y *CBF* α -*MYH11*), se realizó mediante cuantificación absoluta según los protocolos del grupo cooperativo *Europe Against Cancer* (EAC) empleando el gen *ABL* como control (12). Este grupo elaboró protocolos de RQ-PCR basados en la tecnología Taqman[®] para la detección de diversos genes de fusión, aplicando la metodología de cuantificación absoluta con el gen *ABL1* como control (10). Para la realización de la técnica se añadieron 5 μ L (100ng) de ADNc o plásmido a 12.5 μ L de Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), junto con los *primers* y la sonda a una concentración final de 300 nM y 200 nM, respectivamente, en un volumen final de 25 μ L. Los resultados fueron reportados de acuerdo a las recomendaciones del grupo EAC, es decir, en números de copias normalizadas (NCN), resultantes de dividir el número de copias del gen de fusión entre el número de copias del gen *ABL1*, y esto a su vez multiplicado por 10000 (12).

7.3 RQ-PCR para cuantificación de mutaciones en *NPM1*

Los casos positivos por análisis de fragmentos que mostraban inserciones de 4 nucleótidos fueron secuenciados para determinar el tipo de mutación (A, B u otras menos comunes) para su empleo como marcador de enfermedad mínima residual. Si la mutación hallada era de tipo A o B, se procedía a su cuantificación por RQ-PCR siguiendo el protocolo de Gorello et al. empleando el gen *ABL1* como control. Brevemente, se mezclaron 5 μ L (100ng) de ADNc o plásmido con 12.5 μ L de Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), además de los *primers* y la sonda a una concentración final de 300 nM y 200 nM, respectivamente, en un volumen final de 25 μ L. Finalmente, se obtuvo el NCN de *NPM1* mutada con respecto al número de copias del transcrito control

ABL1, y se expresó el resultado como el NCN multiplicado por 10000, es decir, el número de copias de *NPM1* mutada por cada 10000 copias de *ABL* (20).

7.4 RQ-PCR para el análisis de expresión génica de *WT1*, *PRAME* y *BAALC*

Umbrales de sobreexpresión: cuantificación de la expresión en donantes sanos

Dado que la expresión de los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* no es exclusiva de las células leucémicas, hubo que fijar previamente unos valores umbral que permitieran considerar sobreexpresión. Para ello, se analizó por RQ-PCR un conjunto de muestras de 24 donantes sanos (10 de SP y 14 de MO).

La expresión de los tres genes (*WT1*, *PRAME* y *BAALC*) se cuantificó en las 10 muestras de SP, y el gen *WT1* en las 14 muestras de MO. En cambio, *PRAME* y *BAALC* solo se estudiaron en 6 de las médulas.

Cuantificación absoluta de *WT1*. Gen control: *GUS*

Para la reacción de RQ-PCR, se añadieron 5 μ L (100 ng) de ADNc de cada muestra a una mezcla que contenía 10 μ L de *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix, No AmpErase*[®] (Applied Biosystems), además de *primers* y sonda a una concentración final de 300 nM y 200 nM, respectivamente, en un volumen final de 20 μ L, empleando las condiciones de RQ-PCR del grupo EAC, que consisten en una incubación de 10 minutos a 95°C seguidos de 50 ciclos de 15 segundos a 92°C y 1 minuto a 60°C. El conjunto de *primers* y sonda elegidos para *WT1* fueron los propuestos previamente por Van Dijk y cols. (Van Dijk et al., 2002), que están situados entre los exones 1 y 2, ya que, según demostraron Cilloni y cols., resultaban más eficientes que otros 9 ensayos empleados para la detección de transcritos de *WT1* en LMA por distintos grupos (22). Se elaboró una curva estándar partir de diluciones seriadas de plásmidos portadores de los genes *WT1* y *GUS* (rango: 10-100000 copias) para realizar una cuantificación absoluta del número de copias en las muestras de donantes y enfermos a partir de sus valores de Ct. Se calculó el NCN dividiendo el número de copias de *WT1* entre el número de copias de *GUS*, y se expresó el resultado multiplicando este NCN por 100, es decir, como porcentaje (% RQ).

Cuantificación relativa de *PRAME* y *BAALC*. Gen control: *GUS*

La expresión de los genes *PRAME* y *BAALC* se evaluó utilizando los ensayos comerciales *TaqMan*[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) con los números de identificación Hs00196132_m1 (*PRAME*) y Hs00227249_m1 (*BAALC*). La mezcla contenía 2 μ L (40 ng) de ADNc, 5 μ L de *TaqMan*[®] Fast Master Mix y 0.5 μ L del ensayo de expresión, en un volumen final de 10 μ L. Las condiciones del termociclador fueron: 50°C-2min, 50x (95°C-15seg; 60°C-1min). Se compararon los Δ Ct de cada muestra problema con el Δ Ct de la muestra calibrador ($\Delta\Delta$ Ct) y los resultados se expresaron como valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Todas las RQ-PCR se llevaron a cabo en el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) y analizadas mediante el software *StepOne v2.1*. (Applied Biosystems).

8. Tarjetas microfluídicas basadas en RQ-PCR

Pacientes analizados mediante tarjetas microfluídicas:

Este panel se utilizó para:

- . Capítulo 1: pacientes con LMA de bajo riesgo para caracterización del perfil de expresión n=112
- . Capítulo 2: pacientes con LMA de todos los tipos para detección de genes de fusión n=29

Diseño de la tarjeta:

Se utilizaron tarjetas de expresión (*microfluidic cards*) "TaqMan Low Density Arrays" (Applied Biosystems), diseñadas para cuantificar hasta 384 genes diferentes, y que contienen ensayos liofilizados para RQ-PCR "TaqMan Gene expression assays" (Applied Biosystems) para cada uno de los genes a cuantificar. Se han diseñado en nuestro laboratorio y permiten analizar simultáneamente 96 genes por duplicado en dos pacientes (36 genes de fusión, 57 genes con valor diagnóstico/pronóstico y 3 genes control: ABL1, GADPH y GUSB) (Tabla 4), siguiendo las recomendaciones de Vandesompele et al. (23).

Protocolo experimental:

Se preparó una mezcla para cada paciente, conteniendo 50 µL de ADNc (400 ng) diluido en agua y 50 µL de TaqMan 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Esta mezcla se cargó en la tarjeta microfluídica, y la RQ-PCR se llevó a cabo en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Análisis de expresión génica mediante tarjetas microfluídicas basadas en RQ-PCR:

Los cambios relativos en la expresión fueron calculados mediante el método del incremento del ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$), empleando muestras de 3 donantes como calibradores. Pasos:

- 1) Normalización con el gen control: $Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen control} = \Delta Ct$
- 2) Normalización con el calibrador: $\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador} = \Delta\Delta Ct$
- 3) Expresión relativa al calibrador: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Por tanto, el calibrador constituye la muestra 1X, y el resto de las cantidades se expresan como n-veces la diferencia relativa al calibrador. Los datos de cuantificación se exportaron al DataAssist™ v2.0 Software (Applied Biosystems) y se llevaron a cabo los análisis de "clusters" representados en "heat maps" para identificar grupos de genes significativos según los subgrupos de pacientes a analizar.

Tabla 4. Lista de genes y los correspondientes ensayos de expresión incluidos en la tarjeta.

ID Ensayo	Gen	ID Ensayo	Gen de fusión
Hs01067802_m1	ABCB1	Hs03043640_ft	ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)
Hs00219905_m1	ABCC1	Hs03024435_ft	BCR-ABL1 e1a2
Hs01053787_m1	ABCG2	Hs03024541_ft	BCR-ABL1 b3a2-b2a2
Hs00245445_m1	ABL1	Hs03024646_ft	BCR-ABL1 b2a2-b2a3
Hs00169867_m1	ANGPT2	Hs03024784_ft	BCR-ABL1 b3a2
Hs00227249_m1	BAALC	Hs03043652_ft	BCR-ABL1 b3a3-b3a2
Hs00414514_m1	BAX	Hs03205538_ft	BCR-ABL1 e19-a2
Hs00153350_m1	BCL2	Hs03043618_ft	CBFB-MYH11 A
Hs00236329_m1	BCL2L1	Hs03043615_ft	CBFB-MYH11 D
Hs00234387_m1	CASP3	Hs03460064_ft	CBFB-MYH11 E
Hs00184697_m1	CAV1	Hs03296420_ft	DEK-NUP214 (DEK-CAN)
Hs00602520_m1	CBFA2T3 (MTG16)	Hs03453394_ft	MDS1-EVI1
Hs00360669_m1	CD177 (PRV1)	Hs03043611_ft	MLL-AFF1 e10-e4/e9-e4
Hs00156373_m1	CD34	Hs03043614_ft	MLL-AFF1 e10-e4/e9-e4/e9-e5
Hs00923894_m1	CDKN2A (p16)	Hs03043643_ft	MLL-AFF1 e11-e4/e10-e4
Hs00365249_m1	CDKN2B (p15)	Hs03024474_ft	MLL-ELL
Hs00269972_s1	CEBPA	Hs03024654_ft	MLL-MLLT1 (MLL-ENL)
Hs00367493_m1	CLIP3	Hs03024656_ft	MLL-EPS15
Hs00170025_m1	CTNBNB1	Hs03043624_ft	MLL-MLL e6-e2/e7-e2
Hs00237052_m1	CXCR4	Hs03024476_ft	MLL-MLLT10 e7-e10/e8-e10
Hs01554635_m1	ERG	Hs03296416_ft	MLL-MLLT3 (MLL-AF9) (6A)
Hs00602795_m1	EVI1 (MECOM)	Hs03296417_ft	MLL-MLLT3 (MLL-AF9) (6B)
Hs00182807_m1	FGF13	Hs03296418_ft	MLL-MLLT3 (MLL-AF9) (6D)
Hs00174690_m1	FLT3	Hs03296419_ft	MLL-MLLT3 (MLL-AF9) (8A)
Hs00818121_m1	FOXO3	Hs03205535_ft	MLL-MLLT4 (MLL-AF6)
Hs99999905_m1	GAPDH	Hs03024806_ft	MLL-MLLT6 (MLL-AF17)
Hs99999908_m1	GUSB	Hs03024544_ft	MYST3-CREBBP
Hs00900066_m1	HGF	Hs03205537_ft	NPM1-RARA
Hs00600844_m1	HOXA7	Hs03205536_ft	NUMA1-RARA
Hs00365956_m1	HOXA9	Hs03296415_ft	ZBTB16-RARA
Hs00234567_m1	JAK2	Hs03043651_ft	PML-RARA bcr1
Hs00174029_m1	KIT	Hs03024794_ft	PML-RARA bcr3
Hs00173587_m1	LGALS3	Hs03024802_ft	RUNX1-MDS1 (AML1-MDS1)
Hs00245789_m1	LYL1	Hs03024752_ft	RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO)
Hs00180020_m1	MEIS1	Hs03296414_ft	SIL-TAL1 1a-3
Hs00610538_m1	MLL	Hs03024664_ft	TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)
Hs00159202_m1	MN1	ID Ensayo	Mutación
Hs00153408_m1	MYC	Hs03063434_gH	NPM1 A
Hs00224622_m1	MYH11	Hs03063435_gH	NPM1 B
Hs01062011_m1	NOTCH1	Hs04260176_gH	NPM1 D
Hs03063422_gH	NPM1		
Hs00231228_m1	PBX1		
Hs00998026_m1	PDGFRA		
Hs01065498_m1	PIM1		
Hs00366711_m1	POU4F1		
Hs00196132_m1	PRAME		
Hs01009261_m1	CD133 (PROM1)		
Hs00940446_m1	RARA		
Hs00153108_m1	RB1		
Hs00231702_m1	RUNX1T1		
Hs00360675_m1	SALL4		
Hs00195591_m1	SNAI1		
Hs00277762_m1	SPARC		
Hs01097987_m1	TAL1		
Hs00153349_m1	TP53		
Hs00900054_m1	VEGFA		
Hs01103749_m1	WT1		

9. Secuenciación de ADN.

Método convencional (Sanger)

Pacientes analizados mediante secuenciación Sanger:

La secuenciación de los genes individuales NPM1 y CEBP α , al igual que FLT3 mediante análisis de fragmentos, se llevó a cabo en todos los pacientes incluidos en la presente tesis doctoral para la detección de mutaciones al diagnóstico. Además, la secuenciación convencional de los 6 genes NPM1, CEBP α , DNMT3A, IDH1/2 y WT1 se utilizó como validación en las primeras etapas de los paneles de secuenciación masiva, que se explicarán más adelante.

Metodología:

La metodología empleada fue la secuenciación Sanger y se llevó a cabo en un secuenciador ABI 3500 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El fundamento de esta técnica es la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) carentes del grupo hidroxilo 3'-OH y marcador con fluoróforos que actúan como terminadores de la cadena de ADN. La reacción de secuenciación se basa en una PCR con estos ddNTPs y los productos de la reacción se separan por tamaños mediante una electroforesis capilar.

El **flujo de trabajo** puede resumirse en los siguientes pasos:

- 1. Realización de una PCR previa del fragmento del gen de interés.**
- 2. Purificación del producto de PCR (Exosap):**

Los productos de PCR de cada una de las muestras se trataron con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) para eliminar los restos de *primers* y de nucleótidos que pudieran haber quedado sin utilizar tras la amplificación. Para ello, se mezclaron 8 μ L del producto de PCR obtenido con 3.2 μ L de ExoSAP-IT y se incubaron a 37°C durante 15 minutos (tiempo en el que la enzima realiza su acción), y a 80°C durante otros 15 minutos para inactivarla. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Veriti (Applied Biosystems).

- 3. Reacción de secuenciación:**

Se utilizó uno de los *primers* (*forward* o *reverse*) de la PCR previa a una concentración de 3.2 μ M, 1 μ L de Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3 μ L del Buffer 5x Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction kit y 5 μ L del producto de ADN purificado previamente con ExoSAP. Se llevó a cabo en un termociclador Veriti® (Applied Biosystems), con un programa que constaba de una primera etapa de activación de la polimerasa a 94°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos que comprendían una fase de

desnaturalización a 96°C durante 10 segundos y una de hibridación a 50°C durante 6 segundos y para terminar, una fase de extensión de la cadena a 60°C durante 4 minutos. Finalmente, el producto de la reacción fue resuspendido en 20 µL de formamida y se sometió a electroforesis capilar.

4. Lectura de las secuencias obtenidas y análisis de los datos mediante los *softwares* Sequencing Analysis y SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

9.1 Mutaciones en el gen NPM1

Las mutaciones en *NPM1* corresponden a inserciones de 4 pb localizadas en el exón 12 del gen. Mediante la técnica de análisis de fragmentos (GeneScan) descrita previamente (apartado 6.2), se detectaron los casos mutados cuando los productos de PCR eran 4pb mayor que el del gen *wild type* (17).

Para determinar el tipo de mutación (A, B u otras menos comunes) y permitir la posterior cuantificación mediante RQ-PCR con *primers* específicos en las muestras de seguimiento, se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos de PCR empleando el mismo *primer* reverso de la PCR. Si la mutación hallada era de tipo A o B, se procedía a su cuantificación por RQ-PCR siguiendo el protocolo descrito por Gorello y cols. como se explica en el apartado 7.2 de este trabajo (7.2 RQ-PCR para cuantificación de mutaciones en *NPM1*).

9.2 Mutaciones en el gen CEBPa

El screening de mutaciones en toda la región codificante del gen (un único exón) se realizó previamente mediante análisis de fragmentos con dos PCR multiplex que involucraban dos parejas de primers cada una. En caso de identificar un cambio de tamaño en alguno/s de los cuatro fragmentos amplificados para cada paciente, se procedió a la secuenciación de dichos fragmentos. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Benthous (Benthous, 2008) empleando ambos cebadores del fragmento de interés (forward y reverso) a una concentración de 3.2 µM.

9.3 Mutaciones en los genes DNMT3A, IDH1, IDH2 y WT1

- **Mutaciones en DNMT3A:**

Se secuenció la segunda mitad del gen *DNMT3A*, que corresponde a los dominios metiltransferasa y dedos de zinc. Esta parte del gen ha sido descrita como la zona donde se localizan más del 95% de las mutaciones, incluyendo la mutación más frecuente R882, y comprende los exones del 11 hasta el final (exón 23) (24). A partir de muestras de cDNA, se realizaron dos PCR distintas para cada paciente, cada una con una pareja de primers (A y C) y los productos se purificaron y secuenciaron empleando cuatro posibles *primers forward*, dos de ellos situados en los extremos de los fragmentos (Ay C) y otros dos más internos (B y D), siguiendo las especificaciones descritas por Ribeiro et al (25).

- **Mutaciones en IDH1 e IDH2:**

Los genes *IDH1* e *IDH2* presentan *hotspots* de mutación muy concretos, en ambos casos localizados en el exón 4. Esta región de cada gen fue amplificada mediante PCR y posteriormente secuenciada con los *primers forward* según el procedimiento de Marcucci et al (26).

- **Mutaciones en WT1:**

Las mutaciones en el gen *WT1* se localizan en los exones 7 y 9 (27). Para su estudio mediante secuenciación Sanger, se siguió el método propuesto por Hou et al (28) en el que se realiza una PCR para cada exón y se secuencian los productos de PCR empleando el *primer forward* de cada uno de los fragmentos.

10. Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing-NGS)

10.1 Introducción y conceptos generales

La tecnología de secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés) permite conocer información de múltiples genes de forma simultánea. Se trata de un conjunto de métodos bioquímicos desarrollados para este fin que se detallarán en los apartados siguientes.

Tipos de paneles de NGS: Paneles basados en Amplicones o Captura

El tipo de secuenciación masiva que se empleó en los trabajos de la presente tesis doctoral se conoce como Secuenciación Dirigida. Consiste en secuenciar sólo las regiones de interés, en lugar del genoma o exoma completo. Para ello, el primer paso es seleccionar dicha región del ADN y aislarla del resto del genoma de la célula. Existen varios enfoques para llevar a cabo la selección del ADN que se desea secuenciar (29), de los cuales en la actualidad prevalecen dos fundamentalmente:

- 1- **Selección de regiones genómicas basada en amplicones.** Implica la amplificación y purificación del ADN deseado usando sets de oligos específicos en PCR multiplex.
- 2- **Selección de regiones genómicas basada en captura.** Las zonas de interés son capturadas mediante hibridación con sondas biotiniladas y posteriormente aisladas por separación magnética.

Proceso de secuenciación en la plataforma Illumina: Secuenciación por síntesis

Una vez seleccionadas las regiones genómicas de interés y aisladas del resto del genoma, se procede a su secuenciación en la plataforma Illumina, cuyo funcionamiento se detalla a continuación.

El primer paso es la amplificación del ADN mediante la generación de puentes, tal y como se muestra en la [Figura 1](#). Para llevar a cabo este paso, se emplea un conjunto de adaptadores específicos de Illumina, que se fusionan a los extremos de los fragmentos del ADN para permitir su adhesión a la celda de flujo (*flow cell*). Esta adhesión es necesaria para llevar a cabo el proceso de amplificación por parte de la ADN polimerasa, encargada de generar múltiples copias de los fragmentos de ADN o *clusters* a partir de un fragmento de ADN inicial.

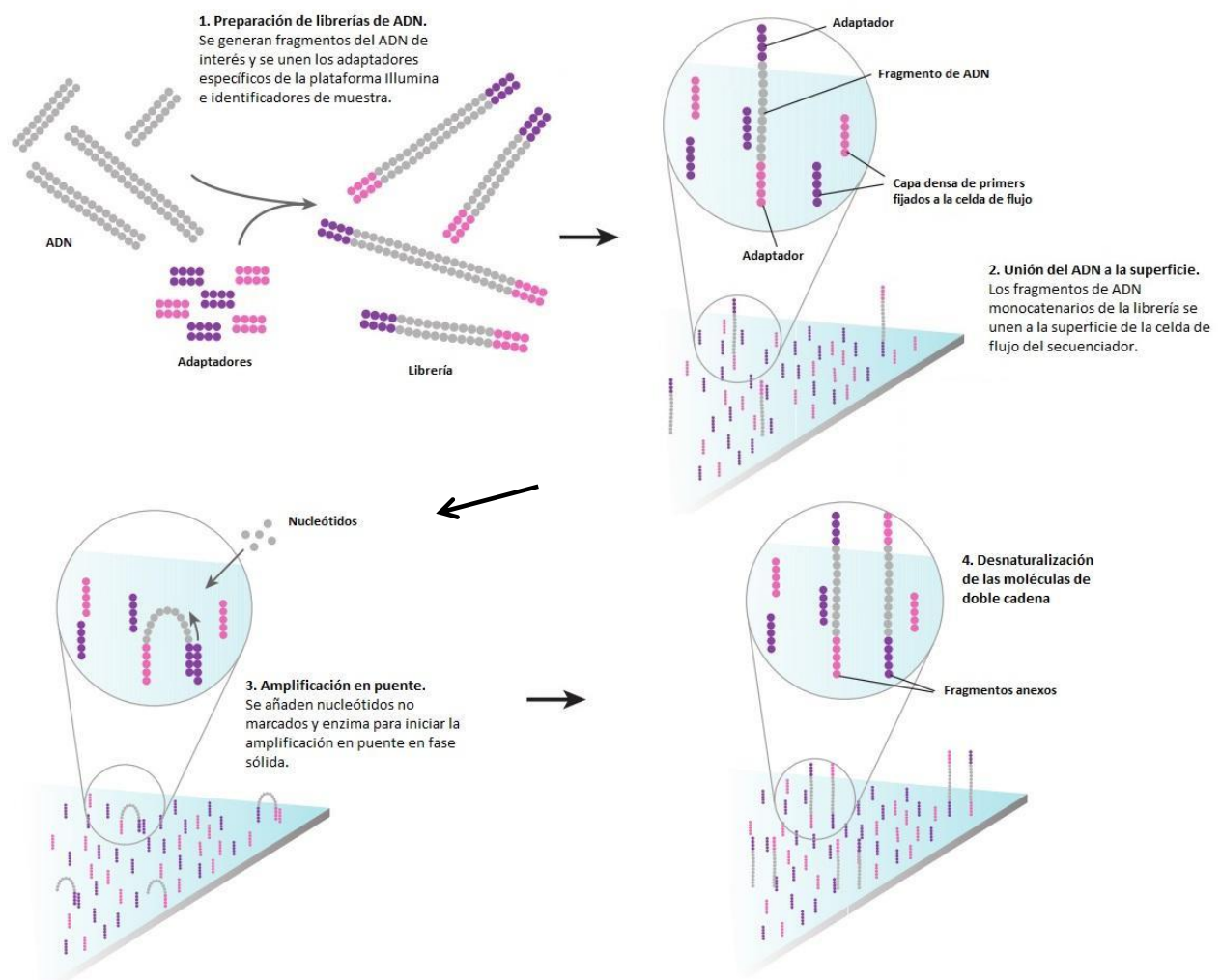


Figura 1. Proceso de secuenciación por síntesis de la plataforma Illumina. (continúa)

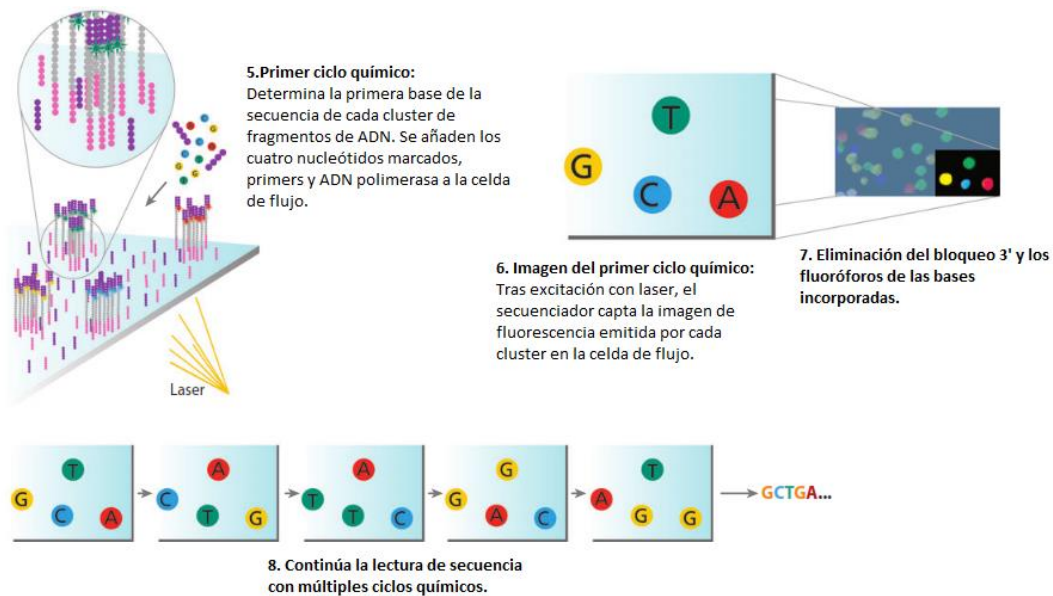


Figura 1 (continuación). Proceso de secuenciación por síntesis de la plataforma Illumina. Tras la preparación de la librería y su carga en el secuenciador, se forman *clusters* (conjuntos) de hebras de ADN mediante amplificación en forma de puente en la superficie de la celda de flujo. A continuación, se añaden los cuatro nucleótidos OH-bloqueados y la enzima ADN polimerasa. Las cadenas de ADN de cada *cluster* incorporan un nuevo nucleótido en cada ciclo. El resto de los nucleótidos y la enzima se eliminan mediante lavado. El sistema óptico del secuenciador capta la imagen de la celda de flujo, con distintas fluorescencias en las distintas posiciones. Esta fluorescencia se elimina con agentes químicos específicos preparando así los *clusters* de moléculas de ADN para otra ronda de incorporación de nucleótidos fluorescentes.



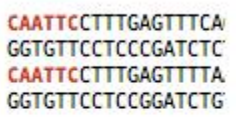

Cada *cluster* contiene aproximadamente un millón de copias del fragmento original, suficientes para emitir una señal con la intensidad adecuada para ser detectada cada vez que se incorpora un nucleótido durante el proceso de secuenciación. La secuenciación por síntesis requiere la incorporación, al inicio de cada ciclo, de una mezcla de los cuatro nucleótidos junto con la ADN polimerasa en la celda de flujo. La clave de este sistema es que los nucleótidos se encuentran modificados con un fluoróforo bloqueado en el extremo 3'-OH, lo que impide la adición de otro nucleótido a la nueva cadena hasta que el anterior no haya sido leído y eliminado. Al final de cada ciclo, se realiza un proceso de captación de imagen en el que se identifica el nucleótido que se ha agregado en cada una de las celdas de la placa. A continuación, se elimina el fluoróforo de los nucleótidos y se comienza con otro ciclo desde el principio, siguiendo la síntesis y secuenciación de la hebra de ADN. El número de ciclos dependerá de la longitud del fragmento de ADN y de la longitud de lectura fijada, y determinará el tiempo de secuenciación y la cobertura media final. La tecnología de Illumina permite la secuenciación tipo *paired-end*, es decir, por ambos extremos del fragmento, en lugar de solo por uno (*single-end*). Este tipo de secuenciación ofrece

una gran ventaja a la hora de realizar el alineamiento de las secuencias leídas contra el genoma de referencia, ya que permite estimar el tamaño del fragmento original y situarlo con mayor precisión en el genoma, mejorando así la cobertura de las zonas de interés. También resulta útil a nivel de detección de variantes estructurales (30).

Flujo de trabajo:

El flujo de trabajo para la secuenciación se sintetiza en la tabla siguiente (Tabla 5) y se desarrolla a continuación.

Tabla 5. Flujo de trabajo de la secuenciación masiva con la tecnología de Illumina

Preparación de librerías de ADN	Secuenciación en MiSeq (Illumina)	Generación de archivos en el secuenciador	Análisis final
		 CAATTCCTTTGAGTTTCA GGTGTTCCTCCCGATCTC CAATTCCTTTGAGTTTCA GGTGTTCCTCCCGATCTG	 GGGCTTATACGACGGG
<ul style="list-style-type: none"> . Diseño/elección de la región genómica de estudio (panel) . Generación de librerías (amplicones o captura) 	<ul style="list-style-type: none"> . Programación del secuenciador . Carga de reactivos (celda de flujo, buffer y cartucho) 	<ul style="list-style-type: none"> . Demultiplexado . Alineamiento con el genoma de referencia (opcional) . Identificación de variantes (opcional) 	<ul style="list-style-type: none"> . Programas: VariantStudio v2.0 y Enrichment (Illumina); IGV (Genome Browser). . Pipelines propios . Interpretación de variantes

1. **Preparación de librerías.** Consiste en generar, a partir de una muestra de ADN genómico total, una colección de fragmentos de tamaño homogéneo a los que se les añaden secuencias nucleotídicas para identificar cada muestra (índices) y para llevar a cabo la secuenciación (adaptadores). Cuando se trata de secuenciación dirigida, como en este caso, los fragmentos de ADN de la librería pertenecerán exclusivamente a las regiones que se quieren secuenciar, descartando el resto del genoma. Para ello, se utilizó un método basado en amplicones y otro basado en captura con sondas, que se detallarán en los apartados posteriores.
2. **Secuenciación en MiSeq.**
 - a. Programación del secuenciador para la carrera:
 - i. Creación del archivo *Sample sheet*.- Se trata de un documento de texto donde se especifican las muestras incluidas en cada experimento y parámetros clave como la longitud de lectura deseada y los índices empleados para cada muestra, de modo que las lecturas de cada paciente puedan ser identificadas.

- ii. Selección del archivo *Manifest* (opcional)- Es el documento de texto donde figuran las posiciones genómicas (coordenadas) de las regiones de ADN de estudio. En el caso de que se desee analizar con un *pipeline* externo propio en lugar de utilizar los alineadores y programas del secuenciador, no será necesario aportar el archivo *Manifest*, ya que únicamente se requerirán los datos de las lecturas sin alinear (archivos FASTQ).
- b. Carga de reactivos en el secuenciador en el siguiente orden:
 - i. Celda de flujo (*flow cell*), previa limpieza con agua y etanol 70% y secado con papel.
 - ii. Botella con solución SBS de (PR2).
 - iii. Cartucho que contiene los reactivos necesarios para la química de Illumina, y el *pool* de librerías añadido previamente.

3. Generación de los archivos en el secuenciador.

- a. **OPCIÓN 1.** Sólo datos crudos (FASTQ), cuando se va a realizar el análisis con un *pipeline* externo al secuenciador.
- b. **OPCIÓN 2.** Las secuencias son alineadas y las variantes reportadas usando las herramientas del secuenciador, de modo que se obtienen, además de archivos FASTQ, archivos alineados (BAM) y archivos con información sobre las variantes encontradas respecto al genoma de referencia (archivos VCF).

4. Análisis de variantes por parte del usuario.

a. Programas de análisis:

- Software VariantStudio v2.0 (Illumina).- Se utiliza para el análisis de mutaciones génicas.
- Aplicación Enrichment (Illumina).-Se emplea para el análisis de variantes estructurales cromosómicas.

b. *Pipelines* propios:

Se trata de una sucesión de algoritmos bioinformáticos destinados a analizar los datos obtenidos mediante secuenciación masiva. Esta opción se emplea cuando son necesarias herramientas bioinformáticas personalizadas que no están implementadas en *softwares* de fácil manejo. En este trabajo, se utilizaron tres *pipelines* propios para el análisis de variantes estructurales cromosómicas, basados en los algoritmos Delly2, GASV y Lumpy.

c. Programas para apoyar el análisis:

- IGV (Integrative Genomics Viewer) (Broad Institute).- Se trata de un visualizador de secuencias alineadas para confirmar los resultados.

d. Interpretación de resultados: Valor clínico de las variantes:

- El último paso consiste en descifrar el interés clínico-biológico de la información genética obtenida. Para ello, es necesario contrastar la información de las variantes en distintas bases de datos genéticos disponibles actualmente (COSMIC, ExAC, 1000 Genomes Project, etc) así como en la bibliografía.

- Principales bases de datos de variantes genéticas:

COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*).- Base que combina datos sobre mutaciones en cáncer seleccionados manualmente a partir de la literatura científica, con los resultados del *Cancer Genome Project* (CGP), del Instituto Sanger (Reino Unido), y el proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Incluye información de más de 32000 genomas (31).

ExAC.- Catálogo de información genética fruto del Consorcio de Agregación de Exomas (ExAC, en sus siglas en inglés), una coalición de investigadores dedicada a reunir y homogeneizar los datos de secuenciación de exomas obtenidos en diferentes proyectos internacionales. Los primeros resultados de ExAC describen el análisis de los exomas de más de 60.000 personas de diversas poblaciones y proporcionan información biológica y clínica (32).

ClinVar.- Archivo público que informa de las relaciones entre variantes genéticas humanas y sus fenotipos asociados (33).

Proyecto 1000 Genomes (2008-2015).- Catálogo de variantes humanas y datos genotípicos en general. Las muestras secuenciadas para este proyecto son anónimas y no tienen datos médicos o de fenotipo asociados, únicamente la etnia y el género. Todos los participantes se declararon sanos en el momento en que se recolectaron las muestras. Su objetivo era encontrar la mayoría de las variantes genéticas con frecuencias de al menos 1% en las poblaciones estudiadas (34).

dbSNP.- Base de datos establecida en 1999 por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Su información se integra con la de otros recursos del NCBI, como GenBank o PubMed. Incluye variantes germinales y somáticas de múltiples especies, tanto aquellas asociadas con enfermedades como polimorfismos neutros (35).

10.2 Estudios de NGS realizados

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral se desarrollaron dos estrategias de secuenciación masiva: una de ellas basada en la tecnología de amplicones para analizar mutaciones génicas (PANEL NGS 1), y otra basada en la tecnología de captura para el estudio simultáneo de variantes estructurales y mutaciones puntuales

(PANEL NGS 2). Estos dos paneles incluían genes relacionados con la leucemia mielobástica aguda y sus características se detallarán a continuación.

Los estudios de NGS se llevaron a cabo con la tecnología de Illumina (San Diego, CA) y con el secuenciador MiSeqDx.

10.2.1 NGS basada en amplicones para el análisis de mutaciones puntuales e indels cortas.

Pacientes secuenciados con este panel:

PANEL NGS 1

Este panel se utilizó para:

- . Capítulo 1: estudio de mutaciones somáticas en 198 pacientes con LMA de riesgo favorable.
- . Capítulo 2: validación de un panel propio basado en captura en 30 pacientes.
- . Capítulo 3: estudio de mutaciones germinales y somáticas en una familia de 6 miembros.

Descripción del panel:

Se trata de un panel comercial basado en amplicones (TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina) para analizar las mutaciones que afectan a **54 oncogenes y genes supresores de tumores**, seleccionados por su relevancia clínica en la LMA (Tabla 6).

Tabla 6: Descripción de los 54 genes y sus regiones concretas incluidas en el panel de NGS TruSight Myeloid Panel (Illumina).

Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones	Gen	Exones
ABL1	4-6	DNMT3A	Completo	KDM6A	Completo	RAD21	Completo
ASXL1	12	ETV6/TEL	Completo	KIT	2,8-11,13+17	RUNX1	Completo
ATRX	8-10	EZH2	Completo	KRAS	2+3	SETBP1	4 (parcial)
BCOR	Completo	FBXW7	9+10+11	MLL	5-8	SF3B1	13-16
BCORL1	Completo	FLT3	14+15+20	MPL	10	SMC1A	2,11,16+17
BRAF	15	GATA1	2	MYD88	3-5	SMC3	10,13,19,23,25
CALR	9	GATA2	2-6	NOTCH1	26-28+34	SRSF2	1
CBL	8+9	GNAS	8+9	NPM1	12	STAG2	Completo
CBLB	9,10	HRAS	2+3	NRAS	2+3	TET2	3-11
CBLC	9,10	IDH1	4	PDGFRA	12,14,18	TP53	2-11
CDKN2A	Completo	IDH2	4	PHF6	Completo	U2AF1	2+6
CEBPA	Completo	IKZF1	Completo	PTEN	5+7	WT1	7+9
CSF3R	14-17	JAK2	12+14	PTPN11	3+13	ZRSR2	Completo
CUX1	Completo	JAK3	13				

Preparación de las librerías:

Antes de empezar, las muestras de ADN se cuantificaron con el kit Qubit dsDNA Broad Range (Invitrogen, Life Technologies) para partir de 50 ng de ADN genómico de cada muestra. Las librerías se construyeron siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (documento FC-130-9008DOC, mayo 2014) como se explica a continuación.

- Construcción de las librerías:

En primer lugar, se realizó la hibridación de las muestras de ADN genómico no fragmentado con un pool de oligonucleótidos flanqueantes de los fragmentos de interés (5 ul). Posteriormente, se llevó a cabo un lavado con bolas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., Brea CA) para eliminar el exceso de oligos no hibridados. Tras el lavado, se inició un proceso de Extensión-Ligación, mediante el cual la ADN-polimerasa añade nucleótidos desde cada oligo *upstream* a lo largo de la cadena molde de ADN y una enzima ligasa une el extremo 5' del oligo *downstream*. A continuación, se separaron de los productos de extensión -ligación del resto de ADN genómico mediante un nuevo lavado con bolas magnéticas Agencourt AMPure XP. Seguidamente, los productos obtenidos se amplificaron mediante PCR para incluir las secuencias identificadoras de paciente, que nos permitirán mezclar posteriormente todas las librerías posteriormente en un único *pool*, y los adaptadores específicos de plataforma (Illumina en nuestro caso) necesarios para la formación de los *clusters* en la celda de flujo durante el proceso de secuenciación. Por último, se purificaron los productos de PCR con bolas magnéticas.

- Normalización de las librerías: generación de un único *pool* de ADN desnaturalizado:

Las librerías de fragmentos obtenidas (una por muestra) se cuantificaron con el kit Qubit dsDNA Broad Range (Invitrogen, Thermo Fisher), obteniéndose concentraciones de entre 60ng/ul y 100 ng/ul. Adicionalmente, se analizó el tamaño medio de fragmentos mediante electroforesis con el kit D1000 de TapeStation 4200 (Agilent Technologies), que consta de un marcador de peso molecular (Ladder) y un buffer diseñados para examinar moléculas de ADN de entre 35 y 1000 pb, obteniéndose tamaños en torno a los 350 pb, según lo esperado.

- Preparación y carga del pool de ADN en el cartucho de secuenciación:

Cada librería fue diluida hasta una concentración de 4nM y se generó un pool equimolar mezclando 5 ul de cada una de ellas. Los fragmentos de ADN de este pool (doble cadena) fueron desnaturalizados mediante la incubación con NaOH 0,2 N durante 5 minutos. Este paso es imprescindible para la posterior formación de los *clusters* en la celda de flujo dentro del secuenciador. Finalmente, el *pool* de fragmentos de ADN de cadena simple fue diluido hasta una concentración final de 16 pM con el buffer de hibridación HT1 (Illumina) y se cargaron 600 ul en el cartucho del kit MiSeq Reagent v3 x 600 clicos (Illumina), con capacidad para 25 millones de lecturas, y que permite longitudes de lectura de hasta 300 pb x 300 pb en secuenciación bidireccional.

Secuenciación en MiSeq (Illumina):

Se llevó a cabo de forma bidireccional (paired-end) con una longitud de lectura de 201 pb en el equipo MiSeqDx (Illumina).

El control de calidad del proceso de secuenciación se llevó a cabo usando múltiples parámetros en MiSeq Reporter (Illumina) y BaseSpace (Illumina). Algunos de estos parámetros fueron: la profundidad de lectura, la densidad media de *clusters* generados durante la secuenciación, el porcentaje de lecturas alineadas con el

genoma de referencia hg19 y el porcentaje de lecturas con *score* de calidad *Phred* mayor de 30 (mide la probabilidad de encontrar una base errónea en 1000).

Análisis de los datos: mutaciones puntuales e indels

Programas empleados:

- **VariantStudio v2.0 (Illumina)**.- Identificación y anotación de variantes.
- **Integrative Genomic Viewer (Broad Institute)** .- Visualización de las secuencias alineadas y verificación de variantes.

El flujo de análisis fue el siguiente:

- Tras el demultiplexado (separación de las secuencias de los distintos pacientes de una misma carrera), el secuenciador genera dos archivos FASTQ (datos crudos) para cada paciente, correspondiendo cada uno a una dirección de lectura (*paired-end*). En estos archivos FASTQ, las lecturas de secuencia están recogidas en formato FASTA, con un valor de calidad (Q) para cada nucleótido.
- Las secuencias de nucleótidos son alineadas frente al genoma humano de referencia (GRCh37/hg19) en el software MiSeqReporter del secuenciador, que emplea la herramienta de alineamiento Smith-Waterman, generándose archivos tipo BAM (secuencias alineadas).
- A continuación, la herramienta Somatic Variant Caller lleva a cabo el análisis de variantes en las regiones especificadas, obteniéndose archivos tipo VCF con las variantes encontradas en el ADN de cada paciente.
- Estos archivos VCF se analizaron con el programa VariantStudio (Illumina) y con el apoyo del visor de secuencias IGV (GenomeBrowser) y fueron procesados aplicando los siguientes filtros:
 - ✓ **CALIDAD de las lecturas.** Eliminación de las variantes de baja calidad (minimum genotype quality GQX<80).
 - ✓ **CONSECUENCIA de la variante en la proteína.** Eliminación de las mutaciones sinónimas (tripletes que codifican para el mismo aminoácido). Se tuvieron en cuenta las mutaciones de cambio de sentido o *missense* (producen cambio de aminoácido), sin sentido o *nonsense* (aparece un triplete de terminación) y de cambio de marco de lectura o *frameshift* (inserción o deleción de un número de bases que no es múltiplo de 3 por lo que suele aparecer un triplete de terminación).
 - ✓ **PROFUNDIDAD.** Número de veces que una base del ADN es leída durante el proceso de secuenciación. Se estableció el umbral en 100x. No se tuvieron en cuenta las variantes encontradas en posiciones leídas menos de 100 veces.
 - ✓ **FRECUENCIA alélica de la variante (VAF (%), variant allele frequency).** La VAF se obtiene dividiendo el número de lecturas con la variante entre el número de lecturas totales para esa posición del genoma.

Todas las variantes con una VAF<5% fueron descartadas. En el caso de variantes somáticas conocidas, frecuentes y con valor pronóstico ampliamente descrito en LMA, se fijó el umbral de VAF en 3%, con el objetivo de no infraestimar la presencia de mutaciones subclonales (mutaciones presentes sólo en algunas de las células tumorales) de mal pronóstico.

- ✓ **POLIMORFISMOS o SNPs (*single nucleotide polymorphisms*)**. Se eliminaron aquellas variantes con frecuencias superiores al 1% en la población. Bases de datos empleadas: 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Exome Variant Server (EVS), dbSNP, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC).

10.2.2 NGS basada en captura para la detección de mutaciones puntuales, indels y reordenamientos cromosómicos a nivel de ADN

PANEL NGS 2

Pacientes secuenciados con este panel:

Este panel se utilizó para:

- . Capítulo 2: diseño de un panel propio basado en captura y validación en 30 pacientes.

Diseño de un panel de secuenciación masiva basado en tecnología de captura:

Diseñamos un panel de secuenciación masiva a medida para analizar simultáneamente las mutaciones en genes potencialmente involucrados en el desarrollo y/o pronóstico de la LMA, así como las traslocaciones más relevantes por su utilidad en el diagnóstico y pronóstico o como dianas para seguimiento de enfermedad mínima residual. La tecnología de enriquecimiento elegida fue la captura de las regiones de interés con sondas específicas, debido a su potencial capacidad para captar zonas del ADN traslocadas en las que una de las dos partes se desconoce, al contrario que en el caso de la tecnología de amplicones (ver “Tipos de paneles de NGS” en apartado 10.1).

Las alteraciones estudiadas mediante este diseño fueron las siguientes:

1. **MUTACIONES:** se incluyeron **32 genes recurrentemente mutados en LMA** (oncogenes, genes supresores de tumores, genes implicados en epigenética, etc). Dependiendo del gen a estudiar, se decidió capturar la región codificante completa cuando las mutaciones aparecen en regiones amplias, o solamente los puntos más frecuentes de mutación (*hotspots*), como en el caso de NPM1 que tiene *hotspots* bien definidos.

Tabla 7: Listado de 32 genes incluidos para estudio de mutaciones y las correspondientes regiones capturadas.

ABL1	exones 4-9	KRAS	exones 2-4
ASXL1	exón 12	MLL (KMT2A)	todos los exones
BCOR	todos los exones	MPL	exón 10
CALR	exón 9	NPM1	exón 12
CBL	exones 8, 9	NRAS	exones 2-4
CEBPA	todos los exones	PTPN11	exones 3,13
DNMT3A	todos los exones	SETBP1	exón 4 (parcial)
ETV6	todos los exones	SF3B1	exones 13-16
EZH2	todos los exones	SMC3	exones 10, 13, 19, 23, 25, 28
FLT3	exones 14, 15, 16, 20	SRSF2	exón 1
GATA2	exones 2-6	STAG2	todos los exones
IDH1	exón 4	TET2	exones 3-11
IDH2	exón 4	TP53	exones 2-11, intrones 2, 3, 5, 8, 9
IKZF1	todos los exones	U2AF1	exones 2, 6
JAK2	exones 12, 14	WT1	exones 7, 9
KIT	exones 2, 8-11, 13, 17	RUNX1	todos los exones

2. REORDENAMIENTOS:

2.1 _Traslocaciones e inversiones más frecuentes: t(15;17), t(8;21), inv(16), t(9;11) y t(9;22). Dado que en estas traslocaciones los puntos de rotura cromosómicos están bien definidos, se incluyeron regiones de ambos lados del potencial reordenamiento para aumentar la probabilidad de detección. Pueden ser zonas de rotura intrónicas o exónicas y se secuenciaron desde ambos genes de la fusión. La ventaja de la tecnología de captura con sondas empleada en este diseño es que se pueden detectar nuevas traslocaciones de estos genes con otros distintos, lo que permite identificar variantes moleculares de algunas de ellas.

Reordenamiento	Genes fusionados (ambos incluidos en el panel)
t(9;22)	BCR-ABL1 (p190, p210, p230)
t(15;17)	PML-RAR α (bcr1,bcr2,bcr3)
inv(16)	CBF β -MYH11 (A, D, E)
t(8;21)	RUNX1-RUNX1T1
t(9;11)	MLL-MLLT3

2.2. Traslocaciones e inversiones poco frecuentes. Por su baja incidencia o debido a que a veces la traslocación no se produce siempre entre los mismos cromosomas y los genes pueden fusionarse con varias parejas o *partners*, se decidió secuenciar solamente desde uno de los dos genes de la fusión y detectar la traslocación sin aumentar demasiado el tamaño del panel.

Gen incluido en el panel	Genes de fusión más frecuentes
MLL (11q23)	t(6;11) MLL-MLLT4(AF6) / t(11;19) MLL-ELL / t(11;19) MLL-MLLT1(ENL)
NUP98	t(5;11) NUP98-NSD1 / t(7;11) NUP98-HOXA9
PDGFRA	FIPI1L1-PDGFRA
PDGFRB	t(5;12) ETV6-PDGFRB
FGFR1	ZNF198-FGFR1 y otros partners
NUP214*	t(6;9) DEK-NUP214
Región intergénica GATA2-RPN1(3q21)	inv(3)/t(3;3) RPN1-MECOM**
RUNX1 (intrón 7)	t(3;21) RUNX1-MECOM
ETV6	t(3;12) ETV6-MECOM
KAT6A	t(8;16) KAT6A-CREBBP

*NUP214=CAN; **MECOM=EVI1

Las coordenadas genómicas de las regiones elegidas se obtuvieron de la base de datos de University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC) así como las secuencias del genoma de referencia GRCh37/hg19 <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/>, último acceso en noviembre de 2015.

(Tabla Suplementaria S1. Diseño: coordenadas genómicas de las regiones incluidas en el panel)

La química de secuenciación masiva elegida fue la captura con sondas de Nextera Rapid Custom Capture (Illumina, San Diego, CA, USA). El panel se diseñó en la plataforma DesignStudio (<https://designstudio.illumina.com>, Illumina) y se optimizó con 3741 sondas específicas de 80 pb de longitud. Para las regiones difíciles de secuenciar, se aumentó la densidad de sondas adicionales para garantizar una cobertura suficiente y minimizar así los resultados falsos negativos. El diseño permitió una cobertura horizontal de toda la región de interés (701.987 pb) del 99%.

Preparación de las librerías:

Las librerías se prepararon siguiendo las instrucciones del protocolo de captura Nextera Rapid Capture Enrichment Reference Guide (documento 15037436 v01, enero 2016) a partir de 50 ng de ADN genómico de cada muestra.

- Fragmentación de las muestras de ADN:

Las 31 muestras se procesaron en 3 sets (3 librerías: 10, 10 y 11 muestras). El ADN fue sometido a fragmentación enzimática durante 10 minutos a 58°C empleando una cantidad de enzima Tagment DNA Enzyme (Illumina) menor de lo fijado en el protocolo (5 ul) con el objetivo de obtener fragmentos más largos, aumentando así la probabilidad de capturar los puntos de corte de las traslocaciones. Para conocer el tamaño medio, así como la integridad de los fragmentos de cada librería, una pequeña alícuota se analizó mediante electroforesis en el

equipo TapeStation 4200 (Agilent Technologies) con el kit D1000, que permite analizar fragmentos de ADN de entre 35 y 1000 pb. Tras el proceso de fragmentación, se realizó un lavado con bolas magnéticas (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter) para eliminar los restos de complejos enzimáticos de Nextera que, de otro modo, podrían unirse al ADN interfiriendo en los pasos posteriores.

A continuación, mediante 10 ciclos de PCR se amplificó el ADN fragmentado y se añadieron las secuencias identificadoras de cada paciente (index 1 e index 2) y los adaptadores necesarios para el proceso de secuenciación, concretamente para la amplificación de los *clusters* de fragmentos de ADN en la celda de flujo del secuenciador. Posteriormente, se llevó a cabo un segundo lavado con bolas AMPure XP, para purificar las librerías de ADN, eliminando el exceso de reactivos.

- Normalización: generación de un *pool*:

Las librerías fragmentadas e identificadas se cuantificaron mediante fluorimetría con el kit Qubit dsDNA Broad Range (Invitrogen, Thermo Fisher) y se mezclaron 500 ng de cada una de ellas para generar un único *pool* equimolar.

- Hibridación y captura de las regiones de interés:

A continuación, se llevó a cabo la primera hibridación con sondas biotiniladas específicas de las regiones de interés, que consistió en un paso previo de 95°C durante 10 minutos, seguidos de una rampa de temperaturas desde 94°C hasta 58°C con una bajada de 2°C por ciclo y para finalizar una incubación de 90 minutos a 58°C. Las regiones unidas a las sondas biotiniladas, fueron capturadas con bolas de Streptavidina. Este proceso de hibridación y captura se repitió bajo las mismas condiciones. Tras ello, se procedió de nuevo a un lavado con bolas AmpureXP para purificar las librerías capturadas antes de amplificarlas. Finalmente, se realizó una PCR de 12 ciclos para amplificar el ADN capturado y asegurar así la especificidad del ADN a secuenciar y aumentar el rendimiento.

- Preparación y carga del *pool* de ADN en el cartucho de secuenciación:

La cuantificación del *pool* final se realizó con el kit Qubit dsDNA High Sensitivity Assay (Thermo Fisher Scientific) para asegurar una densidad de *clusters* óptima en la celda de flujo. El *pool* de librerías se desnaturalizó con NaOH 0.2 N durante 5 minutos y, previa dilución con el buffer de hibridación HT1, se cargó a una concentración de 14 pM en cartuchos MiSeq Reagent v3 de 600 ciclos (Illumina), que contienen los reactivos necesarios para la reacción de secuenciación.

Secuenciación en MiSeq (Illumina):

Las librerías cargadas fueron sometidas a secuenciación bidireccional (paired-end) con una longitud de lectura de 251 pb en el equipo MiSeqDx (Illumina).

El control de calidad de la secuenciación se realizó con los múltiples parámetros de calidad incluidos en MiSeq Reporter (Illumina) y BaseSpace (Illumina). Algunos de estos parámetros son la densidad de *clusters* generados durante el proceso de secuenciación, el número de lecturas totales cuya calidad supera los filtros del secuenciador, el porcentaje de estas lecturas de secuencias que pertenece a la región de interés (*on target*) y la cobertura media de la región *on-target*.

Análisis de los datos: mutaciones génicas y reordenamientos

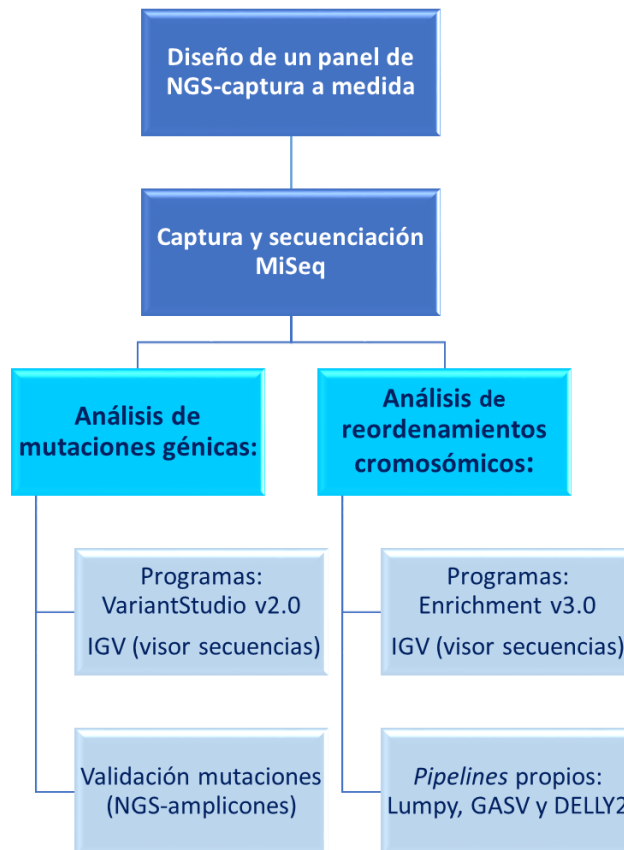


Figura 2: Representación esquemática de los métodos de análisis empleados para el panel de NGS basado en captura.

a. Análisis de mutaciones puntuales mediante NGS:

Se llevó a cabo del mismo modo que en el caso del panel anteriormente descrito, basado en amplicones (PANEL NGS 1): mediante el software VariantStudio v2.0 (Illumina) y el visor de secuencias alineadas IGV (*Genome Browser*). Se aplicaron los mismos flitros de calidad y, tras descartar los polimorfismos, las mutaciones sin sentido

y el resto de las alteraciones no valorables, se seleccionaron las variantes que serán expuestas en los capítulos de RESULTADOS.

Validación de las mutaciones encontradas:

En todos los casos, se compararon las mutaciones obtenidas mediante este nuevo panel de captura (PANEL NGS 2) con el panel de genes basado en la tecnología de amplicones (PANEL NGS 1) (TruSight Myeloid Sequencing Panel, Illumina) con el que se tenía experiencia en nuestro laboratorio, como se ha explicado anteriormente. Todos los genes incluidos en este panel personalizado basado en captura estaban incluidos también en el panel de amplicones.

b. Análisis de reordenamientos (traslocaciones e inversiones) mediante NGS:

Para este análisis se partió de los archivos FASTQ que contienen las lecturas (datos crudos) y se realizó en la **aplicación Enrichment 2.1.1 (Illumina)**. Esta herramienta integra varios algoritmos, destacando el alineador Isaac y el *variant caller* de variantes estructurales MANTA (36). Se trata de una aplicación sencilla, rápida y que no requiere programas adicionales, por lo que resultaba atractiva para su implantación en la práctica rutinaria.

Para evitar falsos negativos, se emplearon además **tres pipelines propios** optimizados para el análisis de reordenamientos, que incluían varias herramientas bioinformáticas. En primer lugar, se comprobó la calidad de los archivos FASTQ empleando el algoritmo FASTQC. Seguidamente, las lecturas se alinearon con el genoma de referencia (Ensembl build GRCh37/hg19) usando el alineador de Burrows-Wheeler (BWA, version 0.7.12-r1039) mediante el algoritmo *BWA-MEM*. Los alineamientos duplicados se detectaron con *samblaster* (version 0.1.24). Los archivos SAM resultantes fueron transformados en archivos BAM, ordenados por posición e indexados, con el programa *samtools* (version 1.3.1). A continuación, se utilizaron tres herramientas diferentes para identificar las traslocaciones e inversiones genómicas: *Delly2* (v. 0.7.7), *GASV* (v. 2.0) y *Lumpy* (v. 0.2.13), con los parámetros que vienen por defecto. En el caso de *Delly2*, se consideraron fiables aquellas traslocaciones con 5 o más lecturas *paired-end* y con al menos una calidad de mapeo media de 20 (*filter* PASS), y las inversiones fueron fiables con 3 o más lecturas. En el caso de *GASV*, se seleccionaron las predicciones de reordenamientos con 4 o más lecturas pareadas, independientemente del tipo de evento. Para el algoritmo *Lumpy* se procedió del mismo modo que con *GASV*. El genotipado de las variantes estructurales de *Lumpy* se llevó a cabo con *SVtyper*.

10.3 Validación de las mutaciones mediante secuenciación convencional (Sanger)

Adicionalmente, las mutaciones identificadas mediante los dos paneles de NGS empleados (PANEL 1 NGS: amplicones y PANEL 2 NGS: captura) en los genes *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *IDH1-2* y *WT1* fueron validadas mediante secuenciación Sanger siguiendo los procedimientos que se detallan en el punto 9: “Secuenciación de ADN. Método convencional (Sanger)”.

11. Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete informático SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL). Para el análisis **univariante** de factores asociados a riesgo de recaída se utilizó la prueba de *chi* cuadrado para variables categóricas, las pruebas paramétricas t de *Student* y ANOVA, además de las no paramétricas (U de Mann-Whitney), para variables continuas.

El análisis **multivariante** se realizó mediante el modelo de regresión múltiple de Cox (paso a paso), donde se incluyeron las variables que en el análisis univariante mostraban relación con la supervivencia con un grado de significación estadística $p < 0.05$ o que en estudios previos hubiese sido demostrado su valor pronóstico. Para estimar el peso de una variable en el análisis multivariante se calcularon las *hazard ratio* (HR) o razón de tasas.

La **supervivencia libre de recaída (SLR)** fue definida como el período de tiempo entre la remisión completa (RC) y la primera recaída, según los criterios previamente descritos, o la última muestra de seguimiento registrada. La **supervivencia global (SG)** hace referencia al período de tiempo entre la remisión completa y la fecha de muerte del paciente o la última muestra de seguimiento registrada, con independencia del estado de la enfermedad. La probabilidad de SLR o SG fue calculada utilizando el método de Kaplan-Meier. Las comparaciones entre las curvas de supervivencia de los distintos grupos de pacientes se realizaron mediante el test Log-Rank. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de p inferiores a 0.05.

Las curvas de supervivencia se realizaron con el programa Graph Pad Prism v6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Las figuras de los perfiles de mutaciones se llevaron a cabo con la función *Waterfall* del paquete GenVisR “Genomic Visualizations in R”.

Tablas suplementarias:

Tabla suplementaria S1.A. Detalles de las regiones genómicas incluidas en el diseño del panel de NGS a medida para el análisis de reordenamientos cromosómicos, obtenidas de la base de datos University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC). Versión del genoma: hg19.

Target	Cromosoma	Gen	Exones/ Intrones	Coordenadas genómicas Inicio	Coordenadas genómicas Fin	Tamaño (pb)	Cadena ADN	ID Tránsito (RefSeq)
REORDENAMIENTOS:								
BCR-ABL1								
	9	ABL1	intrón1b	133589843	133729450	139.608	for	NM_0073132
p190	22	BCR	intrón 1	23524427	23595985	71.559	for	NM_0043273
p210	22	BCR	intrón 13	23631809	23632525	717	for	
p210	22	BCR	intrón 14	23632601	23634727	2.127	for	
p230	22	BCR	intrón 19	23654024	23655073	1.050	for	
Reordenamientos de MLL (11q23)								
	11	KMT2A (MLL)	intrón 6	118350954	118352429	1.476	for	NM_0011971041
	11	KMT2A (MLL)	exón 7	118352430	118352807	378	for	
	11	KMT2A (MLL)	intrón 7	118352808	118353136	329	for	
	11	KMT2A (MLL)	exón 8	118353137	118353210	74	for	
	11	KMT2A (MLL)	intrón 8	118353211	118354897	1.687	for	
	11	KMT2A (MLL)	exón 9	118354898	118355029	132	for	
	11	KMT2A (MLL)	intrón 9	118355030	118355576	547	for	
	11	KMT2A (MLL)	exón 10	118355577	118355690	114	for	
	11	KMT2A (MLL)	intrón 10	118355691	118359328	3.638	for	
	11	KMT2A (MLL)	exón 11	118359329	118359475	147	for	
	11	KMT2A (MLL)	intrón 11	118359476	118360506	1.031	for	
(site A = bcr1)	9	MLLT3 (AF9)	intrón 5	20413718	20365743	47.976	rev	NM_004529
	6	MLLT4 (AF6)	desde MLL					
	10	MLLT10 (AF10)	desde MLL					
	19	ELL	desde MLL					
	19	MLLT1 (ENL)	desde MLL					
PML-RARA								
	17	RARA	intrón 2	38487649	38504567	16.919	for	NM_000964
bcr1	15	PML	intrón 6	74325756	74326818	1.063	for	

Tabla suplementaria S1.A (continuación)

<i>Target</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Gen</i>	<i>Exones/ Intrones</i>	<i>Coordenadas genómicas Inicio</i>	<i>Coordenadas genómicas Fin</i>	<i>Tamaño (pb)</i>	<i>Cadena ADN</i>	<i>ID Transcrito (RefSeq)</i>
REORDENAMIENTOS:								
bcr2	15	PML	exón 6	74325497	74325755	259	for	NM_00332382
bcr3	15	PML	intrón 3	74315750	74317197	1.448	for	
CBFB-MYH11								
	16	CBFB	intrón 5	67116243	67132612	16.370	for	NM_001755
	16	CBFB	exón 5	67116116	67116242	127	for	
tipo A	16	MYH11	intrón 33	15815278	15814909	370	rev	NM_001040113
tipo D	16	MYH11	intrón 29	15820704	15818850	1.855	rev	
tipo E	16	MYH11	intrón 28	15826420	15820912	5.509	rev	
RUNX1-RUNX1T1								
	21	RUNX1 (AML1)	intrón 6	36231770	36206899	24.872	rev	NM_0017544
	8	RUNX1T1 (ETO)	intrón 2	93088192	93029592	58.601	rev	NM_1756342
NUP98 rearrangements								
	11	NUP98	intrón 11	3774545	3765880	8.666	rev	NM_016320
	11	NUP98	intrón 12	3765738	3765555	9.184	rev	
	5	NSD1	desde NUP98					
	7	HOXA9	desde NUP98					
KAT6A-CREBBP								
	8	KAT6A (MYST3)	intrón 16	41794773	41792386	2.388	rev	NM_006766
	16	CREBBP	desde KAT6A					
DEK-NUP214								
	9	NUP214 (CAN)	intrón 17	134027282	134034769	7.488	for	NM_005085
	6	DEK	desde NUP214					
FIPI1L1-PDGFRB	4	PDGFRA	exón 12	55141008	55141140	133	for	NM_006206
ETV6-PDGFRB	5	PDGFRB	intrón 10	149509319	149506178	3.142	rev	NM_0026093
	12	ETV6	desde PDGFRB					
	4	FIP1L1	desde PDGFRA					
ZNF198-FGFR1 y otros	8	FGFR1	intrón 9	38277050	38275892	1.159	rev	NM_0158503
Reordenamientos de 3q								
3q21: inv(3)/t(3;3)	3q21	GATA2-RPN1	región intergénica GATA2-RPN1	128320813	128212030	108.783	rev	
3q26: t(3;21)	21	RUNX1 (AML1)	intrón 7	36206706	36171760	34.947	rev	NM_001754
3q26: t(3;12)	12	ETV6	intrón 2	11905514	11992073	86.560	for	NM_001987

Tabla suplementaria S1.B Detalles de las regiones genómicas incluidas en el diseño del panel de NGS a medida para el análisis de mutaciones génicas, obtenidas de la base de datos University of California Santa Cruz Genome Browser (UCSC). Versión del genoma: hg19

Target	Cromosoma	Gen	Exones/ Intrones	Coordenadas genómicas Inicio	Coordenadas genómicas Fin	Tamaño (pb)	Cadena ADN	ID Transcrito (RefSeq)
MUTACIONES:								
ABL	9	ABL	exón 4	133738149	133738422	274	for	NM_0073132
			exón 5	133747515	133747600	86	for	
			exón 6	133748246	133748424	178	for	
			exón 7	133750255	133750439	185	for	
			exón 8	133753802	133753954	153	for	
			exón 9	133755454	133755544	90	for	
ASXL1	20	ASXL1	exón 12	31022234	31025141	2.907	for	NM_015338
BCOR	X	BCOR	CDS completa	39910499	40036582	5.265	rev	NM_001123385
CALR	19	CALR	exón 9	13054527	13054727	201	for	NM_004343
CBL	11	CBL	exón 8 + exón 9	119148875	119149423	549	rev	NM_005188
CEBPA	19	CEBPA	CDS completa	33790840	33793430	1.074	rev	
DNMT3A	2	DNMT3A	CDS completa	25455830	25565459	2.858	rev	
ETV6	12	ETV6	CDS completa	11802788	12048325	1.356	for	
EZH2	7	EZH2	CDS completa	148504464	148581441	2.253	rev	
FLT3	13	FLT3	exón 14	28608218	28608351	132	rev	NM_004119
			exón 15	28608024	28608128	105	rev	
			exón 16	28602315	28602425	111	rev	
			exón 20	28592603	28592726	123	rev	
GATA2	3	GATA2	exón 2	128205645	128205874	229	rev	NM_032638
			exón 3	128204569	128205211	642	rev	
			exón 4	128202702	128202848	146	rev	
			exón 5	128200661	128200787	126	rev	
			exón 6	128199861	128200161	300	rev	
IDH1	2	IDH1	exón 4	209113092	209113384	292	rev	NM_005896
IDH2	15	IDH2	exón 4	90631818	90631979	161	rev	NM_002168
IKZF1	7	IKZF1	CDS completa	50344378	50472798	1.557	for	
JAK2	9	JAK2	exón 12	5069924	5070052	128	for	NM_004972
			exón 14	5073697	5073785	88	for	
KIT	4	KIT	exón 2	55561677	55561947	270	for	NM_000222
			exón 8	55589749	55589864	115	for	

Tabla suplementaria S1.B (continuación)

<i>Target</i>	Cromosoma	Gen	Exones/ Intrones	Coordenadas gnómicas Inicio	Coordenadas genómicas Fin	Tamaño (pb)	Cadena ADN	ID Transcrito (RefSeq)
MUTACIONES:								
KIT			exón 9	55592022	55592216	194	for	
			exón 10 + exón 11	55593383	55593708	325	for	
			exón 13	55594176	55594287	111	for	
			exón 17	55599235	55599358	123	for	
KRAS	12	KRAS	exón 2	25398207	25398329	122	rev	NM_033360
			exón 3	25380167	25380346	179	rev	
			exón 4	25378548	25378707	159	rev	
MLL (KMT2A)		MLL (KMT2A)	CDS completa					
MPL	1	MPL	exón 10	43814933	43815030	97	for	NM_005373
NPM1	5	NPM1	exón 12	170837530	170837569	39	for	NM_002520
NRAS	1	NRAS	exón 2	115258670	115258798	128	rev	NM_002524
			exón 3	115256420	115256599	179	rev	
			exón 4	115252190	115252349	159	rev	
PTPN11	12	PTPN11	exón 3	112888121	112888316	195	for	NM_002834
			exón 13	112926827	112926979	152	for	
RUNX1	21	RUNX1	CDS completa					
SETBP1	18	SETBP1	exón 4 (partial)	42531877	42531918	41	for	NM_015559
SF3B1	2	SF3B1	exones 13-14	198267279	198267759	480	rev	NM_012433
			exones 15-16	198266465	198266854	389	rev	
SMC3	10	SMC3	exón 10	112342320	112342400	80	for	NM_005445
			exón 19 (parcial: 8 aa')	112356155	112356178	24	for	
			exón 23	112360781	112360888	108	for	
			exón 25 (partial)	112361782	112361834	52	for	
			exón 28	112362943	112363048	105	for	
SRSF2	17	SRSF2	exón 1	74732880	74733242	362	rev	NM_003016
STAG2	X	STAG2	CDS completa					
TET2	4	TET2	exón 3	106155053	106158597	3.544	for	NM_001127208
			exón 4	106162495	106162590	95	for	
			exón 5	106163990	106164084	94	for	
			exón 6	106164726	106164935	209	for	
			exón 7	106180775	106180926	151	for	
			exón 8	106182915	106183005	90	for	
			exón 9	106190766	106190904	138	for	

Tabla suplementaria S1.B (continuación)

<i>Target</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Gen</i>	<i>Exones/ Intrones</i>	<i>Coordenadas genómicas Inicio</i>	<i>Coordenadas genómicas Fin</i>	<i>Tamaño (pb)</i>	<i>Cadena ADN</i>	<i>ID Transcrito (RefSeq)</i>
MUTACIONES:								
TET2			exón 10	106193720	106194075	355	for	
			exón 11	106196204	106197676	1.472	for	
TP53	17	TP53	exones 2-4 intrones 2-3	7579311	7579912	601	rev	NM_001276761
			expnes 5-6 intrón 5	7578176	7578554	378	rev	
			exón 7	7577498	7577608	110	rev	
			exones 8-9 intrones 8-9	7576536	7577155	619	rev	
			exón 10	7573926	7574033	107	rev	
			exón 11	7572926	7573008	82	rev	
U2AF1	21	U2AF1	exón 2	44524424	44524512	88	rev	NM_006758
			exón 6	44514764	44514898	134	rev	
WT1	11	WT1	exón 7	32417802	32417953	151	rev	NM_024426
			exón 9	32413517	32413610	93	rev	

12. Bibliografía:

1. Bennett JM. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia : A report of the french-american-british cooperative group. *Ann Intern Med.* 1985;103(4):620-5.
2. Vardiman JW, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2008;114(5):937-52.
3. Grimwade D, Hills RK, Moorman a V, Walker H, Chatters S, Goldstone a H, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials. *Br J Haematol.* 2010;116(5):354-65.
4. Dohner H, Estey EHE, Amadori S, Appelbaum FRFR, Buchner T, Burnett a. KAK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* enero de 2010;115(3):453-74.
5. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Vol. 129, *Blood.* 2017. 424-447 p.
6. Sanz MA, Martí G, Gonza M, Leo A, Rivas C, Colomer D, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all- trans -retinoic acid and anthracycline monochemotherapy : a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood.* 2004;103(4):1237-44.
7. Sanz MA, Coco F Lo, Martí G, Avvisati G, Rayo C, Fioritoni G, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia : a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood.* 2000;96(4):1247-54.
8. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol.* 2003;21(24):4642-9.
9. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(14):1051-62.
10. Beillard E, Pallisgaard N, Velden VHJ Van Der, Bi W, Dee R, Schoot E Van Der, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using ‘ real-time ’ quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2474-86.
11. Kern W. Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer.* 2008;112(1):4-16.
12. Gabert J, Beillard E, Velden VHJ Van Der, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality

- control studies of ' real-time ' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318-57.
13. Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*. 1997;22(3):550-3.
 14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
 15. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Scha U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia : association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326-36.
 16. Falini. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254-66.
 17. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107(10):4011-21.
 18. Benthaus T, Schneider F, Mellert G, Zellmeier E, Schneider S, Kakadia PM, et al. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;143(2):230-9.
 19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
 20. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103-8.
 21. Van Dijk JP, Knops GHJN, Van De Locht LTF, Menke AL, Jansen JH, Mensink EJBM, et al. Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br J Haematol*. 2002;118(4):1027-33.
 22. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic J V., et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5195-201.
 23. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn I, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(711):34-1.
 24. McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Ph D, Kandoth C, Ph D, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2424-33.
 25. Ribeiro AFT, Pratcorona M, Erpelinck-Verschueren C, Rockova V, Sanders M, Abbas S, et al. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(24):5824-31.

26. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2348-55.
27. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood.* 2009;113(19):4505-11.
28. Hou H, Huang T, Lin L-I, Liu C-Y, Chen C, Chou W, et al. WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood.* 2010;115(25):5222-31.
29. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods.* 2010;7(2):111-8.
30. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9(1):387-402.
31. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D777-83.
32. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-91.
33. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D862-8.
34. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
35. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-11.
36. Chen X, Schulz-Trieglaff O, Shaw R, Barnes B, Schlesinger F, Källberg M, et al. Manta: Rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics.* 2016;32(8):1220-2.

The background features several stylized DNA double helices in various colors (green, blue, purple, pink, teal) and a sequence of colored circles (grey, pink, blue, yellow, orange, green) arranged in a curved path. The word "RESULTADOS" is centered in a bold, black, sans-serif font.

RESULTADOS

Esta sección se compone de cuatro capítulos, correspondientes a cada uno de los cuatro trabajos de investigación que forman parte de la presente tesis doctoral.

En cada capítulo se exponen los resultados obtenidos en relación con los objetivos planteados, así como una explicación más detallada de las características de los pacientes correspondientes a cada trabajo, descritos en la sección previa de '*Material & métodos*'. Cada capítulo está precedido de un resumen que pretende facilitar una revisión rápida de la información contenida en el mismo.

CAPÍTULO 1- CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA DE BAJO RIESGO GENÉTICO. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS ASOCIADAS CON RECAÍDA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) Y RQ-PCR.

CAPÍTULO 2- NUEVA ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL ESTUDIO SIMULTÁNEO DE MUTACIONES Y REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

CAPÍTULO 3- ANÁLISIS GENÓMICO DE VARIANTES GERMINALES Y SOMÁTICAS EN UN CASO DE LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA FAMILIAR.

CAPÍTULO 4- UTILIDAD DE LOS GENES WT1, PRAME Y BAALC COMO MARCADORES DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA DE BAJO RIESGO GENÉTICO. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS ASOCIADAS CON RECAÍDA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) Y RQ-PCR

RESUMEN:

Introducción: No todos los pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA) de bajo riesgo citogenético/molecular presentan buen pronóstico. De hecho, hasta un 40% de los pacientes con LMA *core binding factor* (CBF) termina recayendo, la mitad de los pacientes con mutaciones en NPM1 sufren una recaída durante los 3 primeros años, y las mutaciones bialélicas de CEBP α (biCEBP α) aunque son de buen pronóstico, no evitan una tasa de recaída del 44%. Sin embargo, aún no se han definido con claridad las mutaciones responsables del comportamiento más agresivo de la enfermedad en estos subgrupos de bajo riesgo. En cuanto a las leucemias promielocíticas agudas (LPA), pese a las notables mejorías gracias a su tratamiento dirigido, aún aparecen casos que presentan resistencia o recaídas. Además, aunque se han descrito mutaciones que potencialmente cooperan con el oncogén de fusión *PML-RAR α* , no se conoce la firma mutacional de cada uno de los tres grupos de LPA con distinto riesgo de recaída (clasificación basada en cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico) (*score* Sanz et al. 2000).

Objetivos: 1) Comparar los perfiles mutacionales (mediante NGS) así como los patrones expresión génica (mediante tarjetas microfluídicas) de los distintos subgrupos genéticos de LMA de bajo riesgo (LMA-CBF, LMA-NPM1, LMA-biCEBP α y LPA) y desvelar las funciones celulares que resultan más afectadas en cada uno de ellos. 2) Investigar en el momento del diagnóstico, la existencia de mutaciones génicas asociadas con mal pronóstico 3) En los pacientes con LPA, definir además la firma mutacional de los tres subgrupos de riesgo según las cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico, así como de los pacientes CD56 positivos.

Pacientes y métodos: Se estudiaron mediante secuenciación masiva 198 pacientes con LMA de bajo riesgo citogenético/molecular: 32 LMA-CBF, 32 LMA-NPM1 (sin *FLT3-ITD*), 6 LMA bi-CEBP α y 128 LPA (un caso con *inv(16)* y dos con biCEBP α presentaron además NPM1 mutado). Los pacientes con LPA fueron clasificados en los 3 grupos de riesgo según las cifras de leucocitos y plaquetas. Las librerías de ADN se prepararon con el panel de 54 genes *TruSight Myeloid Panel* (Illumina), basado en tecnología de amplicones. Las secuencias se

analizaron con *Variant Studio* v3.0, fijando umbrales de cobertura y frecuencia alélica de 100X y 5% respectivamente. En 112 de los 198 pacientes, se estudió además el perfil de expresión mediante tarjetas microfluídicas.

Resultados: En la serie global (n=198) se encontraron 378 variantes ubicadas en 42 genes en 162 pacientes, con profundidades de lectura entre 101x y 61749x (mediana:3720x). Treintaiséis pacientes no presentaron mutaciones en ninguno de los genes analizados. Además de *NPM1* y *CEBPα*, los genes más frecuentemente mutados fueron *FLT3* (17%), *NRAS* (16%), *DNMT3A* (11%) y *WT1* (10%). Todas las mutaciones de *NPM1* (n=35) y *CEBPα* (12 mutaciones en 6 pacientes) que habían sido detectadas por secuenciación convencional fueron identificadas también mediante NGS. En el caso de la duplicación en tándem de *FLT3* (*FLT3-ITD*) sólo se detectaron 6 de 33 casos positivos por *GeneScan* (tamaño: 18-36 pb). En todos los análisis posteriores se tuvieron en cuenta tanto las variantes detectadas por NGS en 42 genes como las mutaciones *FLT3-ITD* identificadas mediante *GeneScan* (total: 405 mutaciones). El número de mutaciones adicionales a las propias de cada subgrupo fue significativamente menor en las LPA (1.5 mutaciones/paciente) que en el resto de subgrupos: LMA-NPM1 (2.5 mut/paciente), LMA-CBF (2.3 mut/paciente) y LMA-biCEBPα (3.0 mut/paciente). Se estudió el valor pronóstico del número de mutaciones estableciendo un score con 3 grupos: (1) pacientes con 0 mutaciones, (2) pacientes con 1 o 2 y (3) pacientes con >2 mutaciones. En la serie global, se observó que un mayor número de mutaciones se correlacionó un SLR más corta: 50% vs. 77% y 95% para los pacientes con >2, 1 o 2 mutaciones y sin mutaciones, respectivamente (p<0.0001). Estas diferencias se observaron también en cuanto a SG (p=0.013). En el análisis multivariante se mantuvo el número de mutaciones como factor pronóstico independiente en cuanto a SLR (p=0.003). Los 42 genes afectados se dividieron en 7 categorías funcionales. En la serie global, las funciones alteradas con mayor frecuencia fueron la señalización celular (34%) y la transcripción (33%), y los genes menos mutados los de control del ciclo celular (*TP53*, *PTEN*, *CDKN2A*) (1.7%). Los pacientes de los distintos subgrupos de LMA presentaron distintos patrones de mutación. Los genes implicados en metilación del ADN (*DNMT3A*, *IDHs*, *TET2*) se encontraban más comúnmente mutados en las LMA-NPM1 (p<0.0001). Seis de las 7 mutaciones en genes de control de ciclo celular se encontraron en LPA, un subgrupo cuya afectación de los genes de cohesinas fue menor que la del resto (p=0.002). La frecuencia alélica de las variantes (VAF) de los genes de metilación fue significativamente mayor que la VAF de mutaciones en otras funciones, como señalización o transcripción (p<0.0001), en la mayoría de los pacientes. En cuanto al valor pronóstico de las variantes encontradas, se observó que en los pacientes con LMA-CBF la presencia de mutaciones en *NRAS/KRAS* permitía seleccionar un subgrupo de pacientes con mayor riesgo de recaída (SLR a 5 años, 36% vs. 86%, p=0.032). Estas diferencias se mantuvieron en el análisis multivariante. Otro factor genético destacable en las LMA-CBF fueron las mutaciones en genes del complejo cohesinas (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3*). Los pacientes con mutaciones presentaron SLR y SG más cortas que aquellos

no mutados (SLR, 0% vs.70%, $P=0.049$; SG 0% vs. 89%, $p<0.0001$). Las diferencias en cuanto a SG se mantuvieron en el análisis multivariante. En el subgrupo LMA-NPM1, la característica genética más destacable fueron las mutaciones en los genes del espliceosoma o *splicing* (*SRSF2*, *SF3B1*, *ZRSR2*). En caso de encontrarse mutados, se observaron tasas de SLR y SG significativamente más cortas (SLR, 0% vs. 61%, $p=0.001$; SG, 0% vs. 54% $p=0.021$).

Los pacientes con LPA de los que se disponía de datos ($n=101$) se clasificaron en base a las cifras de plaquetas y leucocitos (score Sanz et al., 2000): 29 de bajo riesgo, 52 de riesgo intermedio y 20 de alto riesgo. La distribución mutacional fue distinta entre los tres subgrupos. La alteración FLT3-ITD fue significativamente más frecuente en las LPA de alto riesgo (13/20, 65%) ($p<0.0001$). Trece de los pacientes con LPA sufrieron recaída. Concretamente, en el grupo de LPA de bajo riesgo recayeron 3 (11%) y los tres presentaban mutaciones de cambio de sentido en el dominio Ras del gen NRAS (p.Ser65Arg y Gln61Arg). El único paciente de dicho grupo con NRAS mutado y que no recayó tenía afectada una zona distinta del gen (p.Gln43Ter), produciendo una proteína truncada. La presencia de estas mutaciones se correlacionó con una SLR más corta (25% vs. 100%, $p<0.0001$). Se analizó el perfil mutacional en 58 pacientes con estudio de CD56 mediante citometría de flujo (52 negativos y 6 positivos). Cinco de las 6 LPA CD56+ presentaban mutaciones en genes relacionados con la transcripción (*WT1*, *ETV6*, *CUX1*), una frecuencia significativamente mayor que en los CD56- ($p=0.011$).

Mediante el estudio de expresión con tarjetas microfluídicas en 112 pacientes (53 LPA, 15 inv(16), 10 t(8;21), 30 NPM1 y 4 biCEBP α) se encontraron 4 transcritos de fusión que no habían sido previamente detectados por técnicas citogenéticas convencionales. Se identificaron genes capaces de discriminar los distintos subgrupos de pacientes con gran precisión. Las LMA con t(15;17) sobreexpresan *HGF/FGF13/VEGFA* ($p<0.0001$), las LMA con t(8;21) sobreexpresan *RUNX1T1/CD34* ($p=0.001$) y *BAALC/POU4F1* ($p=0.007$), las LMA con inv(16) sobreexpresan *MYH11/MN1* ($p<0.0001$) y *CLIP3/SPARC/BAALC* ($p=0.003$), las LMA-NPM1 sobreexpresan *HOXA9* ($p<0.0001$) y *MEIS1/PIM1/CXCR4* ($p=0.003$), y las LMA biCEBPA sobreexpresan *PROM1/CEBPA* ($p<0.0001$) y *CD34* ($p=0.001$).

En cuanto al valor pronóstico de los perfiles de expresión, en el subgrupo LMA-NPM1, los pacientes con sobreexpresión del antígeno de superficie *CD34* presentaron SLR y SG más cortas (SLR 0% vs. 62%, $p=0.001$ y SG 29% vs. 67%, $p=0.005$), confirmándose en el análisis multivariante de SLR con valor pronóstico independiente ($p=0.003$)., El análisis de expresión en las LPA reveló que la sobreexpresión del oncogén *MYC* fue más frecuente en las LPA de alto riesgo (54%) con respecto a las de riesgo intermedio (20%) y bajo (7%) ($p=0.002$).

Discusión y conclusiones: Hemos llevado a cabo un análisis genético integral de las leucemias de bajo riesgo, que combina la evaluación de mutaciones somáticas mediante un panel de secuenciación de nueva generación

con el análisis de expresión génica masiva empleando una estrategia de RQ-PCR personalizada mediante tarjetas. En este trabajo, demostramos que los paneles de NGS basados en amplicones resultan útiles para detectar todas las mutaciones con relevancia clínica en las LMA, excepto en el caso de la alteración *FLT3*-ITD, que deberá ser analizada mediante GeneScan de forma paralela. En segundo lugar, validamos la utilidad de la tarjeta microfluidica para la detección sensible y específica de transcritos de fusión, así como de genes con expresión desregulada (infra/sobreexpresión) capaces de identificar con precisión la existencia de alteraciones citogenéticas/moleculares de bajo riesgo.

Nuestro estudio reveló que cuanto mayor es el número de mutaciones, peor es el pronóstico de los pacientes con LMA de bajo riesgo. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente en síndromes mielodisplásicos y LMA de cariotipo intermedio y sugieren que los casos con un gran número de mutaciones tienen un nivel correlativamente alto de inestabilidad genómica.

Los genes mutados en las LMA de bajo riesgo pueden clasificarse en un número reducido de categorías funcionales, siendo las más frecuentes la transcripción y la señalización celular, lo que coincide con el clásico modelo de “doble *hit*”. Sin embargo, con frecuencia se encuentran alteradas otras funciones celulares más recientemente descritas, como la epigenética, el *splicing* y el complejo de las cohesinas. Gracias al análisis de las frecuencias alélicas que permite la NGS, identificamos que las mutaciones en genes de metilación (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*) ocurren de forma precoz en la leucemogénesis, aunque el valor clínico de estas alteraciones ha sido puesto en duda debido a estudios muy recientes. En los distintos subgrupos de bajo riesgo, se encontraron perfiles mutacionales diferentes, lo que sugiere procesos leucemogénicos distintos. Dada la homogeneidad de tratamiento en las LMA-NPM1 (sin *FLT3*-ITD), las mutaciones en los genes de *splicing* o la sobreexpresión de *CD34* podrían ser algunos de los factores que contribuyen a las diferencias en el pronóstico de los pacientes. En el grupo de LMA-CBF, observamos que la presencia de mutaciones en *NRAS*/*KRAS* al diagnóstico influía negativamente en la SLR, siendo la variable de mayor influencia, incluso por encima de la edad. Lo mismo ocurría con las mutaciones en genes del complejo cohesinas, cuya alteración podría desregular la función de ciertos *enhancers* y con ello la transcripción.

El perfil mutacional de las LPA difiere entre los tres grupos con distinto riesgo (bajo, intermedio y alto), observándose una mayor incidencia de *FLT3*-ITD en el grupo de alto riesgo. Al igual que en el caso de las LMA-CBF, el estado mutacional del gen *NRAS* podría emplearse como marcador pronóstico en LPA, especialmente en el grupo de bajo riesgo, permitiendo una clasificación más precisa de estos pacientes con el objetivo de plantear nuevos enfoques en el tratamiento post-remisión.

INTRODUCCIÓN:

La leucemia mieloblástica aguda es una neoplasia maligna que se caracteriza por la acumulación de blastos mieloides inmaduros que reemplazan a la hematopoyesis normal en la médula ósea y sangre periférica de los pacientes afectados. Su tratamiento se inicia con quimioterapia estándar de inducción, basada en el antimetabolito citarabina (Ara-C) y una antraciclina como idarubicina o daunorubicina, que consigue remisión completa (RC) entre el 40 y el 90% de los casos, dependiendo de la edad del paciente y de la presencia o ausencia de lesiones genéticas específicas adquiridas de forma somática (1–5). A pesar de este tratamiento, al que se le añade el tratamiento post-remisión (quimioterapia intensiva adicional y/o trasplante de células hematopoyéticas), la tasa de supervivencia a 5 años es inferior al 30% en pacientes mayores de 65 años y en torno al 40% en pacientes más jóvenes (5–8). Dentro de las LMA, los pacientes afectados por leucemia promielocítica aguda (LPA), un subtipo caracterizado por una alteración genética específica que produce proteínas de fusión que involucran al receptor del ácido retinoico (RARα), tienen unas expectativas de curación significativamente mejores que otros pacientes con LMA. Esto se debe a que las LPA son sensibles al tratamiento dirigido basado en ácido retinoico todo trans (ATRA), combinado con citarabina o trióxido de arsénico (ATO), alcanzando RC tras el tratamiento de inducción y consolidación en más del 90% de los casos, y tasas de remisión a largo plazo en el 80% (9,10). En el año 2000, el grupo de Sanz et al. estableció dentro de las LPA tres categorías pronósticas de pacientes con distinto riesgo de recaída según las cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico (11).

La discrepancia entre las tasas favorables de respuesta primaria y las tasas de supervivencia a largo plazo sustancialmente más bajas en la LMA, se explica porque una alta proporción de pacientes que logran RC termina recayendo (2,3,5). Aunque se pueden alcanzar segundas y terceras remisiones, estas son de duración progresivamente más corta y, en estos casos, rara vez se consigue la curación de la enfermedad. La recaída y la resistencia asociada a las terapias actualmente disponibles representan, por lo tanto, uno de los problemas centrales en el tratamiento de la LMA (2,5,6,12)

Si bien generalmente se considera una enfermedad agresiva, existe una considerable heterogeneidad en cuanto a la genética, la evolución clínica y el pronóstico de los pacientes con LMA (13–15). En las últimas décadas, se han identificado anomalías cromosómicas comunes y mutaciones genéticas, que forman la base para la subclasificación y la estratificación de riesgo de la LMA (15,16). La clasificación realizada por el grupo cooperativo ELN (*European Leukemia Net*) categoriza a los pacientes en tres grupos de riesgo basándose en las anomalías citogenéticas y moleculares: (i) riesgo favorable, (ii) intermedio y (iii) adverso (14). Según este sistema, el grupo de riesgo favorable incluye aquellas LMA que presentan las siguientes alteraciones:

traslocación t(15;17)/PML-RAR α (LPA); reordenamientos que involucran a los factores de transcripción *core binding factor* (CBF), como la t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 y la inv(16)/CBFb-MYH11; cariotipo normal con mutaciones en NPM1 en ausencia de la duplicación en tándem de FLT3 (FLT3-ITD); y cariotipo normal con mutaciones bialélicas en CEBP α . En la última versión de esta clasificación (2017), se ha incluido además el valor de la ratio 'alelo mutado/alelo salvaje' de FLT3-ITD, considerando que esta mutación solo tiene valor pronóstico adverso en caso de encontrarse en ratios iguales o superiores a 0.5. Sin embargo, este criterio ha sido puesto en duda por algunos autores, que defienden que es suficiente con la presencia de la mutación (17) para excluir a un paciente con LMA del subgrupo de bajo riesgo, tal como se refleja en clasificaciones anteriores (18) y en otros sistemas de estratificación similares, como el americano (*National Comprehensive Cancer Network -NCCN*)(19). En cualquier caso, la idea fundamental reside en el hecho de que los pacientes con las anomalías genéticas de bajo riesgo comentadas exhiben claramente resultados clínicos superiores en comparación con aquellos con LMA de riesgo intermedio o alto (20–25).

A pesar de los enfoques recomendados para la categorización y el tratamiento de la LMA de riesgo favorable, no todos los pacientes de este grupo presentan realmente buen pronóstico. De hecho, hasta un 40% de los pacientes con LMA-CBF termina recayendo (25–28), la mitad de los pacientes con mutaciones en NPM1 sufren recaída durante los 4 primeros años (29) y las mutaciones bialélicas en CEBP α , no evitan una tasa de recaída del 44% (30). En cuanto a las LPA, pese a las notables mejorías gracias a su tratamiento dirigido, aún aparecen una serie de casos (31–35) que presentan resistencia o recaídas y, aunque se han encontrado mutaciones en los genes implicados en la fusión (PML y RAR α) en casos de progresión (36–41), el perfil de aberraciones genéticas asociado a los tres subgrupos de LPA con distinto riesgo (*score* Sanz et al.) aún no ha sido definido. Por lo tanto, aunque existen evidencias que sugieren diferencias en la biología y la clínica de los diferentes subtipos genéticos de la LMA con riesgo favorable (25,26), aún no se han esclarecido las posibles mutaciones responsables del comportamiento más agresivo de la enfermedad en dichos subgrupos.

En este escenario, nos propusimos comparar los perfiles mutacionales de los distintos subgrupos genéticos que conforman el colectivo de LMA de bajo riesgo (LMA-CBF, LMA-NPM1, LMA-biCEBPA y LPA) y revelar las funciones celulares que resultan más afectadas en cada uno de ellos. Adicionalmente, dentro del subtipo específico de las LPA, quisimos definir la firma mutacional de cada uno de los tres subgrupos de pacientes con distinto riesgo de recaída, según las cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico. El objetivo final ha sido investigar en el momento del diagnóstico, la existencia de mutaciones génicas asociadas con mal pronóstico, comparando pacientes que recaen con aquellos que permanecen en primera remisión, con el fin de identificar pacientes con alto riesgo de progresión, a pesar de haber sido catalogados y tratados todos ellos del mismo modo, siguiendo las pautas de las guías actuales para las LMA de riesgo favorable o LPA, en su caso.

RESULTADOS:

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Se estudiaron 198 pacientes con LMA seleccionados por cumplir los criterios del subgrupo de bajo riesgo citogenético y molecular según la clasificación de la European LeukemiaNet (ELN) (Döhner H. et al., 2017). Los pacientes seleccionados pertenecían a los siguientes subgrupos (Tabla 1):

1. LMA-CBF “*core binding factor*” con reordenamientos t(8;21) o inv(16): 32 pacientes. No se tuvo en cuenta el estado mutacional de *c-KIT*.
2. LMA con cariotipo normal y mutaciones en *NPM1*: 32 pacientes sin mutaciones *FLT3*-ITD.
3. LMA con mutaciones bialélicas en *CEBPα*: 6 pacientes. No se tuvieron en cuenta los pacientes con una sola mutación.
4. LMA con traslocación t(15;17) (LPA): 128 pacientes, 32 de ellos presentaban mutaciones *FLT3*-ITD.

Uno de los pacientes con inv(16) y dos pacientes con mutaciones bialélicas en *CEBPα* presentaron además mutaciones en *NPM1*, por lo que estos 3 pacientes fueron estudiados también en dicho grupo, sumando un total de 35 pacientes. En los subgrupos CBF y *NPM1* solo se incluyeron pacientes sin mutaciones *FLT3*-ITD, independientemente de la ratio, con el objetivo de analizar el valor clínico de mutaciones adicionales que pudieran aparecer en otros genes.

Características clínico-biológicas de los pacientes:

Los 198 pacientes correspondían a 99 mujeres y 99 hombres, con una mediana de edad de 52 años (rango, 9-89) y sus características clínico-biológicas se resumen en la Tabla 1. De ellos, se disponía de datos clínicos en 166 casos, por lo que el resto fueron excluidos de los análisis de supervivencia como se refleja dicha tabla.

Tabla 1. Características clínicas y biológicas de 198 pacientes con LMA de bajo riesgo genético.

	Serie global <i>n=198</i>	Grupo CBF <i>n=32</i>	Grupo NPM1* <i>n=35</i>	Grupo biCEBPA <i>n=6</i>	Grupo LPA <i>n=128</i>
Sexo(M/F)	99/99	17/15	19/16	5/1	60/68
Edad (años)	50,3 ± 18,4	46,9 ±16,7	60,8±11,4	51,6±14,3	48,5±19,8
Leucocitos (x10⁹/L)	25,6 ± 45,3	36,4±38,7	53,3 ± 55,7	129,9±125,7	10,4 ± 20,9
Blastos MO (%)	66,1 ± 23,9	46,0 ± 22,1	60,3 ± 26,6	44,7 ± 18,6	75,2 ± 18,3
Plaquetas (x10⁹/L)	55,8 ± 86,1	48,8 ± 56,8	116,9 ±168,4	81,5 ± 35,6	38,3 ± 33,7
Hemoglobina (g/dL)	9,63 ± 2,4	8,7 ± 2,3	9,1 ± 2,5	10,5 ± 0,9	10,0 ± 2,3
Citogenética (cariotipo y/o FISH)					
Cariotipo Normal	38	0	34	6	0
inv(16)	20	20	1	0	0
t(8;21)	12	12	0	0	0
t(15;17)	128	0	0	0	128
Mutaciones					
FLT3-ITD, n(%)	33	0	0	1	32
Datos clínicos					
Tasa RC, N(%)**	147/166 (88,5)	26/30(86,7)	31/33(93,9)	3/4(75)	88/101(87,1)
Tasa Recaída, N(%)	35/147 (23,8)	9/26(34,6)	13/31(41,9)	1/3(33,3)	13/88(14,7)
Trasplante (TPH)	37/166 (22,3)	15/30(50)	18/33(54,5)	3/4(75%)	2/101(1,9)***
Autólogo	24	11	9	0	0
Alogénico	13	4	9	3	2

*Un paciente con inv(16) y otros dos biCEBPA presentaron además mutaciones en NPM1.

** Se disponía de datos clínicos de 166 pacientes.

*** Los 2 pacientes con LPA recibieron ALO-TPH en recaída.

2. RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS): control de calidad de los datos

Las muestras de ADN de MO de los 198 pacientes al diagnóstico se secuenciaron con el panel de NGS TruSight Myeloid Panel (Illumina), que analiza 54 genes relacionados con patología mieloide y se basa en la tecnología de amplicones, como se detalla en el punto 10.2.1 de “Pacientes y Métodos”. Para las 198 muestras, que fueron secuenciadas en 20 carreras incluyendo en cada carrera una media de 10 muestras, se obtuvieron

profundidades de lectura comprendidas entre 101x y 61749x (mediana de profundidad: 3720x). La densidad media de *clusters* generados durante la secuenciación fue de 1170 K/mm² *clusters* por carrera. Durante el análisis, fueron filtradas y eliminadas las variantes o regiones con profundidades totales menores de 100x (*Total read depth*). Los filtros de calidad del secuenciador fueron superados por una media de 21,3 millones de lecturas de 25,5 millones totales (83,5%). De media, el 89,4% de las lecturas alineadas con el genoma de referencia presentaban un *score* de calidad *Phred* mayor de 30 (Q30), lo que significa una identificación de cada base con una precisión del 99,9% (probabilidad de una base errónea en 1000).

3. VARIANTES GÉNICAS EN LMA DE BAJO RIESGO

3.1 Variantes totales detectadas mediante NGS en la serie global (n=198):

Una vez aplicados los procedimientos de filtrado de variantes en base a la calidad de la NGS y eliminados los polimorfismos (procedimiento detallado en el apartado 10.2.1 “Material & Métodos”), en la serie global (n=198) se detectaron un total de 378 variantes en 162 pacientes, de ellas, 261 eran variantes de cambio de sentido, 71 de cambio de marco de lectura, 20 codones de stop, 21 inserciones en fase y 5 deleciones en fase. En 36 de los pacientes (32 LPA y 4 LMA-CBF) no se encontró ninguna mutación en los 54 genes analizados. Del total de 378 variantes, 226 (60%) eran mutaciones descritas en la base de datos COSMIC y el resto (152/378, 40%) eran variantes que pudieron contrastarse con otras bases de datos, como ExAC (41/378,11%), o bien se encontraron descritas en trabajos individuales y/o estaban localizadas en dominios importantes para la función de la proteína.

De los 54 genes analizados mediante el panel de NGS, se encontraron mutaciones en 42, los cuales se representan en la [Figura 1](#). No se detectó ninguna mutación en los siguientes genes estudiados: *ABL1*, *CBL1*, *CBLC*, *GATA1*, *IKZF1*, *JAK2*, *JAK3*, *MPL*, *MYD88*, *PDGFRA*, *SMC1A* y *U2AF1*.

Además de *NPM1* (35/198, 17,7%) y *CEBPα* (19/198, 9,6%; 12 bialélicas y 7 monoalélicas), genes característicos de sus respectivos subgrupos de bajo riesgo, los genes más frecuentemente mutados en la serie global fueron *FLT3* (34/198, 17,2%) (28 mutaciones puntuales TKD y 6 duplicaciones *FLT3*-ITD), *NRAS* (32/198, 16,2%), *DNMT3A* (22/198, 11,1%) y *WT1* (19/198, 9,6%).

3.2 Comparación de la técnica de NGS con las técnicas convencionales (FLT3, CEBPα, NPM1):

Mediante análisis de fragmentos, se habían identificado previamente las mutaciones *FLT3*-ITD en 33 pacientes, 32 de ellos eran LPA y uno LMA bi*CEBPα*. Mediante secuenciación Sanger se detectaron las mutaciones en *NPM1* en los 35 pacientes del grupo LMA *NPM1*, así como las 12 mutaciones en *CEBPα* halladas en los 6 pacientes del grupo LMA bi*CEBPα* (dos por paciente). Empleando el panel de secuenciación masiva (NGS), se

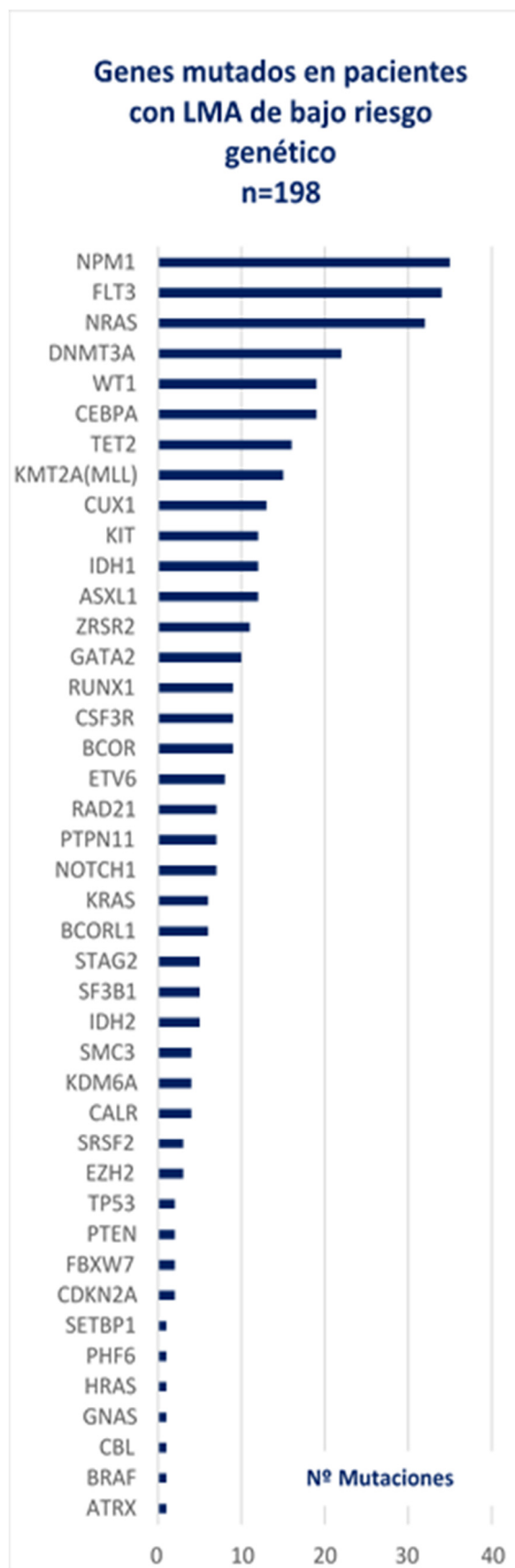


Figura 1. Relación de los 42 genes mutados en 198 pacientes con LMA de bajo riesgo genético.

podieron identificar todas las mutaciones en *NPM1* (35 mutaciones en 35 pacientes) y *CEBPα* (12 mutaciones en 6 pacientes), observándose una concordancia del 100% con las técnicas convencionales. Sin embargo, en el caso de la duplicación en tándem de *FLT3*, mediante NGS solo se detectaron 6 de los 33 casos positivos por GeneScan, con frecuencias alélicas (VAF) comprendidas entre 13% y 22% (mediana, 16%) y con tamaños de ITD entre 18 pb y 36 pb (mediana, 22 pb).

3.3 Mutaciones totales: variantes en 42 genes (NGS) y alteración FLT3-ITD (técnicas convencionales)

En todos los análisis se tuvieron en cuenta tanto las variantes detectadas por NGS en los 42 genes descritos anteriormente (Figura 1), como las mutaciones *FLT3*-ITD identificadas mediante análisis de fragmentos (GeneScan) que fueron negativas con la técnica de NGS. Por tanto, el número total de mutaciones en 198 pacientes con LMA de bajo riesgo genético fue de 405: 378 detectadas mediante NGS (incluye 6 *FLT3*-ITD que sí fueron identificadas) y 27 *FLT3*-ITD determinadas por técnicas estándar.

3.4 Número de mutaciones adicionales a las propias de cada subgrupo genético de LMA de bajo riesgo

Se analizó el número medio de mutaciones por paciente, teniendo en cuenta únicamente aquellas mutaciones adicionales a las definitorias de cada subgrupo. Así, para este fin, en el subgrupo LMA-NPM1 no se tuvieron en cuenta las mutaciones en *NPM1* y en el subgrupo LMA-biCEBPA no se contaron las mutaciones en *CEBPα*. En la serie global, el número medio de mutaciones por paciente fue de $2,3 \pm 0,6$. Por grupos, los pacientes con LMA-CBF presentaron una media de $2,3 \pm 1,8$ mutaciones, los del subgrupo LMA-NPM1 una media de $2,5 \pm 1,3$, los pacientes biCEBPA una media de

3,0±2,7 y las LPA de 1,5±1,3. Los pacientes con LPA presentaron un número de mutaciones significativamente menor que el resto de los subgrupos ($p<0.0001$). Entre el resto de los subgrupos (NPM1, CBF y biCEBP α) no se observaron diferencias significativas (Tabla 4).

▪ **Valor pronóstico del número de mutaciones:**

Para estudiar la influencia del número de mutaciones en el pronóstico de los pacientes, se establecieron tres grupos: (1) pacientes con 0 mutaciones, (2) pacientes con 1 o 2 mutaciones y (3) pacientes con más de 2 mutaciones. En la serie global, un mayor número de mutaciones se correlacionó con una SLR significativamente más corta, 50% vs. 77% y 95% para los pacientes con >2, 1 o 2 mutaciones y sin mutaciones, respectivamente, ($p>0.0001$) (Tabla 2, Figura 2). Estas diferencias se observaron también en cuanto a SG ($p=0.013$). A 5 años, seguían vivos el 81% de los pacientes sin mutaciones, el 73% de los pacientes con 1 o 2 mutaciones y solo el 53% de los pacientes con >2 mutaciones. Al seleccionar solo los casos “LPA” o “NO LPA”, se mantenía esta tendencia en la SLR, aunque sin alcanzarse significación estadística ($p=0.166$; $p=0.154$).

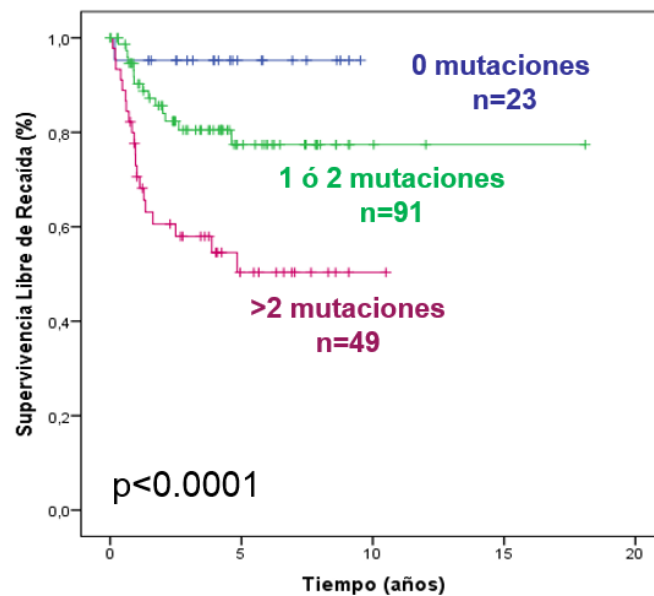


Figura 2. Curvas de supervivencia libre de recaída (SLR) para los pacientes con LMA de bajo riesgo y mutaciones en alguno de los 54 genes analizados mediante el panel de NGS *TruSight Myeloid* (Illumina).

En el análisis multivariante de SLR mediante regresión de Cox llevado a cabo en 132 pacientes con datos clínicos, se incluyeron como covariables la edad (>65), cifra de leucocitos (>50) además de las alteraciones propias de cada subgrupo (PML-RAR α , traslocación CBF y NPM1 mutada) y la presencia de mutaciones en las distintas categorías funcionales (señalización, vía de RAS, transcripción, cromatina, metilación, espliceosoma, cohesinas y ciclo celular). Resultaron seleccionadas con valor pronóstico adverso independiente la presencia

de un número de mutaciones mayor ($p=0.003$) y la existencia de mutaciones en la vía de RAS ($p=0.034$) o los genes de *splicing* ($p=0.012$). En el análisis multivariante de SG no se mantuvo la significación estadística del número de mutaciones ($p=0.110$).

Tabla 2. Estudio de supervivencia libre de recaída en 132 pacientes con LMA de bajo riesgo genético. Análisis univariante y multivariante.

-Estudio de SLR-			
Característica clínico-biológica	Univariante	Multivariante	HR (95% IC)
Edad >65 años	0.056	0.062	-
Leucocitos >50 x 10⁹/L	0.204	0.702	-
Número de mutaciones*	<0.0001	0.003	2.6 (1.4-4.9)
NPM1+	0.011	0.426	-
LPA+	0.001	0.077	-
CBF+	0.107	0.183	-
Señalización celular (general)	0.803	0.203	-
--> Vía RAS	0.017	0.034	2.4 (1.1-5.8)
Transcripción	0.956	0.535	-
Modific. Cromatina	0.878	0.316	-
Metilación ADN	0.025	0.461	-
Espliceosoma	0.010	0.012	3.2 (1.4-4.9)
Cohesinas	0.113	0.600	-
Ciclo celular	0.757	0.268	-

*Número de mutaciones: score 0 mutaciones/ 1-2 mutaciones/>2 mutaciones. HR: Hazard ratio. IC: intervalo de confianza.

3.5 Funciones celulares afectadas en LMA de bajo riesgo

Los 42 genes afectados, se dividieron para su estudio en 7 categorías distintas en base a su función biológica en la célula (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los genes en distintas categorías funcionales según la función biológica de las proteínas que codifican.

A. Señalización celular	B. Transcripción	C. Modific. Cromatina	E. Espliceosoma
FLT3	RUNX1	ASXL1	SRSF2
CBL	BCOR	EZH2	SF3B1
KIT	BCORL1	KMT2A (y sus fusiones)	ZRSR2
NRAS	CEBPA	KDM6A	F. Complejo Cohesinas
KRAS	CUX1	ATRX	STAG2
PTPN11	ETV6	D. Metilación ADN	RAD21
CSF3R	GATA2	DNMT3A	SMC3
NOTCH1	PHF6	TET2	G. Control ciclo celular
FBXW7	WT1	IDH1	TP53
HRAS	CALR	IDH2	PTEN
KRAS	NPM1		CDKN2A
	BRAF		SETBP1

En la serie global (405 mutaciones en total), las categorías más frecuentemente afectadas fueron la señalización celular, con 139 mutaciones (34,3%), y la transcripción, con 134 (33,1%). Se identificaron 55 (13,6%) mutaciones en genes implicados en metilación, 35 (8,6%) en modificadores de la cromatina, 19 (4,7%) en reguladores del *splicing*, 16 (3,9%) en componentes del complejo de las cohesinas y solo 7 (1,7%) mutaciones en genes involucrados en control de ciclo celular, una categoría que incluye supresores de tumores y otros reguladores de la proliferación de las células.

Tabla 4: Número medio de mutaciones en cada subgrupo de LMA de bajo riesgo y número de pacientes con cada categoría funcional afectada

	CBF n=32	NPM1 n=35	biCEBPA n=6	LPA n=128	P ●
Nº Mutaciones adicionales*	2.3±1.8	2.5±1.3	3.0±2.7	1.5±1.3	<0.0001
Categoría funcional afectada					
Señalización celular*	23 (72%)	19(54%)	3(50%)	64(50%)	0.172
Transcripción	12 (37%)	11(31%)	4(67%)	48(37%)	0.435
Modificación cromatina	7(22%)	4(11%)	2(33%)	18(14%)	0.604
Metilación del ADN	4(12%)	28(80%)	1(17%)	11(8%)	<0.0001
Espliceosoma	1(3%)	5(14%)	0 (0%)	12(9%)	0.378
Cohesinas	6(19%)	3(8%)	2(33%)	4(3%)	0.002
Ciclo celular	1(3%)	0 (0%)	0 (0%)	6(5%)	0.592

* Número de mutaciones adicionales a las propias de cada subgrupo genético. Incluye las mutaciones detectadas mediante NGS y las *FLT3-ITD* detectadas por análisis de fragmentos. ● Para la estimación de significación estadística se empleó el test ANOVA en el caso del número de mutaciones y el test χ^2 para la afectación de las distintas categorías funcionales entre los subgrupos de LMA de bajo riesgo.

Los pacientes de los diferentes subgrupos de LMA de bajo riesgo, presentaron distintos patrones de afectación de las funciones celulares, como puede observarse en la Figura 3 y Tabla 4. Las frecuencias de alteración de las categorías funcionales de genes en cada subgrupo se reflejan en la Tabla 3. En particular, los genes implicados en metilación del ADN, como *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* y *TET2*, se encontraban más comúnmente mutados en el subgrupo de pacientes LMA-NPM1 comparado con los demás grupos ($p < 0.0001$). Por otra parte, sólo las LPA, a excepción de un paciente con LMA-CBF, presentaron alteraciones en genes relacionados con la regulación del ciclo celular, como *TP53*, *PTEN* o *CDKN2A*. Ocurría lo contrario en el caso de los genes del complejo de las cohesinas, cuya afectación fue significativamente más baja en las LPA ($p = 0.002$). Los pacientes del subgrupo LMA-biCEBPA no presentaron mutaciones en los genes que participan en el ciclo celular ni en el proceso de *splicing*.

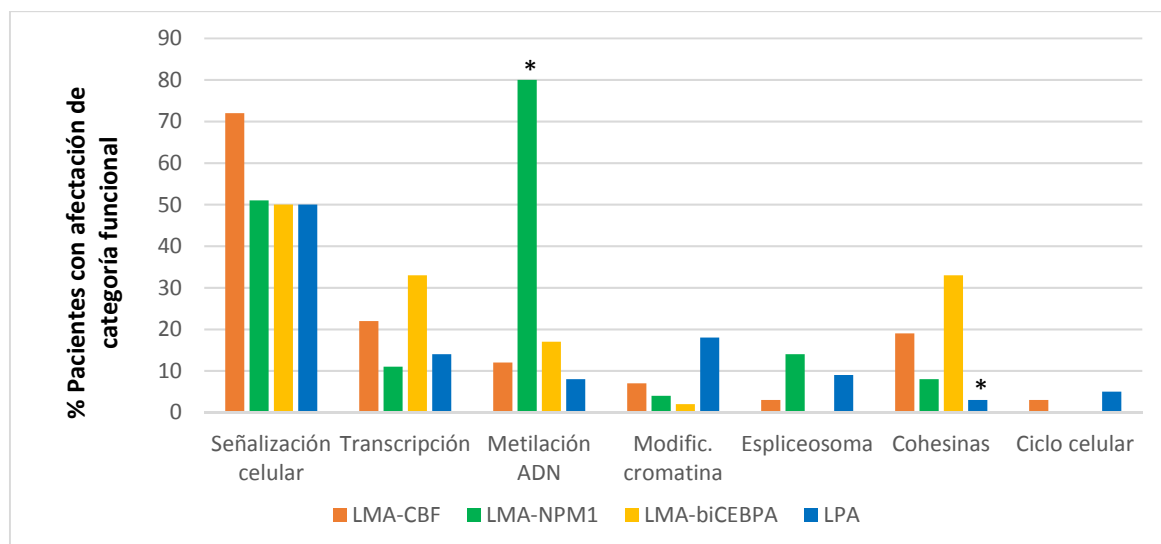


Figura 3. Representación del porcentaje de pacientes de cada subgrupo de LMA de bajo riesgo con afectación de las distintas categorías funcionales en las que se clasifican los genes estudiados.

3.6 Frecuencia alélica de las variantes (VAF)

Los valores de frecuencia alélica (VAF) de las variantes detectadas en este trabajo mediante NGS oscilaron entre 3% y 90% (mediana, 28%). Generalmente, sólo se consideraron las variantes con VAF por encima del 5%, sin embargo, si se trataba de una variante conocida, el límite se fijó en el 3%, como se explica en el apartado 10.2.1 de “Material y métodos”. Sólo 4 de las variantes consideradas presentaron una VAF entre el 3 y 5%: dos mutaciones en *CEBPα* y dos en *FLT3*, ambas alteraciones con conocido valor clínico en LMA. En el extremo opuesto, se observaron 9 variantes con VAF superiores al 60%: 3 en *NPM1*, 1 en *CDKN2A*, 2 en *WT1*, 2 en *TET2* y 1 en *KDM6A*. Estos casos, se prevé que corresponden a variantes en homocigosis, aunque podría deberse a otras causas (pérdida de heterocigosis, disomía uniparental, etc).

Como se refleja en la [Tabla 5](#), se observaron diferencias significativas en cuanto a la VAF media de las variantes detectadas en los genes según la categoría funcional. En general, se observó que la VAF de las mutaciones de los genes implicados en metilación del ADN era significativamente mayor que la VAF de las mutaciones que afectan a genes que participan en otras funciones celulares, como la señalización celular, la regulación del ciclo celular o la transcripción ($p < 0.0001$) (Figura 4.A). Aunque estas características representan la línea más frecuente, se identificaron casos donde la tendencia era diferente, encontrándose VAF similares para mutaciones de genes implicados en metilación del ADN y señalización celular, lo que podría indicar la aparición simultánea de estas variantes (Figura 4.B). Por último, tan solo en un caso aislado se observó la tendencia opuesta (Figura 4.C), es decir, una frecuencia alélica más alta en las mutaciones de genes de señalización celular que en las mutaciones de genes de metilación. Este paciente suponía ya un caso especial, al presentar

8 mutaciones simultáneamente al diagnóstico, un número muy superior a la media, siendo uno de los casos con más alteraciones genéticas, probablemente en relación con su edad avanzada (76 años) y la presencia de displasia.

Tabla 5. Frecuencia alélica media (VAF media) de las variantes que afectan a genes pertenecientes a las diferentes categorías funcionales.

Categoría funcional	VAF media (%)
Señalización celular	22,9 ± 15,1
Transcripción	28,9 ± 18,6
Modific. Cromatina	26,9 ± 21,5
Metilación ADN	37,9 ± 18,2
Espliceosoma	31,8 ± 16,4
Cohesinas	24,9 ± 19,6
Ciclo celular	22,1 ± 23,9

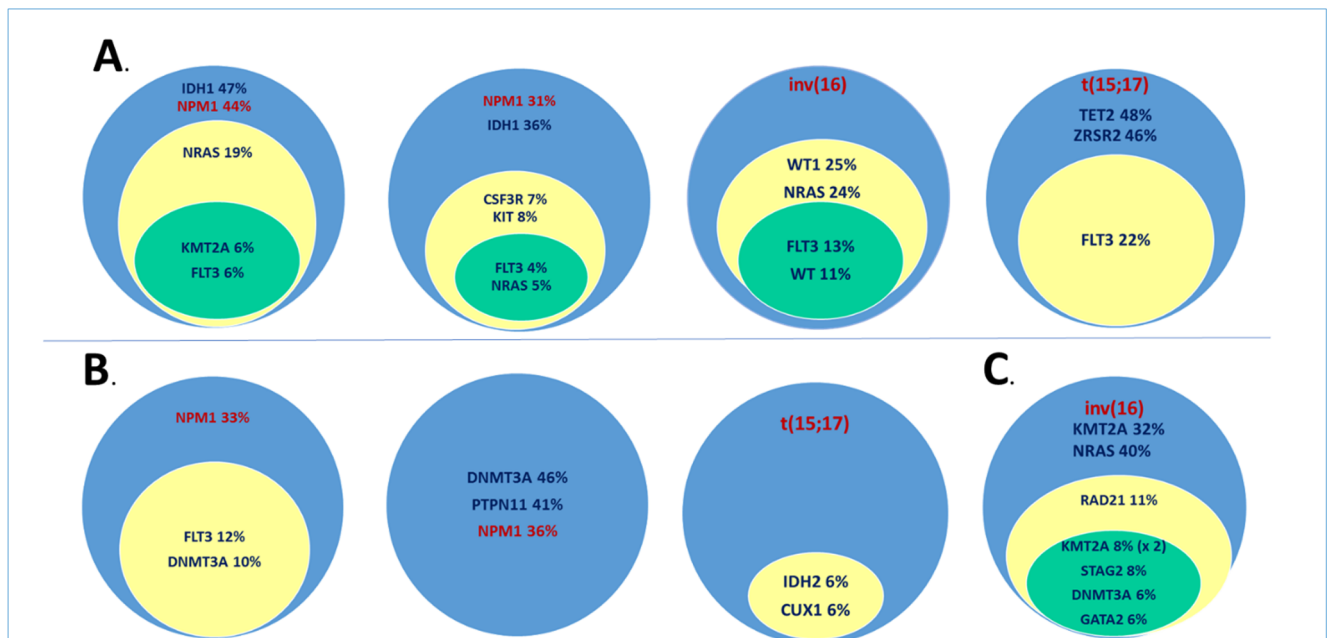


Figura 4. Diagramas de Venn para la representación esquemática de las frecuencias alélicas de las distintas mutaciones (VAF) que afectan al grupo de pacientes con LMA de bajo riesgo al diagnóstico. El tamaño de los círculos concéntricos es proporcional a la VAF de cada mutación. En azul, se representan los círculos más grandes, correspondientes a los valores más altos de VAF encontrados en un paciente, y por tanto a un mayor % de secuencias mutadas. En amarillo, las mutaciones con VAF intermedia; y en verde aquellas con menor VAF. Se muestran ejemplos representativos de 3 pacientes. A. Tendencia más común: las mutaciones en genes de metilación del ADN (*DNMT3A*, *IDH1*, *TET2*) están presentes en un mayor número de células que las mutaciones en genes implicados en señalización celular (*FLT3*, *NRAS*, *KIT*). B. Pacientes en los que las VAF de mutaciones en metilación (*DNMT3A*, *IDH2*) y señalización (*FLT3*, *PTPN11*) u otras funciones como transcripción (*CUX1*) son similares (alteraciones simultáneas). C. Único caso en el que la tendencia es la contraria: las mutaciones en genes de

metilación (*DNMT3A*) están menos representadas que aquellas en genes de señalización (*NRAS*) u otras categorías como modificación de la cromatina (*KMT2A*).

4. PERFIL MUTACIONAL DE LAS LMA DE RIESGO FAVORABLE NO LPA: LMA-NPM1, LMA-CBF y LMA-biCEBPA

4.1 Descripción del perfil mutacional

En la figura 5 se muestra el patrón de genes afectados en las 70 LMA de bajo riesgo no pertenecientes al subtipo LPA: 35 con LMA-NPM1, 32 con LMA-CBF y 6 con LMA-biCEBPA. Los dos pacientes con LMA-NPM1 y dobles mutaciones en CEBPα, y el paciente con inv(16) y NPM1 mutada se encuentran en los extremos del diagrama que delimitan un subgrupo y otro.

En dicha figura puede observarse cómo las alteraciones en genes de señalización celular se distribuían de forma relativamente homogénea entre los 3 subgrupos de estudio (LMA-NPM1, LMA-CBF, LMA-biCEBPA), siendo ligeramente más frecuentes en las LMA-CBF. Por el contrario, la afectación de los genes involucrados en *splicing*, así como los que participan en la metilación del ADN, se produce preferentemente en el grupo de pacientes con mutaciones en NPM1. La modificación de la cromatina, otra función celular englobada en la epigenética, se encontró poco alterada en general en los tres subgrupos. Por último, cabe destacar el reducido número de casos sin ninguna mutación en los 54 genes analizados, que corresponde solo a 4 pacientes con LMA-CBF.

4.2 Relación de las mutaciones con el pronóstico de los pacientes

De los 70 pacientes con LMA de bajo riesgo NO LPA, disponíamos de datos clínicos en 65. De ellos, 59 (59/65, 90,1%) alcanzaron remisión completa y 23 recayeron (23/59, 38.9%), 13 con mutaciones en *NPM1*, 9 con traslocaciones CBF y uno con doble mutación en *CEBPα*. Se realizó un estudio de supervivencia (SLR y SG) para determinar la relación entre la presencia de mutaciones génicas y el pronóstico de los pacientes, incluyéndose además otras variables como la edad o la cifra de leucocitos al diagnóstico (Tabla 6). En el análisis de SG se incluyeron solo los pacientes que fallecieron por causas relacionadas con la enfermedad (progresión, muerte asociada a trasplante o infección).

En el grupo de las LMA NO LPA (CBF, NPM1, biCEBPA), la única variable clínica que se asoció con una SLR y SG más cortas fue la edad >65 años al diagnóstico ($p=0.001$ y $p<0.0001$, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias solo se mantuvieron en el subgrupo de las LMA-NPM1, ya que en las LMA-CBF sólo 3 de los pacientes eran mayores de 65 años.

En cuanto a las variables genéticas, en el subgrupo de LMA-CBF la de mayor peso fue la presencia de mutaciones en los genes *NRAS* y *KRAS*, ya que permitía seleccionar un subgrupo de pacientes con mayor riesgo de sufrir recaída. Como se muestra en la gráfica de la Figura 6.A, de los 12 pacientes con mutaciones en *NRAS*

o *KRAS* recayeron 7 (58,3%), mientras que, de los 14 casos no mutados, recayeron solo 2 (14,3%) (SLR a 5 años, 36,4% vs. 85,7% $p=0.032$). Estas diferencias en la SLR aportadas por las mutaciones en la vía de Ras no se tradujeron en cambios en la SG. Otro factor genético destacable en las LMA-CBF, fueron las mutaciones en los genes que codifican las proteínas del complejo cohesinas, como *STAG2*, *RAD21* y *SMC3* (Figura 6.B y 6.C). Los pacientes con mutaciones presentaron SLR y SG significativamente más cortas que aquellos no mutados (SLR a 5 años, 0% vs. 70.2%, $p=0.049$; SG a 5 años, 0% vs. 89.3%, $p<0.0001$). De los 4 pacientes con LMA-CBF que presentaban mutaciones en genes de las cohesinas, 3 (75%) recayeron. En cambio, de los 22 casos no mutados, recayeron sólo 6 (27,3%). El único paciente que no había recaído falleció debido a shock séptico y de los 22 pacientes sin alteración de las cohesinas, solo 2 murieron. En el análisis multivariante para SLR, la única característica seleccionada como factor pronóstico adverso independiente en las LMA-CBF fue la presencia de mutaciones en genes implicados en la vía Ras, con una SLR más corta a 5 años ($p=0.052$). En cambio, en el análisis de SG, fueron las mutaciones en el complejo de cohesinas las que mostraron valor pronóstico adverso independiente ($p=0.002$).

En el subgrupo LMA-NPM1, la característica genética adicional más destacable fueron las mutaciones en genes de la maquinaria del espliceosoma (*splicing*), como *SRSF2*, *SF3B1* o *ZRSR2* (Figura 6.D y 6.E). En el estudio de supervivencia se observó que tanto la SLR como la SG de los pacientes LMA-NPM1 fue significativamente más corta en caso de encontrarse mutado alguno de los genes implicados en el proceso de *splicing* (SLR a 5 años, 0% vs. 61.1%, $p=0.001$; SG a 5 años, 0% vs. 54.4%, $p=0.021$) (Tabla 6). Se observó que los 5 pacientes mutados recayeron (100%), y de los 26 que no presentaron mutaciones, recayeron 8 (31%). Solo uno de los pacientes que habían recaído pudo alcanzar una segunda remisión completa. Este paciente había sido sometido a trasplante autólogo previamente, a diferencia del resto.

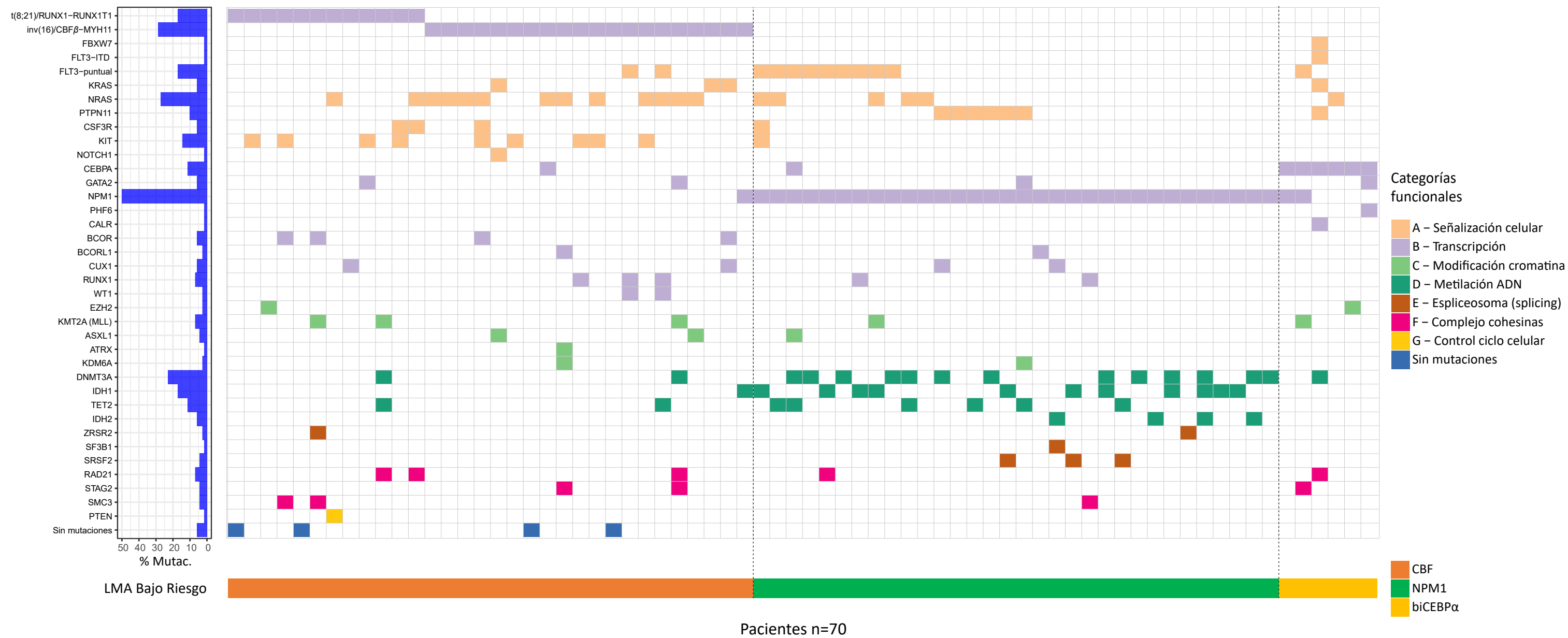


Figura 5. Distribución de genes mutados en LMA de riesgo favorable. Cada columna representa un paciente. Los cuadros coloreados indican los genes mutados en cada caso. Cada fila corresponde a un gen y éstos están agrupados por las categorías funcionales que se representan en la leyenda, identificándose cada una con un color.

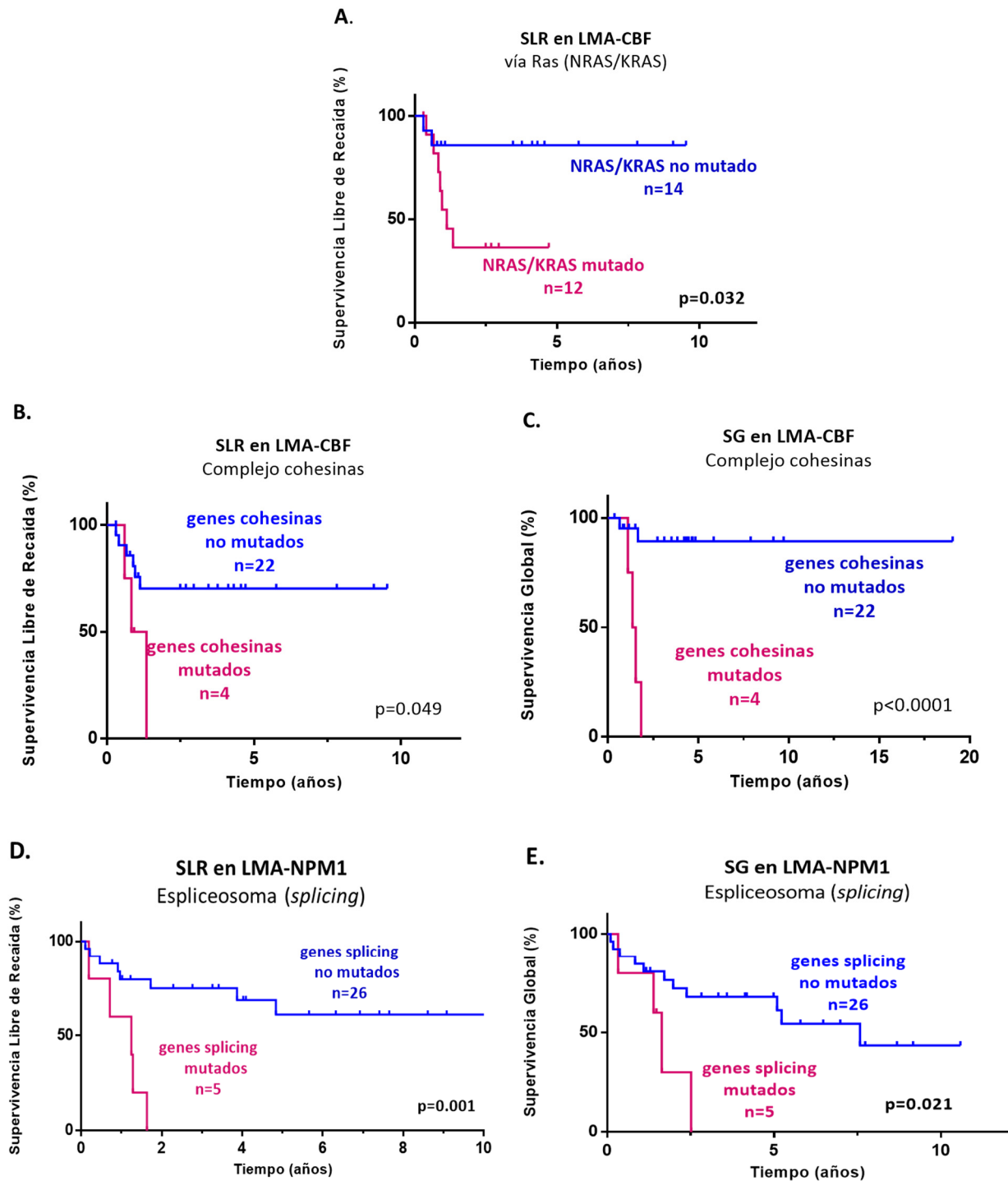


Figura 6. Curvas de supervivencia para los pacientes con LMA de bajo riesgo y mutaciones en genes implicados en las distintas funciones celulares relevantes. **A.** Influencia de las mutaciones en la vía de Ras en la SLR del subgrupo LMA-CBF; **B.** y **C.** Influencia en SLR y SG de las mutaciones en los genes del complejo de las cohesinas (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3*) en pacientes con LMA-CBF. **D.** y **E.** Influencia en SLR y SG de las mutaciones en genes de *splicing* (*SRSF2*, *SF3B1*, *ZRSR2*) en pacientes con LMA-NPM1.

Estudio de supervivencia	LMA no LPA (CBF, NPM1 y biCEBPA)			LMA-CBF			LMA-NPM1			LPA
	n=59			n=26			n=31			n=88
Supervivencia Libre de Recaída (SLR)										
Característica clínico-biológica	Univariante	Multivariante	HR (95% IC)	Univariante	Multivariante	HR (95% IC)	Univariante	Multivariante	HR (95% IC)	Univariante
Edad >65 años	0.001*	<0.0001*	5.1(2.1-12.6)	0.121	0.186	-	<0.0001*	<0.0001*	12.0(3.0-47.7)	0.430
Leucocitos >50 x 10 ⁹ /L	0.850	0.380	-	0.460	0.470	-	0.739	0.774	-	0.578
Señalización celular (general)	0.673	0.518	-	0.05*	0.140	-	0.150	0.281	-	0.772
--> Vía RAS	0.043*	0.007*	3.4(1.4-8.3)	0.032*	0.052*	4.7(1.0-22.9)	0.960	0.927	-	0.087
--> cKIT	-	-	-	0.777	0.572	-	-	-	-	-
Transcripción	0.736	0.746	-	0.292	0.269	-	0.283	0.269	-	0.563
Modific. Cromatina	0.651	0.910	-	0.583	0.794	-	0.883	0.630	-	0.503
Metilación ADN	0.452	0.812	-	0.481	0.317	-	0.206	0.237	-	0.850
Espliceosoma	0.008*	0.051*	3.6(1.0-1.3)	-	-	-	0.001*	0.002*	8.6(2.3-32.7)	0.505
Cohesinas	0.367	0.565	-	0.049*	0.141	-	-	-	-	-
Ciclo celular	0.699	0.383	-	-	-	-	-	-	-	0.704
Supervivencia global (SG)										
LMA no LPA (CBF, NPM1 y biCEBPA)										
n=65										
LMA-CBF										
n=30										
LMA-NPM1										
n=33										
LPA										
n=101										
Característica clínico-biológica	Univariante	Multivariante	HR (95% IC)	Univariante	Multivariante	HR (95% IC)	Univariante	Multivariante	HR (95% IC)	Univariante
Edad >65	<0.0001*	<0.0001*	5.0 (2.0-12.3)	0.208	0.424	-	<0.0001*	<0.0001*	6.1(1.7-22.2)	0.718
leucocitos 50	0.493	0.610	-	0.638	0.419	-	0.570	0.367	-	0.618
Señalización celular (general)	0.979	0.961	-	0.130	0.338	-	0.150	-	-	0.187
--> Vía RAS	0.722	0.123	-	0.160	0.146	-	0.858	0.607	-	0.780
--> cKIT	-	-	-	0.361	0.131	-	-	-	-	-
Transcripción	0.388	0.287	-	0.722	0.471	-	0.224	0.175	-	0.825
Modific. Cromatina	0.059	0.181	-	0.001*	0.103	-	0.865	0.789	-	0.556
Metilación ADN	0.037*	0.366	-	0.565	0.720	-	0.170	0.224	-	0.733
Espliceosoma	<0.0001*	0.059*	2.9(1.0-9.3)	-	-	-	0.021*	0.031*	3.8(1.2-13.4)	0.830
Cohesinas	0.001*	0.015*	3.7(1.3-10.6)	<0.0001*	0.002*	16.5(2.9-95.1)	-	-	-	-
Ciclo celular	0.517	0.607	-	-	-	-	-	-	-	0.556

Tabla 6: Influencia en la supervivencia en la edad, la cifra de leucocitos y la presencia al diagnóstico de mutaciones que afectan a genes implicados en las distintas funciones celulares relevantes en 166 pacientes con LMA de bajo riesgo tratados con intención curativa. El grupo de "LMA NO LPA" incluye pacientes con mutaciones en NPM1 en ausencia de FLT3-ITD (LMA-NPM1), pacientes con mutaciones dobles en CEBPa (biCEBPa) y pacientes con traslocación t(8;21) o inv(16) (LMA-CBF, *core binding factor*). No se estudiaron los casos biCEBPA separadamente debido al reducido número de casos, solamente fueron incluidos dentro del grupo "LMA NO LPA". Sólo se analizó el valor de las mutaciones en una categoría funcional en caso de encontrarse más de tres mutaciones por subgrupo, como ocurría en el caso de las mutaciones en genes de cohesinas en las LMA-NPM1, genes de *splicing* en las LMA-CBF, y genes de ciclo celular en ambos subgrupos. El valor de las mutaciones en cKIT solo se analizó en los pacientes con LMA-CBF. En el subgrupo LPA no se realizó análisis multivariante debido a la ausencia de características con un valor de p<0.05 en el análisis univariante. HR: Hazard ratio. IC: intervalo de confianza. EL HR se calculó para las características que presentaron un valor de p<0.1 en el análisis multivariante. Solo se consideraron variables con valor pronóstico independiente aquellas que presentaron un valor de p<0.05 en el modelo de regresión de Cox.

5. FIRMA MUTACIONAL DE LA LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA SEGÚN EL GRUPO DE RIESGO

Los pacientes con LPA de los que se disponía de datos (n=101), fueron clasificados en los tres grupos con distinto riesgo según las cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico (*score* Sanz et al. 2000). De este modo, 29 (28,7%) pacientes pertenecían al grupo de bajo riesgo, 52 (51,5%) al de riesgo intermedio y 20 (19,8%) al grupo de alto riesgo. Se identificaron 144 mutaciones en 31 genes, siendo la mediana de 1 mutación/paciente (rango: 0-8). De los 101 pacientes, 23 no presentaron mutaciones en ninguno de los genes analizados. La mayoría de los pacientes sin mutaciones pertenecían al grupo de riesgo intermedio (Tabla 7). El perfil mutacional de las LPA clasificadas en los distintos grupos de riesgo se representa en la Figura 7.

5.1 Categorías funcionales afectadas en LPA

➤ Serie global LPA:

Se encontraron mutaciones en todas las categorías génicas funcionales características de las LMA, descritas en apartados anteriores del presente trabajo. La distribución de las mutaciones identificadas en las distintas categorías fue la siguiente: 57 (56,4%) mutaciones en genes involucrados en señalización celular, 43 (42,6%) en reguladores transcripcionales, 16 (15,8%) en modificadores de la cromatina, 11 (10,9%) en factores relacionados con el *splicing*, 9 (8,9%) mutaciones en reguladores de la metilación del ADN, 4 (3,9%) en componentes del complejo de las cohesinas y 4 (3,9%) en factores de control del ciclo celular. Concretamente, *FLT3* fue el gen más afectado (Figura 8), con 36 mutaciones detectadas: 27 *FLT3*-ITD y 9 mutaciones puntuales en la región correspondiente al dominio tirosina quinasa (*tyrosine kinase domain*, TKD). Estas mutaciones se encontraron en 34 pacientes (34/101, 33,6%), ya que dos de los casos presentaban una alteración ITD y una puntual simultáneamente. Seguidamente, el factor de transcripción *WT1* fue el segundo gen más alterado en las LPA, con un total de 16 mutaciones, 1 por paciente (16/101, 15,8%). Estas mutaciones se localizaron en el dominio *dedos de zinc*, concretamente entre los aminoácidos 377 y 462, implicado en la unión de *WT1* con el ADN. Siete de estas mutaciones dieron lugar a codones de stop que generarían una proteína truncada, y el resto fueron mutaciones de cambio de sentido.

➤ **Tres subgrupos de riesgo de LPA:**

La distribución mutacional fue distinta entre los tres subgrupos de riesgo (Tabla 6). En concreto, se identificó un mayor porcentaje de mutaciones en genes implicados en rutas de señalización celular en los pacientes con LPA de alto riesgo ($p=0.002$). El hallazgo más significativo fue la alta incidencia de mutaciones en el receptor FLT3 en el subgrupo de alto riesgo con respecto a las de riesgo intermedio y bajo. En particular, la alteración ITD de FLT3 fue significativamente más frecuente (13/20, 65%) ($p<0.0001$) (Figura 7) (Tabla 7). Además de *FLT3*, otros factores implicados en señalización celular, como *CSF3R*, *KRAS*, *NOTCH1* y *KIT* se vieron afectados en LPA de alto riesgo. Otra diferencia destacable, fue la ausencia de alteraciones en el gen *NRAS* en los pacientes de alto riesgo, al contrario de lo ocurrido en los de riesgo intermedio y bajo, donde se observaron mutaciones en *NRAS* en 5 (5/52, 9,6%) y 4 (4/29, 13,8%) pacientes, respectivamente.

Por otra parte, los reguladores transcripcionales se encontraron más comúnmente alterados en las LPA de bajo riesgo, aunque sin alcanzar significación estadística ($p=0.093$). Para el resto de las categorías funcionales, la afectación fue relativamente homogénea entre los tres subgrupos.

Tabla 7. Número de mutaciones en los genes de cada categoría funcional afectada en los 3 grupos de LPA.

MUTACIONES, n(%)	LPA Bajo Riesgo n=29	LPA Riesgo Intermedio n=52	LPA Alto Riesgo n=20	P
Categoría funcional				
Señalización celular	13(44.8%)	20 (38.5%)	17 (85.0%)	0.002*
Transcripción	16(55.2%)	17 (32.7%)	6 (30.0%)	0.093
Modific. Cromatina	5 (17.2%)	6 (11.5%)	5 (25.0%)	0.364
Metilación ADN	3 (10.3%)	2 (3.8%)	3 (15.0%)	0.248
Espliceosoma	3 (10.3%)	7 (13.5%)	1 (5.0%)	0.583
Cohesinas	1 (3.4%)	2 (3.8%)	1 (5.0%)	0.961
Ciclo celular	1 (3.4%)	3 (5.8%)	0 (0%)	0.524
Sin mutaciones	5(17.2%)	15 (28.9%)	3(15.0%)	0.326

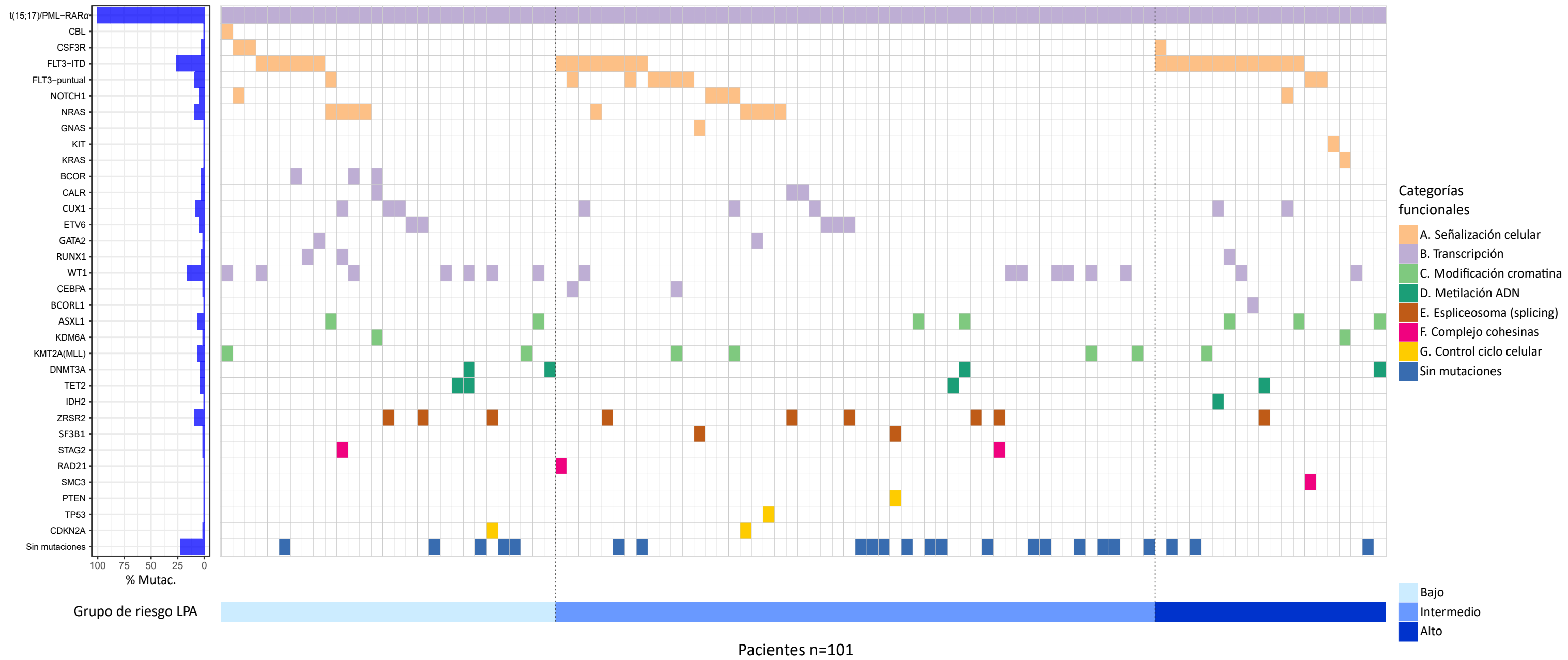


Figura 7. Firma mutacional de las LPA divididas en los distintos grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) según las cifras de leucocitos y plaquetas al diagnóstico.

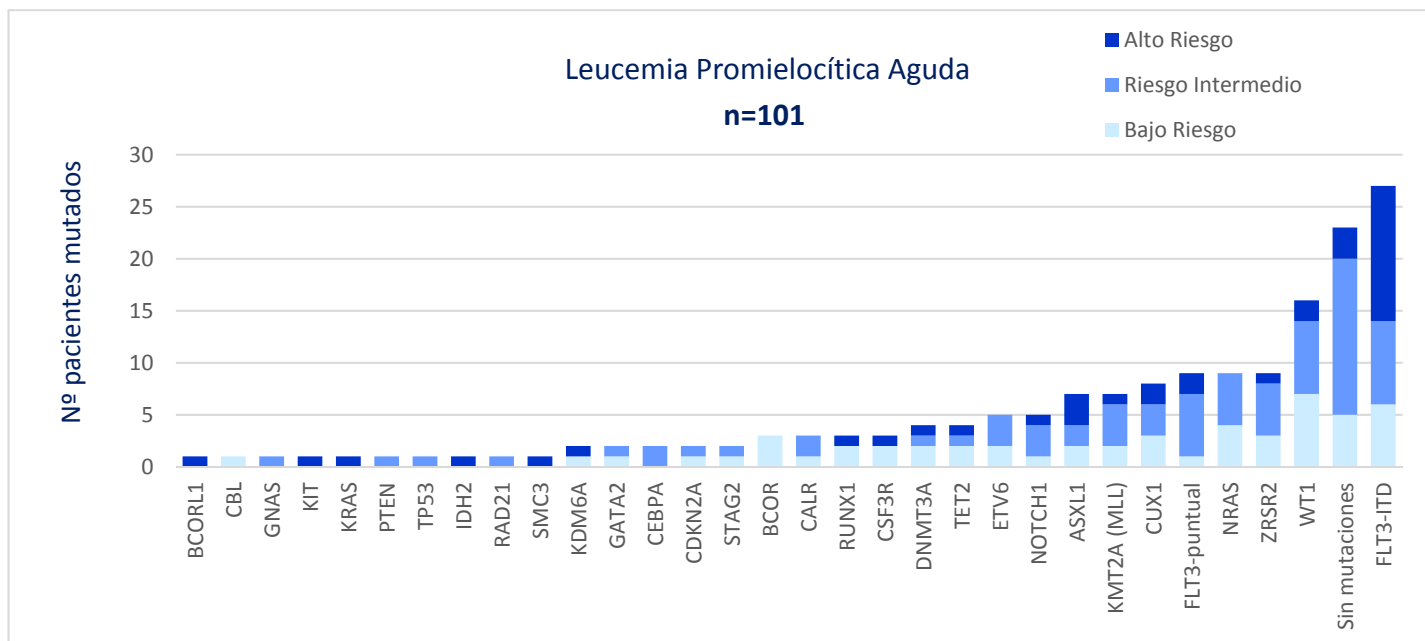


Figura 8: Genes afectados y número de pacientes con mutaciones en ellos en cada subgrupo de riesgo LPA.

5.3 Relación de las mutaciones con el pronóstico de los pacientes con LPA:

De los 101 pacientes con LPA, 88 (87%) alcanzaron remisión completa y de ellos recayeron 13 (15%). En el grupo de LPA de bajo riesgo se observó la mayor tasa de RC (96,5%), aunque estas diferencias con el resto de grupos (intermedio y alto riesgo) no fueron significativas (Tabla 8). En cuanto a la tasa de recaída de los tres grupos, tampoco hubo diferencias significativas. Concretamente, en el grupo de LPA de bajo riesgo, 3 de 29 pacientes sufrieron recaída (11%) y los tres presentaban mutaciones de cambio de sentido en el dominio Ras del gen *NRAS* en el momento del diagnóstico (p.Ser65Arg y p.Gln61Arg). El único paciente del grupo de bajo riesgo con mutaciones en *NRAS* y que no recayó, tenía afectada una zona distinta del gen (p.Gln43Ter), dando lugar a una proteína truncada, probablemente con pérdida de función. La presencia de estas mutaciones se correlacionó con una supervivencia libre de recaída más corta (5 años, 25% vs. 100%, $p < 0.0001$) (Figura 9).

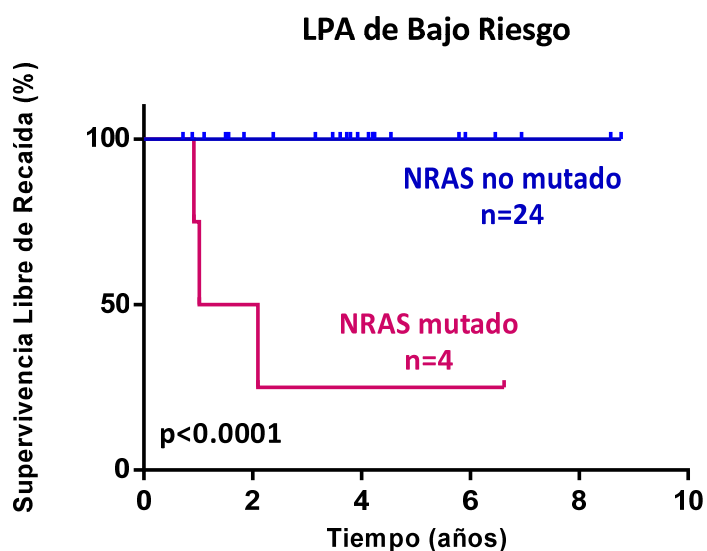
De los 8 pacientes de riesgo intermedio que recayeron, todos excepto uno, tenían al menos una mutación en genes de mal pronóstico en LMA (*FLT3*, *PTEN*, *WT1*, *ASXL1* y *CUX1*). En cambio, los pacientes de este grupo que permanecían en remisión completa carecían de mutaciones con una alta frecuencia (14/35, 40%).

En el grupo de alto riesgo, recayeron 2 pacientes. Uno de ellos presentó mutaciones en *FLT3-ITD*, *TET2* y *ZRSR2* y el otro caso no tenía ninguna mutación en los genes analizados.

Tabla 8. Características clínicas y biológicas de 101 pacientes con LPA clasificados en los 3 grupos de riesgo.

	Serie global LPA n=101	Bajo Riesgo n=29	Riesgo Intermedio n=52	Alto Riesgo n=20	P
Edad (años)	48,8±19,2	51,0±21,5	50,3±17,2	46,5±21,2	0.699
Blastos MO (%)	75,1±18,4	67,7±19,6	74,5±18,0	85,2±12,9	0.006
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	10,4±21,1	1,8±1,4	2,52±18,0	41,7±30,3	<0.0001
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	38,5±33,9	77,4±36,1	20,33±9,7	25,7±18,0	<0.0001
Hemoglobina (g/dL)	10,0±2,3	10,3±2,7	9,5±2,1	10,9±2,2	0.059
FLT3 mutado, N(%)					
ITD	27/101 (26,7%)	6/29 (20,7%)	8/52(15,4%)	13/20(65%)	<0.0001
D835	9/101 (8,9%)	1/29 (3,4%)	6/52 (11,5%)	2/20 (10%)	0.472
Tasa RC, N(%)*	88/101 (87,1%)	28/29 (96,5%)	43/50*(86%)	17/20 (85%)	0.197
Tasa Recaída, N(%)	13/88 (14,7%)	3/28 (10,7%)	8/43 (18,6%)	2/17 (11,8%)	0.618
PML-RARa isoforma					0.457
bcr1	65	21	32	12	
bcr2	8	2	6	0	
bcr3	28	6	14	8	

* Dos de los pacientes del grupo LPA de riesgo intermedio no recibieron tratamiento, por lo que se excluyeron del cálculo de la tasa de remisión completa.

**Figura 9:** Influencia de las mutaciones en el gen *NRAS* en la Supervivencia Libre de Recaída en pacientes con LPA de bajo riesgo.

5.4 Perfil mutacional en LPA con expresión del antígeno de mal pronóstico CD56

En cuanto al estudio de pacientes con expresión del antígeno CD56, comparamos su perfil mutacional con el de los casos CD56 negativos. De los 58 pacientes en los que se realizó estudio de inmunofenotipo, solamente 6 presentaron expresión del antígeno CD56 en >20% de la población blástica. La tasa de mutaciones en genes implicados en las distintas funciones celulares (señalización, transcripción, metilación, *splicing*, etc) en los pacientes CD56 positivos y CD56 negativos se resume en la Tabla 8. De forma destacable, se observó que 5 de los 6 (83.3%) pacientes con LPA que expresaban CD56 al diagnóstico, presentaban mutaciones en genes relacionados con la transcripción, como *WT1*, *ETV6* o *CUX1*, con una frecuencia significativamente mayor ($p=0.011$) que los pacientes CD56 negativos, donde la tasa de mutación fue del 30.7% (16/52). Para el resto de las categorías funcionales no se observaron diferencias (Tabla 9).

Tabla 9. Afectación de las distintas funciones celulares en pacientes con LPA que expresan CD56 en >20% de los blastos al diagnóstico (CD56 pos) y aquellos que no lo expresan (CD56 neg). En la tabla se presenta el número y % de pacientes con mutaciones en alguno de los genes de cada categoría.

PACIENTES CON MUTACIÓN, n(%)	LPA CD56 neg n=52	LPA CD56 pos n=6	P
Señalización celular	27(51.9%)	3(50.0%)	0.929
Transcripción	16(30.8%)	5(83.3%)	0.011*
Modificación cromatina	6(11.5%)	1(16.6%)	0.715
Metilación del ADN	7(13.5%)	0(0%)	0.338
Espliceosoma	5(9.6%)	2(33.3%)	0.091
Cohesinas	3(5.8%)	0(0%)	0.546
Ciclo celular (supr. Tumores)	1(1.9%)	0(0%)	0.732

5. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS LMA DE BAJO RIESGO MEDIANTE TARJETAS MICROFLUÍDICAS BASADAS EN RQ-PCR

En este estudio se incluyeron un total de 112 pacientes de los que se disponía de ARN valorable: 53 LPA (14 de bajo riesgo, 26 de riesgo intermedio y 13 de alto riesgo), 15 inv(16), 10 t(8;21), 30 NPM1, y 4 biCEBPA. Las muestras de ADNc se analizaron mediante tarjetas de expresión (*microfluidic cards*) "TaqMan Low Density Arrays" (Applied Biosystems), diseñadas para cuantificar hasta 384 genes diferentes, y que contienen ensayos liofilizados para RQ-PCR "TaqMan Gene expression assays" (Applied Biosystems) para cada uno de los genes a cuantificar. Estas tarjetas permiten el estudio simultáneo de 96 genes por duplicado en dos pacientes (36 genes de fusión, 57 genes con valor diagnóstico/pronóstico y 3 genes control: *ABL1*, *GADPH* y *GUSB*), como se detalla en el punto 8 de "Material y Métodos".

▪ Detección de transcritos de fusión mediante tarjetas microfluídicas:

Esta metodología nos permitió detectar un total de 78 transcritos de fusión: 53 *PML-RARA* (30 bcr1, 4 bcr2 y 19 bcr3), 15 *CBFB-MYH11* (12 tipo A, 2 tipo D y 1 tipo E) y 10 *RUNX1-RUNX1T1*. En cuatro de estos pacientes, 3 con inv(16) y 1 con t(15;17), no se habían detectado anomalías cromosómicas mediante citogenética y fue el empleo de la tarjeta microfluídica lo que permitió la detección de los transcritos de fusión aberrantes de forma retrospectiva (Tabla 10).

Tabla 10. Relación de pacientes con alteraciones detectadas mediante tarjetas microfluídicas que habían sido negativos por técnicas citogenéticas.

ID paciente	Cariotipo	sonda FISH / Resultado	Tránsito de fusión
20091847	46,XY [20]	t(15;17) PML-RARA / Normal	<i>PML-RARA bcr1</i>
20087060	46,XY [20]	11q23-MLL, C-8, 7q, 5q / Normal	<i>CBFβ-MYH11-A</i>
20095662	46,XY [12]	11q23-MLL, C-8, 7q, 5q / Normal	<i>CBFβ-MYH11-A</i>
20084744	46,XY [14]	11q23-MLL, C-8, 7q, 5q / Normal	<i>CBFβ-MYH11-E</i>

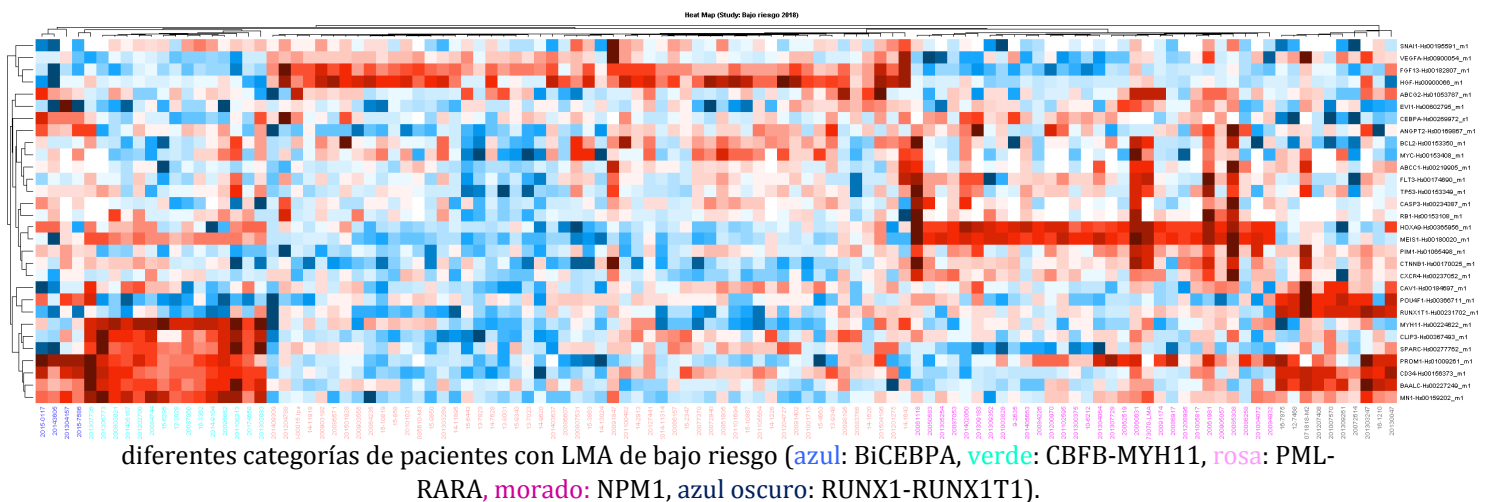
Además, 30 pacientes presentaron mutaciones en *NPM1* (28 tipo A, 1 tipo B y 1 tipo D), confirmadas posteriormente por secuenciación.

▪ Perfiles de expresión para diagnóstico de las LMA de bajo riesgo por subgrupos citogenéticos/moleculares:

Se realizó un test ANOVA para la comparación de medias de expresión entre las cinco categorías de LMA de bajo riesgo (*PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *NPM1* y *biCEBPA*). Se seleccionaron los 30 genes desregulados con mayores diferencias significativas ($p < 0.05$) para generar un mapa de calor o *heat map* como se muestra en la figura 10. El análisis supervisado permitió identificar genes capaces de discriminar los diferentes subgrupos de pacientes con gran precisión. Así, las LMA con t(15;17) presentaron un patrón característico con una infraexpresión generalizada de genes asociados con mal pronóstico, como *PIM1*

($p < 0.0001$), *TP53* ($p < 0.0001$) o *BAALC* ($p < 0.0001$), en cambio, *HGF* ($p < 0.0001$), *FGF13* ($p < 0.0001$) y *VEGFA* ($p = 0.007$) se sobreexpresaron en un elevado número de casos. Las LMA con $t(8;21)$ sobreexpresaron *RUNX1T1* ($p = 0.001$), *BAALC* ($p = 0.007$), *POU4F1* ($p = 0.008$), *CD34* ($p = 0.001$), y sin embargo infraexpresaron el gen anti-apoptótico *BCL2* ($p < 0.0001$). Las LMA con $inv(16)$ sobreexpresaron: *MYH11* ($p < 0.0001$), *MN1* ($p < 0.0001$), *CLIP3* ($p = 0.002$), *SPARC* ($p = 0.003$) y *BAALC* ($p = 0.005$), en cambio la expresión de *PIM1* ($p < 0.0001$) y *VEGFA* ($p < 0.0001$) fue prácticamente nula. En cuanto a las LMA con mutaciones en *NPM1*, todos los pacientes sobreexpresaron *HOXA9* ($p < 0.0001$) y su cofactor *MEIS1* ($p = 0.001$), y de forma más puntual *PIM1* ($p = 0.003$), *CASP3* ($p = 0.009$), *CXCR4* ($p = 0.005$), *FLT3* (0.014) y *TP53* ($p = 0.024$). Finalmente, las LMA biCEBPA sobreexpresaron: *CD133 (PROM1)* ($p < 0.0001$), *CEBP α* ($p < 0.0001$), *BAALC* ($p = 0.004$) y *CD34* ($p = 0.001$).

Figura 9. Heat map que muestra los resultados del análisis supervisado de expresión génica en las



diferentes categorías de pacientes con LMA de bajo riesgo (azul: BiCEBPA, verde: CBFb-MYH11, rosa: PML-RARA, morado: NPM1, azul oscuro: RUNX1-RUNX1T1).

▪ **Perfiles de expresión asociados con el pronóstico:**

En el análisis multivariante de SLR mediante regresión de Cox llevado a cabo en 29 de los 30 pacientes con LMA NPM1 y datos clínicos, se incluyeron como covariables continuas los niveles de expresión de los siguientes genes:

- Vías de diferenciación (factores de transcripción): *CEBPA*, *EVI1*, *WT1*, *ERG*, *SNAI1*, *MLL*, *MN1*, *MYC*.
- Vías de transducción de señales (proliferación, supervivencia y apoptosis): *ANGPT2*, *VEGFA*, *CXCR4*, *BCL2*, *TP53*, *NPM1*, *PRAME*, *CASP3*, *SPARC*, *FLT3*, *KIT*, *PIM1*, *RB1*, *CDKN2B*, *CTNNB1*.
- Metabolismo y resistencia a drogas: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2*.
- Antígenos: *CD34*, *CD133 (PROM1)*

Fueron seleccionadas con valor pronóstico adverso independiente la sobreexpresión del oncogén *PIM1* ($p = 0.026$) y del antígeno de superficie *CD34* ($p = 0.030$). Analizamos el valor de distintos puntos de corte para ambos genes, resultando únicamente significativa la sobreexpresión de *CD34* por encima del percentil 75 (HR 5.56, 95% CI 1.76-17.52, $p = 0.003$). En el análisis de Kaplan-Meier, demostramos que los pacientes con LMA-NPM1 que sobreexpresaban *CD34* por encima de este valor presentaban una SLR y una SG más cortas a 5

años (62% vs. 0%, $p=0.001$ y 67% vs. 29%, $p=0.005$, respectivamente) como se observa en la figura 11. En cuanto a la sobreexpresión de PIM1 observamos una SLR más corta para los pacientes que superaban el percentil 25 pero sin alcanzar significación estadística (39% vs. 75%, $p=0.181$).

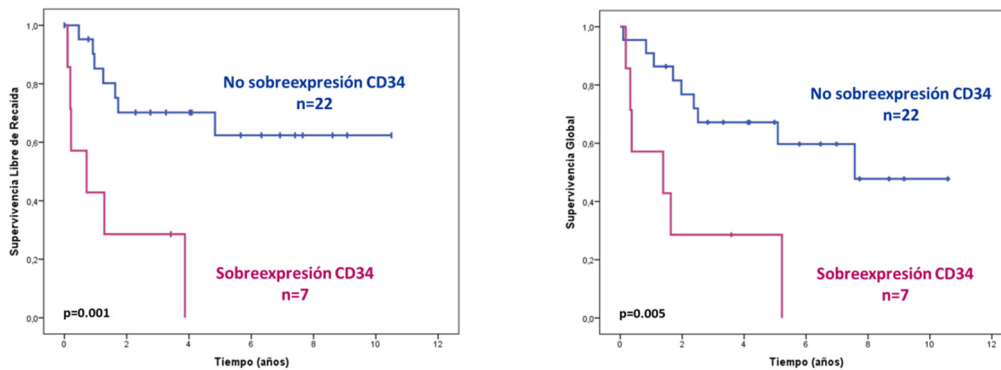


Figura 11. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier (SLR y SG) para los pacientes con LMA NPM1 según el nivel de expresión del gen *CD34*.

En las LMA CBF y en las BiCEBP α no pudimos demostrar asociación entre sobreexpresión y pronóstico para ninguno de los genes analizados debido al escaso número de pacientes estudiados en estos subgrupos.

Dentro del grupo de las LPA, se llevó a cabo un test ANOVA para encontrar diferencias en la expresión génica entre los tres subgrupos de riesgo (bajo, intermedio y alto). Únicamente la expresión del oncogén *MYC* presentó diferencias significativas ($p=0.002$) como puede observarse en la figura 12. Tomando como punto de corte para sobreexpresión el percentil 75, pudimos demostrar que 7 de los 13 (54%) pacientes de alto riesgo sobreexpresaban *MYC*, frente a 1/14 (7%) y 5/25 (20%) de los pacientes de riesgo bajo e intermedio, respectivamente. Sin embargo, no pudimos demostrar ninguna asociación entre la sobreexpresión de *MYC* y la SLR ya que solo uno de los dos pacientes que recayeron sobreexpresaba *MYC*.

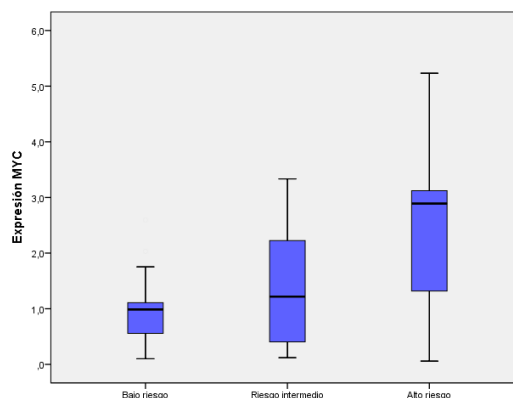


Figura 12. Diagrama de cajas que muestra las diferencias en la expresión del oncogén *MYC* entre los diferentes subgrupos de riesgo de leucemia promielocítica aguda ($p=0.002$).

DISCUSIÓN:

En este estudio nos hemos centrado en aquellos pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA) que a pesar haber sido clasificados como de bajo riesgo citogenético/molecular (14), tienen un comportamiento agresivo de la enfermedad y finalmente recaen. Estos pacientes están incluidos en cuatro subgrupos: LMA-CBF, LMA-NPM1, LMA-biCEBP α y leucemia aguda promielocítica (LPA). Por ello, hemos llevado a cabo un análisis genético integral de estas leucemias, que combina la evaluación de mutaciones somáticas mediante un panel de secuenciación de nueva generación con el análisis de expresión génica masiva empleando una estrategia de RQ-PCR personalizada mediante tarjetas microfluídicas.

En primer lugar, se evaluó la utilidad de un panel de secuenciación masiva que analiza genes implicados en patología mieloide comparándolo con las técnicas convencionales de análisis de mutaciones. En nuestro caso, detectamos todas las mutaciones halladas mediante secuenciación Sanger en los genes NPM1 y CEBP α pero, debido a la limitación del panel para la detección de inserciones y deleciones largas, solo pudo detectarse un 18% de las mutaciones FLT3-ITD, previamente analizadas mediante análisis de fragmentos, las cuales presentaban tamaños de entre 18 y 36 pb. Este resultado es similar al de otras publicaciones y es una limitación bien documentada del estudio de mutaciones por secuenciación masiva analizadas mediante amplicones (42).

En segundo lugar, se valoró la utilidad clínica de las tarjetas microfluídicas de baja densidad basadas en RQ-PCR, diseñadas nuestro laboratorio y que incluyen genes desregulados asociados con pronóstico o procesos patogénicos en la LMA, además de transcritos de fusión y mutaciones en el gen *NPM1*. Esta metodología, empleada en los 112 pacientes con ARN valorable, permitió detectar un total de 78 transcritos de fusión: 53 *PML-RAR α* , 15 *CBFB-MYH11* y 10 *RUNX1-RUNX1T1*, y 30 mutaciones en *NPM1*. Además, pudimos identificar perfiles de expresión génica que predicen con gran precisión la existencia de alteraciones citogenéticas/moleculares de bajo riesgo: la LMA t(15;17) sobreexpresa *HGF/FGF13/VEGFA*, la LMA t(8;21) sobreexpresa *RUNX1T1/POU4F1/CD34/BAALC*, la LMA inv(16) sobreexpresa *MYH11/MN1/CLIP3/SPARC/BAALC*, la LMA-NPM1 sobreexpresa *HOXA9/MEIS1/PIM1/CASP3/CSCR4* y la LMA biCEBPA sobreexpresa *PROM/CD34/BAALC/CEBPA*. Estos datos coincidieron con los publicados anteriormente por nuestro grupo (43). Además, la detección de transcritos de fusión aberrantes mediante esta nueva metodología basada en tarjetas, se comparó con la técnica clásica de citogenética, detectándose 3 casos con inv(16)/*CBFB-MYH11* y uno t(15;17)/*PML-RAR α* que habían sido negativos por cariotipo y FISH. Estos hallazgos fueron después confirmados mediante RQ-PCR convencional, validándose la utilidad de la tarjeta microfluídica para la detección sensible y específica de transcritos de fusión.

Número de mutaciones por paciente:

Aunque las LMA son uno de los tumores con menor número de mutaciones por paciente de todos los estudiados hasta la fecha, el rango varía ampliamente entre los casos individuales (44). Recientemente, un interesante trabajo llevado a cabo en más de 7500 tumores, muestra cómo el número de mutaciones que causan cáncer varía considerablemente según los diferentes tipos de tumores. Este trabajo, ha atraído de nuevo la atención sobre la importancia, no solo cualitativa, sino cuantitativa de las mutaciones en la tumorigénesis (45). Por ello, quisimos analizar el número de mutaciones presentes en el genoma de las LMA clasificadas como de riesgo favorable. Concretamente, en el presente estudio analizamos cuántas mutaciones adicionales a las propias de cada subgrupo (traslocación CBF, traslocación LPA, NPM1 mutada o CEBP α mutada) presentaban los pacientes. Observamos que las LPA, con una media de 1.5 mutaciones por paciente acompañando a la t(15;17), eran las leucemias de bajo riesgo con menor número de mutaciones, lo que coincide con lo descrito previamente por otros autores (36,46). De esta observación, podría deducirse que la fusión PML-RAR α necesita un menor número de eventos genéticos anómalos cooperantes que la LMA con mutaciones en NPM1 o aquellas que afectan a los factores de transcripción tipo CBF. Por el contrario, entre el resto de los subgrupos de LMA de bajo riesgo (LMA-CBF, LMA-NPM1 y LMA-biCEBP α) no se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de mutaciones, situándose en todos los casos en torno a 2-3 mutaciones por paciente. Este resultado, difiere del propuesto por Strickland et al. (47), donde observaron que las LMA-CBF tenían menos genes afectados que las LMA-NPM1. Estas diferencias probablemente se deban a que estos autores no incluyeron en su estudio algunos genes relevantes, como *CSF3R*, de gran importancia por su respuesta a los inhibidores de JAK2 (48), y que presentó mutaciones en 3 de los casos de LMA-CBF en nuestra serie. Además, a diferencia de nuestro estudio, seleccionaron a los pacientes con LMA-CBF sin mutaciones en KIT, grupo de riesgo favorable propuesto por la clasificación americana (49). En cambio, en la clasificación europea (14) no se contemplan las mutaciones en *KIT* para reclasificar a los pacientes. En las LMA-CBF, particularmente en LMA con t(8;21), la presencia de mutaciones en KIT parece estar asociada con un peor pronóstico, en especial en caso de niveles altos de carga mutacional (50,51). Sin embargo, según otros autores, la presencia de una mutación en KIT no debe asignar a un paciente una categoría de riesgo genético diferente, sino que en estos pacientes debe seguirse más de cerca el estudio de enfermedad mínima residual, cuya ausencia se ha demostrado que anula el efecto de KIT (27). De hecho, en la guía más actual sobre recomendaciones para la estratificación de los pacientes con LMA (14) no se tienen en cuenta las mutaciones en KIT para la clasificación de riesgo y por ello, en este trabajo se incluyeron todos los pacientes con LMA-CBF, con mutaciones en el receptor celular KIT o no.

En cuanto al valor pronóstico del número de mutaciones por caso, nuestro estudio reveló que cuanto mayor es el número de mutaciones, peor es el pronóstico. Los pacientes con más de dos mutaciones presentaron las tasas de SLR y SG más cortas y aquellos con 1 o 2 mutaciones tenían una peor evolución que los pacientes sin mutaciones. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo descrito previamente en LMA de

cariotipo intermedio para un número ≥ 3 (52) y en otras neoplasias mieloides, como los SMD, donde Papaemanni et al. observaron tasas de progresión a leucemia mayores a medida que aumentaba el número de mutaciones (53). Estos hallazgos sugieren que los casos con un gran número de mutaciones genéticas tienen un nivel correlativamente alto de inestabilidad genómica y señalan la posibilidad de que existan mutaciones en genes aún no examinados (54). Por lo tanto, para mejorar el análisis del pronóstico en LMA de bajo riesgo sería importante no solo centrarse en cada mutación individual, sino también identificar los casos de inestabilidad genómica general.

Funciones celulares afectadas en LMA de bajo riesgo (serie global):

La posibilidad de analizar, en un solo experimento y de manera simultánea, la presencia de mutaciones en la mayor parte de los genes conocidos relacionados con patología mieloide, nos proporcionó nuevos datos que nos han permitido profundizar en el conocimiento de la biología de las LMA, aportando ideas sobre las alteraciones que cooperan con las previamente descritas en la patogénesis de dicha entidad. En la serie global de pacientes de bajo riesgo analizada, se identificaron 405 mutaciones en 42 de los 54 genes estudiados. Estos genes se clasificaron en 7 categorías por su implicación en distintas funciones celulares relevantes para la supervivencia, proliferación y/o diferenciación. En general, las categorías funcionales más frecuentemente afectadas fueron los factores de transcripción (34% de las mutaciones), como *WT1* (9.6%), y aquellos implicados en las diferentes vías de señalización celular (33% de las mutaciones), incluyendo receptores tirosina quinasa (TK), como *FLT3* (17%), y otros implicados en la transducción de señales externas al núcleo de la célula, como *NRAS* (16%). Este resultado, se encuentra en concordancia con el antiguo “modelo de doble *hit*”, comentado previamente, según el cual la leucemogénesis incluiría el daño de un factor de transcripción que afectara a la diferenciación mieloide, seguido de una ventaja proliferativa adquirida mediante mutación de genes de señalización celular (36)

Además de estas funciones clásicamente reconocidas, se vieron también afectados genes implicados en otras funciones descritas más recientemente en neoplasias mieloides (1,55), como factores de metilación del ADN (8.6%), modificadores de la cromatina (4.7%), reguladores del proceso de *splicing* y componentes del complejo cohesinas (3.7%).

De todas las categorías funcionales estudiadas, la que mostró una menor afectación de sus genes en nuestra serie de LMA favorables, fue el control del ciclo celular. Tan solo 7 de las 405 mutaciones (1.7%) estaban presentes en genes de control del ciclo celular, como el supresor de tumores *TP53* (n=1) y otros reguladores de la proliferación (*PTEN*, *CDKN2A*), al contrario que lo descrito para LMA de riesgo adverso, en las que son frecuentes tanto las mutaciones en *TP53* como las pérdidas de 17p que afectan a este gen (56–58). Cabe destacar que, de los 7 pacientes afectados, 6 pertenecían al subgrupo LPA y solo uno era LMA-CBF. Estos resultados sugieren, que el proceso de leucemogénesis en las LMA con genética de bajo riesgo, se desarrolla por vías ajenas al control de *TP53*, sin ser necesaria la desregulación del ciclo celular.

Frecuencia alélica de las variantes (VAF):

Más allá de la presencia o ausencia de las mutaciones, quisimos estudiar las frecuencias alélicas (*variant allele frequency*, VAF) de las mismas. En los últimos años, se ha demostrado que la VAF puede usarse para inferir el árbol filogenético que acompaña al desarrollo de la leucemia (14). Varios estudios de evolución clonal en pacientes y en modelos de xenoinjertos derivados de pacientes, han revelado que las mutaciones en ciertos genes implicados en la metilación del ADN y el estado de la cromatina, como *DNMT3A*, *TET2* o *ASXL1*, están a menudo presentes en las células madre preleucémicas y ocurren de forma precoz en la leucemogénesis (59–62). Aunque tras importantes y numerosos estudios es evidente que tales mutaciones se presentan de forma temprana, muy recientemente, el valor clínico de las variantes en *DNMT3A*, *ASXL1* y *TET2* (variantes “DAT”) ha sido puesto en duda en un trabajo de Jongen-Lavrencic et al. en el que observaron cómo la persistencia de estas mutaciones a cualquier VAF en pacientes en remisión completa, no se asociaba con mayor incidencia de recaída (63). Tales mutaciones (DAT), aunque puedan persistir después del tratamiento y conducir a la expansión clonal durante la remisión, no serían las responsables de causar enfermedad recurrente. Estudios recientes en grandes cohortes de donantes mediante NGS de alta sensibilidad han identificado, mutaciones recurrentes en genes del espliceosoma, como *SRSF2* y *SF3B1* (64), muchas de ellas con VAFs menores del 3%, que dan lugar a hematopoyesis clonal en individuos ancianos, siendo mucho más frecuente de lo que se pensaba hasta ahora.

De acuerdo con esta idea, en nuestra serie observamos VAF significativamente superiores para las variantes ubicadas en genes de metilación, con una VAF media del 37.9% y, a continuación, las variantes en los genes de *splicing* (VAF media 31,8%). En el caso de los genes de metilación (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*), cabe destacar el caso de *IDH1*, que codifica la enzima del ciclo de Krebs isocitrato deshidrogenasa, y que en los pacientes que estaba mutado, casi todos LMA-NPM1, siempre fue el gen con mayor VAF, es decir, el primer evento en la leucemogénesis. Esto sugiere un compromiso temprano de la función metabólica en el desarrollo de la leucemia en estos pacientes y confirma lo descrito previamente (65). En el caso de los genes que controlan el *splicing* (*SRSF2*, *SF3B1*, *ZRSR2*), de nuevo, se encontraron preferentemente en las LMA-NPM1. En cambio, en nuestra serie de LMA de riesgo favorable, los genes reguladores de la cromatina (VAF media: 26.9%), estaban afectados en frecuencias alélicas inferiores a los de otras categorías como transcripción (VAF media: 28.9%) o *splicing* (VAF media: 31,8%), señalando una menor participación de estas alteraciones en la patogénesis de las LMA de bajo riesgo con respecto a las LMA en general observadas en otros trabajos (66). Estos resultados coinciden con el carácter tardío de los eventos mutacionales en genes que regulan el estado de la cromatina, descrito previamente por Papaemanuil et al. para los síndromes mielodisplásicos (53).

En definitiva, nuestros resultados sugieren que las mutaciones en metilación, seguidas de las de *splicing*, se encuentran al diagnóstico en un mayor porcentaje de las células, por lo que podría deducirse que corresponden a eventos más tempranos en el desarrollo de la LMA de riesgo genético favorable. Por el

contrario, las VAF más bajas se observaron en variantes de genes implicados en ciclo y señalización celular, sugiriendo una afectación más tardía de estos genes. Aunque en una enfermedad de gran heterogeneidad como la LMA estas reglas no pueden ser absolutas, nuestros resultados establecen tendencias robustas para dar idea sobre la adquisición de alteraciones genéticas a lo largo del desarrollo de la LMA.

Funciones celulares afectadas en los distintos subgrupos de LMA de bajo riesgo y su valor pronóstico:

▪ Subgrupo LMA-NPM1:

En trabajos anteriores (67) se ha establecido una asociación entre las mutaciones en el gen implicado en metilación DNMT3A y las mutaciones en NPM1. Estos hallazgos, se confirmaron en nuestro estudio, donde se observó que las mutaciones en genes de **metilación** (40% DNMT3A, 34% IDH1, 17% TET2, 11% IDH2), presentes en conjunto en un 80% de los pacientes con LMA-NPM1, en algunos casos con hasta 3 genes afectados en un mismo paciente, eran significativamente más frecuentes en este subgrupo de bajo riesgo que en otros como las LMA-CBF o las LPA. La presencia de estas mutaciones al diagnóstico no tenía impacto en el pronóstico de los pacientes, coincidiendo con la carencia de valor clínico recientemente descrita de las mutaciones en DNMT3A, que fueron las más frecuentes en genes de metilación en nuestra serie de LMA-NPM1.

También el subgrupo de LMA-NPM1 fue el que acumulaba un mayor número de mutaciones al diagnóstico en genes del espliceosoma o *splicing*, que codifican proteínas involucradas en el procesamiento del ARN pre-mensajero antes de su traducción a proteína (67). Del subgrupo LMA-NPM1, un 14% de los pacientes tenían alteraciones en ZRSR2, SF3B1 o SRSF2, al contrario que el subgrupo biCEBP α , donde no se identificó ninguna mutación en los reguladores del *splicing*, y que las LMA-CBF, con solo un caso de t(8;21) mutado en ZRSR2. Estas diferencias entre subgrupos, no fueron tan acusadas como en el caso anteriormente comentado de la metilación, debido al reducido número de casos afectados en general. No obstante, se observó que las mutaciones al diagnóstico en genes de *splicing* en los pacientes con LMA-NPM1, permitían identificar pacientes con SLR y SG significativamente más cortas. Esta característica genética de mal pronóstico tuvo valor independiente en el análisis multivariante tanto en términos de SLR como de SG, donde se incluyeron además variantes clásicas de mal pronóstico como la edad y la cifra de leucocitos. Otros trabajos previos han definido el mal pronóstico que pueden aportar las mutaciones que desregularían el proceso de *splicing*, aunque sin hacer distinción entre los distintos subgrupos de pacientes con LMA (68). Dado que las diferencias en cuanto a SLR observadas en nuestro estudio sí se tradujeron en una mayor mortalidad, serían necesarios estudios posteriores para definir la eficacia de los tratamientos de rescate en pacientes con LMA-NPM1 y mutaciones en genes de *splicing* que sufren recaída. En este sentido, Kronke et al. (60) estudiaron las posibles mutaciones responsables de estas recaídas en pacientes NPM1 positivos, sin embargo, no incluyeron en su estudio los genes de *splicing*, por lo que su papel en la recaída aún debe ser definido. Por otra parte, es importante mencionar que las mutaciones que afectan a los genes de *splicing* SF3B1 y SRSF2, se han

observado estrechamente asociadas con los síndromes mielodisplásicos, y que en los estudios en sujetos sanos se identificaron solo en personas mayores de 70 años (64). Esto indica que las mutaciones del espliceosoma impulsan la expansión clonal bajo presiones de selección que se dan particularmente en sistemas hematopoyéticos envejecidos, lo que explicaría la alta incidencia de trastornos clonales asociados con estas mutaciones en la edad avanzada (64). De forma destacable, en nuestro estudio, las mutaciones en *splicing* presentaron un valor pronóstico independiente de la edad. Estas mutaciones se encontraron en pacientes con edades comprendidas entre 59 y 76 años (mediana: 70).

La tasa de recaída de los pacientes LMA-NPM1 del presente estudio fue la mayor de todos los subgrupos de LMA de bajo riesgo analizados (41.9%). Dada la homogeneidad de tratamiento, el perfil genético compuesto por las mutaciones que acompañan a *NPM1* al diagnóstico (como los eventos tempranos en *splicing* y metilación) podría ser uno de los factores que contribuyen a estas diferencias en el pronóstico.

En este subgrupo también pudimos demostrar una asociación entre la sobreexpresión del antígeno de superficie CD34 y pronóstico adverso, resultando seleccionada como variable independiente, confirmando resultados previos de otros grupos (69,70).

▪ Subgrupo LMA-CBF:

De acuerdo con los datos publicados (14), y dado que nuestra serie de pacientes con LMA-CBF carecía de mutaciones *FLT3*-ITD, los genes más frecuentemente mutados fueron aquellos implicados en señalización, incluyendo al transductor de la señal *NRAS* (13/32, 41%) y al receptor tirosina-kinasa (TK) *KIT* (9/32, 28%). Además de estos genes, también se observaron mutaciones en casos aislados (3 pacientes de 32) en factores de metilación del ADN, como *TET2* o *DNMT3A*. También presentaron mutaciones en modificadores de la cromatina (7 de 32), como *MLL* o *ASXL1*, con mayor frecuencia que las LMA-NPM1 (3 de 35), pero menor que en las LPA, que fueron las que más mutaciones presentaron en los genes de esta categoría funcional.

Un resultado destacable fue la potencial implicación de la **vía Ras** en la recaída de los pacientes con LMA-CBF. Concretamente, observamos cómo la presencia de mutaciones en *NRAS* o *KRAS* al diagnóstico influía negativamente en la SLR de los pacientes, siendo la variable genética con mayor influencia en la probabilidad de recaída, por encima incluso de la edad de los pacientes de este subgrupo o las mutaciones en *KIT* (Tabla 5). Estas diferencias en SLR aportadas por las mutaciones en la vía de Ras no se tradujeron en cambios en la SG en nuestra serie, ya que de los 7 pacientes mutados que recayeron, 3 fueron tratados con tratamientos de rescate, incluido el trasplante alogénico, alcanzando una segunda remisión completa (RC). Y los otros 4 progresaron y finalmente murieron. El papel de las mutaciones en *NRAS/KRAS* en LMA sigue siendo un tema controvertido. Mientras que algunos autores afirman la ausencia de valor pronóstico en cuanto a tasa de RC, SLR y SG (71,72), otros han observado un valor clínico de las mutaciones en esta vía (72). El estudio de Kiyoi et al. mostró peores tasas de remisión en los casos RAS mutados en ausencia de *FLT3*-ITD (73), al igual que otras series pequeñas previamente reportadas (74). En el caso de Duployez et al., el estudio en LMA-CBF

reveló que los pacientes con ratios alélicas altas de mutaciones en *NRAS/KRAS* presentaban un ligero mejor pronóstico (75). Sin embargo, esta serie de pacientes, al contrario que en nuestro caso, incluyen todo tipo de LMA-CBF, incluidas aquellas con mutaciones FLT3-ITD, lo que podría estar influenciando el pronóstico final de los pacientes.

En nuestro estudio, a pesar de tratarse de un reducido número de casos, el valor de *NRAS/KRAS* se estudió en un contexto de tratamiento homogéneo y sin la influencia de mutaciones de peso en LMA, como FLT3-ITD, que además con frecuencia son excluyentes (76). Las proteínas RAS (*KRAS*, *HRAS* y *NRAS*) son GTPasas de la vía de las MAP-quinasas, cuya sobre-activación continua genera una estimulación celular constante de diversas funciones oncogénicas tales como crecimiento, progresión del ciclo celular a través de la fase G1-S, transformación del metabolismo celular hacia programas predominantemente anabólicos que sustentan los nuevos y elevados requerimientos tumorales, estimulación de la angiogénesis, immortalización celular o incremento de la motilidad y conferencia del potencial metastático (78,79). Las mutaciones encontradas en los pacientes con LMA-CBF en nuestro estudio fueron mutaciones de cambio de sentido que se localizaron todas en los codones 12, 13 y 61 del gen, y que habían sido previamente reportadas en otros tipos de cáncer y concretamente en LMA como mutaciones activadoras (80), lo que conduciría a una estimulación continua aberrante de la vía de las MAP-quinasas. Además de las implicaciones pronósticas que aquí valoramos, las mutaciones en los genes RAS se han asociado con respuesta al tratamiento en LMA en estudios previos. Concretamente, varios trabajos (81,82) han observado que los pacientes con LMA portadores de mutaciones en *KRAS* se beneficiaron de dosis más elevadas de Ara-C que los pacientes no mutados. Por todo ello, la detección de mutaciones previas al tratamiento podría ser un importante predictor de la estrategia de tratamiento y la supervivencia de los pacientes con LMA-CBF.

Otro resultado destacable en el grupo de **LMA-CBF** fue la presencia de mutaciones en el complejo de las **cohesinas** en una proporción de pacientes superior al resto de subgrupos de LMA de bajo riesgo. Además, la presencia de mutaciones en estos genes (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3*) permitía seleccionar un conjunto de pacientes con peor pronóstico dentro de las LMA-CBF, en cuanto a SLR y a SG. La influencia de estas mutaciones en la SG de los pacientes se conservó como variable independiente en el análisis multivariante. El complejo de las cohesinas es una estructura anular compuesta por 4 proteínas: *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *STAG*, que participa en la adhesión de las cromátidas hermanas durante la división celular, la regulación de la reparación del ADN post-replicación y el control transcripcional mediante la coordinación de interacciones entre promotores y otros elementos reguladores (83,84). Se ha observado que las mutaciones de los genes del complejo cohesinas son excluyentes con la citogenética de riesgo desfavorable, así como con cambios cromosómicos complejos. Por tanto, la hipótesis de que las mutaciones conducirían a la separación prematura de cromátidas hermanas en la LMA debería ser desechada (85). Por lo tanto, se prevé que las mutaciones en las cohesinas pueden tomar parte en la leucemogénesis por mecanismos alternativos. Dado que la habilidad de los potenciadores o *enhancers* transcripcionales para operar a larga distancia es mediada

por las cohesinas, uno de estos mecanismos podría basarse en que las mutaciones alterarían la transcripción desregulando la función de ciertos *enhancers*, al igual que ocurre en casos de variantes en genes de epigenética (86,87).

Aunque la función de las cohesinas en la célula parece estar bien definida, al igual que en el caso de las mutaciones en genes de *splicing* o de la vía Ras, no existe un consenso sobre el valor clínico de las mutaciones del complejo de las cohesinas en LMA. Son pocos los trabajos que analizan el papel de las cohesinas en el pronóstico de los pacientes. Tsai et al. (85), que estudiaron una serie de LMA de todos los tipos, sin distinción entre las diferentes categorías de riesgo, observaron un pronóstico favorable en caso de mutación de los genes que codifican cohesinas. Por el contrario, otros estudios (87,88) afirmaron no encontrar valor pronóstico para las mutaciones de este complejo. En el otro extremo, se encuentra el trabajo de Duployez et al., que quizá es el estudio genómico más completo realizado en LMA-CBF, donde concluyeron que las variantes en genes de cohesinas empeoraban el pronóstico de los pacientes con t(8;21). Nuestros resultados apoyan estos hallazgos, no solo en LMA-CBF con t(8;21), sino también en los casos de inv(16). Según nuestros datos, y a diferencia de lo reportado previamente (75,87), las mutaciones en los genes *STAG2* y *RAD21* también pueden aparecer en pacientes con inv(16) y, aunque menos frecuentes que en las t(8;21), no son exclusivas de éstas. En concreto, hallamos mutaciones en dos pacientes de nuestra serie con inv(16) y, de hecho, uno de ellos, presentaba mutaciones tanto en *STAG2* (p.Leu436AlafsTer, VAF 8%) como en *RAD21* (p.Lys605Glu, VAF 11%), ambas localizadas en regiones importantes de la proteína. En el caso de la mutación de *STAG2*, se trataba de un codón de stop, que eliminaban el dominio donde se ubican los sitios de fosforilación, de gran relevancia para la activación/desactivación de la proteína; y en el caso de *RAD21*, la mutación de cambio de sentido se encontraba en el dominio de unión de *SMC1*, otro de los factores que componen el complejo de las cohesinas. Cabe destacar sin embargo, que este paciente con inv(16) y dos mutaciones en genes de cohesinas era un caso especial desde el punto de vista genómico, al tratarse de un paciente con un número de mutaciones elevado (n=8), muy por encima de la media en LMA-CBF (media: 2.3 ± 1.8) y con unas frecuencias alélicas distintas del resto de pacientes, lo que sugiere un proceso de leucemogénesis diferente.

- **Subgrupo LPA:**

La LPA constituye un subgrupo de LMA de bajo riesgo reconocido como una entidad única por su sensibilidad al tratamiento con antraciclinas y su respuesta al tratamiento dirigido con ATRA y ATO. Observamos, según lo esperado, que su espectro mutacional difería del de otros subtipos de LMA de riesgo favorable. Hemos demostrado que la firma mutacional de la LPA queda definida por la presencia de mutaciones recurrentes en genes implicados en señalización celular, especialmente *FLT3*, y *NRAS*, además del gen *WT1* implicado en la transcripción, y en menor proporción mutaciones en el gen de *splicing* *ZRSR2*. Por otra parte, hemos confirmado la ausencia de mutaciones en genes estándar de las LMA como *NPM1*, *IDH1*, *PTPN11* y *EZH2*, así

como otros genes menos conocidos (*FBXW7*, *PHF6*, *SRSF2* y *ATRX*), que sí se encontraron mutados en los pacientes con LMA NO LPA de nuestro estudio. Sin embargo, aunque no se encontraron mutaciones en estos genes, las vías celulares afectadas fueron similares. Es el caso de *FBXW7*, no mutado en LPA pero implicado en la vía de *NOTCH1*, un gen que sí se encontró mutado. Ocurrió lo mismo con *PTPN11*, una fosfatasa clave en la vía de Ras, cuyos componentes *NRAS*, *KRAS*, *HRAS* y *CBL* sí se encontraron mutados en LPA. De hecho, se encontraron mutaciones en todas las categorías funcionales definidas previamente para el resto de LMA NO LPA. Al igual que los demás subgrupos, las LPA presentaban una mayor afectación de los genes de transcripción y señalización celular, según lo esperado. Además de un menor número de mutaciones por paciente, destaca en este grupo la baja frecuencia de mutación de los componentes del complejo de las cohesinas con respecto a otros grupos de LMA de bajo riesgo ($p=0.002$). En cambio, las LPA fueron las únicas LMA de este estudio con mutaciones en los genes de control del ciclo celular, entre los que se incluyen los supresores de tumores *TP53* y *PTEN*, salvo un caso aislado de LMA-CBF. Estas diferencias dan una idea de los distintos caminos que sigue el proceso patogénico con respecto a otros subgrupos de LMA, en las que la desregulación parece estar más relacionada con los procesos transcripcionales, en los que finalmente convergen la mayoría de las funciones afectadas (cohesinas, metilación del ADN, modificación de la cromatina), mientras que, en las LPA, parecen necesitar un menor número de alteraciones genéticas, siendo estas más agresivas.

De forma destacable, en este estudio hemos descrito el perfil mutacional de los tres grupos de LPA con distinto riesgo, definidos por las cifras de leucocitos y plaquetas, y hemos observado que la distribución de las mutaciones fue distinta entre ellos. En primer lugar, se identificó en el grupo de alto riesgo un mayor porcentaje de mutaciones en genes implicados en vías de señalización celular, como *FLT3*($n=15$), *CSF3R* ($n=1$), *KRAS*($n=1$), *NOTCH1*($n=1$) o *KIT*($n=1$), con respecto a los grupos de riesgo intermedio y bajo ($p=0.002$). Estos resultados coinciden con los publicados por Shen et al., en un trabajo en el que estudiaron únicamente 13 genes, excluyendo importantes categorías como los genes de *splicing*, de la transcripción o los relacionados con epigenética. Hay que destacar, que, de los genes implicados en señalización celular, el más frecuentemente mutado fue el receptor *FLT3*, con una incidencia de mutaciones *FLT3*-ITD del 65% en los pacientes de alto riesgo, frente a un 15% y 21% respectivamente, en los grupos de intermedio y bajo riesgo. A pesar de estas diferencias en la presencia de *FLT3*-ITD, no se observó un peor pronóstico en los pacientes mutados. Otro hallazgo que destacar en nuestro estudio con respecto a la categoría funcional de señalización celular fue la ausencia de mutaciones en el gen *NRAS* en los pacientes de alto riesgo, que por el contrario sí estaba mutado en los pacientes de riesgo intermedio (9.6%) y más frecuentemente en el grupo de riesgo favorable (13.8%). En este caso, sí se observaron diferencias en cuanto al pronóstico de los pacientes. De hecho, los 3 pacientes de bajo riesgo LPA que sufrieron recaída presentaban ya al diagnóstico mutaciones en el dominio Ras del gen *NRAS*. En todos los casos, estas mutaciones tuvieron como consecuencia un cambio de aminoácido (*missense*) y se localizaron en los codones 61 y 65 del gen, previamente descritos y conocidos

por su valor tumorigénico en varios tipos de cáncer, debido a que provocan la activación constante y descontrolada de NRAS, y con ello una sobreactivación de la vía de las MAP-quinasas, que conduce a una proliferación celular aberrante (78). El único paciente con LPA de bajo riesgo y mutaciones en NRAS que no experimentó recaída, presentaba una mutación distinta que dio lugar a una proteína NRAS truncada, lo que potencialmente anularía su función, en contraposición con las mutaciones sobre-activadoras de los pacientes que sí recayeron. El potencial mal pronóstico aportado por las mutaciones en NRAS en los pacientes de bajo riesgo LPA, se observó en términos de supervivencia, con SLR a 5 años significativamente más cortas (25% vs. 100%, $p < 0.0001$). Estudios previos sobre el valor clínico de NRAS en LPA no han encontrado un papel claro de estas mutaciones en la evolución de los pacientes, (89,90), sin embargo, su valor en el subgrupo concreto de LPA de bajo riesgo, no había sido estudiado a fondo. Estos antecedentes, coinciden con nuestros datos en la serie global de LPA, donde no se encontraron diferencias en SLR ni SG debidas a las mutaciones que afectaron a ninguna de las 7 categorías funcionales estudiadas.

En cuanto al estudio de expresión génica en los tres subgrupos de riesgo de LPA, aunque observamos que los pacientes de alto riesgo sobreexpresaban el oncogén MYC de forma significativa, sin embargo, no pudimos demostrar una asociación con el pronóstico debido al reducido número de recaídas en este subgrupo. Estos resultados están en la línea de los publicados por Awwad et al. (91), que demuestran un descenso en la expresión de MYC en la mayoría de los pacientes con LPA después del tratamiento con ATRA, lo que podría explicar que los pacientes de alto riesgo presenten niveles más altos de MYC que el resto.

Por lo tanto, aunque la clasificación de riesgo basada en el conteo de plaquetas y leucocitos ha demostrado ser una forma validada de identificar pacientes al diagnóstico con LPA y alto riesgo de recidiva (90), siguen existiendo pacientes que recaen incluso dentro del grupo de bajo riesgo, como demostramos en nuestro estudio, donde las tasas de recaída fueron similares entre ambos grupos.

En cuanto al grupo de LPA de riesgo intermedio ($n=52$), en el que recayeron 8 pacientes, todos excepto un caso, presentaron mutaciones en alguno de los genes estudiados y pertenecían a diversas categorías funcionales, como señalización celular (FLT3), ciclo celular (PTEN), transcripción (WT1 y CUX1), o modificación de la cromatina (ASXL1). En cambio, los pacientes que permanecían en remisión completa, carecían de mutaciones frecuentemente (40%), lo que sugiere que la presencia de alteraciones genéticas adicionales a *PML-RAR α* tendrían un valor pronóstico desfavorable que habría que confirmar en series con mayor número de pacientes con LPA de riesgo intermedio.

En este trabajo, tras definir la firma mutacional de los distintos grupos de LPA, quisimos estudiar si existía una influencia molecular en el mal pronóstico asociado a la expresión del antígeno de membrana CD56.

Además de en la LPA, la expresión de CD56 también ha sido propuesta como factor pronóstico desfavorable en la LMA con t(8;21) (92). Sin embargo, otros trabajos recientes indican que la expresión de CD56 no se relaciona por sí sola con una peor evolución en términos de SLR ni SG (90,93). Ante esta controversia, algunos autores han propuesto que el valor otorgado a CD56 se debe en realidad a la presencia de otros eventos moleculares asociados a su expresión en la leucemia, como ocurre con la trisomía 4 o las mutaciones en *c-KIT* para el caso de la LMA con t(8;21) (90).

En nuestra serie de pacientes con LPA observamos que el grupo CD56 positivo presentaba una tasa de mutación significativamente mayor en genes de factores de transcripción (83.3%), como *WT1*, *ETV6* o *CUX1*, con respecto a aquellos pacientes que no expresaban CD56 (30.7%) ($p=0.011$). Aunque son escasos, existen estudios previos sobre las causas de la expresión aberrante de CD56 en LMA (94) y en otras neoplasias hematológicas, como el mieloma múltiple (95), donde se ha propuesto que la ausencia de expresión de este antígeno podría contribuir a un empeoramiento del curso de la enfermedad (96). En ellos, se ha demostrado que ciertos factores de transcripción concretos, como *RUNX1*, *BTBD3* o *MMSET*, podrían activar el promotor del gen que codifica CD56. Con estos antecedentes, para el caso de la LPA, podría especularse que al existir una mayor desregulación de los factores transcripcionales debida a su estado mutacional, estos podrían estar actuando sobre el promotor de CD56, aumentando su expresión. En cualquier caso, se necesitan estudios funcionales para establecer conexiones directas entre los factores transcripcionales *WT1*, *ETV6* y *CUX1* y la regulación del promotor CD56.

En resumen, el trabajo de investigación llevado a cabo en este capítulo ha permitido identificar, gracias a un análisis global (mutaciones y perfil de expresión génica), varias alteraciones que aportan nueva información acerca de la patogénesis de la LMA de bajo riesgo y que podrían tener relevancia clínica para esta enfermedad. En este estudio, se demuestran diferencias significativas en el perfil genético de las distintas subcategorías de LMA de riesgo favorable y en las funciones celulares afectadas en cada caso, como las mutaciones en los genes de *splicing* en el subgrupo de LMA-NPM1, del complejo de las cohesinas en las LMA-CBF y la alteración de la vía de Ras tanto en LMA-CBF como en LPA de bajo riesgo.

En conjunto, todos los genes descritos en esta tesis doctoral podrían estar contribuyendo en la patogénesis de las LMA de bajo riesgo y, en un futuro podrían considerarse como marcadores diagnósticos e incluso, en algunos casos, como posibles dianas terapéuticas para mejorar el pronóstico de los pacientes y evitar recaídas. Como conclusión, nuestros resultados confirman la complejidad de la patogénesis molecular también en los grupos de bajo riesgo, donde aún existen pacientes que recaen y mueren. Además, demuestran la utilidad de las técnicas de análisis masivo (secuenciación masiva y tarjetas microfluídicas) en el estudio de la LMA, al tratarse de una enfermedad muy heterogénea a nivel clínico y molecular.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Hartmut Döhner, M.D., Daniel J. Weisdorf, M.D., and Clara D. Bloomfield MD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2015;373.
2. Szer J. The prevalent predicament of relapsed acute myeloid leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2012;2012:43-8.
3. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;106(4):1154-63.
4. Sanz MA, Iacoboni G, Montesinos P, Venditti A. Emerging strategies for the treatment of older patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2016;95(10):1583-93.
5. Bryan JC, Jabbour EJ. Management of Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia in the Elderly: Current Strategies and Developments. *Drugs Aging.* 2015;32(8):623-37.
6. Saraceni F, Labopin M, Gorin N-C, Blaise D, Tabrizi R, Volin L, et al. Matched and mismatched unrelated donor compared to autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a retrospective, propensity score-weighted analysis from the ALWP of the EBMT. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):79.
7. Almeida AM, Ramos F. Acute myeloid leukemia in the older adults. *Leuk Res reports.* 2016;6:1-7.
8. Sanford D, Ravandi F. Management of Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia in the Elderly: Current Strategies and Future Directions. *Drugs Aging.* 2015;32(12):983-97.
9. Lo-Coco F, Cicconi L, Breccia M. Current standard treatment of adult acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2016;172(6):841-54.
10. Mi J-Q, Li J-M, Shen Z-X, Chen S-J, Chen Z. How to manage acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* agosto de 2012;26(8):1743-51.
11. Sanz MA, Coco F Lo, Marti G, Avisati G, Rayo C, Fioritoni G, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia : a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood.* 2000;96(4):1247-54.
12. Forman SJ, Rowe JM. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult. *Blood.* 2013;121(7):1077-82.
13. Pulte D, Jansen L, Castro FA, Krilaviciute A, Katalinic A, Barnes B, et al. Survival in patients with acute myeloblastic leukemia in Germany and the United States: Major differences in survival in young adults. *Int J cancer.* 2016;139(6):1289-96.
14. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017. 129:424-447 .
15. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-406.
16. Vardiman JW, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2008;114(5):937-52.
17. Straube J, Ling VY, Hill GR, Lane SW. The impact of age, NPM1(mut), and FLT3(ITD) allelic ratio in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2018. 131:1148-53.
18. Döhner H, Estey E, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett a. K, 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.
19. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017;15(7):926-57.
20. Hou H a, Lin CC, Chou WC, Liu CY, Chen CY, Tang JL, et al. Integration of cytogenetic and molecular alterations in risk stratification of 318 patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2014;28(1):50-8.
21. 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.
22. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela J-M, Tigaud I, de Botton S, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood.* 2002;100(8):2717-23.
23. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood.* 2005;106(12):3733-9.

24. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109(3):874-85.
25. Marcucci G, Mrozek K, Ruppert AS, Maharry K, Kolitz 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. *J Clin Oncol*. 2005;23(24):5705-17.
26. 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. *Br J Haematol*. 2006;135(2):165-73.
27. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(12):2213-23.
28. 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. *J Clin Oncol*. 2004;22(18):3741-50.
29. Kronke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschurtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2709-16.
30. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. 2010;28(16):2739-47.
31. Mathews V, George B, Chendamarai E, Lakshmi KM, Desire S, Balasubramanian P, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3866-71.
32. Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghaffari SH, Jahani M, Iravani M, et al. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2753-7.
33. Zhou J, Zhang Y, Li J, Li X, Hou J, Zhao Y, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of children with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(9):1697-702.
34. Sanz MA, Lo-Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. febrero de 2011;29(5):495-503.
35. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*. 2013;97(6):717-25.
36. Madan V, Shyamsunder P, Han L, Mayakonda A, Nagata Y, Sundaresan J, et al. Comprehensive mutational analysis of primary and relapse acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2016;30(8):1672-81.
37. Schachter-Tokarz E, Kelaidi C, Cassinat B, Chomienne C, Gardin C, Raffoux E, et al. PML-RARalpha ligand-binding domain deletion mutations associated with reduced disease control and outcome after first relapse of APL. *Leukemia*. 2010. 24:473-6.
38. Gallagher RE, Moser BK, Racevskis J, Poire X, Bloomfield CD, Carroll AJ, et al. Treatment-influenced associations of PML-RARalpha mutations, FLT3 mutations, and additional chromosome abnormalities in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(10):2098-108.
39. Gurrieri C, Nafa K, Merghoub T, Bernardi R, Capodiecì P, Biondi A, et al. Mutations of the PML tumor suppressor gene in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2004;103(6):2358-62.
40. Goto E, Tomita A, Hayakawa F, Atsumi A, Kiyoi H, Naoe T. Missense mutations in PML-RARA are critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood*. 2011;118(6):1600-9.
41. Lehmann-Che J, Bally C, de Thé H. Resistance to therapy in acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 2014 371(12):1170-2.
42. Kuo FC, Dong F. Next-Generation Sequencing-Based Panel Testing for Myeloid Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10(2):104-11.
43. Gutierrez NC, Lopez-Perez R, Hernandez JM, Isidro I, Gonzalez B, Delgado M, et al. Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19(3):402-9.
44. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G V, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
45. Martincorena I, Raine KM, Gerstung M, Dawson KJ, Haase K, Van Loo P, et al. Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic

- Tissues. Cell. 2017;171(5):1029-1041.e21.
46. Ibáñez Company M. Caracterización Molecular de las Leucemias Mieloides Agudas de novo (Tesis doctoral). Universidad de Valencia. 2013.
 47. Strickland SA, Shaver AC, Byrne M, Daber RD, Ferrell PB, Head DR, et al. Genotypic and clinical heterogeneity within NCCN favorable-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2018;65:67-73.
 48. Lavalley V-P, Kros J, Lemieux S, Boucher G, Gendron P, Pabst C, et al. Chemo-genomic interrogation of CEBPA mutated AML reveals recurrent CSF3R mutations and subgroup sensitivity to JAK inhibitors. *Blood.* 2016;127(24):3054-61.
 49. Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, Bejar R, Bennett JM, et al. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017;15(1):60-87.
 50. Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AML5SG). *Blood.* 2013;121(1):170-7.
 51. Allen C, Hills RK, Lamb K, Evans C, Tinsley S, Sellar R, et al. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2013;27(9):1891-901.
 52. Wakita S, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kurosawa S, Kobayashi Y, et al. Complex molecular genetic abnormalities involving three or more genetic mutations are important prognostic factors for acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016;30(3):545-54.
 53. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* noviembre de 2013;122(22):3616-27.
 54. Ryotokuji T, Yamaguchi H, Ueki T, Usuki K, Kurosawa S, Kobayashi Y, et al. Clinical characteristics and prognosis of acute myeloid leukemia associated with DNA-methylation regulatory gene mutations. *Haematologica.* 2016;101(9):1074-81.
 55. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014;28(2):241-7.
 56. Seifert H, Mohr B, Thiede C, Oelschlagel U, Schakel U, Illmer T, et al. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009;23(4):656-63.
 57. 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. *J Clin Oncol.* 2008;26(29):4791-7.
 58. Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005;43(3):227-38.
 59. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2012;4(149):149ra118.
 60. Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschurtz F, Gaidzik VI, Kuhn MWM, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;122(1):100-8.
 61. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2548-53.
 62. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328-33.
 63. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Kavelaars FG, Al Hinai ASA, Zeilemaker A, Eipelink-Verschueren CAJ, et al. Prospective Molecular MRD Detection By NGS: A Powerful Independent Predictor for Relapse and Survival in Adults with Newly Diagnosed AML. *Blood.* 2017;130:LBA-5
 64. McKerrell T, Park N, Moreno T, Grove CS, Ponstingl H, Stephens J, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep.* 2015;10(8):1239-45.
 65. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Haddank M, Kronke J, Bullinger L, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol.* 2010;28(22):3636-43.
 66. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet.* 2012;44(11):1179-81.

67. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-42.
68. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
69. Dang H, Chen Y, Kamel-Reid S, Brandwein J, Chang H. CD34 expression predicts an adverse outcome in patients with NPM1-positive acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*. 2013;44(10):2038-46.
70. Zhu H-H, Liu Y-R, Jiang H, Lu J, Qin Y-Z, Jiang Q, et al. CD34 expression on bone marrow blasts is a novel predictor of poor prognosis independent of FIT3-ITD in acute myeloid leukemia with the NPM1-mutation. *Leuk Res*. 2013;37(6):624-30.
71. Bowen DT, Frew ME, Hills R, Gale RE, Wheatley K, Groves MJ, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*. 2005;106(6):2113-9.
72. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*. 2006;107(10):3847-53.
73. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999;93(9):3074-80.
74. Al-Issa K, Nazha A. Molecular landscape in acute myeloid leukemia: where do we stand in 2016. *Cancer Biol Med*. 2016;13(4):474-82.
75. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2451-9.
76. The Cancer Genome Atlas Research Network, Cancer T, Atlas G. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia The Cancer Genome Atlas Research Network. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
77. Cancer T, Atlas G. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia The Cancer Genome Atlas Research Network. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
78. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. mayo de 2012;72(10):2457-67.
79. Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*. 2012;149(3):656-70.
80. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. enero de 2003;3(1):11-22.
81. Ahmad EI, Gawish HH, Al Azizi NM, Elhefni AM. The prognostic impact of K-RAS mutations in adult acute myeloid leukemia patients treated with high-dose cytarabine. *Onco Targets Ther*. 2011;4:115-21.
82. Brendel C, Teichler S, Millahn A, Stiewe T, Krause M, Stabla K, et al. Oncogenic NRAS Primes Primary Acute Myeloid Leukemia Cells for Differentiation. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123181.
83. Kon A, Shih L-Y, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232-7.
84. Leeke B, Marsman J, O'Sullivan JM, Horsfield JA. Cohesin mutations in myeloid malignancies: underlying mechanisms. *Exp Hematol Oncol*. 2014;3:13.
85. Tsai C-H, Hou H-A, Tang J-L, Kuo Y-Y, Chiu Y-C, Lin C-C, et al. Prognostic impacts and dynamic changes of cohesin complex gene mutations in de novo acute myeloid leukemia. *Blood cancer journal*. 2017;7: 663.
86. Herz H-M, Mohan M, Garruss AS, Liang K, Takahashi Y-H, Mickey K, et al. Enhancer-associated H3K4 monomethylation by Trithorax-related, the Drosophila homolog of mammalian Mll3/Mll4. *Genes Dev*. 2012;26(23):2604-20.
87. Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, Boggs K, Cheng J, Ma J, et al. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat Genet*. 2016;48(12):1551-6.
88. Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, Walter C, Dugas M, Suchanek KJ, et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *Blood*. 2014;123(6):914-20.
89. Shen Y, Fu Y-K, Zhu Y-M, Lou Y-J, Gu Z-H, Shi J-Y, et al. Mutations of Epigenetic Modifier Genes as a Poor Prognostic Factor in Acute Promyelocytic Leukemia Under Treatment With All-Trans Retinoic Acid and Arsenic Trioxide. *EBioMedicine*. 2015;2(6):563-71.
90. Testa U, Lo-Coco F. Prognostic factors in acute promyelocytic leukemia: strategies to define high-risk patients. *Ann Hematol*. 2016;95(5):673-80.
91. Awwad RT, Do K, Stevenson H, Fu SW, Lo-Coco F, Costello M, et al. Overexpression of BP1, a homeobox gene, is associated with

- resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Ann Hematol.* 2008;87(3):195-203.
92. De J, Zanjani R, Hibbard M, Davis BH. Immunophenotypic profile predictive of KIT activating mutations in AML1-ETO leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(4):550-7.
93. Ono T, Takeshita A, Kishimoto Y, Kiyoi H, Okada M, Yamauchi T, et al. Expression of CD56 is an unfavorable prognostic factor for acute promyelocytic leukemia with higher initial white blood cell counts. *Cancer Sci.* 2014;105(1):97-104.
94. Zaidi SZA, Motabi IH, Al-Shanqeeti A. CD56 and RUNX1 isoforms in AML prognosis and their therapeutic potential. *Hematology/oncology and stem cell therapy.*; 2016; 9(3): 129-30.
95. Damgaard T, Knudsen LM, Dahl IMS, Gimsing P, Lodahl M, Rasmussen T. Regulation of the CD56 promoter and its association with proliferation, anti-apoptosis and clinical factors in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2009;50(2):236-46.
96. Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, Fujisawa S, Takeshita K, Naito K, et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2002;117(4):882-5.

CAPÍTULO 2

NUEVA ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL ESTUDIO SIMULTÁNEO DE MUTACIONES Y REORDENAMIENTOS CROMOSÓMICOS EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

RESUMEN:

Introducción:

Hoy en día, existe un creciente interés en detectar en un único test de secuenciación masiva (NGS) toda la variedad de alteraciones con valor diagnóstico y pronóstico en las leucemias mieloblásticas agudas (LMA), por lo que cada vez son más los laboratorios que están implantando dicha tecnología en la rutina clínica para el manejo de la LMA. Sin embargo, son pocos los trabajos que estudian además de mutaciones génicas, el resto de las alteraciones en LMA. Ya que todavía existen limitaciones técnicas para la detección de reordenamientos, los métodos convencionales continúan siendo imprescindibles. Es necesario mejorar los diseños de los paneles y simplificar el análisis informático.

Objetivos:

1) Identificar mediante NGS basada en captura las alteraciones genéticas más frecuentes en las LMA (sustituciones, inserciones/deleciones y traslocaciones/inversiones), así como nuevas alteraciones no detectadas por técnicas convencionales. 2) Demostrar la utilidad de la NGS para definir el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con LMA en la práctica clínica. 3) Comparar cuatro estrategias bioinformáticas para el análisis de las variantes estructurales características de las LMA.

Material y métodos:

Se estudiaron mediante NGS muestras de ADN genómico de MO al diagnóstico de 30 pacientes (27 LMA, 3 LMC) con alteraciones detectadas previamente mediante técnicas convencionales (cariotipo, FISH y/o RQ-PCR) y un donante como control. Se diseñó un panel a medida basado en captura (Nextera Custom Enrichment, Illumina) en el que se incluyeron: 1) 32 genes recurrentemente mutados en neoplasias mieloides (exones completos y/o regiones *hotspot*). 2)

Zonas de rotura intrónicas o exónicas previamente identificadas en cada uno de los *partners* de las traslocaciones más frecuentes (PML-RARA, CBFb-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, MLL-MLLT3, BCR-ABL1). 3) Zonas de rotura habituales de uno de los dos genes implicados en los reordenamientos poco frecuentes (NUP98-NSD1, ETV6-PDGFRB, DEK-NUP214, etc) o con varios *partners*, como MLL (KMT2A). Las librerías de ADN fueron secuenciadas en el equipo MiSeqDx (Illumina). Las secuencias se analizaron mediante un *pipeline* que incluye el algoritmo 'Manta Structural Variant Caller' (incluido en el software Enrichment, de Illumina) para la detección de traslocaciones y el software *VariantStudio* v3.0 (Illumina) para la detección de mutaciones somáticas. Finalmente, se comparó la eficacia de cuatro algoritmos distintos para la detección de variantes estructurales a nivel de ADN (Manta, Lumpy, GASV y DELLY2). Además, se llevó a cabo un estudio de expresión génica mediante una tarjeta microfluidica basada en RQ-PCR (TaqMan Array Micro Fluidic Cards, ThermoFisher), diseñada también por nuestro grupo, que estudia 96 marcadores simultáneamente en cada paciente: 36 genes de fusión y 57 genes con valor diagnóstico/pronóstico en LMA y 3 genes control.

Resultados:

La cobertura media de secuenciación de todas las muestras fue de 819X ($\pm 261x$). Mediante el software *VariantStudio* (Illumina) se identificaron 41 mutaciones (33 sustituciones y 8 indels) en 21/30 pacientes con una media de 1.4 mutaciones por paciente. En un caso con t(8;21) se detectó la mutación p.Asp816His en KIT, de mal pronóstico y no identificada por técnicas convencionales. Además, se detectaron dos de las tres duplicaciones internas en tándem de FLT3 (FLT3-ITD), caracterizadas previamente (una de 30 pb y otra de 36 pb), pero no una ITD de 108 pb, y una mutación FLT3-TKD p.Asp835Tyr con una VAF del 3.6%. Todas las variantes fueron validadas con un panel de NGS de amplicones TruSight Illumina (concordancia: 100%). Además, En los mismos datos de NGS, también se analizaron las variantes estructurales. En primer lugar, se empleó el software Enrichment (algoritmo MANTA), seleccionado por su sencillez y su potencial aplicabilidad en el laboratorio clínico. Con dicho software se identificaron 18 de los 24 (75%) reordenamientos detectados por cariotipo/FISH y/o RQ-PCR: t(15;17) (4/4), inv(16) (3/5), t(8;21) (1/3), t(9;22) (4/5), fusiones de MLL (3/4), MLL-PTD (2/2) y t(1;17) (1/1). De forma destacable, caracterizamos una t(1;17)-IRF2BP2/RARA, capturada y secuenciada desde el *partner* RARa, que no había sido detectada mediante las técnicas convencionales. Además, fuimos capaces de identificar una nueva traslocación t(3;21), que involucraba al gen del factor de transcripción mieloide RUNX1(21q22.1) y al gen LRRC34 (3q26.2). Los 6 casos discordantes negativos por NGS analizada con Enrichment fueron 2 inv(16) CBFbMYH11, 2 t(8;21) RUNX1-RUNX1T1, 1 t(9;22) BCR-ABL y 1 t(11;19) MLL-MLLT1. De estos 6 casos, todos excepto la t(11;19)

habían sido detectados previamente en ARN mediante RQ-PCR. Cuatro de los 6 [2 inv (16) y 2 t(8;21)] presentaban un cariotipo normal, siendo dos de ellos también negativos por FISH y, la t(9;22) fue identificada tanto por citogenética/FISH como por RQ-PCR. Empleando 3 pipelines propios, se realizó un nuevo análisis de los 6 falsos negativos obtenidos con el software Enrichment. El algoritmo Lumpy fue el más eficaz para la detección de reordenamientos, permitiendo identificar 5 de los 6 casos analizados (83%) y superando así a los análisis basados en GASV y DELLY2 que identificaron 3/6 (50%) y 4/6 (67%) reordenamientos respectivamente. El algoritmo Lumpy fue capaz de caracterizar tanto los casos falsos negativos de la citogenética como el paciente con dos alteraciones. En cuanto a la t(11;19), no pudo ser detectada por ninguno de los cuatro algoritmos de análisis ni tampoco mediante RQ-PCR. Las alteraciones numéricas no se analizaron con este panel.

Además, el estudio en tarjetas microfluídicas permitió identificar patrones de expresión génica característicos que predicen la existencia de determinadas alteraciones citogenéticas, especialmente las de buen pronóstico, confirmando los resultados previos del capítulo 1. Los pacientes con t(15;17) sobreexpresaron HGF, FGF13 y VEGFA; los pacientes con inv(16) sobreexpresaron MYH11, CLIP3, SPARC, BAALC, CD34 y MN1 y aquellos con t(8;21) presentaron altos niveles de RUNX1T1, POU4F1, CD34, CAV1 y BAALC. En cuanto a los pacientes con reordenamientos en 11q23, aunque mostraron un patrón característico con alta expresión de HOXA7, HOXA9 y MEIS1, no sirvió para discriminar con precisión a estos pacientes del resto.

Discusión y conclusiones:

La estrategia de secuenciación masiva basada en captura desarrollada y validada en este trabajo permite analizar en un solo test tanto mutaciones puntuales en los genes más relevantes en LMA, como los reordenamientos (traslocaciones e inversiones) a nivel de ADN que afectan recurrentemente a las células leucémicas. Una de las ventajas de esta estrategia es que requiere muy poca cantidad de ADN de partida (50 ng), pudiéndose estudiar todas las traslocaciones en una sola reacción de secuenciación sin aumentar la cantidad de muestra. Proponemos un método sencillo de análisis con dos softwares de fácil manejo, VariantStudio para mutaciones y Enrichment para reordenamientos, con el fin de poder aplicar estas herramientas bioinformáticas en el laboratorio clínico. Sin embargo, es necesario optimizar el diseño de programas de análisis para detectar ciertas alteraciones estructurales con mayor fiabilidad minimizando el número de falsos negativos. Por ello, validamos nuestro diseño con un *pipeline* propio basado en algoritmos de acceso libre y comparamos a su vez la utilidad de tres herramientas distintas de análisis de variantes estructurales en datos de NGS (Lumpy, GASV y DELLY2). Demostramos que el algoritmo Lumpy resulta el más adecuado para la identificación

de traslocaciones e inversiones en datos de secuenciación masiva. El siguiente paso, será implementar los algoritmos de elección en softwares manejables que no requieran el uso de programación, para su adaptación al laboratorio de diagnóstico clínico. Nuestros resultados demuestran que este panel es capaz de identificar todas las alteraciones genéticas previamente detectadas mediante técnicas convencionales de citogenética/FISH y RQ-PCR, tanto mutaciones puntuales (sustituciones y pequeños indels) como inversiones y traslocaciones, excepto un caso con una t(11;19) que también había sido negativo por RQ-PCR y que no pudo ser detectada por ninguno de los cuatro algoritmos de análisis. Estos datos sugieren que nuestro diseño no cubre el punto de rotura de la traslocación en este caso concreto, porque se sitúa fuera de la región más frecuentemente involucrada (intrones 6-11 y exones 7-11) y que fue la incluida en este panel. En todos los casos de traslocaciones más frecuentes para las que se incluyeron ambos *partners* en el diseño [t(15;17), t(8;21), inv(16) y t(9;11)] observamos que el reordenamiento es capturado y secuenciado desde los dos genes, lo que sugiere la posibilidad de reducir el tamaño del panel en futuras versiones, secuenciando solo uno de los genes. Además, fuimos capaces de detectar los reordenamientos secuenciados desde sólo uno de los dos *partners*, como ocurrió con una t(6;11), capturada desde MLL y una t(1;17)-IRF2BP2/RARA no descrita previamente, capturada y secuenciada desde RARA y que había sido caracterizada mediante PCR-RACE. Además, detectamos una nueva traslocación, la t(3;21)-RUNX1/LRRC34, tampoco identificada hasta ahora. Este hecho refleja el poder de las técnicas de NGS para interrogar genomas tumorales de un modo eficaz, y pone de manifiesto que alteraciones de distinta naturaleza pueden ser identificadas en datos de secuenciación multiplex.

INTRODUCCIÓN:

Las leucemias mieloblásticas agudas (LMA) presentan una gran variedad de alteraciones genéticas (1) que se emplean cada vez más para personalizar el tratamiento y mejorar el pronóstico de los pacientes (2). Como en otros tipos de cáncer, la naturaleza de estas alteraciones abarca desde sustituciones de nucleótidos y pequeñas inserciones y deleciones (indels), hasta cambios que involucran grandes regiones genómicas, como las traslocaciones, duplicaciones y deleciones cromosómicas. Aunque el número de genes y traslocaciones que requieren ser evaluados aumenta a medida que lo hace el conocimiento sobre la patogénesis de la leucemia, los métodos por los cuales se obtiene esta información han cambiado poco en los últimos 10-20 años. Las guías internacionales actuales (3) recomiendan el estudio del cariotipo convencional, FISH y análisis moleculares de un limitado número de mutaciones.

En el laboratorio clínico, las **mutaciones** se han estudiado tradicionalmente mediante PCR (y sus variantes) en ADN o ARN y secuenciación Sanger. Aunque estos métodos son relativamente sencillos de implementar, el tiempo requerido para optimizar cada ensayo para un nuevo gen ralentiza el proceso. Dado cada vez son más los genes identificados con valor diagnóstico y pronóstico en LMA, se incrementa aún más el tiempo a la vez que los costes. En cuanto a las **traslocaciones** balanceadas recurrentes, críticas para emitir un diagnóstico y/o un pronóstico preciso en LMA, generalmente se estudian mediante técnicas citogenéticas de bandeo-G y FISH, basadas en la visualización directa del ADN. Aunque la FISH mejora la sensibilidad frente a la citogenética convencional, la identificación de nuevos genes implicados en traslocaciones, como los diferentes posibles *partners* que se traslocan con un gen concreto (ej. los *partners* del gen MLL son múltiples), o variantes en los puntos de corte, suponen un problema: requieren el uso de múltiples sondas, aumentando el coste, el tiempo y la complejidad del estudio, y pueden llevar a la pérdida de información relevante.

En este contexto de gran variedad y número de alteraciones a estudiar para una correcta caracterización de la LMA, la secuenciación del genoma o exoma completos (WGS: *whole genome sequencing*; WES: *whole exome sequencing*) pueden parecer a priori una opción atractiva, ya que son tecnologías que permiten el estudio de la gran mayoría de mutaciones diana. Sin embargo, tanto la WGS como WES, presentan limitaciones hoy en día insalvables para su incorporación en la práctica clínica rutinaria: ambas siguen teniendo un alto coste, requieren un potente análisis informático y, en sus formas estándar, son incapaces de detectar traslocaciones y variaciones en el número de copias (CNV: *copy number variations*). Además,

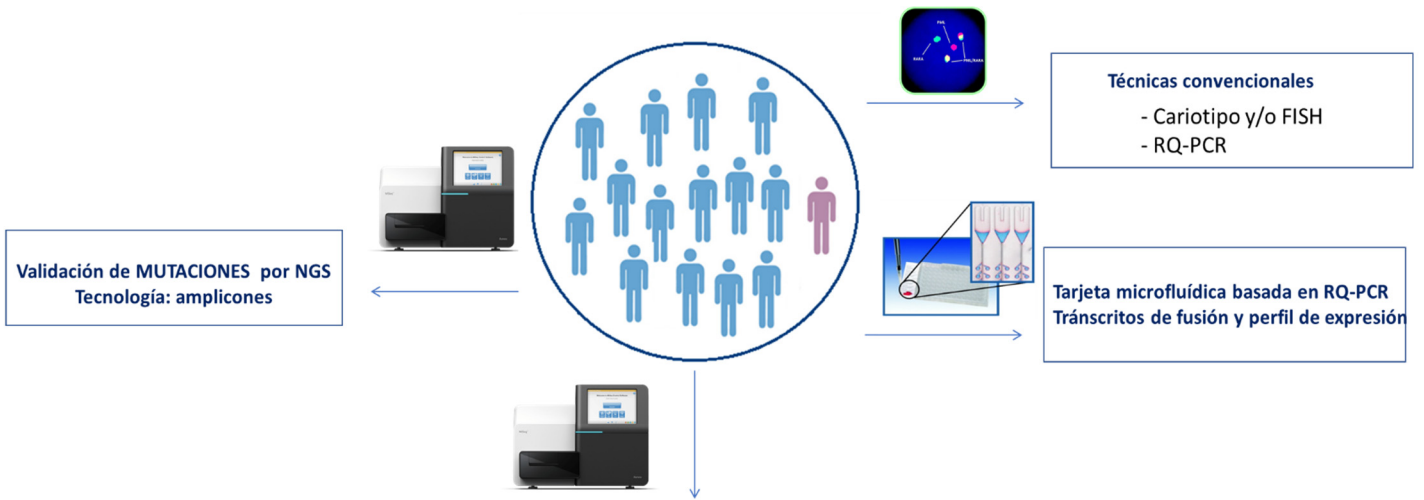
estas técnicas genómicas pueden fallar en la detección de mutaciones de baja carga alélica (subclonales) con significado clínico como TP53 (4). Con el objetivo de simplificar estas limitaciones de la secuenciación masiva de genomas/exomas, surgen los paneles de genes, que permiten una secuenciación multiplex más barata, de un mayor número de pacientes simultáneamente y moderan la complejidad del análisis de los datos obtenidos.

Hoy en día, existe un creciente interés en detectar en un único test de NGS toda la variedad de alteraciones con valor pronóstico en las LMA (mutaciones, traslocaciones y variaciones en el número de copias-CNV). No obstante, son pocos los trabajos que estudian además de mutaciones génicas, el resto de las alteraciones en LMA. Todavía existen limitaciones técnicas y analíticas para la detección de reordenamientos, por lo que los métodos convencionales continúan siendo imprescindibles. Para poder aplicar la técnica de la NGS al estudio de estas alteraciones cromosómicas es necesario mejorar el diseño de los paneles y sobre todo simplificar el análisis informático de modo que pueda incorporarse a la práctica rutinaria del laboratorio clínico. Quizá el estudio más completo en esta línea, es la plataforma Karyogene (5), un panel de NGS que pretende estudiar simultáneamente mutaciones somáticas, traslocaciones y CNV. Sin embargo, esta plataforma requiere el uso de múltiples algoritmos bioinformáticos de gran complejidad, lo que representa un problema fundamental para su implantación en la práctica diaria. Cabe destacar además, que el diseño de Karyogene, a pesar de tratarse de un panel de gran tamaño (2,3 Mbp), lo cual aumenta los costes significativamente, no incluye el estudio de traslocaciones fundamentales en el diagnóstico y pronóstico de las LMA, como las $inv(3)/t(3;3)/GATA2-EVI1$, la traslocación $t(6;9)/DEK-CAN$ o la $t(9;22)/BCR-ABL1$.

Actualmente, existen numerosas herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de NGS, incluyendo tanto opciones libres como comerciales. La mayoría de ellas, se basan en *pipelines* compuestos por múltiples algoritmos. El flujo de trabajo de estos *pipelines* incluye diferentes pasos: demultiplexado (para separar y asignar las lecturas de secuencia de cada paciente), ensamblaje y alineamiento de las secuencias leídas con el genoma de referencia, *variant callers* (para identificar las variantes) y otras muchas posibles opciones. Además de los programas que analizan cambios en un solo nucleótido o pequeños indels, se han desarrollado enfoques computacionales para detectar CNV y otras alteraciones estructurales como las traslocaciones (6–8) Este trabajo requiere un gran esfuerzo bioinformático y la necesidad de expertos técnicos, además del coste de los *software* y equipos potentes, lo que representa una consideración crítica a tener en cuenta cuando se desarrolla un panel de NGS que pretende ser implantado en el laboratorio clínico, y debe considerarse desde el inicio del diseño (9).

En este escenario, resulta evidente la necesidad de una plataforma robusta y accesible que permita caracterizar los distintos tipos de alteraciones en las LMA al diagnóstico para guiar las decisiones clínicas. En respuesta a esta necesidad, en el presente trabajo de tesis doctoral hemos desarrollado un panel de secuenciación masiva basada en tecnología de captura asociado a una plataforma de análisis sencilla que estudia las características moleculares (mutaciones génicas, reordenamientos cromosómicos) con valor diagnóstico o pronóstico y que identifica posibles dianas para tratamientos específicos. Esta estrategia ha sido validada en una serie de pacientes con LMA con mutaciones genéticas y/o alteraciones cromosómicas identificadas previamente mediante las distintas técnicas convencionales.

Diseño del estudio



Diseño de un panel de NGS Tecnología: captura con sondas



1. MUTACIONES

32 genes recurrentemente mutados en LMA
(oncogenes, genes supresores de tumores, genes implicados en epigenética, etc.)

ABL1	exones 4-9	KRAS	exones 2-4
ASXL1	exón 12	MLL (KMT2A)	todos los exones
BCOR	todos los exones	MPL	exón 10
CALR	exón 9	NPM1	exón 12
CBL	exones 8, 9	NRAS	exones 2-4
CEBPA	todos los exones	PTPN11	exones 3,13
DNMT3A	todos los exones	SETBP1	exón 4 (parcial)
ETV6	todos los exones	SF3B1	exones 13-16
EZH2	todos los exones	SMC3	exones 10, 13, 19, 23, 25, 28
FLT3	exones 14, 15, 16, 20	SRSF2	exón 1
GATA2	exones 2-6	STAG2	todos los exones
IDH1	exón 4	TET2	exones 3-11
IDH2	exón 4	TP53	exones 2-11, intrones 2, 3, 5, 8, 9
IKZF1	todos los exones	U2AF1	exones 2, 6
JAK2	exones 12, 14	WT1	exones 7, 9
KIT	exones 2, 8-11, 13, 17	RUNX1	todos los exones

2. REORDENAMIENTOS:

2.1 Traslocaciones e inversiones más frecuentes
Captura y NGS desde ambos genes de la fusión

Reordenamiento	Genes fusionados (ambos incluidos en el panel)
t(9;22)	BCR-ABL1 (p190, p210, p230)
t(15;17)	PML-RARa (bcr1,bcr2,bcr3)
inv(16)	CBFB-MYH11 (A, D, E)
t(8;21)	RUNX1-RUNX1T1
t(9;11)	MLL-MLLT3

2.2 Traslocaciones e inversiones poco frecuentes
Captura y NGS desde uno de los genes de la fusión

Gen incluido en el panel	Genes de fusión más frecuentes
MLL (11q23)	t(6;11) MLL-MLLT4(AF6) / t(11;19) MLL-ELL / t(11;19) MLL-MLLT1(ENL)
NUP98	t(5;11) NUP98-NSD1 / t(7;11) NUP98-HOXA9
PDGFRA	FIP1L1-PDGFRB
PDGFRB	t(5;12) ETV6-PDGFRB
FGFR1	ZNF198-FGFR1 y otros partners
NUP214*	t(6;9) DEK-NUP214
Región intergénica GATA2-RPN1(3q21)	inv(3)/t(3;3) RPN1-MECOM**
RUNX1 (intrón 7)	t(3;21) RUNX1-MECOM
ETV6	t(3;12) ETV6-MECOM
KAT6A	t(8;16) KAT6A-CREBBP

RESULTADOS:

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Se estudiaron 30 pacientes diagnosticados en nuestro hospital, 27 con leucemia mieloblástica aguda (LMA) y 3 con leucemia mieloide crónica (LMC), seleccionados por sus alteraciones citogenéticas y/o moleculares. Todas las alteraciones habían sido detectadas previamente mediante técnicas convencionales (cariotipo, FISH y/o RQ-PCR) y/o mediante RQ-PCR en tarjetas microfluídicas. Además, se incluyó una muestra de MO de un donante sano como control.

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos mediante técnicas convencionales para la caracterización de las alteraciones de los 30 pacientes: mutaciones en NPM1 mediante RQ-PCR y secuenciación Sanger, mutaciones FLT3-ITD estudiadas por análisis de fragmentos (GeneScan) y alteraciones cromosómicas (traslocaciones e inversiones) analizadas mediante RQ-PCR, cariotipo (bandas G) y/o FISH.

a. Reordenamientos detectados mediante técnicas convencionales: cariotipo/FISH y/o RQ-PCR:

Los reordenamientos detectados en los 30 pacientes mediante técnicas convencionales fueron los siguientes (Tabla 1):

- 23 casos con traslocaciones o inversiones cromosómicas y otras alteraciones moleculares que producen genes de fusión: 10 casos positivos tanto por citogenética y/o FISH como por RQ-PCR, 9 casos positivos solo por RQ-PCR (falsos negativos de citogenética), 2 casos positivos solo por cariotipo/FISH (falsos negativos moleculares) y 2 casos con duplicación parcial en tándem del gen MLL (MLL-PTD) solo detectable por RQ-PCR. Uno de los 12 pacientes (LMA8) presentó simultáneamente una t(9; 22) y una inv(16) por lo que en total fueron 24 reordenamientos.
- 3 casos con alteraciones estructurales no balanceadas.
- 4 casos sin alteraciones citogenéticas o moleculares.

b. Alteraciones (reordenamientos y perfil de expresión) detectadas mediante RQ-PCR en tarjetas microfluídicas:

Se incluyeron todos los pacientes del estudio excepto un caso (LMA22) del que no se disponía de ARN valorable. Esta metodología nos permitió detectar un total de 21 de los 23 transcritos de fusión: PML-RARA (n=4), CBFβ-MYH11(n=5), RUNX1-RUNX1T1 (n=3), MLL-MLLT3 (n=2), BCR-

ABL1 (n=5) y MLL-PTD (n=2). No se detectaron ni el MLL-MLLT4 de la t(6;11) ni el MLL-MLLT1 de la t(11;19).

Además, el estudio en tarjetas microfluídicas permitió identificar patrones de expresión génica característicos que predicen la existencia de determinadas alteraciones citogenéticas, especialmente las de buen pronóstico, como se detalla en el [CAPÍTULO 1 de RESULTADOS](#) de la presente tesis. En la figura 1 se puede observar que los pacientes con t(15;17) sobreexpresaron HGF, FGF13 y VEGFA; los pacientes con inv(16) sobreexpresaron MYH11, CLIP3, SPARC, BAALC, CD34 y MN1 y aquellos con t(8;21) presentaron altos niveles de RUNX1T1, POU4F1, CD34, CAV1 y BAALC. En cuanto a los pacientes con reordenamientos en 11q23, aunque mostraron un patrón característico con alta expresión de HOXA7, HOXA9 y MEIS1, no sirvió para discriminar con precisión a estos pacientes del resto.

Uno de los resultados más destacados de este estudio ha sido la caracterización molecular de un paciente que presentaba leucemia promielocítica aguda (LPA) al diagnóstico, pero que no se pudo demostrar una t(15;17) o cualquiera de sus variantes por ninguna de las técnicas convencionales. Sin embargo, presentó un perfil de expresión típico de una LPA con t(15;17), como puede verse en la figura 1, y se identificó mediante PCR-RACE una t(1;17) con el gen de fusión IRF2BP2-RARA no descrita hasta la fecha, de gran relevancia por su sensibilidad al tratamiento con ATRA. Posteriormente, se diseñó un ensayo de RQ-PCR para el seguimiento molecular de la fusión y el paciente continúa en remisión completa. Este trabajo ha sido publicado recientemente (Jovanovic et al. *Leukemia* 2017). Este reordenamiento también fue identificado mediante la estrategia de secuenciación masiva que se describe en el presente trabajo, como se explicará más adelante.

b. Mutaciones en NPM1, FLT3-ITD y CEBPα mediante técnicas moleculares convencionales:

Se analizó el estado mutacional de los genes NPM1, FLT3 (mutación ITD) y CEBPα en los 27 pacientes con LMA incluidos en este estudio. De ellos, 2 (7%) pacientes presentaron mutaciones en NPM1 y 3 (11%) tenían la duplicación en tándem de FLT3. Las mutaciones de CEBPα fueron negativas en todos los casos.

En los 3 casos con diagnóstico de LMC y en el donante sano no se estudiaron estas mutaciones.

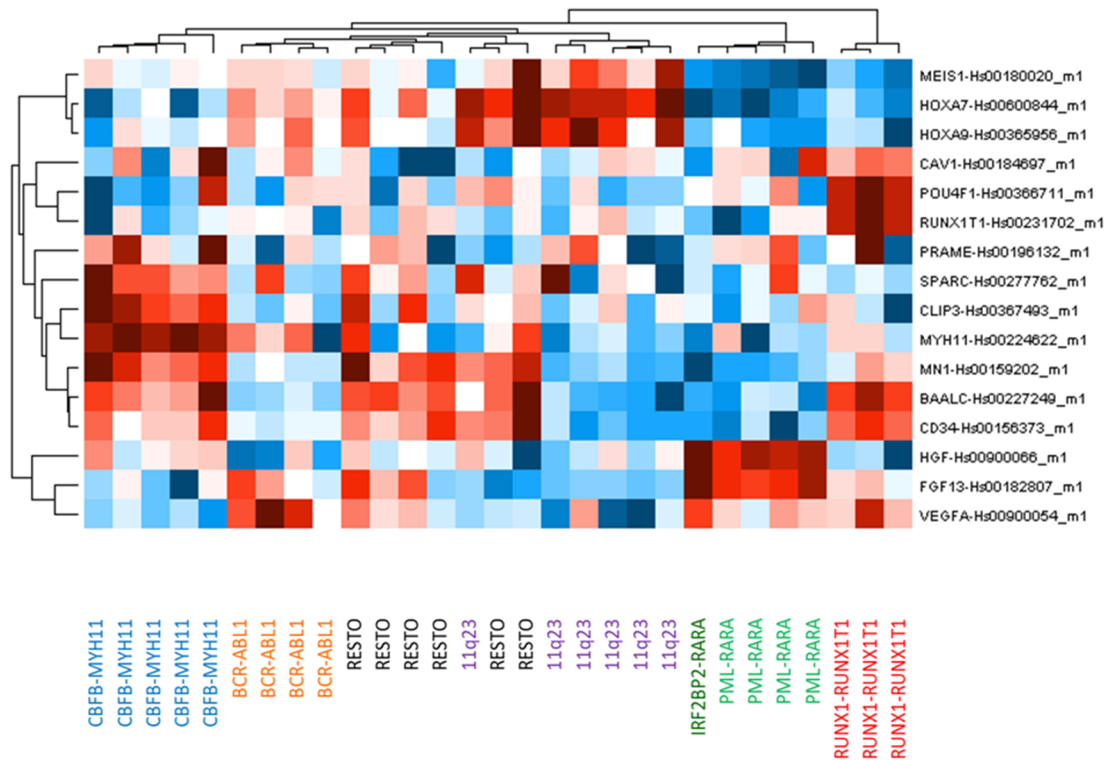


Figura 1. El heatmap muestra el análisis supervisado llevado a cabo en 29 pacientes con leucemia mieloide (26 LMA y 3 LMC) y distintas alteraciones citogenéticas.

2. CONTROL DE CALIDAD DE LOS DATOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA:

Las 31 muestras (27 LMA, 3 LMC y 1 donante de MO sano) se secuenciaron en 3 carreras de 10, 10 y 11 muestras. De media, 25,5 millones de lecturas de 31,5 millones totales (81,9%) pasaron los filtros de calidad del secuenciador. En general, el 91,5% ($\pm 3,6\%$) de las lecturas fueron mapeadas, con un 95% y 82% en el mejor y peor de los casos, respectivamente. De ellas, el 77,2% de las lecturas fueron mapeadas en la región *on-target*.

De las lecturas alineadas, el 80,2% presentaban un Q30 o *score* de calidad Phred mayor de 30, lo que significa la identificación de cada base con una precisión del 99,9% (probabilidad de una base errónea en 1000, es decir, un 0,1% de error).

El 96,8% de las regiones dianas estaban cubiertas a más de 50x, es decir, fueron leídas más de 50 veces en el secuenciador; con una cobertura media total de todas las muestras de 819x ($\pm 261x$), con un rango de coberturas comprendido entre 0 y 1345 en las distintas bases secuenciadas (Tabla 2). Durante el análisis, fueron filtradas y eliminadas las variantes o regiones con coberturas totales menores de 100x (*Total read depth*).

Tabla 2. Parámetros de control de calidad de NGS basada en captura. Densidad de *clusters*: fragmentos de ADN que se fijan a la celda de flujo para ser secuenciados.

Parámetros de calidad	Carrera1 Media (\pm sd)	Carrera2 Media (\pm sd)	Carrera3 Media (\pm sd)	Media global (\pmsd)
Densidad de clusters ($\times 10^3/\text{mm}^2$)	1748 (± 65)	1161 (± 15)	1361 (± 17)	1423(± 298)
Lecturas totales ($\times 10^6$)	36,4	26,9	31,3	31,5 ($\pm 4,7$)
Lecturas PF ($\times 10^6$)	25,1	24,1	27,3	25,5 ($\pm 1,6$)
Lecturas PF (%)	68,9	89,5	87,3	81,9 ($\pm 9,2$)
% Bases totales Q\geq30	76,4	80,9	83,1	80,2 ($\pm 2,8$)
% Lecturas <i>on target</i>	81,3 ($\pm 1,7$)	82,8 ($\pm 1,6$)	67,8 ($\pm 1,7$)	77,2($\pm 7,1$)
Cobertura media de región <i>on target</i>*	730X (± 221)	909X (± 339)	810X (± 185)	819X (± 261)
% Target con cobertura >50X	95,0 ($\pm 4,5$)	98,2 ($\pm 0,8$)	97,1 ($\pm 0,9$)	96,8 ($\pm 1,6$)

**On target*: región de interés (incluida en el diseño). Lecturas PF (*passing filter*): lecturas que superan los filtros de calidad mínimos del secuenciador. Q30: *score* de calidad Phred mayor de 30 (probabilidad de una base errónea en 1000).

3. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES SOMÁTICAS: sustituciones nucleotídicas e indels (inserciones y deleciones de pequeño tamaño):

Mediante técnicas convencionales habían sido identificadas 2 mutaciones en NPM1, 3 FLT3-ITD y ninguna mutación en CEBP α . Empleando el software VariantStudio v2.0, se identificaron 41 mutaciones (33 sustituciones de nucleótido y 8 indels) en 21 de los 30 pacientes del estudio con una media de 1,4 variantes por paciente (rango, 0-5). De las 41 mutaciones, 28 eran de cambio de sentido (*missense*), 7 de cambio de marco de lectura (*frameshift*) y 4 sustituciones nucleotídicas que dieron lugar a un codón de terminación o *stop* (*nonsense*). Veintinueve de las 41 mutaciones, figuraban en el catálogo de mutaciones reportadas COSMIC y de las 12 restantes, 7 estaban descritas como mínimo en la base de variantes de ExAC (Exome Aggregation Consortium) y las 5 restantes eran variantes localizadas en las zonas frecuentes de mutación de los respectivos genes (ver Tabla 3).

Se detectaron inserciones de 4 nucleótidos en el gen NPM1 en dos casos que habían sido previamente identificados por técnicas convencionales (RQ-PCR y Sanger) permitiendo clasificar a los pacientes el grupo de riesgo favorable. En el gen CEBP α no se encontró ninguna mutación, concordante con los resultados obtenidos con la metodología convencional. RUNX1 y ASXL1 fueron los genes más frecuentemente mutados (4/30, 13% en ambos casos). Además, se encontraron mutaciones en los genes supresores de tumores WT1, (2/30, 6,6%) y TP53 (1/30, 3,3%), en los reguladores transcripcionales GATA2 (1/30, 3,3%), ETV6 (1/30, 3,3%) y CALR (2/30, 6,6%); en los reguladores epigenéticos EZH2 (3/30, 10%), DNMT3A (2/30, 6,6%), TET2 (2/30,

6,6%), IDH1 (2/30, 6,6%) e IDH2 (1/30, 3,3%), en los genes implicados en señalización celular KIT (2/30, 6,6%), KRAS (3/30, 10%), NRAS (1/30, 3,3%) y ABL1 (1/30, 3,3%), en el gen de ciclo celular SETBP1 (1/30, 3,3%) y en el factor de *splicing* SRSF2 (2/30, 6,6%).

De las tres muestras de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), sólo una presentó mutaciones en el gen SETBP1.

En el paciente LMA1, con traslocación t(8;21) RUNX1-RUNX1T1, se detectó la mutación en KIT p.Asp816His de mal pronóstico y que no había sido identificada por secuenciación Sanger convencional.

Todas las variantes reportadas en este trabajo presentaron una VAF superior al 5%, excepto un caso (LMA17) en el que se dio como válida una VAF del 3,6% por tratarse de una mutación puntual en el dominio TKD (*tirosin kinasa domain*) del gen FLT3 con significado clínico demostrado.

Mutación FLT3-ITD:

Mediante la metodología estándar (análisis de fragmentos por GeneScan) se identificaron duplicaciones internas en tándem de FLT3 en tres pacientes: LMA17, LMA22 y LMA26, con longitudes de 108 pb, 36 pb y 30 pb respectivamente. Empleando nuestro panel de NGS mediante captura y el mismo *software* básico de análisis de mutaciones puntuales e indels (VariantStudio; alineador: Smith Waterman), se detectaron solo dos de ellas, la de 30 pb y la de 36 pb. La primera, de 30 pb (paciente LMA26), fue reportada por el *software* VariantStudio, con una profundidad de lectura para esa posición de 217X y una VAF del 10%. Esta variante fue además contrastada en el visor de secuencias IGV (GenomeBrowser) como se muestra en la [figura 2](#). La segunda ITD, de 36 pb (paciente LMA22), no fue reportada por el software de análisis VariantStudio y, sin embargo, sí pudo visualizarse mediante el visor IGV, es decir, que la ITD había sido capturada, secuenciada y alineada con el genoma de referencia, pero no había sido expuesta como variante en el *software* de análisis.

Por el contrario, en el caso de la ITD de 108 pb, no se encontró ninguna inserción en el gen FLT3 durante la visualización del archivo alineado, lo que sugirió que esta inserción no pudo ser capturada durante el proceso de enriquecimiento o, si lo fue, su secuencia no pudo ser alineada con el genoma de referencia con los alineadores empleados.

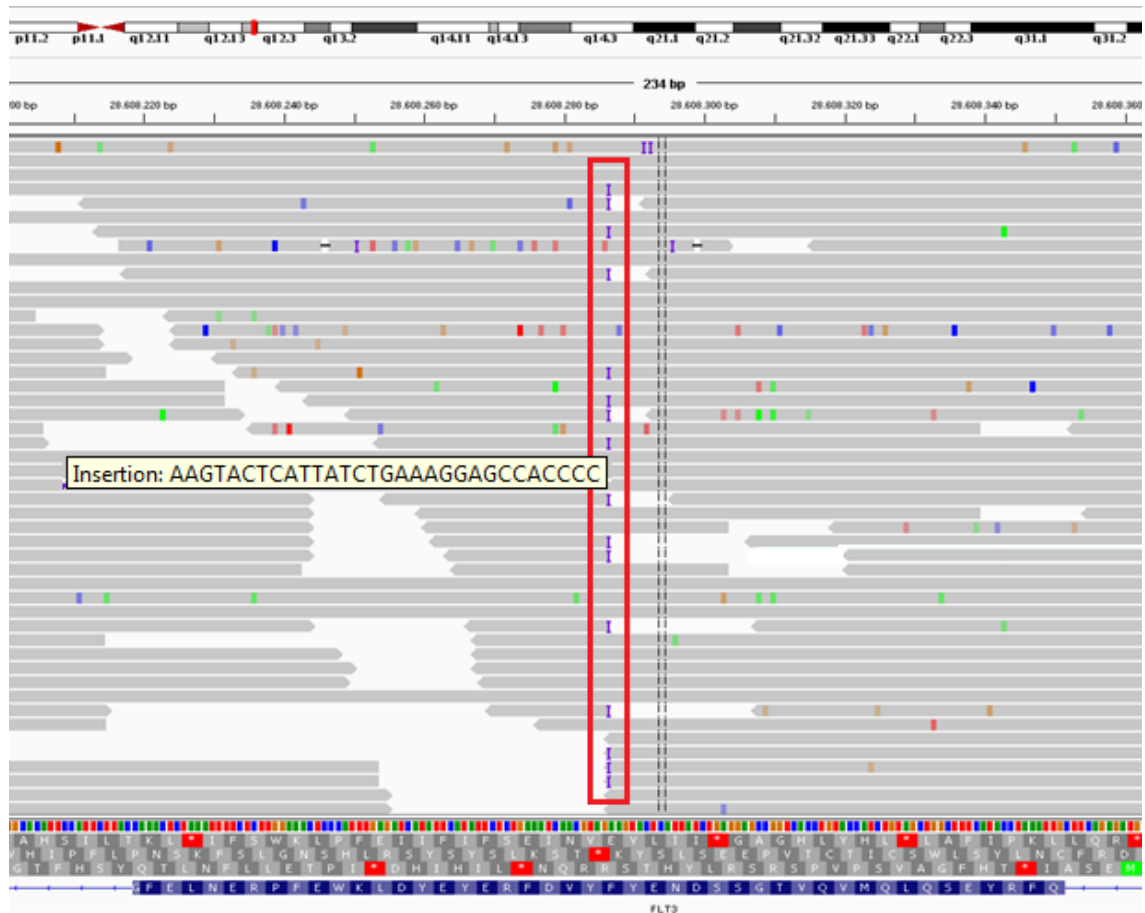



Figura 2. Visualización del archivo alineado (.bam) correspondiente a la secuenciación del gen FLT3 del paciente LMA26 en el visor IGV (GenomeBrowser). Las barras horizontales de color gris representan las lecturas de secuencia, todas ellas se encuentran alineadas con el genoma de referencia hg19. En este caso se trata de una inserción de 30 pb y se representa con el icono característico de las inserciones (). El rectángulo rojo agrupa en la imagen la misma posición genómica de las distintas lecturas.

Tabla 1 (continúa). Caracterización al diagnóstico mediante técnicas estándar y secuenciación masiva basada en captura de los 30 pacientes con leucemia mieloide (27 con LMA y 3 con LMC) y un donante de médula ósea incluidos en este estudio. NR: no realizado; NV: no valorable. Las mutaciones de CEBPα se estudiaron en todos los pacientes con LMA y fueron negativas en todos los casos. *Detectada mediante PCR-RACE y secuenciación.

ID Paciente	TÉCNICAS CONVENCIONALES						SECUENCIACIÓN MASIVA (captura)	
	Mutaciones FLT3-ITD (GeneScan)	Mutaciones NPM1 (RQ-PCR y Sanger)	MORFOLOGÍA FAB	CARIOTIPO	FISH (%)	RQ-PCR	REORDENAMIENTO NGS (Algoritmo MANTA)	REORDENAMIENTO NGS (Algoritmo Lumpy)
LMA1	No mutado	No mutado	M2	46,XY,t(8;21)(q21;q21) [12]	RUNX1-RUNX1T1 (95)	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +	NR
LMA2	No mutado	No mutado	M2	46,XY [20]	NR	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 -	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +
LMA3	No mutado	No mutado	M2	46,XX [20]	RUNX1-RUNX1T1 (0)	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 -	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +
LMA4	No mutado	No mutado	M4 Eo	46,XY [14]	CBFB/MYH11 (65)	inv(16)/CBFb-MYH11-E +	inv(16)/CBFB-MYH11 -	inv(16)/CBFB-MYH11 +
LMA5	No mutado	Mutado	M1	46,XY [20]	CBFB/MYH11 (0)	inv(16)/CBFb-MYH11-A +	inv(16)/CBFB-MYH11 -	inv(16)/CBFB-MYH11 +
LMA6	No mutado	No mutado	M4	46,XY	NV	inv(16)/CBFb-MYH11-A +	inv(16)/CBFB-MYH11 +	NR
LMA7	No mutado	No mutado	M0	46,XY [6] 47,XY,+8 [7]	Trisomía 8 (86)	inv(16)/CBFb-MYH11-D +	inv(16)/CBFB-MYH11 +	NR
LMA8	No mutado	No mutado	M3 Clásica	47,XY,+7,t(9;22)(q34;q11) [8]	CBFB-MYH11 (54) BCR-ABL (90)	inv(16)/CBFb-MYH11-A + t(9;22)/BCR-ABL minor +	inv(16)/CBFB-MYH11 + t(9;22)/BCR-ABL minor -	inv(16)/CBFB-MYH11-A + t(9;22)/BCR-ABL minor +
LMA9	No mutado	No mutado	LA Bilineal	NR	NR	t(9;22)/BCR-ABL minor +	t(9;22)/BCR-ABL minor +	NR
LMC1	NR	NR	LMC	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11) [20]	BCR-ABL (97)	t(9;22)/BCR-ABL micro +	t(9;22)/BCR-ABL micro +	NR
LMC2	NR	NR	LMC	46,XY,t(9;22)(q34;q11) [23]	NR	t(9;22)/BCR-ABL major +	t(9;22)/BCR-ABL Major +	NR
LMC3	NR	NR	LMC	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[17]	NR	t(9;22)/BCR-ABL major +	t(9;22)/BCR-ABL Major +	NR
LMA10	No mutado	No mutado	M5	NR	11q23/MLL (81) Del(5q) (8)	t(9;11)/MLL-AF9 6A +	t(9;11)/MLLT3-MLL +	NR
LMA11	No mutado	No mutado	M5	46,XX [8] 47,XX,+8 [12]	NR	t(9;11)/MLL-MLLT3 +	t(9;11)/MLLT3-MLL +	NR
LMA12	No mutado	No mutado	M5	46,XX,t(6;11)(p21;q23)[8]	11q23/MLL (96)	t(6;11)/MLL-MLLT4 -	t(6;11)/MLLT4-MLL +	NR
LMA13	No mutado	No mutado	M1	46,XY,t(11;19)(q23;p13) [17]	11q23/MLL (90)	t(11;19)/ MLL-MLLT1 -	t(11;19)/MLL-MLLT1 -	No alteración
LMA14	No mutado	No mutado	M2	46,XX [14]	11q23/MLL (75)	MLL-PTD +	MLL-PTD +	NR
LMA15	No mutado	No mutado	M4	46,XY [20]	NR	MLL-PTD +	MLL-PTD +	NR
LMA16	No mutado	No mutado	M3 Variante	46,XY,t(15;17)(q21;q21) [20]	PML-RARA (88)	t(15;17)/PML-RARA bcr3 +	t(15;17)/PML-RARA +	NR
LMA17	Mutado	No mutado	NR	46,XX,t(15;17)(q12;q21) [10]	PML-RARA (85)	t(15;17)/PML-RARA bcr3 +	t(15;17)/PML-RARA +	NR

Tabla 1 (continuación). Caracterización al diagnóstico mediante técnicas estándar y secuenciación masiva basada en captura de los 30 pacientes con leucemia mieloide (27 con LMA y 3 con LMC) y un donante de médula ósea incluidos en este estudio. NR: no realizado; NV: no valorable. Las mutaciones de CEBP α se estudiaron en todos los pacientes con LMA y fueron negativas en todos los casos. *Detectada mediante PCR-RACE y secuenciación.

ID Paciente	TÉCNICAS CONVENCIONALES					SECUENCIACIÓN MASIVA (captura)		
	Mutaciones FLT3-ITD (GeneScan)	Mutaciones NPM1 (RQ-PCR y Sanger)	MORFOLOGÍA FAB	CARIOTIPO	FISH (%)	RQ-PCR	REORDENAMIENTO NGS (Algoritmo MANTA)	REORDENAMIENTO NGS (Algoritmo Lumpy)
LMA15	No mutado	No mutado	M4	46,XY [20]	NR	MLL-PTD +	MLL-PTD +	NR
LMA16	No mutado	No mutado	M3 Variante	46,XY,t(15;17)(q21;q21) [20]	PML-RARA (88)	t(15;17)/PML-RARA bcr3 +	t(15;17)/PML-RARA +	NR
LMA17	Mutado	No mutado	NR	46,XX,t(15;17)(q12;q21) [10]	PML-RARA (85)	t(15;17)/PML-RARA bcr3 +	t(15;17)/PML-RARA +	NR
LMA18	No mutado	No mutado	M3 Clásica	46,XX,t(15;17)(q12;q21) [12]	PML-RARA (20)	t(15;17)/PML-RARA bcr2 +	t(15;17)/PML-RARA +	NR
LMA19	No mutado	No mutado	NR	46,XY,t(15;17)(q12;q21)[10]	PML-RARA (0)	t(15;17)/PML-RARA bcr1 +	t(15;17)/PML-RARA +	NR
LMA20	No mutado	No mutado	M3 Clásica	46,XY [20]	PML-RARA (0)	t(15;17)/PML/RARA- *t(1;17)/IRF2BP2-RARA +	*t(1;17)/IRF2BP2-RARA +	NR
LMA21	No mutado	No mutado	M2	46,XY [10] 47,XY,add(2)(q37),der(4)(q),+9 [10]	7q- (93)	No alteración	No alteración	NR
LMA22	Mutado	Mutado	M1	46,XX [22]	7q- (8)	No alteración	No alteración	NR
LMA23	No mutado	No mutado	M0	NR	RUNX1-RUNX1T1 (0) Trisomía 8 (0)5q- (0)	No alteración	No alteración	NR
LMA24	No mutado	No mutado	M1	46,XY,del(20)(q21) [5] 46,XY [7]	CBFB/MYH11 (0) RUNX1-RUNX1T1 (0)	inv(16)/CBFB-MYH11-E - t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 -	No alteración	NR
LMA25	No mutado	No mutado	M0	46,XY [21]	NR	No alteración	t(3;21) RUNX1-LRRC34	t(3;21) RUNX1-LRRC34
LMA26	Mutado	No mutado	M0	46,XX [24]	BCR-ABL (0) 11q23/MLL (0) CBFB/MYH11 (0)	No alteración	No alteración	NR
LMA27	No mutado	No mutado	NR	46,XY[10]	PML-RARA(0) CBFB/MYH11(0) RUNX1-RUNX1T1(0) 11q23/MLL(0) Trisomía 8(0) 5q-(0) 7q-(0)	No alteración	No alteración	NR
DONANTE	NR	NR	NR	NR	NR	NR	No alteración	NR

Tabla 3 (continúa)). Mutaciones génicas encontradas en 20 pacientes con LMA y un paciente con LMC. Los pacientes LMC01, LMC03, LMA03, LMA08, LMA09, LMA10, LMA13, LMA19 y LMA21, al igual que el donante sano, no presentaron mutaciones en ninguno de los genes analizados

ID Paciente	Técnicas convencionales		Secuenciación masiva (captura con sondas)						
	FLT3-ITD (GeneScan)	NPM1 (RQ-PCR y Sanger)	Gen mutado	Tipo de mutación (consecuencia en la proteína)	Mutación (ADN)	Mutación (proteína)	Nº Total lecturas	Frecuencia Alélica de la Variante (%)	ID COSMIC
LMA25	No mutado	No mutado	DNMT3						
			A	cambio de sentido	c.2645G>A	p.Arg882His	627	44,98	COSM442676
			IDH2	cambio de sentido	c.419G>A	p.Arg140Gln	1370	43,36	COSM41590
LMA26	Mutado (ITD: 30 pb)	No mutado	SRSF2	cambio de sentido	c.284C>A	p.Pro95His	456	46,49	COSM211504
			FLT3-ITD	cambio de marco de lectura (elongación)	c.1770_1771ins30	p.Phe590LeufsTer10	217	10,14	COSM5879555
			RUNX1	cambio de marco de lectura (elongación)	c.366_370dupGGAG	p.Val124GlyfsTer11	182	33,52	COSM5879772
LMA27	No mutado	No mutado	TET2	cambio de sentido	c.3781C>A	p.Arg1261Ser	647	45,29	COSM87130
			ASXL1	cambio de sentido	c.2888C>T	p.Pro963Leu	915	49,73	
			ASXL1	cambio de marco de lectura (p. truncada)	c.2986delG	p.Gly996ValfsTer28	1074	38,18	
			EZH2	cambio de sentido	c.434T>C	p.Phe145Ser	361	34,35	COSM133050
			RUNX1	codón stop	c.422C>A	p.Ser141Ter	284	27,82	COSM25125
LMA15	No mutado	No mutado	RUNX1	cambio de sentido	c.318G>T	p.Trp106Cys	693	44,01	COSM24720
			CALR	cambio de sentido	c.1139A>G	p.Glu380Gly	1281	44,73	
LMA14	No mutado	No mutado	TP53	cambio de sentido	c.572C>G	p.Pro191Arg	431	48,03	COSM44172
			DNMT3						
LMA12	No mutado	No mutado	A	cambio de sentido	c.2644C>T	p.Arg882Cys	194	45,36	COSM53042
			IDH1	cambio de sentido	c.394C>T	p.Arg132Cys	165	42,42	COSM28747
LMA24	No mutado	No mutado	KRAS	cambio de sentido	c.183A>C	p.Gln61His	534	52,43	COSM1135364
LMA23	No mutado	No mutado	SRSF2	cambio de sentido	c.284C>A	p.Pro95His	150	41,5	COSM211504
LMA22	Mutado (ITD: 36 pb)	Mutado (tipo A)	KRAS	cambio de sentido	c.38G>A	p.Gly13Asp	137	39,42	COSM1140132
			FLT3-ITD* (visor IGV)	cambio de marco de lectura (elongación)	c.1782_1783ins36	p.F594_R595ins12	–	–	COSM36099
			NPM1	cambio de marco de lectura (elongación)	c.859_860insTCTG	p.Trp288CysfsTer12	162	22,22	COSM1319222
			NRAS	cambio de sentido	c.181C>A	p.Gln61Lys	192	6,77	COSM580

Tabla 3 (continuación). Mutaciones génicas encontradas en 20 pacientes con LMA y un paciente con LMC. Los pacientes LMC01, LMC03, LMA03, LMA08, LMA09, LMA10, LMA13, LMA19 y LMA21, al igual que el donante sano, no presentaron mutaciones en ninguno de los genes analizados

ID Paciente	Técnicas convencionales		Secuenciación masiva (captura con sondas)						
	FLT3-ITD (GeneScan)	NPM1 (RQ-PCR y Sanger)	Gen mutado	Tipo de mutación (consecuencia en la proteína)	Mutación (ADN)	Mutación (proteína)	Nº Total lecturas	Frecuencia Alélica de la Variante (%)	ID COSMIC
LMA11	No mutado	No mutado	ASXL1	codón stop	c.2077C>T	p.Arg693Ter	607	45,8	COSM51388
LMA01	No mutado	No mutado	KIT	cambio de sentido	c.2446G>C	p.Asp816His	413	28,33	COSM1311
LMA02	No mutado	No mutado	ABL1	cambio de sentido	c.646G>A	p.Glu216Lys	115	45,2	COSM132883
			EZH2	cambio de sentido	c.2233G>A	p.Glu745Lys	340	40,6	
			EZH2	cambio de sentido	c.1990G>A	p.Asp664Asn	298	34,5	
LMA16	No mutado	No mutado	TET2	codón stop	c.1795C>T	p.Gln599Ter	344	39,1	
LMA18	No mutado	No mutado	ETV6	cambio de marco de lectura (elongación)	c.236_237insAA	p.Arg80LysfsTer11	358	30,45	
LMA17	Mutado (ITD: 108 pb)	No mutado	CALR	cambio de sentido	c.1139A>G	p.Glu380Gly	1584	49,31	COSM783
			FLT3	cambio de sentido	c.2503G>T	p.Asp835Tyr	884	3,62	
LMA04	No mutado	No mutado	ASXL1	cambio de sentido	c.2059T>C	p.Cys687Arg	352	42,1	COSM1135366
			KRAS	cambio de sentido	c.35G>A	p.Gly12Asp	710	21,1	
LMA05	No mutado	Mutado (tipo A)	IDH1	cambio de sentido	c.394C>T	p.Arg132Cys	380	48,42	COSM28747
			NPM1	cambio de marco de lectura (elongación)	c.861_862insTGCT	p.Trp288CysfsTer12	324	30,56	COSM1319222
LMA06	No mutado	No mutado	KIT	cambio de sentido	c.2447A>T	p.Asp816Val	285	39,9	COSM1314
			WT1	codón stop	c.1142C>A	p.Ser381Ter	413	23,2	
LMA07	No mutado	No mutado	FLT3	cambio de sentido	c.2503G>C	p.Asp835His	746	45,31	COSM785
			RUNX1	cambio de sentido	c.167T>C	p.Leu56Ser	1313	35,11	COSM24756
			WT1	cambio de marco de lectura (elongación)	c.1139_1140insTG	p.Ser381GlyfsTer69	996	43,17	
LMA20	No mutado	No mutado	GATA2	cambio de sentido	c.1186C>T	p.Arg396Trp	148	32,4	
LMC02	NR	NR	SETBP1	cambio de sentido	c.2602G>A	p.Asp868Asn	496	36,9	COSM1318400

4. IDENTIFICACIÓN DE TRASLOCACIONES E INVERSIONES ASOCIADAS A LMA:

a. Secuenciación masiva: análisis con software Enrichment (Illumina):

Mediante captura y secuenciación de las regiones recurrentes de rotura (*breakpoint*) obtuvimos las secuencias correspondientes a cada paciente y las analizamos en primer lugar con la aplicación Enrichment v3.0 (Illumina), específica para detectar variantes estructurales, concretamente mediante el algoritmo MANTA (8). Este método de análisis fue elegido por su relativa sencillez y potencial aplicabilidad en la práctica rutinaria en el laboratorio clínico, ya que presenta una interfaz manejable que no requiere el uso de programación.

Enrichment v3.0 (Illumina) permitió la detección del 75% (18/24) de los reordenamientos más importantes en las LMA, que habían sido detectados previamente: t(15;17) PML-RARA (4/4), t(1;17) IRF2BP2-RARA (1/1), inv(16) CBF-MYH11 (3/5), t(8;21) RUNX1-RUNX1T1 (1/3), t(9;22) BCR-ABL (4/5), fusiones del gen MLL (3/4) y MLL-PTD (2/2) (Tabla 1). De forma destacable, todos estos reordenamientos habían sido detectados por técnicas convencionales excepto en el caso de la variante t(1;17) IRF2BP2-RARA, cuya presencia fue identificada mediante PCR-RACE tras encontrarse un perfil de expresión génica compatible con leucemia promielocítica aguda. El método de secuenciación masiva que se expone en este trabajo, permitió también su detección. Las coordenadas genómicas de los puntos de corte se detallan en la Tabla suplementaria S1. Los 6 reordenamientos que no se detectaron con la aplicación Enrichment v3.0 (Illumina) fueron 2 inv(16) CBF-MYH11, 2 t(8;21) RUNX1-RUNX1T1, 1 t(9;22) BCR-ABL y 1 t(11;19) MLL-MLL1.

El *software* Enrichment no detectó ningún reordenamiento en 6 de los 7 pacientes con cariotipo normal o con alteraciones estructurales no balanceadas, ni tampoco en el caso de la muestra de donante de médula ósea. Sin embargo, en uno de los casos con cariotipo normal, se identificó una nueva traslocación no detectada por técnicas convencionales que se detallará a continuación.

b. Comparación de las técnicas convencionales con el programa de análisis Enrichment (Illumina):

- ALTERACIONES DETECTADAS TANTO POR CITOGÉNÉTICA (cariotipo y/o FISH) COMO POR RQ-PCR (n=11): De los 11 casos con fusiones demostradas tanto por técnicas citogenéticas como moleculares, Enrichment detectó alteraciones en todos ellos excepto en 2 pacientes: uno de ellos presentaban una inv(16) y el otro tenía una t(9;22) minor-BCR-ABL (además de una inv(16) que sí se detectó; paciente LMA8).
- FALSOS NEGATIVOS DE LA CITOGÉNÉTICA (n=8): Sin embargo, de los 8 pacientes con alteraciones sólo detectadas por PCR, 3 casos tampoco fueron identificados con el

software Enrichment. Dos de estos 3 pacientes presentaban un cariotipo y una FISH normales (LMA3 y LMA5) y el otro tenía un cariotipo normal, sin poder realizarse el estudio de FISH.

- **FALSOS NEGATIVOS DE LA RQ-PCR (n=2):** el algoritmo de Enrichment sí detectó la alteración t(6;11) pero la t(11;19) no.
- **Casos MLL-PTD (n=2):** Ambos fueron detectados tanto por RQ-PCR como por el *software* Enrichment.

c. Secuenciación masiva: análisis con *pipeline* bioinformático propio:

Debido a que 6 de los 24 reordenamientos que habían sido previamente caracterizados por técnicas convencionales no fueron detectadas con los algoritmos que componen el *software* Enrichment, analizamos los mismos datos crudos (archivos .fastq) empleando tres estrategias bioinformáticas diferentes basadas en *pipelines* propios, optimizados para el análisis de reordenamientos. Estos *pipelines*, que incluían varias herramientas bioinformáticas, se fundamentaban en tres algoritmos libres de análisis de variantes estructurales: Lumpy, GASV y DELLY2. En el nuevo análisis de los 6 falsos negativos obtenidos con el *software* Enrichment, el algoritmo Lumpy fue el más eficaz, permitiendo la detección de 5 de los 6 casos analizados (83%) y superando así a los análisis basados en GASV y DELLY2 que identificaron 3/6 (50%) y 4/6 (67%) reordenamientos respectivamente (Tabla 4). El algoritmo Lumpy fue capaz de caracterizar tanto los 4 casos falsos negativos de la citogenética como el paciente con dos alteraciones. En cuanto a la t(11;19) en el paciente LMA13, no pudo ser detectada por ninguno de los cuatro algoritmos de análisis ni tampoco mediante RQ-PCR, sólo fue identificada mediante cariotipo, lo cual sugiere la presencia de una zona de rotura en los genes fuera de la región comúnmente implicada en esta traslocación.

En resumen, mediante captura de las regiones específicas de *breakpoint* y NGS se pudieron detectar 23 de los 24 reordenamientos (96%) previamente identificados por técnicas convencionales y/o RQ-PCR en tarjetas microfluídicas.

Tabla 4. Alteraciones estructurales detectadas mediante secuenciación masiva en los seis casos falsos negativos del software Enrichment. Comparación de los cuatro algoritmos de análisis de variantes estructurales.

Técnicas convencionales						
Cariotipo	FISH (%)	RQ-PCR	Enrichment	Lumpy	GASV	DELLY2
46,XY,t(11;19)(q23;p13) [17]	11q23/MLL (90)	t(11;19)/ MLL-MLLT1 -	neg	neg	neg	neg
46,XY [20]	no realizado	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +	neg	pos	pos	pos
46,XX [20]	RUNX1-RUNX1T1 (0)	t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 +	neg	pos	pos	pos
47,XY,+7,t(9;22)(q34;q11) [8]	CBFB-MYH11 (54) BCR-ABL (90)	inv(16)/CBFb-MYH11-A + t(9;22)/BCR-ABL minor +	neg t(9;22)	pos	pos	pos
46,XY [14]	CBFB/MYH11 (65)	inv(16)/CBFb-MYH11-E +	neg	pos	neg	pos
46,XY [20]	CBFB/MYH11 (0)	inv(16)/CBFb-MYH11-A +	neg	pos	neg	neg

neg: negativo, pos: positivo.

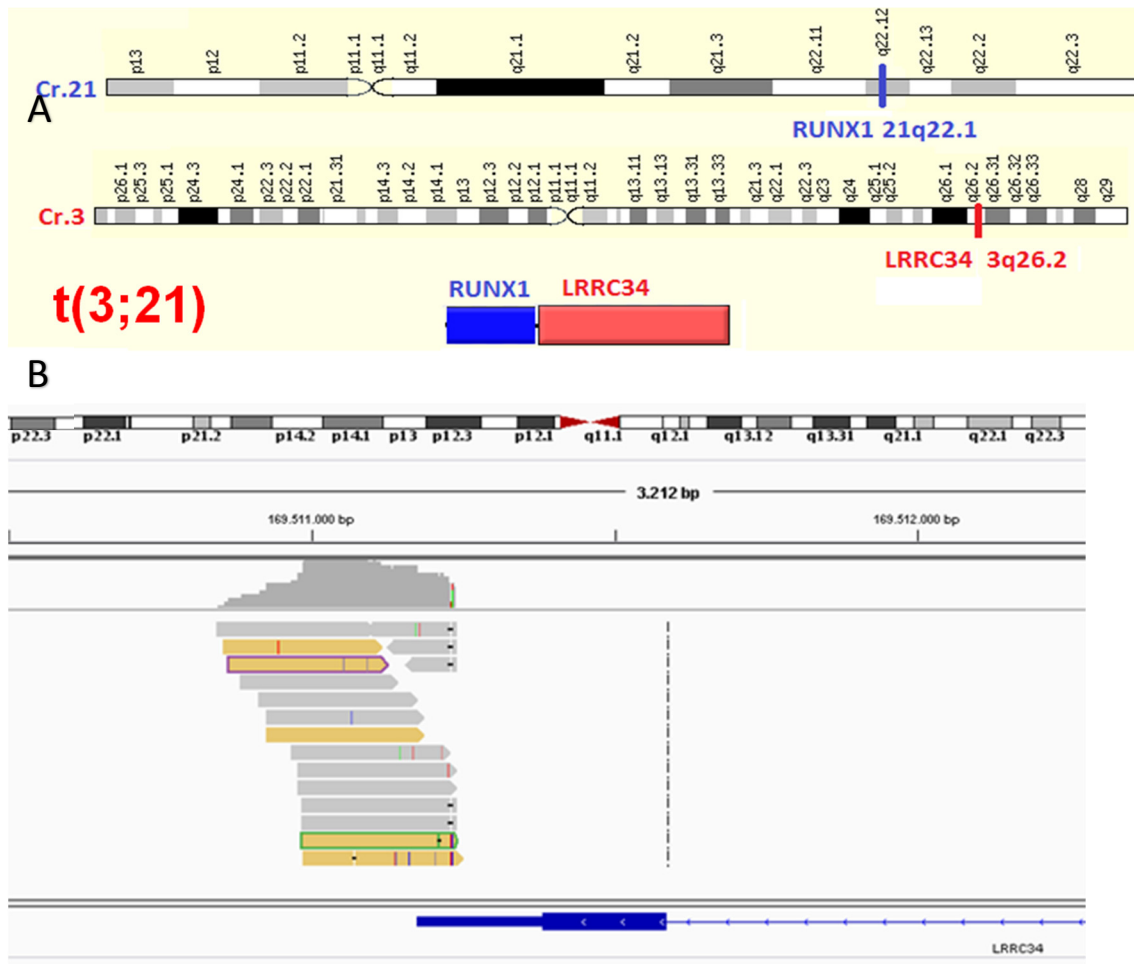


Figura 3: A. Representación esquemática de la traslocación t(3;21)/LRR34-RUNX1 determinada por secuenciación masiva. B. Visualización de las lecturas de secuencias en IGV (Genome Browser). Cada barra horizontal representa uno de los dos fragmentos de una misma lectura que se alineó tanto en LRR34 como en RUNX1 debido a la fusión de estos dos genes en la muestra secuenciada.

Tabla Suplementaria S1. Localización genómica de los 24 *breakpoints* de los reordenamientos identificados en este trabajo.

D Paciente	Reordenamiento	Gen de fusión	Coordenadas Breakpoint
LMA1	t(8;21)	RUNX1-RUNX1T1	cr8:93081699-cr21:36228722
LMA2	t(8;21)	RUNX1-RUNX1T1	cr8:93046231-cr21:36214545
LMA3	t(8;21)	RUNX1-RUNX1T1	cr8:93082797-cr21:36207719
LMA4	inv(16)	CBFB-MYH11	cr16:15825661-cr16:67126596
LMA5	inv(16)	CBFB-MYH11	cr16:15822745-cr16:67126738
LMA6	inv(16)	CBFB-MYH11	cr16:15815201-cr16:67133874
LMA7	inv(16)	CBFB-MYH11	cr16:15819075-cr16:67132503
LMA8	inv(16)	CBFB-MYH11	cr16:15815289-cr16:67132083
LMA8	t(9;22)	BCR-ABL	cr9:133720795-cr22:23569723
LMA9	t(9;22)	BCR-ABL	cr9:133726051-cr22:23588918
LMC1	t(9;22)	BCR-ABL	cr9:133676317-cr22:23654270
LMC2	t(9;22)	BCR-ABL	cr9:133607382-cr22:23634661
LMC3	t(9;22)	BCR-ABL	cr9:133637300-cr22:23632861
LMA10	t(9;11)	MLL-MLLT3	cr9:20376622-cr11:118355589
LMA11	t(9;11)	MLL-MLLT3	cr9:20381503-cr11:118355661
LMA12	t(6;11)	MLL-MLLT6	cr6:168259494-cr11:118354317
LMA14	MLL-PTD	MLL-PTD	cr11:118327142-cr11:118353745
LMA15	MLL-PTD	MLL-PTD	cr11:118330945-cr11:118353442
LMA16	t(15;17)	PML-RARA	cr15:74316123-cr17:38493378
LMA17	t(15;17)	PML-RARA	cr15:74316901-cr17:38502633
LMA18	t(15;17)	PML-RARA	cr15:74317002-cr17:38503964
LMA19	t(15;17)	PML-RARA	cr15:74326139-cr17:38488815
LMA20	t(1;17)	IRF2BP2-RARA	cr1:234744312-cr17:38500791
LMA25	t(3;21)	RUNX1-LRRC34	cr3:169511228 -cr21:36201591

DISCUSIÓN:

En los últimos años, las metodologías de alto rendimiento, especialmente la secuenciación masiva o *next-generation sequencing* (NGS), se han empezado a aplicar con gran éxito en numerosos laboratorios clínicos. La reducción de los costes y la simplificación de algunos de sus procesos, están haciendo posible que la NGS sea accesible y se incorpore a la práctica rutinaria en el estudio de la leucemia mieloblástica aguda (LMA). Sin embargo, debido a la complejidad en el análisis bioinformático y al elevado coste, la mayoría de ellos se centran en el estudio exclusivo de mutaciones somáticas y no incluyen otras alteraciones genéticas, como las traslocaciones e inversiones cromosómicas, fundamentales para el diagnóstico y definir el pronóstico de los pacientes con LMA.

Es por ello, que en este trabajo nos hemos propuesto desarrollar y validar un panel personalizado de secuenciación masiva que permite analizar tanto mutaciones puntuales en los genes más relevantes en LMA, como reordenamientos (traslocaciones e inversiones) a nivel de ADN que afectan recurrentemente a las células leucémicas. Proponemos un método sencillo de análisis con dos softwares de fácil manejo, VariantStudio para mutaciones y Enrichment para reordenamientos, con el fin de poder aplicar estas herramientas bioinformáticas en el laboratorio clínico. Además, validamos nuestro diseño con un *pipeline* propio basado en algoritmos de acceso libre y comparamos a su vez la utilidad de tres herramientas distintas de análisis de variantes estructurales en datos de NGS (Lumpy, GASV y DELLY2).

Nuestros resultados demuestran que este panel es capaz de identificar todas las alteraciones genéticas previamente detectadas mediante técnicas convencionales de citogenética/FISH y RQ-PCR, tanto mutaciones puntuales (sustituciones y pequeños indels) como inversiones y traslocaciones, excepto un caso con una t(11;19) que también había sido negativo por RQ-PCR. Además, mediante este panel, fuimos capaces de detectar una nueva traslocación, la t(3;21) que conduce a la fusión aberrante de los genes RUNX1 y LRRC34, y que no había sido identificada previamente. Este hecho refleja el poder de las técnicas de NGS para interrogar genomas tumorales de un modo eficaz, y pone de manifiesto que alteraciones de distinta naturaleza pueden ser identificadas en datos de secuenciación multiplex.

Para el diseño de este panel, elegimos la tecnología de NGS mediante captura con sondas específicas, una metodología empleada en los diseños más innovadores que pretenden estudiar diferentes tipos de alteraciones, no sólo mutaciones génicas (5,10). A pesar de ser más laboriosa que la tecnología de amplicones, resulta imprescindible para la detección de inserciones o deleciones de gran tamaño y de traslocaciones, especialmente aquellas en las que uno de los dos genes implicados se desconoce, como por ejemplo en el caso del gen MLL.

Para maximizar la precisión y alcanzar el nivel requerido para diagnóstico clínico, hemos incluido sólo las regiones con más probabilidad de ubicar los puntos de corte de las traslocaciones. Esto nos ha permitido limitar el tamaño del diseño (región capturada y secuenciada: 700kb), disminuyendo a su vez los costes y la cantidad de datos de secuenciación obtenidos. En todos los casos de traslocaciones más frecuentes para las que se incluyeron ambos *partners* en el diseño [t(15;17), t(8;21), inv(16) y t(9;11)] hemos observado que el reordenamiento es capturado y secuenciado desde los dos genes. Además, en los casos que secuenciamos sólo uno de los dos *partners* han funcionado según lo esperado, como ocurre con la t(6;11), capturada desde MLL. De forma destacable, este mismo fenómeno ocurrió en el caso de la t(1;17)-IRF2BP2/RARA, variante de las LPA sensible al tratamiento con ATRA, que pudo ser capturada y secuenciada desde el *partner* RARA empleando nuestra estrategia de secuenciación masiva. Esta variante t(1;17) no había sido detectada mediante las técnicas convencionales empleadas en el laboratorio, sino que fue caracterizada por PCR-RACE. El paciente portador de esta alteración respondió al tratamiento con ATRA y actualmente continúa en remisión completa (11). Incluso hemos podido comprobar que este diseño permite identificar nuevos *partners* o puntos de rotura de los genes traslocados, aportando una ventaja significativa con respecto a las sondas FISH y la PCR. Por ello, consideramos que en futuras versiones podría plantearse incluir solo uno de los dos genes implicados en cada traslocación, a excepción de los reordenamientos de 11q23, debido a la gran variabilidad de puntos de rotura. De este modo se reducirían más los costes y la complejidad de los análisis.

Otra ventaja del panel empleado en este estudio es que requiere muy poca cantidad de ADN de partida (50 ng), pudiéndose estudiar todas las traslocaciones posibles de las LMA en una sola reacción de secuenciación sin necesidad de aumentar la cantidad de muestra.

ESTUDIO DE MUTACIONES:

Sustituciones e indels:

Demostramos que este método identifica de forma eficiente todas las sustituciones nucleotídicas y pequeños indels en los seis genes principales propuestos en las guías ELN (*European Leukemia Net*) para el diagnóstico y manejo de las LMA (3): NPM1, CEBPA, RUNX1, FLT3, TP53 y ASXL1. Además, identificamos sustituciones e indels en otros genes con valor pronóstico como DNMT3A, SRSF2 e IDH2 que ya han sido propuestos para añadirse en próximas guías pronósticas (12). Incluso en un paciente con traslocación t(8;21)-RUNX1-RUNX1T1 (paciente LMA1), se detectó la mutación de KIT p.Asp816His, de mal pronóstico y que no había sido identificada por secuenciación convencional. Además, se detectaron sustituciones nucleotídicas en la posición p.Asp835 del dominio TK del gen FLT3 en dos pacientes, presentando en uno de ellos (LMA17) una frecuencia alélica (VAF) muy baja, un 3.6%, con una profundidad de lectura para esa posición de 884x. Al tratarse de una mutación candidata para tratamiento diana-específico (Ej. Midostaurin u otros inhibidores de FLT3) es obligado informarla ya que se puede tratar de una mutación subclonal, es decir, presente sólo en una fracción de las células tumorales (13). Esta variante no hubiera sido detectada por secuenciación

convencional debido a la baja sensibilidad de ésta (15-20%). La identificación de variantes como éstas en el momento del diagnóstico es de vital importancia para guiar las decisiones clínicas de una forma precisa.

Todas estas alteraciones fueron validadas mediante el panel de NGS basado en tecnología de amplicones con el que nuestro grupo tiene amplia experiencia (TruSight Myeloid Panel, Illumina), alcanzándose una correlación del 100%.

Duplicación interna en tándem de FLT3 (FLT3-ITD):

Con nuestro panel de NGS basado en captura con sondas, fuimos capaces de detectar dos de los tres casos de FLT3-ITD que habían sido previamente positivos por los métodos tradicionales de estudio (análisis de fragmentos por GeneScan). Una de las mutaciones ITD (30 pb) fue reportada por el software básico de análisis de variantes puntuales e indels (Variant Studio; alineador: Smith Waterman) y la otra, aunque descartada por el software debido probablemente al bajo número de secuencias alineadas, pudo ser determinada de forma sencilla mediante visualización directa de las lecturas de secuencia, con el programa IGV (Genome Browser). Se confirma por tanto que ambas mutaciones ITD fueron capturadas y alineadas correctamente con el genoma de referencia. La ITD más larga (108 pb) no se pudo determinar mediante el software ni tampoco mediante visualización del archivo alineado, indicando la ausencia de esta región alterada del gen en las secuencias de ADN alineadas. Ninguna de las ITD fue detectada con el panel de NGS basado en la tecnología de amplicones, empleando el mismo alineador y mismo software de análisis, lo cual constata la gran dificultad en identificar este tipo de mutaciones mediante NGS basada en amplicones, como se ha descrito en otros trabajos previamente (14). Por tanto, la captura debe ser la tecnología de NGS de elección para detectar ITDs. Es bien conocido que la detección de la mutación FLT3-ITD supone todo un reto para las técnicas de secuenciación masiva (15). Aunque se han desarrollado algunos algoritmos concretos, o adaptaciones de ellos, sólo para analizar esta alteración (5,16), las inserciones de gran tamaño no siempre son capturadas por las sondas y la mayoría de los algoritmos para alineamiento de secuencias con el genoma de referencia, no manejan las duplicaciones grandes de forma correcta o resultan una complicación añadida. Teniendo en cuenta que el tamaño de la ITD puede alcanzar hasta 400 pb (17) es fundamental el estudio paralelo con metodología convencional para evitar falsos negativos.

Duplicación parcial en tándem de MLL (MLL-PTD):

Otra de las alteraciones importantes en LMA que ha supuesto un problema para ser analizada en datos de NGS, es la duplicación parcial en tándem del gen MLL. Usando el enfoque analítico más sencillo de este trabajo para la detección de variantes estructurales (software Enrichment), pudimos identificar estas inserciones genómicas de gran tamaño en dos pacientes que habían sido positivos por RQ-PCR. Ambos casos tenían cariotipo normal, y el único en el que se había realizado la FISH presentó un 75% de 11q23/MLL reordenado.

ESTUDIO DE REORDENAMIENTOS:

En cuanto al estudio de traslocaciones e inversiones empleamos este mismo software (Enrichment), que elegimos en primer lugar por tratarse de un programa sencillo con opciones de ser incorporado en el laboratorio clínico de rutina. Este software permitió la detección del 75% (18/24) de los reordenamientos previamente identificados por alguna de las técnicas convencionales (citogenética/FISH y/o PCR). Todos los casos de traslocación t(9;11)-MLL/MLLT3 y de t(15;17)-PML/RARA fueron detectados con este método, además de una variante nueva descrita, la t(1;17)-IRF2BP2/RARA, de gran interés debido a su sensibilidad al tratamiento con ATRA (11). Los seis resultados falsos negativos que se obtuvieron con este software correspondían a una traslocación t(9;22)/BCR-ABL *minor* en un paciente con LMA que presentaba además una inv(16) sí identificada; cuatro casos de LMA-CBF, dos inv(16) y dos t(8;21), identificados gracias a la PCR, que fueron falsos negativos del cariotipo y FISH, excepto el caso LMA4, cuyo estudio de FISH sí fue positivo; y una t(11;19) que no se había visto por PCR y sí por cariotipo.

Debido al alto porcentaje de falsos negativos obtenidos con el software Enrichment (algoritmo MANTA), decidimos implementar un *pipeline* bioinformático propio para comprobar si se trataba de un problema de diseño del panel o bien de un problema de análisis informático. Hoy en día existen varios algoritmos para el análisis de variantes estructurales en datos de NGS, sin existir ningún acuerdo sobre cuál es el más exacto para cada caso. Muchos de estos algoritmos, presentan una muy buena sensibilidad detectando traslocaciones e inversiones en regiones mapeables del genoma, pero funcionan peor cuando están involucradas regiones repetitivas, como es el caso de los *breakpoints* intrónicos, frecuentes en LMA, y además con frecuencia tienen una baja especificidad (18). Seleccionamos 3 algoritmos libres para analizar las variantes estructurales (Lumpy, GASV y DELLY2) y diseñamos un *pipeline* con cada uno de ellos, con el objetivo adicional de compararlos entre sí. Los mejores resultados se obtuvieron en el caso de Lumpy, que permitió identificar 5 de los 6 reordenamientos falsos negativos del software Enrichment. El único caso no identificado por ninguno de los dos enfoques fue la traslocación t(11;19), también falso negativo de la PCR. Este hecho, sugiere que el punto de rotura de la traslocación se sitúa en este caso fuera de la región más frecuentemente involucrada, que fue la incluida en el diseño de este panel (intrones 6-11 y exones 7-11). Además, debido a la baja frecuencia de aparición de esta alteración y al carácter promiscuo del gen MLL, todos los reordenamientos de MLL se capturaron desde dicho gen, incluyendo ambos *partners* únicamente en el caso de la traslocación t(9;11), por ser la más frecuente del locus 11q23. Sin embargo, ante este resultado, sería interesante añadir también la zona de rotura frecuente de los *partners* de MLL situados en los cromosomas 6, 10 y 19 (genes: MLLT4, MLLT10, MLLT1 y ELL) con el objetivo de mejorar futuros diseños.

Identificación de una nueva traslocación t(3;21)/RUNX1-LRRC34:

Además de las traslocaciones más frecuentes en LMA, con este panel fuimos capaces de identificar una nueva traslocación t(3;21), que involucraba al gen del factor de transcripción mieloide RUNX1(21q22.1) y el gen de la proteína nucleolar LRRC34, localizado en la región cromosómica 3q26.2. Este gen, no había sido incluido en el diseño del panel, por lo que la fusión fue capturada desde RUNX1 y pudo detectarse con el algoritmo MANTA de Enrichment y confirmarse con el pipeline más fiable (basado en algoritmo Lumpy) de los tres contrastados. Esta traslocación, en la que están implicadas dos zonas genómicas de gran importancia en la LMA, no ha sido descrita previamente en la literatura. La proteína LRRC34 es un marcador pluripotencial, que por tanto se expresa de forma predominante en células madre, contribuyendo a mantener el estado indiferenciado. LRRC34 no ha sido previamente asociada a LMA, sin embargo, se ha demostrado que interacciona con la proteína nucleolar Nucleofosmina (NPM1) (19) cuya desregulación en la LMA es ampliamente conocida.

En cuanto a las limitaciones que presenta este panel, una de ellas y quizás la más importante es su incapacidad para detectar *copy number variations* (CNV) para contar así con todo el espectro de alteraciones genómicas de las LMA. El análisis de este tipo de alteraciones, que ha sido propuesta por algunos grupos (5,10,20), requiere la inclusión de regiones de gran tamaño, lo cual hay que optimizar para no disparar los costes ni la cantidad de datos de secuenciación. En este sentido, nuestro grupo está trabajando actualmente en el diseño y validación de un panel mieloide para el estudio de CNV, en el que se han incluido genes ubicados en las regiones más frecuentes de pérdidas y ganancias de ADN además de zonas cromosómicas concretas como control, y se está desarrollando un *pipeline* específico basado en algoritmos que tienen en cuenta la profundidad de lectura de la secuenciación.

Con respecto a los métodos de análisis de reordenamientos en datos de NGS, podemos decir que las plataformas más sencillas a nivel de usuario aún no están preparadas para el grado de precisión que se requiere en el diagnóstico clínico.

En resumen, en este trabajo de investigación demostramos que el algoritmo Lumpy resulta adecuado para la identificación de traslocaciones e inversiones en datos de secuenciación masiva, al contrario que ocurre con las herramientas GASV y DELLY2, con las que se obtuvo un mayor número de falsos negativos. El siguiente paso, será implementar los algoritmos de elección en softwares manejables que no requieran el uso de programación, para su adaptación al laboratorio de diagnóstico clínico.

Otro de los motivos por los que las nuevas tecnologías de NGS aún no cumplen todos los requisitos necesarios para sustituir al resto de métodos empleados en el laboratorio de diagnóstico en oncohematología es la necesidad de un importante trabajo de estandarización intra e interlaboratorio de los resultados obtenidos, para confirmar la sensibilidad, así como la reproducibilidad.

Como conclusión, la secuenciación Sanger, la PCR cuantitativa y la citogenética siguen siendo las técnicas de referencia sobre las que se validan estas nuevas tecnologías. Sin embargo, algunos autores proponen un futuro en el que algunas de las técnicas hoy en día estándar, como el cariotipo convencional mediante bandeado cromosómico, sean sustituidas por la secuenciación masiva (21)

Es evidente que la secuenciación masiva tiene el potencial de agilizar y mejorar en gran medida la precisión de los diagnósticos basados en la genética. La reducción de los costes y la creación de softwares accesibles para análisis de mutaciones puntuales ya están propiciando el empleo de los paneles de NGS en muchos laboratorios como apoyo al diagnóstico tradicional, sobre todo en aquellos casos más complejos. En el caso del análisis de traslocaciones y CNV por NGS, aún se necesita un paso extra de validación debido a la dificultad que conlleva no solo el diseño de los paneles sino también el análisis bioinformático de estas alteraciones. Trabajos como el que aquí presentamos contribuirán al desarrollo de una metodología con la que se pretende conseguir un abordaje integral de la célula neoplásica en un solo test diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-42.
2. Grimwade D, Hills RK, Moorman a V, Walker H, Chatters S, Goldstone a H, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials. *Br J Haematol*. 2010;116(5):354-65.
3. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Vol. 129, *Blood*. 2017. 424-447 p.
4. Wong, Terrence N., Giridharan Ramsingh#2, Andrew L. Young#3, Christopher A. Miller4, Waseem Touma1, John S. Welch1,5, Tamara L. Lamprecht1, Dong Shen6, Jasreet Hundal4, Robert S. Fulton4, Sharon Heath1, Jack D. Baty7, Jeffery M. Klc08, Li Ding1,5, Elaine TA, Graubert1, 5, Timothy J. Ley1, 5, Todd Druley3, Daniel C. Link1, 5 and RKW. The Role of TP53 Mutations in the Origin and Evolution of Therapy-Related AML. *Nature*. 2015;171(9):969-78.
5. McKerrell T, Moreno T, Ponstingl H, Bolli N, Dias JML, Tischler G, et al. Development and validation of a comprehensive genomic diagnostic tool for myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(1):E1-9.
6. Iyer MK, Chinnaiyan AM, Maher CA. ChimeraScan: A tool for identifying chimeric transcription in sequencing data. *Bioinformatics*. 2011;27(20):2903-4.
7. Fan X, Abbott TE, Larson D, Chen K. BreakDancer – Identification of Genomic Structural Variation from Paired-End Read Mapping. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014;1-13.
8. Chen X, Schulz-Trieglaff O, Shaw R, Barnes B, Schlesinger F, Källberg M, et al. Manta: Rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications. *Bioinformatics*. 2016;32(8):1220-2.
9. Konnick EQ, Wu D. Precision Molecular Pathology of Myeloid Neoplasms. Vol. 12. 2018. 369-412 p.
10. He J, Abdel-wahab O, Nahas MK, Wang K, Rampal RK, Intlekofer AM, et al. Integrated genomic DNA / RNA profiling of hematologic malignancies in the clinical setting. 2016;127(24):3004-15.
11. Jovanovic J V., Chillón MC, Vincent-Fabert C, Dillon R, Voisset E, Gutiérrez NC, et al. The cryptic IRF2BP2-RARA fusion transforms hematopoietic stem/progenitor cells and induces retinoid-sensitive acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(3):747-51.
12. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
13. Fernandez-Mercado M, Burns A, Pellagatti A, Giagounidis A, Germing U, Agirre X, et al. Targeted re-sequencing analysis of 25 genes commonly mutated in myeloid disorders in del(5q) myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2013;98(12):1856-64.
14. Kuo FC, Dong F. Next-Generation Sequencing-Based Panel Testing for Myeloid Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10(2):104-11.
15. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, Haghshenas V, Routbort MJ, Harmon MA, et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: Applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica*. 2014;99(3):465-73.
16. Spencer DH, Abel HJ, Lockwood CM, Payton JE, Szankasi P, Kelley TW, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication in targeted, short-read-length, next-generation sequencing data. *J Mol Diagnostics*. 2013;15(1):81-93.
17. Opatz S, Polzer H, Herold T, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, et al. Exome sequencing identifies recurring FLT3 N676K mutations in core-binding factor leukemia. *Blood*. 2013;122(10):1761-9.
18. Abel HJ, Al-Kateb H, Cottrell CE, Bredemeyer AJ, Pritchard CC, Grossmann AH, et al. Detection of gene rearrangements in targeted clinical next-generation sequencing. *J Mol Diagnostics*. 2014;16(4):405-17.
19. Lührig S, Siamishi I, Tesmer-Wolf M, Zechner U, Engel W, Nolte J. *Lrrc34*, a Novel Nucleolar Protein, Interacts with *Npm1* and *Ncl* and Has an Impact on Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2014;23(23):2862-74.
20. Bolli N, Manes N, McKerrell T, Chi J, Park N, Gundem G, et al. Characterization of gene mutations and copy number changes in acute myeloid leukemia using a rapid target enrichment protocol. *Haematologica*. 2015;100(2):214-22.
21. Percival M-E, Lai C, Estey E, Hourigan CS. Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2017;31(4):185-92.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS GENÓMICO DE VARIANTES GERMINALES Y SOMÁTICAS EN UN CASO DE LEUCEMIA MIELOBÁSTICA AGUDA FAMILIAR

RESUMEN:

Introducción: En la actualidad, los casos de neoplasias hematológicas familiares, que cada vez son más frecuentes, siguen siendo infradiagnosticados. La base molecular de las hemopatías malignas ha comenzado a dilucidarse recientemente. Esto se debe fundamentalmente al uso creciente de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS) en los últimos años, que han facilitado el descubrimiento rápido de un número cada vez más amplio de casos familiares y de los genes responsables de ello. En el caso de la leucemia mieloblástica aguda (LMA) familiar, aunque se han descrito casos con mutaciones en CEBPA, GATA2, RUNX1 y genes reconocidos más recientemente (ANKRD26, DDX41), es difícil una caracterización molecular completa con las técnicas convencionales, así como la monitorización correcta de los familiares sanos.

Objetivos: Realizar un estudio molecular de una LMA familiar mediante secuenciación masiva dirigida para identificar genes candidatos implicados en la transformación maligna que ayuden a entender los mecanismos de susceptibilidad y progresión a LMA.

Material y métodos: Se presenta el caso de una familia de 8 hermanos, 4 de los cuales desarrollaron LMA secundaria a síndrome mielodisplásico (SMD). Un paciente varón de 63 años (Fig. 1, II.4) fue diagnosticado en 2014 de SMD AREBII 5q-. El paciente evolucionó de forma rápida a LMA y se sometió a un trasplante de células madre hematopoyéticas (TPH) de donante emparentado, siendo la donante su hermana menor sana (II.6). En el momento del trasplante, el paciente se encontraba en RC con enfermedad mínima residual (EMR) positiva mediante citometría de flujo. Este paciente trasplantado recayó cinco meses después del TPH y finalmente murió debido a la progresión de su enfermedad. Dos de sus hermanos (II.1 y II.8) habían muerto anteriormente debido también a LMA, habiendo sido diagnosticados a los 49 y 41 años de edad. Un año después, su hermana de 58 años (II.5) también fue diagnosticada con SMD AREBII 5q- y, al igual que su hermano, sufrió una rápida evolución a LMA. La paciente recibió TPH alogénico de donante no emparentado en situación de RC con EMR negativa. Cuatro meses después del TPH, sufrió una recaída y finalmente murió. El hermano gemelo del paciente II.4 (II.3), una hermana menor (II.7) y un hermano mayor (II.2) se encuentran sanos actualmente (última fecha: abril de 2018). En cuanto a sus padres, murieron a una edad avanzada por

causas no relacionadas con el cáncer. Ninguno de los 8 hermanos tenía antecedentes de trombocitopenia o hemorragias u otros síntomas que reflejaran un déficit en la función plaquetaria.

El ADN se extrajo de la médula ósea (MO) de los pacientes II.4 y II.5 al diagnóstico y en la recaída hematológica en ambos casos. Además, se recolectaron muestras germinales de mucosa bucal de ambos pacientes (II.4, II.5) y también de dos de los hermanos sanos (II.3, II.6), y sangre periférica (PB) de los cuatro hermanos sanos (II.2, II.3, II.6, II.7). Se disponía de una muestra adicional de SP de la paciente II.5, que fue extraída un año antes de desarrollar la LMA. En resumen, se contaba con un total de 13 muestras: 4 tumorales de MO y 9 germinales, siendo 5 de ellas SP y 4 de mucosa bucal. Las muestras se analizaron mediante secuenciación masiva (NGS) de 54 genes relacionados con enfermedades mieloides (TruSight Myeloid Panel, Illumina).

Resultados: La secuenciación de las muestras familiares permitió identificar cuatro variantes génicas diferentes: una en el factor de transcripción mieloide RUNX1 y tres en el supresor de tumores TP53. Todas las variantes fueron cambios heterocigotos de un único nucleótido. La variante detectada en RUNX1, c.167T>C (p.Leu56Ser) se localiza en el dominio de unión al ADN (dominio RHD) de la proteína. Esta mutación estaba presente en los dos pacientes con LMA (II.4 y II.5) en el momento del diagnóstico, en la muestra de recaída de la hermana con LMA (II.5) y también en las muestras de sangre periférica de dos de los cuatro hermanos sanos (II.2 y II.7). Confirmamos el origen germinal de la mutación p.Leu56Ser en RUNX1 secuenciando el ADN de células de mucosa bucal de ambos pacientes (II.4, II.5). La variante estaba presente en células de mucosa bucal con frecuencias alélicas (VAF) de 46% en el caso del paciente II.4 y 29% en la paciente II.5. En las muestras de SP y mucosa bucal de los hermanos sanos II.3 y II.6 no se identificó ninguna mutación en los 54 genes analizados, incluidos RUNX1 y TP53. Según lo descrito, la mutación en el gen RUNX1 no es suficiente para desarrollar la leucemia. Además de ella, se encontraron tres mutaciones adicionales en el gen TP53. Una de estas mutaciones, p.Gly245Asp, estaba presente en la paciente que desarrolló la leucemia a los 58 años (II.5). El resto de las mutaciones, p.Met246Val y p.Ile195Thr, se localizaron en el mismo dominio de TP53, el dominio de unión al ADN, y aparecieron en el ADN tumoral del hermano II.4, que desarrolló la LMA a los 63 años. Estas mutaciones de TP53 no estaban presentes en el ADN de las células de mucosa bucal de los pacientes, confirmando su origen somático. Las mutaciones tanto de RUNX1 como de TP53 ya estaban presentes en el ADN de sangre periférica de la paciente II.5 un año antes de su diagnóstico de LMA. El paciente II.4 recayó 5 meses después del TPH. La muestra relativa a este momento que fue secuenciada fue médula ósea con un 3.7% de blastos por citometría de flujo y 5q negativa. En este momento, se pudieron identificar las mismas dos mutaciones de TP53 que se observaron en la muestra de diagnóstico, aunque en una baja frecuencia alélica: 3.0% en el caso de p.M246V y 3.4% para la mutación p.I195T. Esta recaída ocurrió 5 meses después de que el paciente fuese trasplantado con células madre hematopoyéticas de su hermana sana II.6, la cual carecía de la mutación germinal en RUNX1. Por lo tanto, la mutación RUNX1 p.L56S no se detectó en la muestra de recaída de II.4, según lo esperado. El quimerismo se analizó en varios puntos

temporales después del trasplante, observándose quimerismo completo en muestras anteriores a la recaída y quimerismo mixto con 8.2% de células del receptor en la recaída. La paciente II.5 sufrió recaída a los 4 meses tras el TPH no emparentado. La muestra que fue secuenciada tenía un 0.3% de blastos por citometría de flujo y presentaba quimerismo completo, aunque con un 2.7% de células hematopoyéticas del receptor. En cuanto a los resultados de NGS de esta muestra, se observaron las mismas mutaciones que en el diagnóstico de la paciente, aunque con frecuencias alélicas más reducidas: 2.7% RUNX1 p.Leu56Ser y 2.0% TP53 p.G245D.

Discusión:

En resumen, de los cuatro hermanos con la mutación en RUNX1, sólo desarrollaron LMA los dos con mutaciones en TP53. Por tanto, el caso de LMA familiar que presentamos en este trabajo, se suma a las evidencias existentes que respaldan que las alteraciones en RUNX1 son un factor de predisposición a LMA, siendo en este caso las mutaciones en TP53 las causantes finales de la misma. El conocimiento de estos síndromes permite facilitar un consejo genético adecuado, guiar las pruebas apropiadas y optimizar el abordaje terapéutico. La incorporación de la secuenciación masiva en la práctica clínica constituye una herramienta muy valiosa para mejorar el diagnóstico molecular en los casos de LMA familiar. Además de las implicaciones clínicas, nuestro estudio nos permite establecer un modelo *multistep* de leucemogénesis, en el que, en resumen, la mutación germinal en RUNX1 constituiría el primer paso, generando un ambiente adecuado para la llegada de nuevas alteraciones genéticas. A continuación, aparecerían las mutaciones puntuales en TP53 (distintas en cada paciente) y, por último, la delección de la región cromosómica 5q, iniciando una fase de displasia previa que pronto desembocaría en una LMA evidente.

Según define la OMS, los casos familiares de LMA con mutaciones en RUNX1 se clasifican en la categoría de síndrome plaquetario familiar con predisposición a LMA (FPD/LMA), aunque se reconoce que algunos individuos no tienen antecedentes de sangrado. Al igual que en la familia estudiada en el presente trabajo, se han descrito casos aislados en los que varios miembros de una familia con FPD/LMA y mutaciones en RUNX1 tenían un recuento y una función plaquetaria normales. Este hallazgo señala la necesidad de test genéticos que permitan detectar mutaciones en RUNX1 y/o otros genes en todos los miembros de una familia con sospecha de LMA familiar, aun en ausencia de ciertos síntomas clínicos, con el objetivo de plantear una estrategia terapéutica adaptada en la que se elimine la opción de trasplante alogénico emparentado.

INTRODUCCIÓN:

Aunque las neoplasias hematológicas hereditarias se han informado clínicamente desde principios del siglo XX, la base molecular de estas enfermedades ha comenzado a dilucidarse recientemente. Esto se debe fundamentalmente al uso creciente de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS, *next generation sequencing*) en los últimos años, que han facilitado el descubrimiento rápido de un número cada vez más amplio de hemopatías malignas heredables y de los genes responsables de ello, al tiempo que han permitido profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a estos síndromes (1,2).

Hasta la fecha, se han descrito más de 50 síndromes hereditarios que predisponen a desarrollar distintos tipos de tumores. La mayoría de ellos son causados por mutaciones de alta penetrancia (2). Concretamente, en el campo de las neoplasias mieloides familiares, se han caracterizado seis síndromes principales de predisposición. El primero en definirse genéticamente fue el trastorno plaquetario familiar con propensión a leucemia mieloide aguda (*familial platelet disorder, FPD/LMA*), causado por mutaciones heredadas en el gen *RUNX1* (3), seguido de la LMA familiar con mutación en *CEBPA* (4). Posteriormente, el uso de la NGS contribuyó al descubrimiento de neoplasias mieloides heredables adicionales, como el síndrome mielodisplásico (SMD)/LMA familiar con mutaciones en *GATA2* (5) o *DDX41* (6); o los casos de trombocitopenia y SMD/LMA familiar con mutaciones en *ANKRD26* (7) o *ETV6* (8). De hecho, estos hallazgos clínico-genéticos se recogen ya en la última clasificación de las neoplasias hematológicas realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2016, donde se incorporó una nueva categoría diagnóstica que engloba los tumores mieloides hereditarios, por lo que deben ser considerados a la hora de establecer un diagnóstico (9).

La mayoría de estos síndromes muestran un patrón de herencia autosómica dominante y pueden agruparse por su presentación clínica. El primer grupo incluye aquellos con mutaciones germinales en *RUNX1*, *ANKRD26* y *ETV6*, y se caracteriza por la presencia de trombocitopenia y defectos funcionales de las plaquetas (2). Las mutaciones de *RUNX1* se asocian con predisposición a hemorragia, trombocitopenia de leve a moderada y un mayor riesgo de desarrollar neoplasias malignas hematológicas, incluidos SMD/LMA y, con menor frecuencia, leucemia linfática aguda T y tricoleucemia (2,10). En cuanto a los pacientes con alteraciones en *ANKRD26*, las cuales se agrupan en la región 5' UTR del gen, experimentan trombocitopenia moderada y dismegacariopoyesis, con un mayor riesgo de SMD/LMA (11). Las mutaciones germinales de *ETV6*, un regulador transcripcional clave en la hematopoyesis, afectan a familias con trombocitopenia y predisposición a un amplio espectro de tumores tanto sólidos como hematológicos, incluido SMD/LMA (2,8). El segundo grupo de síndromes SMD/LMA heredados está compuesto por aquellos con mutaciones germinales en *CEBPA* y *DDX41* y un mayor riesgo de neoplasia mieloide, pero sin trombocitopenia u otras manifestaciones orgánicas. La forma familiar de LMA con mutaciones germinales en *CEBPA* se ha asociado con mutaciones bialélicas, presentando con mayor frecuencia la mutación germinal en el extremo 5' del gen.

Aproximadamente el 11% de los casos de LMA con CEBPA doblemente mutado al diagnóstico son portadores de una de las mutaciones en la línea germinal (12) y estos casos, curiosamente, presentan un pronóstico algo mejor que las LMA con mutaciones adquiridas en ambos alelos de CEPBA (13). En el caso de los pacientes con mutaciones germinales en el gen DDX41, el cual codifica una helicasa de ARN, es más probable que la LMA desarrollada sea de cariotipo normal, a menudo eritroblástica, y con un mal pronóstico (14). Este síndrome se caracteriza por un alto grado de penetrancia y latencia prolongada, con una edad promedio de inicio de 62 años (14). El tercer grupo de SMD/LMA hereditarios se caracteriza por una alta incidencia de SMD/LMA. Este grupo implica alteraciones en la línea germinal en GATA2 y manifestaciones orgánicas heterogéneas (15). Los pacientes presentan frecuentemente monosomía 7, trisomía 8 y mutaciones en ASXL1 adquiridas (16–18).

El presente trabajo se centrará en las mutaciones germinales de RUNX1, también conocido como AML1 o CBF α . Se trata de un gen ubicado en el cromosoma 21 que codifica una de las subunidades de complejo de transcripción *core-binding factor*. Es considerado un regulador clave en la diferenciación de las células mieloides, entre otras funciones, y resulta esencial para una hematopoyesis normal (10). En el gen RUNX1, se han descrito alteraciones tanto somáticas o adquiridas como germinales o heredadas. En el caso de las alteraciones adquiridas, se incluyen tanto reordenamientos cromosómicos en los que RUNX1 está implicado, como mutaciones génicas que interrumpen la función de la proteína (19). Con respecto a las alteraciones germinales de RUNX1, se trata de mutaciones monoalélicas que pueden ocurrir a lo largo de todo el gen, incluyendo todo tipo de variantes, como cambios de sentido, codones de stop, cambios del marco de lectura o pequeñas inserciones y deleciones (indels) (20). La localización más frecuente de estas mutaciones es el dominio RHD, que corresponde a la zona de la proteína que se une al ADN para desempeñar su papel como factor de transcripción (10). En cuanto al efecto fenotípico que habitualmente producen las mutaciones en RUNX1, estudios funcionales han demostrado que estos cambios suelen traducirse en pérdidas de la función proteica, que generan el efecto final debido a una haploinsuficiencia, es decir, la disminución de la dosis génica al 50% ya es capaz de provocar un déficit de la función proteica a nivel celular. Por tanto, el patrón de herencia de predisposición a neoplasias asociadas a mutaciones en RUNX1, sería autosómico dominante (21). Además de las mutaciones génicas hereditarias, según datos recientes, también se han encontrado en casos familiares reordenamientos cromosómicos de origen germinal que involucran a RUNX1 (16,22).

Desde un principio, como se ha señalado previamente, las mutaciones heredadas de RUNX1 se han asociado con predisposición a hemorragia, trombocitopenia y mayor riesgo de desarrollar neoplasias malignas hematológicas, incluidas las de origen mieloide (2,10). Sin embargo, según las guías de la OMS, los portadores de mutaciones heterocigotas de RUNX1, muestran un amplio rango de presentaciones clínicas, incluso dentro de la misma familia. La mayoría de los individuos afectados tienen una tendencia a la hemorragia que varía

de forma notable, generalmente evidente desde la infancia, pero algunos no tienen antecedentes de sangrado. En cuanto a la aparición de la neoplasia mieloide, las presentaciones varían desde casos que desarrollan el tumor de forma muy precoz, hasta miembros de la familia asintomáticos (23–26).

Aunque las mutaciones de RUNX1 alteran la diferenciación y proliferación de las células progenitoras mieloides, su consecuencia es un estado preleucémico que requiere alteraciones adicionales adquiridas de forma somática para el desarrollo de una leucemia (10,27–30). De acuerdo con esto, se han reportado distintos tipos de variantes secundarias, siendo el evento adicional más frecuente una mutación adquirida en el segundo alelo de RUNX1 (31), aunque también se han encontrado variantes adquiridas en otros genes. Recientemente, se han identificado mutaciones adicionales en más de 20 genes, implicados en distintas funciones celulares, incluyendo señalización celular (FLT3, KRAS, KIT, MPL, CBL, NOTCH1), otros factores de transcripción (WT1), supresores de tumores (TP53), genes de *splicing* (SRSF2, SF3B1), genes del complejo cohesinas (RAD21) o reguladores de la metilación del ADN (TET2, DNMT3A). Sin embargo, aún son necesarios estudios genómicos adicionales que permitan identificar los genes recurrentemente mutados que cooperan con RUNX1. (21,31–33).

En la actualidad, los casos de neoplasias hematológicas familiares cada vez son más frecuentes y siguen estando infradiagnosticados (1), por lo que son necesarias nuevas estrategias para identificar, diagnosticar y manejar estas familias afectadas. El carácter genético de estas enfermedades supone una ventaja a la hora de establecer un diagnóstico preciso, lo que pone de manifiesto la potencial utilidad de desarrollar nuevos enfoques de diagnóstico molecular. La detección de mutaciones mediante estas estrategias puede proporcionar una explicación rigurosa de las condiciones presentes en un individuo y una familia afectados, lo que permitiría evitar tratamientos inapropiados, además de ayudar a los pacientes a comprender su trastorno específico. Adicionalmente, es importante tener en cuenta que los casos de leucemia familiar permiten una investigación detallada de la leucemogénesis, un proceso secuencial en varios pasos, que se inicia desde un estado de predisposición definido por una alteración génica heredada, conduciendo al desarrollo de la neoplasia debido a la acumulación de nuevos eventos genéticos adquiridos.

Por todo lo anterior, el estudio molecular de los casos de LMA familiar resulta de gran interés para identificar genes implicados en la transformación maligna que ayuden a entender los mecanismos de susceptibilidad y progresión a esta enfermedad. Dado que la tecnología de NGS permite analizar conjuntamente numerosos genes, en el presente trabajo, empleamos una estrategia de NGS dirigida para caracterizar y detectar las mutaciones responsables de un caso de LMA familiar.

RESULTADOS:

1. Presentación de un caso de LMA familiar: Características clínico-biológicas de los miembros de la familia

Se presenta el caso de una familia de 8 hermanos con 4 casos de leucemia mieloblástica aguda (LMA) secundaria a SMD. El pedigrí de esta familia se muestra en la Figura 1 y sus características clínicas y genéticas se resumen en la Tabla 1.

Un paciente varón de 63 años (Fig. 1, II.4) fue diagnosticado en 2014 de síndrome mielodisplásico (SMD) con exceso de blastos (AREBII) y alteración citogenética 5q-, recibiendo tratamiento con 5-azacitidina. El paciente evolucionó de forma rápida a LMA, con un 16.3% de blastos en médula ósea y un aumento de blastos en SP, en un periodo de aproximadamente un mes, por lo que fue tratado con FLAGIDA, alcanzando remisión completa (RC). Posteriormente, se sometió a un trasplante de células madre hematopoyéticas (TPH) de donante emparentado, siendo la donante su hermana menor sana (II.6). En el momento del trasplante, el paciente se encontraba en RC con enfermedad mínima residual (EMR) positiva mediante citometría de flujo. Este paciente recayó cinco meses después del TPH y finalmente murió debido a la progresión de su enfermedad.

Un año después, una hermana de 58 años (II.5) también fue diagnosticada con SMD AREBII 5q- con un 15% de blastos en médula ósea y un 3% en sangre periférica y, al igual que su hermano, sufrió una rápida evolución a LMA. La paciente recibió tratamiento de inducción con Daunorrubicina y Ara-C (3+7), alcanzando RC y mantenimiento con 5-Azacitidina, y estando en situación de RC con EMR negativa se le realizó un TPH alogénico de donante no emparentado. La paciente sufrió una recaída cuatro meses después del TPH y finalmente falleció.

Otros dos hermanos (II.1 y II.8), habían fallecido anteriormente como consecuencia también de una LMA, habiendo sido diagnosticados a los 49 y 41 años de edad. Los hermanos restantes, un mellizo del paciente II.4 (II.3), una hermana menor (II.7) y un hermano mayor (II.2), se encuentran sanos actualmente (última fecha: abril de 2018). En cuanto a sus padres, murieron a una edad avanzada por causas no relacionadas con el cáncer.

En el momento del diagnóstico, los enfermos II.4 y II.5 presentaron trombocitopenia (58000 y 28000 plaquetas / μ l respectivamente, rango normal 150,000-450,000 plaquetas / μ l). El hematocrito y otros índices hematológicos estaban dentro de los rangos normales. Ninguno de los 8 hermanos tenía antecedentes de trombocitopenia o hemorragias u otros síntomas que reflejaran un déficit en la función plaquetaria.

- **Muestras de ADN analizadas:**

El ADN se extrajo de la médula ósea (MO) de los pacientes II.4 y II.5 al diagnóstico y en la recaída hematológica en ambos casos. Además, se recolectaron muestras germinales de mucosa bucal de ambos pacientes (II.4, II.5) y también de dos de los hermanos sanos (II.3, II.6), y sangre periférica (PB) de los cuatro hermanos sanos (II.2, II.3, II.6, II.7). Se disponía de una muestra adicional de SP de la paciente II.5, que fue extraída un año antes de desarrollar la leucemia. En resumen, se contaba con un total de 13 muestras: 4 tumorales de MO y 9 germinales, siendo 5 de ellas SP y 4 de mucosa bucal. No se disponía de muestras de ADN de los hermanos II.1 y II.8, fallecidos con anterioridad.

2. Caracterización genómica de los miembros de la familia

Una vez extraído el ADN de las distintas muestras especificadas previamente, se llevó a cabo el análisis mediante secuenciación masiva (NGS) empleando el panel TruSight Myeloid Panel (Illumina) de 54 genes relacionados con enfermedades mieloides. Los detalles metodológicos y técnicos se explican en el apartado 10.1 de “Pacientes y Métodos” de la presente tesis doctoral. Se obtuvieron profundidades de lectura de entre 100x y 9391x para las distintas regiones del ADN en las diferentes muestras (mediana: 7436x). Los valores de profundidad media alcanzados en cada muestra se reflejan en la Tabla 1.

La secuenciación de las muestras familiares permitió identificar cuatro variantes génicas diferentes: una en el factor de transcripción mieloide RUNX1 (NM_001754.4, NP_001745.2) y tres en el supresor de tumores TP53 (NM_000546.5, NP_000537.3) (Tabla 1). Todas las variantes fueron cambios heterocigotos de un único nucleótido.

La **variante detectada en RUNX1**, c.167T> C, codifica un cambio de aminoácido de leucina a serina (p.Leu56Ser) y se localiza en el dominio de unión al ADN (dominio RHD) de la proteína. Esta mutación estaba presente en los dos pacientes con LMA (II.4 y II.5) en el momento del diagnóstico, en la muestra de recaída de la hermana con LMA II.5, y también en las muestras de sangre periférica de dos de los cuatro hermanos sanos (II.2 y II.7). Confirmamos el origen germinal de esta mutación secuenciando el ADN de células de mucosa bucal de ambos pacientes (II.4, II.5). La variante estaba presente en células de mucosa bucal con frecuencias alélicas (*variant allele frequency*, VAF) de 33% en el caso del paciente II.4 y 29% en la paciente II.5. En las muestras de SP y mucosa bucal de los hermanos sanos II.3 y II.6 no se identificó ninguna mutación en los 54 genes analizados, incluidos RUNX1 y TP53.

Además de la mutación en RUNX1, se encontraron **tres mutaciones adicionales en el gen TP53**. Dos mutaciones, p.Met246Val y p.Ile195Thr, se localizaron en el dominio de unión al ADN, y se detectaron en el ADN tumoral del hermano II.4., y la misma mutación p.Gly245Asp se encontró en la paciente II.5. Estas mutaciones de TP53 no estaban presentes en el ADN de las células de mucosa bucal de los pacientes,

confirmando su origen somático. Cabe señalar que no se encontraron mutaciones en TP53 en las muestras correspondientes a los hermanos sanos, ni en SP ni en mucosa bucal.

Las mutaciones tanto de RUNX1 como de TP53 ya estaban presentes en el ADN de sangre periférica de la paciente II.5 un año antes de su diagnóstico de LMA. En esta muestra, sin embargo, no se detectó la deleción en 5q que presentó al diagnóstico. Sin embargo, ya en este momento, la paciente presentó trombocitopenia, con una cifra de 92.000 plaquetas / μ l.

Muestras estudiadas en la recaída.

El paciente II.4 recayó 5 meses después del TPH. La muestra estudiada de la recaída fue médula ósea con un 3.7% de blastos por citometría de flujo y 5q normal. En este momento, se pudieron identificar las mismas dos mutaciones de TP53 que se observaron al diagnóstico, aunque en una frecuencia alélica baja: 3.0% en el caso de p.M246V y 3.4% para la mutación p.I195T. La mutación RUNX1 p.L56S no se detectó en la muestra de recaída ya que la donante II.6 tampoco la presentaba. Se observó quimerismo hematopoyético completo en muestras anteriores a la recaída y quimerismo mixto con 8.2% de células del receptor en el momento de la recaída.

La **paciente II.5 sufrió recaída a los 4 meses tras el TPH** no emparentado. La muestra que fue secuenciada tenía un 0.3% de blastos por citometría de flujo y presentaba quimerismo completo, aunque con un 2.7% de células hematopoyéticas del receptor. En ella se observaron las mismas mutaciones que en el diagnóstico de la paciente, aunque con frecuencias alélicas mucho más reducidas: 2.7% RUNX1 p.Leu56Ser y 2.0% TP53 p.G245D.

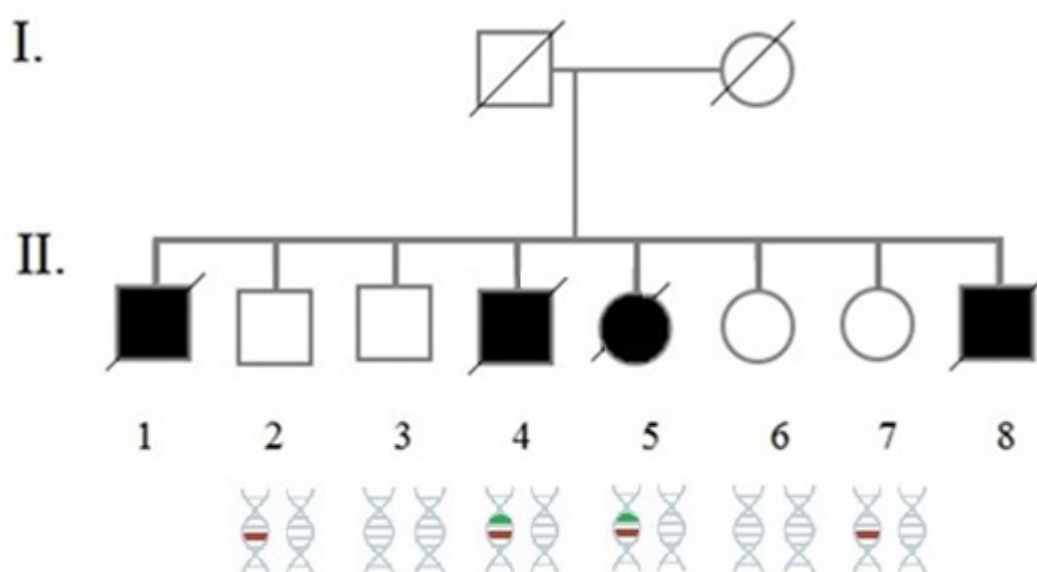


Figura 1. Pedigrí de la familia. Cuadrados: hombres; círculos: mujeres. Negro: afectados con SMD / LMA; blanco: no afectados. Una barra roja en el cromosoma: portador de la mutación RUNX1 (germinal). Dos barras en el cromosoma, una roja y una verde: RUNX1 y TP53 (adquirida) mutados.

Familiar	Edad (años)	Momento	Tratamiento	Origen Muestra	Plaquetas (x10 ⁹ /L)	Blastos (%)	Cariotipo/FISH	Quimerismo	RUNX1	%VAF	TP53	%VAF	Profundidad NGS (media±σ)
II.1	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II.2	67	Sano	-	SP	224	-	-	-	Mutado L56S	51	No mutado	-	7541x ± 9577x
II.3	63	Sano	-	SP	208	-	-	-	No mutado	-	No mutado	-	8539x ± 8785x
				Mucosa bucal	-	-	-	-	No mutado	-	No mutado	-	4279x ± 4025x
II.4	63	Diagnóstico LMA	FLAGIDA; alo-TPH emparentado (donante: II.6)	BM	58	16,3	5q-	-	Mutado L56S	42	Mutado M246V	65	4780x ± 4715x
											Mutado I195T	19	
		Recaída LMA post-TPH (+ 5 meses)	5-AZA	MO	35	3,7	5q NORMAL; Cariotipo Normal	Mixto (8.28% receptor)	No mutado	-	Mutado M246V	3	2982x ± 2925x
										Mutado I195T	3,4		
		Post-TPH (+10 meses)	-	Mucosa bucal	-	-	-	-	Mutado L56S	33	No mutado	-	4781x ± 4372x
II.5	58	1 año previo al diagnóstico	-	SP	92	-	5q NORMAL; Cariotipo Normal	-	Mutado L56S	51	Mutado G245D	52	9391x ± 8323x
		Diagnóstico SMD AREBII 5q-	Dauno+Ara-C Mant. 5-AZA Alo-TPH donante no emparentado	SP	28	3	5q-	-	Mutado L56S	59	Mutado G245D	58	6542x ± 6240x
		Recaída LMA post-TPH (+ 4 meses)	-	MO	-	0,3	5q NORMAL; Cariotipo Normal	Completo (2.79% receptor)	Mutado L56S	2,7	Mutado G245D	2	4288x ± 4248x
		Recaída LMA post-TPH (+ 5 meses)	-	Mucosa bucal	-	-	-	-	Mutado L56S	29	No mutado	-	4452x ± 4665x
II.6	56	Sano	-	SP	207	-	-	-	No mutado	-	No mutado	-	8058x ± 6600x
				Mucosa bucal	-	-	-	-	No mutado	-	No mutado	-	4069x ± 4441x
II.7	57	Sano	-	SP	289	-	-	-	Mutado L56S	50	No mutado	-	7666x ± 9494x
II.8	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1: Características clínicas y biológicas de los miembros de la familia en estudio.

DISCUSIÓN:

Aunque las mutaciones heterocigotas en el gen RUNX1 no son suficientes para la leucemogénesis, los eventos genéticos secundarios pueden promover la transformación a SMD/LMA. Como se ha visto en el caso de LMA familiar que aquí presentamos, la adquisición de alteraciones en TP53 puede explicar la penetrancia variable y la heterogeneidad clínica observadas en esta familia, coincidiendo con lo descrito en otros casos familiares con mutaciones en RUNX1. Cuatro de los seis hermanos de esta familia presentaron la variante RUNX1 p.Leu56Ser en la línea germinal, sin embargo, solo los dos casos que presentaban además mutaciones en TP53 desarrollaron la leucemia.

Como se comentó previamente, dentro de la clasificación de la OMS, las neoplasias mieloides con predisposición genética germinal y trastornos plaquetarios preexistentes conllevan mutaciones en RUNX1, ANKRD26 o ETV6. En los casos con mutaciones en ANKRD26 y ETV6 la trombopenia constituye una constante, sin embargo, en el caso de RUNX1, los defectos en las plaquetas, así como las manifestaciones clínicas derivadas de ello, son más heterogéneos (9,34). Según define la OMS, los casos familiares de LMA con mutaciones en RUNX1 se clasifican en la categoría de síndrome plaquetario familiar con predisposición a LMA (FPD/LMA), siendo el rasgo más destacable de esta patología el alto riesgo de desarrollar una neoplasia mielóide, bien SMD o LMA. La mayoría de los individuos afectados con FPD/LMA tienen una tendencia a la hemorragia que va de leve a moderada, generalmente evidente desde la infancia, sin embargo, algunos no tienen antecedentes de sangrado (24,25). En esta entidad, que ha sido descrita en aproximadamente 70 familias en la actualidad, se ha observado que la edad de desarrollo de la trombopenia puede variar entre los 2 y los 67 años (3,35,36). Incluso se han descrito casos aislados en los que varios miembros de una familia con FPD/LMA y mutaciones en RUNX1 tenían un recuento y una función plaquetaria normales, características reportadas por primera vez por Owen et al. en 2008 (23). En cuanto a la edad de desarrollo de la neoplasia mielóide (SMD o LMA), en el contexto de FPD/LMA, la media está en 39 años. (31).

Al igual que en los casos descritos por Owen et al. (23), en la familia estudiada en el presente trabajo, ninguno de los individuos, tampoco los portadores de la mutación en RUNX1, presentó antecedentes de trombopenia previos al desarrollo de la neoplasia mielóide, y ninguno de ellos tenía un historial de sangrado, por lo que no se realizaron pruebas de función plaquetaria. Sin embargo, la mitad de los hermanos (n=4) desarrollaron SMD/LMA a edades comprendidas entre 41 y 63 años. Este hallazgo señala la necesidad de test genéticos que permitan detectar mutaciones en RUNX1 y/o otros genes en todos los miembros de una familia con sospecha de LMA familiar, aun en ausencia de síntomas clínicos. El objetivo final consiste en no subestimar un diagnóstico de neoplasia familiar en casos similares al que aquí presentamos, donde no se manifiestan síntomas hasta el desarrollo inminente de la enfermedad maligna.

Según muestran diversos estudios funcionales, las mutaciones de RUNX1 son la causa de los defectos en la megacariopoyesis de los pacientes con FPD/LMA (37–40). Sin embargo, la disfunción plaquetaria no es el único efecto celular producido por las mutaciones en RUNX1, también se incluyen otros más recientemente descritos, como su capacidad para producir inestabilidad genómica, que será discutido más adelante. Michaud y colaboradores estudiaron en modelos *in vitro* el mecanismo de acción de los distintos mutantes de RUNX1 detectados hasta entonces en FPD/LMA. Los autores observaron que las mutaciones *missense*, como la identificada en nuestro caso, así como las *nonsense*, daban lugar a proteínas RUNX1 disfuncionales que además inhibían la función de RUNX1 salvaje mediante su secuestro en el citoplasma. De este modo, aumentaba la probabilidad de desarrollar una neoplasia mieloide en caso de encontrarse estas mutaciones, al contrario de lo que observaron al estudiar deleciones de RUNX1, que no ejercían este efecto inhibitor sobre el alelo salvaje (30).

Algunos autores (41) han considerado la variante p.Leu56Ser como polimorfismo (SNP) debido a que su frecuencia en la población se encuentra en el límite de la definición tradicional de SNP (>1% de la población general), concretamente en el 1.6% según la base de datos ExAC (*The Exome Aggregation Consortium*; <http://exac.broadinstitute.org>; último acceso: abril de 2018). Sin embargo, con la llegada de la secuenciación masiva, se ha producido un crecimiento exponencial del número de individuos sanos y enfermos secuenciados, observándose un aumento de la frecuencia de muchas variantes en la población general. Debido a ello, numerosos expertos coinciden en la necesidad de revisar esta definición antigua de polimorfismo, que se fijó de forma arbitraria antes del desarrollo de las nuevas técnicas genómicas y que puede dar lugar a error a la hora de hablar del potencial patogénico de una mutación. Por ello, resulta lógico que para evaluar una variante sea importante separar tres conceptos clave: (1) su frecuencia en la población; (2) su origen (germinal o somático) y (3) su valor patogénico (42–44). En el caso de la mutación RUNX1 p.Leu56Ser, identificada en la familia de estudio, demostramos el origen germinal de la misma, y sugerimos su papel como factor de predisposición a sufrir nuevos eventos y con ello una consecuente neoplasia maligna, como ocurrió en el caso de los hermanos enfermos II.4 y II.5. Lo que sí se desconoce es el mecanismo molecular mediante el cual esta variante produciría su efecto, ya que para dilucidar su patogenicidad y entender cómo afecta al papel multiregulador de RUNX1, se necesitarían estudios funcionales o modelos murinos. Estos estudios suponen un reto debido a la dificultad para generar modelos animales con mutaciones en RUNX1 con las herramientas clásicas; un problema que podría ser solventado mediante las nuevas estrategia de edición del genoma desarrolladas recientemente, como CRISPR-Cas9. No obstante, podrían establecerse similitudes con otras mutaciones también *missense* y que afectan al mismo dominio RHD, responsable de la unión de RUNX1 al ADN (21), casos en los que se ha observado que este tipo de mutantes no eran capaces de unirse al ADN pero sí a la subunidad CBF β de su complejo de transcripción (30).

Independientemente del mecanismo de acción y el fenotipo clínico generado por la mutación de RUNX1 p.Leu56Ser, es evidente que se trata de un evento genético iniciador tras el que se produjeron nuevos cambios aberrantes en los individuos de la familia de estudio. Los pacientes II.4 y II.5 presentaron pérdida de 5q y tres mutaciones en TP53 al diagnóstico (p.M246V y p.I195T en el paciente II.4 y p.G245 en II.5) que se localizaban en el dominio de unión al ADN y habían sido descritas previamente en LMA (45). Para un mejor conocimiento del caso presentado, secuenciamos el ADN de una muestra de sangre periférica de la paciente II.5 un año antes de ser diagnosticada de su SMD AREBII. En aquel momento, la paciente ya presentaba la mutación de TP53 p.G245D con una frecuencia alélica elevada (58%). No pudo realizarse estudio morfológico, pero es probable que ya hubiese iniciado la fase de displasia, y que por ello presentara trombopenia (92×10^9 plaquetas/L) que, en analíticas previas rutinarias de la paciente todavía no se manifestaba, permitiendo descartar un fenotipo clásico de FPD/LMA. Sin embargo, en este momento no pudo demostrarse la pérdida aberrante de 5q, probablemente debido a que se encontraba aún en un reducido número de células, no detectable mediante FISH.

Varios estudios previos han demostrado que la pérdida completa de la función de RUNX1, ya sea por mutaciones somáticas de la copia normal o por un efecto dominante negativo de la mutación heredada, conduce a un estado de inestabilidad genómica en la célula, lo que propiciaría la aparición de nuevas alteraciones y explicaría el alto riesgo de desarrollar leucemia en caso de RUNX1 mutado (21,40). Aunque se desconoce el motivo por el cual las segundas mutaciones en ambos pacientes ocurrieron en TP53, trabajos anteriores *in vitro* e *in vivo* han demostrado una cooperación entre RUNX1 y TP53. Según ellos, RUNX1 estimularía a TP53 cuando existe un daño en el DNA (46,47) y, por otra parte, TP53 sería imprescindible para la inhibición de RUNX1 mediante fármacos dirigidos (48). Estos hallazgos, muestran la estrecha relación entre los mecanismos de acción de ambos genes. El tercer evento genético ocurrido en la familia de estudio probablemente fue la pérdida de 5q. Esta delección y las mutaciones de TP53 se ha observado que coexisten más a menudo de lo que predecirían las tasas de ocurrencia individuales, lo que indica una posible sinergia entre las dos lesiones genéticas (49).

Comprender los síndromes familiares es fundamental para mejorar las posibilidades de un diagnóstico preciso. En nuestro estudio, el origen germinal de la mutación de RUNX1 detectada nos permite establecer un **modelo multistep** de leucemogénesis en el que, en resumen, dicha alteración constituiría el primer paso, generando un ambiente adecuado para la llegada de nuevas alteraciones genéticas. A continuación, aparecerían las mutaciones puntuales en TP53 (distintas en cada paciente) y, por último, la delección de la región cromosómica 5q, iniciando una fase de displasia previa que pronto desembocaría en una LMA evidente. El tiempo transcurrido entre el diagnóstico del SMD y el desarrollo de la LMA en los dos pacientes estudiados fue muy corto, dificultando incluso la definición de unos límites temporales entre el SMD y la

LMA. En concordancia con nuestro caso, son varios los trabajos que han propuesto que las mutaciones tanto en RUNX1 (50) como en TP53 (51) acelerarían el paso de SMD a LMA. El papel exacto de ambos genes en esta evolución aún se desconoce. En el caso de RUNX1, el estrecho periodo entre el SMD y la LMA se ha asociado también a la capacidad de las mutaciones en este factor de transcripción para propiciar la aparición de segundas alteraciones, tanto citogenéticas (pérdidas de 7/7q), como mutaciones génicas (sobreactivadoras de la vía de Ras), como se ha comentado (52–54).

Además, secuenciamos muestras del momento de la recaída de los dos pacientes con LMA (II.4 y II.5). Ambas recaídas se produjeron en momentos posteriores al trasplante alogénico. En el caso de la paciente II.5, cuyo donante fue no emparentado, la muestra de MO secuenciada tenía un 0.3% de blastos detectados por citometría de flujo, y quimerismo completo, aunque ya se detectaba el 2.8% de hematopoyesis del receptor. En este momento, fuimos capaces de detectar tanto la variante germinal de RUNX1 como la adquirida en TP53, identificadas al diagnóstico, debido a la alta sensibilidad conseguida en la NGS (profundidad: 4288 lecturas). En cambio, en el paciente II.4, que recayó 4 meses después del trasplante alogénico y la donante había sido su hermana sana II.6, que carecía de la mutación germinal en RUNX1, no pudimos detectar esta alteración a pesar de presentar un 3.7% de blastos. Por el contrario, sí observamos las mismas mutaciones de TP53 que al diagnóstico (p.M246V y p.I195T), aunque con frecuencias alélicas muy bajas (3 y 3.4%). En este momento, el quimerismo en MO fue mixto con un 8.3% de hematopoyesis del receptor, lo que explicaría la presencia de estas mutaciones. Este resultado negativo para la detección de la mutación en RUNX1 probablemente fue debido a una menor sensibilidad de la reacción de NGS (profundidad: 2982 lecturas) y una peor calidad del ADN empleado.

De la familia que aquí reportamos, puede extraerse que, en presencia de mutaciones germinales de RUNX1, el paso por la fase de trombopenia no es indispensable para llegar a la fase de la leucemia. Por ello, es fundamental realizar un estudio minucioso de la historia familiar, así como un análisis genético completo ante una mínima sospecha de LMA familiar, aun en casos en los que no hayan existido síntomas clínicos previos. Este hecho es especialmente importante cuando el tratamiento de elección es el trasplante alogénico, ya que el empleo de un donante emparentado debe ser evaluado a fondo, debido al riesgo de existencia de células madre afectadas por la misma mutación heredada (10). Incluso se ha recomendado no emplear células madre de ningún donante emparentado que presente la mutación de predisposición a SMD/LMA familiar, ya que se han obtenido resultados deficientes incluyendo injerto pobre, fallo del injerto y leucemia derivada del donante (23,55), aunque el recuento de plaquetas sea normal (56), lo que concuerda con nuestros resultados.

Además de controlar las opciones de trasplante alogénico, la identificación de casos familiares es importante para monitorizar a los miembros de la familia en riesgo. Para los individuos de la familia que carecen de neoplasias hematológicas pero que albergan mutaciones RUNX1 en la línea germinal, las recomendaciones actuales incluyen realizar una biopsia de médula ósea, donde se haría un análisis citogenético, seguido de hemograma completo y exámenes clínicos a intervalos regulares. Cada vez que se identifiquen cambios significativos en el hemograma, se debe repetir la médula ósea (57). De acuerdo con la nueva clasificación de la OMS y con los casos más actuales reportados, como el que se presenta en este trabajo, sería de gran interés añadir un análisis genómico de los familiares a las recomendaciones anteriores.

En este punto, la secuenciación masiva juega un papel importante debido a su alta sensibilidad detectando mutaciones ya que los defectos moleculares que predisponen y/o causan el fenotipo también pueden infraestimarse mediante los análisis moleculares de rutina. Ante una sospecha clínica de LMA familiar, el paso imprescindible sería el análisis de los genes incluidos en la nueva categoría de la OMS de neoplasias mieloides con predisposición germinal. Sin embargo, muchas familias con SMD/LMA familiar son negativas para las mutaciones en todos los genes actualmente reconocidos en esta categoría, lo que sugiere la necesidad de identificar genes responsables adicionales (17,21). De forma destacable, en el caso de familias con mutaciones germinales de RUNX1, donde resulta clave la aparición de segundos eventos, es especialmente importante estudiar un abanico de genes mieloides lo suficientemente amplio que permita extraer conclusiones con relevancia clínica, como la detección de alteraciones de mal pronóstico en TP53 en el caso familiar que presentamos. Además, en estos casos se recomienda establecer un diagnóstico molecular secuenciando todos los exones de RUNX1 y además las variaciones del número de copias de este gen, así como posibles reordenamientos, en ocasiones crípticos, recientemente descritos y que no serían detectados mediante las técnicas convencionales (2), para detectar posibles segundos eventos. En este sentido, nuestro grupo ha diseñado una novedosa herramienta de secuenciación masiva que permitiría la detección simultánea tanto de reordenamientos como de mutaciones puntuales, según se detalla en el *CAPÍTULO 2 de RESULTADOS* de la presente tesis doctoral. La combinación de este tipo de enfoques genómicos con la realización de una historia clínica familiar completa, constituye todo un reto y una estrategia cada vez más necesaria para mejorar el manejo clínico de los casos de LMA familiar.

El caso de LMA familiar que presentamos en este trabajo, se suma a las evidencias existentes que respaldan que las alteraciones en RUNX1 son un factor de predisposición a leucemia mieloblástica aguda, siendo en este caso las mutaciones en TP53 las causantes finales de la misma. El conocimiento de estos síndromes permite facilitar un consejo genético adecuado, guiar las pruebas apropiadas y optimizar el abordaje terapéutico de los pacientes. La incorporación de la secuenciación masiva en la práctica clínica constituye una herramienta muy valiosa para mejorar el diagnóstico molecular en los casos de LMA familiar.

BIBLIOGRAFÍA:

1. The University of Chicago Hematopoietic Malignancies Cancer Risk Team. How I diagnose and manage individuals at risk for inherited myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(14):1800-13.
2. Feurstein S, Drazer MW, Godley LA. Genetic predisposition to leukemia and other hematologic malignancies. *Semin Oncol*. 2016;43(5):598-608.
3. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*. 1999;23(2):166-75.
4. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(23):2403-7.
5. Hahn CN, Chong C-E, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li X-C, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(10):1012-7.
6. Cardoso SR, Ryan G, Walne AJ, Ellison A, Lowe R, Tummala H, et al. Germline heterozygous DDX41 variants in a subset of familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016; 30:2083-6.
7. Noris P, Perrotta S, Seri M, Pecci A, Gnan C, Loffredo G, et al. Mutations in ANKRD26 are responsible for a frequent form of inherited thrombocytopenia: analysis of 78 patients from 21 families. *Blood*. 2011;117(24):6673-80.
8. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat Genet*. 2015;47(2):180-5.
9. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-406.
10. Liew E, Owen C. Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica*. 2011;96(10):1536-42.
11. Pippucci T, Savoia A, Perrotta S, Pujol-Moix N, Noris P, Castegnaro G, et al. Mutations in the 5' UTR of ANKRD26, the ankirin repeat domain 26 gene, cause an autosomal-dominant form of inherited thrombocytopenia, THC2. *Am J Hum Genet*. 2011;88(1):115-20.
12. Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, Schardt J, Mueller BU. Somatic CEBPA mutations are a frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2008;26(31):5088-93.
13. Pastore F, Kling D, Hoster E, Dufour A, Konstandin NP, Schneider S, et al. Long-term follow-up of cytogenetically normal CEBPA-mutated AML. *J Hematol Oncol*. 2014;7:55.
14. Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, et al. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 2015;27(5):658-70.
15. Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol*. 2015;169(2):173-87.
16. Godley LA. Inherited predisposition to acute myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2014;51(4):306-21.
17. Churpek JE, Pyrtel K, Kanchi K-L, Shao J, Koboldt D, Miller CA, et al. Genomic analysis of germ line and somatic variants in familial myelodysplasia/acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(22):2484-90.
18. Micol J-B, Abdel-Wahab O. Collaborating constitutive and somatic genetic events in myeloid malignancies: ASXL1 mutations in patients with germline GATA2 mutations. *Haematologica*.; 2014. 99: 201-3.
19. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017. 129: 424-447.
20. Baptista RLR, Dos Santos ACE, Gutiyama LM, Solza C, Zalberg IR. Familial Myelodysplastic/Acute Leukemia Syndromes-Myeloid Neoplasms with Germline Predisposition. *Front Oncol*. 2017;7:206-7.
21. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood*. 2017;129(15):2070-82.
22. Buijs A, Poot M, van der Crabben S, van der Zwaag B, van Binsbergen E, van Roosmalen MJ, et al. Elucidation of a novel pathogenomic mechanism using genome-wide long mate-pair sequencing of a congenital t(16;21) in a series of three RUNX1-mutated FPD/AML pedigrees. *Leukemia*. 2012. 26:2151-4.
23. Owen CJ, Toze CL, Koochin A, Forrest DL, Smith CA, Stevens JM, et al. Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood*. 2008;112(12):4639-45.

24. Perez Botero J, Chen D, Cousin MA, Majerus JA, Coon LM, Krusselbrink TM, et al. Clinical characteristics and platelet phenotype in a family with RUNX1 mutated thrombocytopenia. *Leukemia & lymphoma*. 2017. 58:1963-7.
25. Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Nancy Lee-Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, Jürgen Thiele, Daniel A. Arber, Robert P. Hasserjian, Michelle M. Le Beau, Attilio Orazi RS. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ISBN:9789283244943). Vol. 4th, Lyon: IARC. 2016.
26. Churpek JE, Garcia JS, Madzo J, Jackson SA, Onel K, Godley LA. Identification and molecular characterization of a novel c.2032G>T mutation in RUNX1 in a family with familial platelet disorder. *Leukemia & lymphoma*. 2010; 51:1931-5.
27. Bluteau D, Gilles L, Hilpert M, James C, Debili N, Camara-Clayette V, et al. Down-regulation of the RUNX1-target gene NR4A3 contributes to hematopoiesis deregulation in familial platelet disorder/acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;118(24):6310-20.
28. Osato M, Yanagida M, Shigesada K, Ito Y. Point mutations of the RUNX1/AML1 gene in sporadic and familial myeloid leukemias. *Int J Hematol*. 2001;74(3):245-51.
29. Ripperger T, Steinemann D, Gohring G, Finke J, Niemeyer CM, Strahm B, et al. A novel pedigree with heterozygous germline RUNX1 mutation causing familial MDS-related AML: can these families serve as a multistep model for leukemic transformation? *Leukemia*. 2009;23(7):1364-6.
30. Michaud J, Wu F, Osato M, Cottles GM, Yanagida M, Asou N, et al. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood*. 2002;99(4):1364-72.
31. Antony-Debre I, Duployez N, Bucci M, Geffroy S, Micol J-B, Renneville A, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016. 30:999-1002.
32. Tech L, Haslam K, Langabeer SE, Hayat A, Conneally E, Vandenberghe E. Targeted next-generation sequencing of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2016;175(1):161-3.
33. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1310:111-8.
34. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-406.
35. Bluteau D, Glembofsky AC, Raimbault A, Balayn N, Gilles L, Rameau P, et al. Dismegakaryopoiesis of FPD / AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood*. 2012;120(13):1-3.
36. Kirito K, Sakoe K, Shinoda D, Takiyama Y, Kaushansky K, Komatsu N. A novel RUNX1 mutation in familial platelet disorder with propensity to develop myeloid malignancies. *Haematologica*. 2008;93:155-6.
37. Connelly JP, Kwon EM, Gao Y, Trivedi NS, Elkahloun AG, Horwitz MS, et al. Targeted correction of RUNX1 mutation in FPD patient-specific induced pluripotent stem cells rescues megakaryopoietic defects. *Blood*. 2014;124(12):1926-30.
38. Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, et al. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia*. 2014;28(12):2344-54.
39. Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM, et al. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002;99(10):3801-5.
40. Antony-Debre I, Manchev VT, Balayn N, Bluteau D, Tomowiak C, Legrand C, et al. Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood*. 2015;125(6):930-40.
41. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Rock J, Paschka P, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1364-72.
42. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining «mutation» and «polymorphism» in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*. 2015;8:37.
43. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(3):341-65.
44. Auer PL, Johnsen JM, Johnson AD, Logsdon BA, Lange LA, Nalls MA, et al. Imputation of exome sequence variants into population-based samples and blood-cell-trait-associated loci in African Americans: NHLBI GO Exome Sequencing Project. *Am J Hum Genet*.

- 2012;91(5):794-808.
45. 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.
 46. Wu D, Ozaki T, Yoshihara Y. Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1) Stimulates Tumor Suppressor p53 Protein in Response to DNA Damage through Complex Formation and Acetylation. *J Biol Chem* 2013;288(2):1353-64.
 47. Ozaki T, Nakagawara A, Nagase H. RUNX Family Participates in the Regulation of p53-Dependent DNA Damage Response. *Int J Genomics*. 2013;2013:271347.
 48. Morita K, Suzuki K, Maeda S, Matsuo A, Mitsuda Y, Tokushige C, et al. Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *J Clin Invest*. 2017;127(7):2815-28.
 49. Adema V, Bejar R. What lies beyond del(5q) in myelodysplastic syndrome? *Haematologica*. 2013. 98:1819-21.
 50. Tsai S-C, Shih L-Y, Liang S-T, Huang Y-J, Kuo M-C, Huang C-F, et al. Biological Activities of RUNX1 Mutants Predict Secondary Acute Leukemia Transformation from Chronic Myelomonocytic Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3541-51.
 51. Jadersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Gohring G, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1971-9.
 52. Niimi H, Harada H, Harada Y, Ding Y, Imagawa J, Inaba T, et al. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia*. 2006;20(4):635-44.
 53. Migas A, Savva N, Mishkova O, Aleinikova O V. AML1/RUNX1 gene point mutations in childhood myeloid malignancies. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(4):583-7.
 54. Chen C-Y, Lin L-I, Tang J-L, Ko B-S, Tsay W, Chou W-C, et al. RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome--the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *Br J Haematol*. 2007;139(3):405-14.
 55. Nickels EM, Soodalter J, Churpek JE, Godley LA. Recognizing familial myeloid leukemia in adults. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(4):254-69.
 56. Latger-Cannard V, Philippe C, Bouquet A, Baccini V, Alessi M-C, Ankri A, et al. Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11:49.
 57. Bannon SA, DiNardo CD. Hereditary Predispositions to Myelodysplastic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).

CAPÍTULO 4

UTILIDAD DE LOS GENES *WT1*, *PRAME* Y *BAALC* COMO MARCADORES DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

RESUMEN:

Introducción: El estudio de la enfermedad mínima residual (EMR) en LMA es de gran relevancia para el seguimiento de los pacientes y permite predecir una recaída inminente. Sin embargo, en la actualidad, solo el 40-60% de los casos de LMA tienen un marcador de EMR robusto cuantificable por PCR (tránscrios de fusión o NPM1 mutada), por lo que es necesaria la identificación de nuevos marcadores que nos permita monitorizar el resto de los pacientes. La expresión del gen del Tumor de Wilm's (*WT1*) ha sido ampliamente estudiada como marcador de EMR en LMA, sin embargo, no se expresa en un 10-20% de los casos y, en cuanto a su papel como indicador precoz de recaída, los resultados son contradictorios. Otros genes planteados para monitorizar EMR son *PRAME* y *BAALC*, aunque han sido menos evaluados y no hay datos consistentes.

Objetivos: Analizar la utilidad de la expresión de los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* para cuantificar la enfermedad mínima residual en los distintos momentos evolutivos y analizar su validez como indicadores precoces de recaída con el fin de cubrir la totalidad de los pacientes.

Material y métodos: Se analizó mediante RQ-PCR la expresión de *WT1*, *PRAME* y *BAALC* en 118 pacientes con LMA no M3 al diagnóstico y en distintos momentos de seguimiento (post-inducción, post-consolidación, pre-y post-trasplante +21 +56 +100 +180 días y +1 año). Setenta y tres (62%) contaban con un marcador estándar (NPM1 o tráncrito de fusión) para seguimiento de EMR: 48 NPM1, 12 CBFb-MYH11, 6 AML1-ETO, 3 BCR-ABL1, 4 MLL-MLL3. Los 45 (38%) pacientes restantes, carecían de marcador clásico de EMR. Todos los pacientes (n=118) presentaban sobreexpresión de al menos uno de los marcadores de estudio (*WT1*, *PRAME* y/o *BAALC*). El estudio de expresión de los transcritos de fusión y de NPM1 mutada se llevó a cabo mediante cuantificación absoluta. Se emplearon curvas estándar y ABL1 como gen control de la expresión. La cuantificación del gen *WT1* se realizó también mediante cuantificación absoluta y los genes *PRAME* y *BAALC* se estudiaron mediante cuantificación relativa. En los tres casos, se empleó el gen *GUS* como control. Dado que los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* se

expresan también en células hematopoyéticas normales, es imprescindible establecer los niveles de expresión en muestras control (no tumorales), por lo que se estudiaron muestras de donantes de MO (n=14) y SP (n=10). En base a estos valores de expresión en donantes se fijaron los puntos de corte para considerar sobreexpresión (positividad del marcador).

Resultados: Al diagnóstico, de los 118 pacientes, 89 (75.4%) sobreexpresaron WT1 (*WT1 positivos*), 51 (43.2%) PRAME (*PRAME positivos*) y 50 (42.4%) BAALC (*BAALC positivos*). Los pacientes con LMA y cariotipo de riesgo intermedio que fueron BAALC+ al diagnóstico presentaron SLR y SG a 5 años más cortas que aquellos BAALC- (SLR 15% vs. 54%, $p=0.006$; SG 0% vs. 59%, $p<0.001$). En los pacientes positivos al diagnóstico para un marcador, se monitorizó dicho marcador en los momentos post-tratamiento. Se analizaron un total de 452 muestras de seguimiento en remisión completa (RC) morfológica en los distintos momentos. La sobreexpresión de cualquiera de los tres genes en la reevaluación del tratamiento de inducción mostró ser un factor pronóstico adverso en términos de SLR. El 20% de los pacientes sobreexpresaron WT1, presentando SLR más cortas con respecto a aquellos que no (23% vs 54%, $p=0.007$). Lo mismo ocurrió con los pacientes que sobreexpresaron PRAME, que fueron el 30% de los casos (SLR, 30% vs. 69%, $p=0.023$). En el caso de BAALC, se observaron SLR más largas en el grupo de pacientes que redujo la expresión de BAALC más de 100 veces comparando con aquellos que no alcanzaron dicha reducción (100% vs. 32%, $p=0.020$). En la post-consolidación, la sobreexpresión de WT1, PRAME o BAALC mostró una tendencia hacia una peor supervivencia, aunque sin alcanzar significación estadística. De los 118 pacientes, 93 fueron sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH), 73 de ellos alogénicos y 20 autólogos. Se analizaron los niveles de PRAME pre-trasplante en 25 (14 alogénicos y 11 autólogos) de los 40 pacientes que habían sido PRAME positivos al diagnóstico. De ellos, 14 fueron positivos (umbral: 0.0006) y presentaron una SLR más corta que los pacientes negativos (49.0% vs. 90.9%, $p=0.022$). Estas diferencias se mantuvieron al analizar exclusivamente los alo-TPH ($p=0.026$). La sobreexpresión de WT1 y BAALC en muestras previas al TPH no mostró valor pronóstico significativo. En cuanto al estudio en los momentos posteriores al TPH, un resultado destacable fue el empeoramiento del pronóstico en cuanto a SLR observado en los casos que sobreexpresaron WT1, especialmente en el día +100 y +1 año (+100: 14% vs. 85%, $p<0.0001$; +1año: 50% vs. 87%, $p=0.005$). Las diferencias observadas en el día +100 se mantuvieron al analizar exclusivamente los alo-TPH ($p<0.0001$). En el caso de PRAME y BAALC no pudieron establecerse diferencias en cuanto al riesgo de recaída post-TPH.

En nuestro trabajo, aunque no se centra en el estudio de este marcador, no se confirmó el valor pronóstico significativo de NPM1 en ninguno de los momentos post-tratamiento, pero sí se observó siempre una tendencia a una peor SLR en caso de positividad, que probablemente alcanzaría significación estadística al aumentar el número de pacientes analizados y en caso de analizar únicamente muestras de SP.

Se analizó la estabilidad de la sobreexpresión de WT1, PRAME y BAALC estudiando muestras pareadas diagnóstico-recaída de 44 pacientes: 35 tenían WT1 como marcador, 19 PRAME y 15 BAALC. Los tres genes mostraron valores de expresión en la recaída muy similares a los del diagnóstico, lo que demostró su estabilidad como marcador de EMR. En el 100% de las recaídas se detectaron valores de WT1, PRAME y BAALC superiores a los umbrales fijados a partir de la expresión en donantes para muestras en RC.

Para definir la capacidad de predicción, se analizó la expresión de WT1, PRAME y BAALC en muestras previas a la recaída hematológica de 34 pacientes. Teniendo en cuenta los umbrales fijados para muestras en RC, WT1 permitió predecir el 61% de las recaídas, PRAME el 77% y BAALC el 81%. Sin embargo, demostramos que existían puntos de corte por encima de los cuales los pacientes siempre acababan recayendo: >1% para WT1, >0.024 para PRAME y >0.6 para BAALC. Demostramos que la cuantificación de los niveles de WT1, PRAME y BAALC, además de los marcadores estándar (NPM1 mutado o transcrito de fusión), permitieron la detección precoz del 91.4% (31/34) de las recaídas analizadas con un rango de antelación de entre 8 y 224 días, siendo WT1 el marcador que permitía una menor tasa de predicción y BAALC el que predecía la recaída de una forma más precoz.

Discusión y conclusiones:

En este trabajo, demostramos que la sobreexpresión de cualquiera de los tres genes de estudio (WT1, PRAME o BAALC) tras el tratamiento de inducción es un importante factor pronóstico, que permite seleccionar pacientes con mayor riesgo de recaída. Estos hallazgos indicarían la necesidad de una monitorización más estrecha de los pacientes con resultados positivos de *WT1*, *PRAME* o *BAALC* tras el tratamiento de inducción y la posibilidad de tomar decisiones terapéuticas de forma precoz. En segundo lugar, sugerimos la validez de PRAME como indicador de recaída post-trasplante, en caso de sobreexpresarse en muestras previas al mismo, lo que podría guiar tratamientos preventivos como regímenes de acondicionamiento más intensivos, que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes con altos niveles de expresión y mayor riesgo de recaída hematológica. En cuanto al valor pronóstico de estos marcadores en momentos posteriores al TPH, el resultado más destacable fue la expresión alta de WT1 en el día +100 después del TPH, que mostró ser un excelente predictor de la recaída.

Nuestros datos sobre la estabilidad en la recaída, la capacidad de predicción y la evolución comparable con los marcadores estándar en LMA (genes de fusión), sugieren que la cuantificación de los niveles de WT1, PRAME y BAALC, podría emplearse en ausencia de otro marcador de EMR, permitiendo monitorizar a un porcentaje de pacientes significativamente mayor del que se consigue solo con las dianas clásicas actuales. Por último, con el fin de mejorar los resultados, podrían plantearse estrategias de monitorización paralela de varios marcadores que combinasen la aplicabilidad de WT1 y su utilidad en la monitorización post-TPH, con la capacidad de antelación a la recaída hematológica de PRAME y BAALC.

INTRODUCCIÓN:

La detección de células leucémicas en pacientes en aparente remisión completa (RC), ha ido adquiriendo en los últimos años una importancia trascendental para el seguimiento de los pacientes, especialmente de aquellos con mayor probabilidad de recaída y, como consecuencia, con un mal pronóstico a largo plazo. Concretamente en la leucemia mieloblástica aguda (LMA), un gran número de estudios han demostrado que la positividad persistente o un aumento de los transcritos leucémicos cuantificados por PCR después de una respuesta molecular inicial, predicen una recaída inminente, que ocurre en el 50-60% de los pacientes con LMA y cariotipo normal (LMA-CN) que alcanzan RC (1). Por ello, la monitorización de la EMR se considera uno de los factores pronósticos post-tratamiento más importantes a la hora de tomar decisiones clínicas que logren retrasar o incluso prevenir la recaída y mejorar el pronóstico de los pacientes (2–4). Sin embargo, es necesario investigar a fondo la utilidad de una intervención terapéutica rápida para evitar una recaída franca, especialmente en el caso del trasplante alogénico (5). Además, la ausencia de EMR aún no se ha traducido en la predicción inequívoca de curación de la enfermedad. Esto implica que siguen existiendo células leucémicas indetectables por las técnicas convencionales, y que es necesario incrementar la sensibilidad de los estudios de EMR. Además, en la actualidad solo el 40-60% de los casos de LMA tienen marcador de EMR robusto cuantificable por PCR, por lo que es necesaria la identificación de nuevos marcadores que nos permitan monitorizar el resto de pacientes.

A pesar de que el valor pronóstico de la monitorización de EMR en la LMA es indiscutible, debido a la inconsistencia observada en la propia definición de EMR (diferentes puntos de corte) y sobre todo a la falta de estandarización de las técnicas empleadas, estos estudios no se utilizan de forma rutinaria para personalizar el tratamiento del paciente con LMA.

La monitorización de EMR en LMA se lleva a cabo mediante dos métodos en el laboratorio clínico: la citometría de flujo (CMF) y la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR). Además, se están desarrollando tecnologías de nueva generación como la secuenciación masiva o la PCR digital, pero que aún se encuentran en fase de investigación y requieren un proceso de estandarización intra e interlaboratorio que impide su aplicación a la rutina clínica (6).

La CMF se emplea para identificar y monitorizar fenotipos leucémicos aberrantes mediante combinaciones de anticuerpos específicos, ya que los blastos tumorales presentan un fenotipo anormal que permite distinguirlos de las células inmaduras normales (infidelidad de línea, asincronismos en la maduración, niveles anormales de expresión de antígenos, etc) (7). Este método es aplicable a la mayoría de las LMA, pero es muy exigente desde el punto de vista técnico y su estandarización no ha sido desarrollada completamente; además, es muy dependiente

de una precisa y correcta caracterización antigénica en el momento del diagnóstico y ha demostrado ser menos sensible que la RQ-PCR.

Hoy en día, la RQ-PCR continúa siendo la técnica molecular estándar que se emplea para seguimiento de EMR en el laboratorio clínico. Por ello, es necesario considerar la importancia de profundizar en el conocimiento de marcadores de EMR que permitan ser estudiados mediante RQ-PCR. Los marcadores más empleados para el estudio de EMR en LMA han sido los genes de fusión resultantes de las **traslocaciones** cromosómicas más frecuentes: t(15;17), t(8;21), inv(16), alteraciones en 11q23, t(6;9) y t(9;22), que en conjunto permiten el estudio en solo el 20-30% de todas las LMA.

En este sentido, en la actualidad se están analizando otros marcadores tumorales como posibles dianas de estudio para EMR mediante RQ-PCR, como son la presencia de **mutaciones génicas** específicamente tumorales y de **transcritos sobreexpresados** en los blastos tumorales de los pacientes con LMA con respecto a los niveles de expresión en células de sangre periférica y medula ósea sanas. Entre las mutaciones, el marcador más empleado y con el que se tiene mayor experiencia es el gen de la nucleofosmina (*NPM1*), cuyas mutaciones están presentes en más de la mitad de las LMA con cariotipo normal (8). La mayoría de los autores apoyan el hecho de que la presencia de transcritos mutados de *NPM1* en muestras de SP o MO de los pacientes tras la quimioterapia es un factor discriminatorio que permite la predicción de recaídas (8,9). Sin embargo, estudios recientes han cuestionado la idoneidad del marcador *NPM1* mutada para el control de la EMR, ya que esta mutación puede surgir en el contexto de un clon preleucémico caracterizado por mutaciones en los genes de regulación epigenética (por ejemplo, *DNMT3A* e *IDH1* / 2), los cuales serían los responsables de la aparición de una recaída (10,11).

En cuanto al empleo de otros genes mutados como marcadores, aunque las técnicas de secuenciación masiva han permitido identificar un gran número de mutaciones potencialmente útiles para seguimiento de EMR, su validez para este fin aún no ha sido confirmada (6). Algunos de esos marcadores presentan limitaciones metodológicas (probablemente influenciadas por el número de blastos), o bien como en el caso de las duplicaciones internas en tándem (ITD) del gen *FLT3*, por ser un marcador clonalmente inestable (12). Otro marcador puesto en duda han sido las mutaciones en el gen *DNMT3A*, al encontrarse en sujetos sanos y en pacientes que permanecen en remisión completa (13,14).

Entre los genes sobreexpresados en LMA, el más utilizado como marcador de EMR es el gen del tumor de Wilms (*WT1*) (15–18). El gen *WT1* codifica un factor de transcripción que se expresa en una gran proporción de pacientes con LMA, por lo que incluso ha llegado a ser propuesto como marcador molecular universal para estudio de EMR por algunos autores (17). Sin embargo, *WT1* tiene algunas limitaciones, ya que no se sobreexpresa en un 10-20%

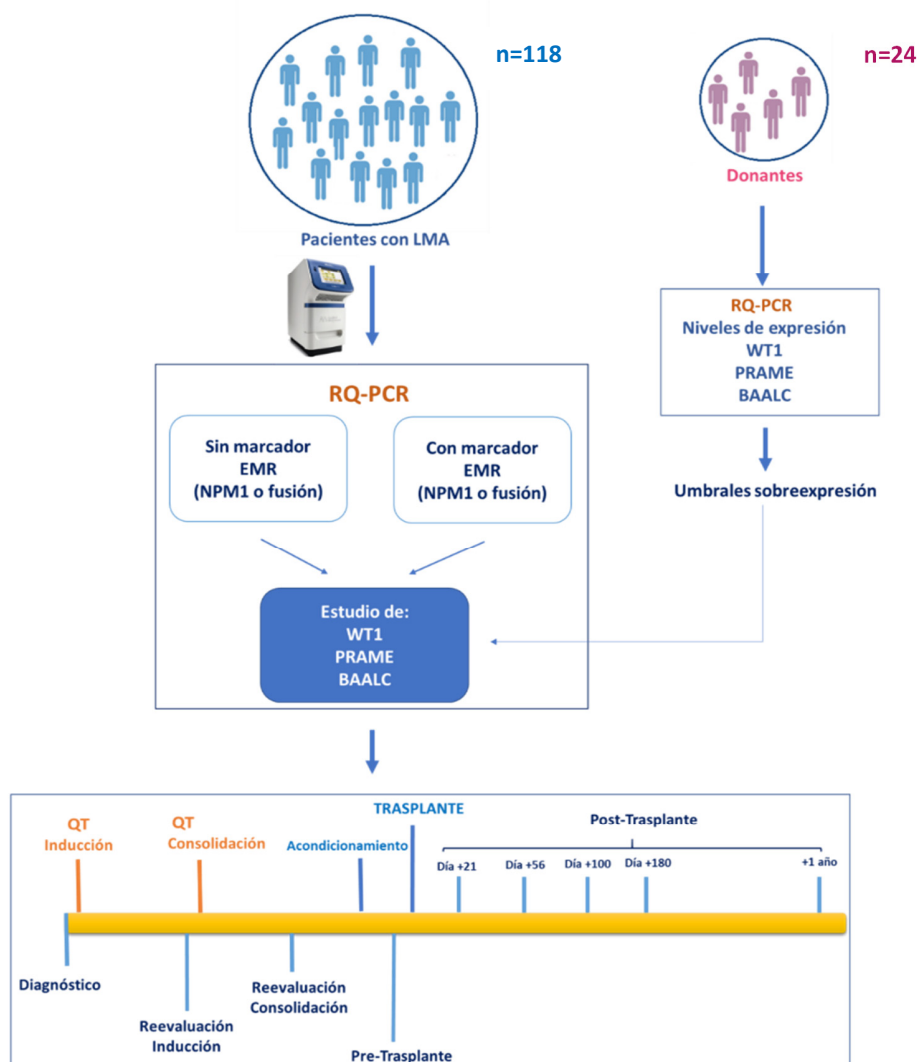
de los pacientes, y además, las células hematopoyéticas normales presentan bajos niveles, por lo que existen datos inconsistentes en la literatura que han impedido su implantación como marcador de primera elección (7). En cuanto al valor pronóstico de la sobreexpresión de WT1, los trabajos previos coinciden en cuanto a su impacto tras el tratamiento de inducción y, en general, en momentos posteriores al trasplante. Sin embargo, aún no se ha definido cuál es el momento post-trasplante en el que la cuantificación de WT1 resulta más informativa y tampoco existe consenso en cuanto a su papel en la predicción de recaídas (7).

Otros genes menos estudiados son PRAME y BAALC. El gen PRAME (*PReferentially expressed Antigen in MELanoma*), es un antígeno tumoral cuya expresión se ha visto aumentada en diversos tipos de tumores sólidos, así como en leucemias agudas (19), presentando una expresión especialmente baja en células de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) (20). En cuanto a su utilidad como marcador de EMR, muy pocos grupos han realizado estudios, siendo éstos en casos individuales o series de pacientes muy reducidas (21,22). El gen BAALC (*Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic*), también ha sido propuesto como posible marcador de EMR debido a su expresión elevada en leucemias, y de forma normal en células progenitoras CD34+, a pesar de desconocerse su papel en la leucemogénesis (23,24). En ambos casos, se tiene especialmente poca información sobre el seguimiento de EMR en los momentos posteriores al trasplante.

Con estos antecedentes y dado que todavía existe un número importante de pacientes en los cuales no se dispone de un marcador fiable de seguimiento, nos propusimos analizar la utilidad de la sobreexpresión de los genes WT1, PRAME y BAALC en la monitorización de EMR con el fin de cubrir la totalidad de los pacientes con LMA. Además, nos planteamos analizar su validez como indicadores precoces de recaída, así como estudiar las implicaciones clínicas de su expresión elevada al diagnóstico y en los distintos momentos post-tratamiento.

Diseño del estudio

Para el desarrollo del presente estudio, se analizó mediante RQ-PCR la expresión de *WT1*, *PRAME* y *BAALC* en 118 pacientes con LMA no M3 al diagnóstico y en distintos momentos de seguimiento. Se incluyeron 73 pacientes que disponían de un marcador de EMR (transcrito de fusión o mutación en *NPM1*) y 45 pacientes sin marcador. Además, analizamos la expresión de dichos genes en muestras de MO y SP de donantes sanos con el fin de establecer puntos de corte que permitieran definir positividad. Una descripción detallada de la metodología empleada se recoge en el apartado 7 de “Material & métodos”. Esquemáticamente, el diagrama de estudio es el que recoge a continuación:



RESULTADOS:

1. Características de los pacientes

En este estudio se incluyeron 118 pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) no M3 que alcanzaron remisión completa morfológica (RC) tras el tratamiento de inducción, 50 (42%) mujeres y 68 (58%) hombres, con una mediana de edad de 55 años (rango, 2-76). Del total de pacientes, 73 (62%) contaban con un marcador estándar (NPM1 o transcrito de fusión) para seguimiento de EMR: 48 NPM1, 12 CBFb-MYH11, 6 AML1-ETO, 3 BCR-ABL1, 4 MLL-MLLT3. Los 45 (38%) pacientes restantes, carecían de marcador clásico de EMR. Todos los pacientes (n=118) presentaban sobreexpresión de al menos uno de los marcadores de estudio (WT1, PRAME y/o BAALC). Las características clínicas y biológicas se detallan en la Tabla 1.

2. Cuantificación de transcritos de fusión (AML1-ETO, CBFb-MYH11, BCR-ABL1, MLL-MLLT3) y de NPM1 mutada al diagnóstico

El estudio de expresión de los transcritos de fusión y de NPM1 mutada se llevó a cabo mediante cuantificación absoluta. Se emplearon curvas estándar realizadas a partir de diluciones decimales de plásmidos para todas las fusiones excepto en el caso del MLL-MLLT3 por lo que no se pudo estimar el número de copias. Para las curvas de los genes de estudio *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11*, *BCR-ABL1 minor* y *NPM1* mutada se obtuvieron valores de pendiente de -3.690, -3.250, -3.320, -3.580 y -y valores de corte con el eje y (y-intercept) de 40.09, 38.34, 38.78, 42.27 y respectivamente. Se empleó el gen *ABL1* como control para *NPM1* mutada y los genes de fusión. Para la curva del gen control *ABL*, el valor de pendiente fue -3.482 y el del y-intercept 39.38

Como se explicó en “Pacientes y Métodos” (apartado 7), los resultados se expresaron obteniendo el número de copias normalizado (NCN) del marcador tumoral (*NPM1* mutada o transcrito de fusión) con respecto al transcrito control *ABL1*, y se multiplicó este NCN por 10000, es decir, número de copias de *NPM1* mutada o fusión por cada 10000 copias de *ABL1*.

El transcrito de fusión *AML1-ETO/t(8;21)* estuvo presente en 6 (5.1%) de los 118 pacientes al diagnóstico. El transcrito *CBFB-MYH11/inv(16)* apareció en 12 (8.5%) pacientes, siendo dos de los casos falsos negativos de la citogenética (Tabla 1). Y finalmente, los transcritos *BCR-ABL1 minor/t(9;22)* y *MLL-MLLT3/t(9;11)* se encontraron en 3(2.5%) y 4(3.4%) pacientes, respectivamente. Los niveles de transcrito *AML1-ETO* oscilaron entre 1509 y 42809 copias (mediana 17586), los niveles de *CBFB-MYH11* entre 1222y 114687 copias (mediana 24449) y los niveles de *BCR-ABL1 minor* entre 7277 y 113306 copias (mediana 60292).

De los 118 pacientes, 51 (43.2%) presentaron mutaciones en el exón 12 del gen de la nucleofosmina (*NPM1*). Estas mutaciones fueron identificadas por análisis de fragmentos (GeneScan). Mediante secuenciación de los

fragmentos se determinó el tipo de mutación, correspondiendo a 45 casos con mutación tipo A, 2 casos tipo B y uno tipo D. Las tres mutaciones restantes correspondieron a variantes no cuantificables. El número de copias de las 48 mutaciones cuantificables (tipos A, B o D) osciló entre 1590 y 320914 copias (mediana 87227).

Tanto los transcritos de fusión como las mutaciones cuantificables en NPM1 se emplearon como marcadores de seguimiento.

3. Cuantificación de los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* al diagnóstico

La cuantificación del gen *WT1* se realizó mediante cuantificación absoluta y se empleó el gen *GUS* como control de la expresión. Los parámetros de las curvas patrón de *WT1* y *GUS* fueron -3.313 y -3.540 para la pendiente y 38.48 y 40.21 en el caso del y-intercept, respectivamente.

Los genes *PRAME* y *BAALC* se estudiaron mediante cuantificación relativa. En ambos casos, se empleó también el gen *GUS* como control.

Según se detalla en “Pacientes y Métodos” (apartado 7), los resultados de *WT1* se expresaron como porcentaje, dividiendo el número de copias de *WT1* entre el número de copias de *GUS*, y multiplicando este número por 100. Los resultados de la *PRAME* y *BAALC* se expresaron como la relación entre los valores Ct de la muestra ($\Delta Ct = Ct_{gen\ en\ estudio} - Ct_{gen\ control}$) y los valores Ct del calibrador ($\Delta\Delta Ct$) por medio de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método comparativo del Ct).

3.1 Definición de umbrales de expresión para *WT1*, *PRAME* y *BAALC* en muestras de donantes sanos

Dado que los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* se expresan también en células hematopoyéticas normales, es imprescindible establecer los niveles de expresión en muestras control (no tumorales) con dos objetivos: 1) Distinguir pacientes cuyos blastos leucémicos sobreexpresan *WT1*, *PRAME* y/o *BAALC* en el momento del diagnóstico, con niveles lo suficientemente altos como para permitir variaciones significativas a lo largo de la enfermedad, relacionándose con la aparición o desaparición de la población celular tumoral. 2) Fijar unos umbrales de expresión que permitan discriminar entre presencia de enfermedad residual y niveles basales normales en las muestras de seguimiento post-tratamiento.

Además, debido a la diferencia de expresión entre sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) en donantes en el caso del gen *WT1*, se consideró necesario establecer umbrales distintos según el tipo de tejido. Sin embargo, en el caso de *PRAME* y *BAALC*, al no haber diferencias significativas de expresión entre SP y MO, se fijó un único umbral, independientemente del origen de la muestra (Figura 1, Tabla 2).

Tabla 1. Características clínicas y biológicas de los pacientes en el momento del diagnóstico.

Variable		Pacientes totales (n=118)	
Sexo , n (%)			
Hombres		68 (58)	
Mujeres		50 (42)	
Edad, años, mediana (rango)		55 (2-76)	
Leucocitos, 10⁹/L, mediana (rango)		25.5 (1-198)	
Blastos MO, %, mediana (rango)		54.5 (8-96)	
FAB, n (%)			
M0	4(3.4)	M4eo	8(6.8)
M1	22(18.6)	M5	17(14.4)
M2	22(18.6)	M6	3(2.5)
M3	3(2.5)	Otros	2(1.7)
M4	15(12.7)	No clasificada	22(18.6)
Cariotipo-FISH, n (%)			
inv(16)(p13;q22)	10(8.5)	del(7/7q)	5 (4.2)
t(8;21)(q22;q22)	6 (5.1)	del(5q)	3 (2.5)
t(9;22) (q34;q11)	3 (2.5)	del(5q)+ del(7q)	1(0.8)
t(6;9) (p23;q34)	1 (0.8)	Cariotipo complejo	4 (3.4)
t(9;11) (p21;q23)	4 (3.4)	Cariotipo normal (CN)	63 (53.4)
11q23 reord (no 9;11)	3(2.5)	Otros cariotipos	15 (12.7)
FLT3-ITD, n (%)		30 (25.4)	
NPM1 mutado, n (%)		51 (43.2)	
Tipo A		45(38.1)	
Tipo B		2(1.7)	
Tipo D		1(0.8)	
Otros (no cuantificables)		3(2.5)	
Marcador de seguimiento EMR, n (%)			
NPM1mut cuantificable(A,B,D)		48 (40.7)	
Fusión CBFβ-MYH11 (tipo A)*		12 (10.2)	
Fusión AML1-ETO		6 (5.1)	
Fusión BCR-ABL <i>minor</i>		3(2.5)	
Fusión MLL-MLLT3		4 (3.4)	
Sin marcador (NPM1/Fusión)		45 (38.1)	
Riesgo Citogenético, n (%)			
Favorable		17 (14.4)	
Intermedio (LMA-CI)		81 (68.6)	
Desfavorable		20 (16.9)	
Riesgo Genético Global, n (%)			
Favorable		54(45.8)	
Intermedio		42(35.6)	
Desfavorable		22(18.6)	

**Dos de las inv(16) que habían sido negativas por técnicas citogenéticas se definieron a posteriori mediante detección de la fusión CBFβ-MYH11 por RQ-PCR (uno de los casos fue "Cariotipo Normal" y el otro presentó una ganancia del cromosoma 20, incluyéndose en el grupo "Otros cariotipos"). Para establecer el Riesgo Genético Global de cada paciente, se tuvo en cuenta, además de la citogenética, la presencia de mutaciones en FLT3-ITD (pronóstico adverso) y NPM1 (en NPM1 (pronóstico favorable en ausencia de FLT3-ITD). Ningún caso presentaba mutaciones bialélicas en el gen CEBPa (pronóstico favorable) (Recomendaciones European LeukemiaNet, 2017).*

Umbrales de expresión de WT1

La expresión de WT1 fue analizada en 24 muestras de donantes sanos, 14 de MO y 10 de SP, confirmándose su baja expresión en sujetos sanos, con un valor medio de WT1/GUS de $0.044\% \pm 0.056\%$ en MO y $0.0022\% \pm 0.0017\%$ en SP. La expresión en SP fue significativamente más baja que en MO ($p < 0.0001$), por ello se establecieron umbrales diferentes según el origen de la muestra.

Umbral WT1 al diagnóstico: En muestras de MO, se consideró sobreexpresión de WT1 un valor dos logaritmos por encima de la expresión media en donantes. En muestras de SP, se consideró un valor tres logaritmos por encima de la expresión media en donantes. Por tanto, los umbrales para definir expresión alta o baja de WT1 al diagnóstico se establecieron en **5% en MO** y **2.5% en SP**.

Umbral WT1 para muestras de seguimiento: Para el estudio de EMR, el umbral de positividad se fijó en el valor dado por la "media+3 σ ", donde " σ " corresponde a la desviación típica, es decir, se considerarán resultados positivos aquellos con porcentajes WT1/GUS mayores de **0.21% en MO**, valor coincidente además con el máximo de expresión encontrado en donantes, y mayores de **0.01% en SP**.

Umbrales de expresión de PRAME

La expresión de PRAME fue analizada en 16 muestras de donantes sanos como calibradores, 6 de médula ósea (MO) y 10 de sangre periférica (SP). Se confirmó la baja expresión de PRAME en sujetos sanos, con una mediana de expresión de 0.00006 (rango, 0.00000-0.0006) en MO y 0.00004 (rango, 0.00000-0.0015) en SP. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión en SP y MO ($p > 0.05$) (Figura 1).

Umbral PRAME al diagnóstico: Se consideró sobreexpresión del gen PRAME en caso de valores superiores a un logaritmo por encima del máximo de expresión en donantes, es decir, de **0.006**. Esta cifra equivale a 100 veces la mediana de expresión en donantes, y muy próximo a la mediana de expresión en pacientes, (0.0022, rango 0.0000-5.657).

Umbral PRAME para muestras de seguimiento: Se consideró positivo un valor correspondiente a 10 veces la mediana de expresión en donantes, es decir, **0.0006**.

Umbrales de expresión de BAALC

Al igual que PRAME, la expresión BAALC se estudió en 16 muestras de donantes sanos, 6 de médula ósea (MO) y 10 de sangre periférica (SP). La mediana de expresión fue de 0.0354 (rango, 0.0051-0.4894) en MO y 0.0156 (rango, 0.0038-0.1506) en SP. Tampoco se observaron diferencias significativas en la expresión entre SP y MO ($p > 0.05$) (Figura 1).

Umbral BAALC al diagnóstico: El umbral de sobreexpresión al diagnóstico se estableció en un valor igual a un logaritmo por encima de la mediana de expresión en donantes, es decir 0.354, aproximado a **0.4**. Este valor es próximo a la mediana de expresión en pacientes (0.1250 (rango 0.0002-183.5463)).

Umbral BAALC para muestras de seguimiento EMR: Se consideraron positivos valores de expresión superiores a la mediana en donantes, es decir, valores por encima de **0.04**.

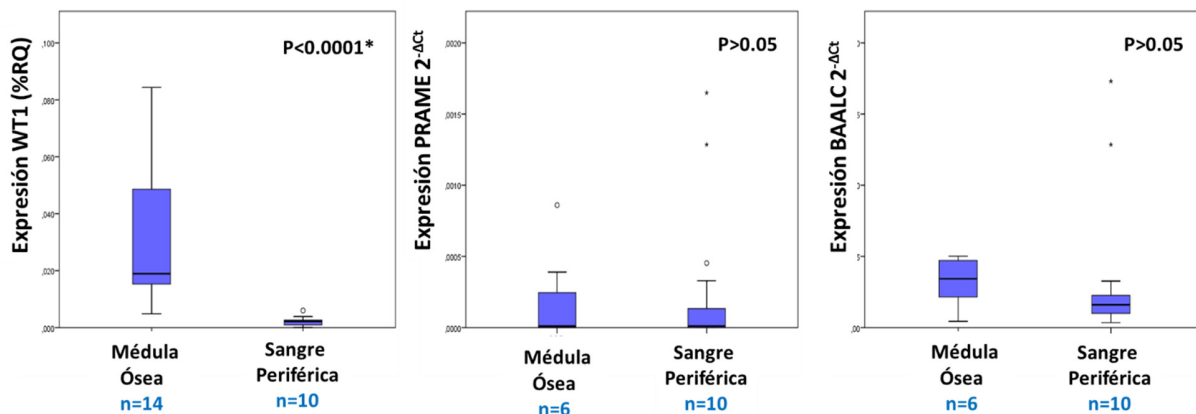


Figura 1: Expresión de los genes WT1 ($p < 0.001$), PRAME ($p > 0.05$) y BAALC ($p > 0.05$) en muestras de médula ósea y sangre periférica de donantes sanos.

Tabla 2. Expresión de WT1, PRAME y BAALC en donantes sanos y puntos de corte para considerar sobreexpresión establecidos en base a dicha expresión en donantes

Marcador *	Expresión donantes sanos			Umbrales sobreexpresión al diagnóstico				Umbrales sobreexpresión seguimiento			
	SP	MO	Diferencias SP vs. MO	SP		MO		SP		MO	
				Criterio	Valor	Criterio	Valor	Criterio	Valor	Criterio	Valor
WT1	0.0022%	0.044%	sí $p < 0.0001$	1000 veces media donantes	2.5%	100 veces media donantes	5%	media donantes $+3\sigma$	0.01%	media donantes $+2\sigma$	0.21%
PRAME	0.00004	0.00006	no	100 veces mediana donantes	0.006	100 veces mediana donantes	0.006	10 veces mediana donantes	0.0006	10 veces mediana donantes	0.0006
BAALC	0.0156	0.04	no	10 veces mediana donantes	0.4	10 veces mediana donantes	0.4	mediana donantes	0.04	mediana donantes	0.04

* WT1: Valor medio de expresión. PRAME y BAALC: mediana de expresión

3.2 Expresión de WT1, PRAME y BAALC en muestras de LMA al diagnóstico

Se cuantificó la expresión de los tres genes mediante RQ-PCR en 118 muestras tumorales de pacientes con LMA al diagnóstico: 107 de médula ósea (MO) y 11 de sangre periférica (SP). Todos los pacientes expresaron al menos uno de los tres genes (WT1, PRAME y/o BAALC) por encima de los valores de corte establecidos a partir de la expresión en donantes sanos.

De los 118 pacientes, 89 (75.4%) sobreexpresaron el gen WT1 por encima de los valores umbrales fijados para muestras de médula ósea (umbral: 5%) y sangre periférica (umbral: 2.5%) con una expresión similar en ambos tipos de muestra (mediana de 16.56% en MO y 16.19% en SP, $p=0.83$). La sobreexpresión de WT1 al diagnóstico no se correlacionó con la edad, el sexo, las mutaciones FLT3-ITD, el subtipo FAB ni el grupo de riesgo citogenético. Por el contrario, se correlacionó con la presencia de mutaciones en NPM1 ($p=0.05$), una mayor cifra de leucocitos ($p=0.009$) y un mayor porcentaje de blastos en MO ($p=0.030$) (Tabla 3).

El gen PRAME estaba sobreexpresado en 51 de 118 pacientes (43.2%) por encima del punto de corte establecido (umbral: 0.006). Al igual que en el caso de WT1, no se encontraron diferencias significativas entre la expresión de PRAME en SP y MO en pacientes (mediana de 0.0020 en MO y 0.0418 en SP, $p=0.193$). La sobreexpresión de PRAME en el momento del diagnóstico se correlacionó con una edad más joven ($p=0.046$), subtipo FAB M2 ($P=0.047$), ausencia de mutaciones en NPM1 ($p=0.023$) y cariotipo de riesgo favorable ($p=0.005$) (Tabla 3).

BAALC se sobreexpresaba al diagnóstico en 50 de los 118 pacientes (42.4%) (umbral: 0.4). De nuevo, no hubo diferencias significativas en cuanto a los valores de expresión en MO y SP (mediana de 0.1022 en MO y 0.5105 en SP, $p=0.434$). La sobreexpresión de BAALC al diagnóstico se correlacionó con una menor cifra de leucocitos ($p=0.009$), un menor porcentaje de blastos en MO ($p=0.002$), ausencia de mutaciones en NPM1 ($p<0.0001$) y cariotipo favorable ($p=0.001$) (Tabla 3).

Valor pronóstico de la sobreexpresión de WT1, PRAME y BAALC al diagnóstico:

WT1: En la serie global ($n=118$), no se observaron diferencias significativas en cuanto a supervivencia libre de recaída (SLR) ni supervivencia global (SG) entre los pacientes que sobreexpresaron WT1 al diagnóstico por encima del umbral fijado (5%) y los que no. Tampoco hubo diferencias en la serie de pacientes con cariotipo de riesgo intermedio ($n=81$) ni en los pacientes menores de 65 años ($n=91$). Sin embargo, en la serie global, sí se observó una tendencia hacia una peor SLR para los pacientes con niveles de expresión de WT1 por encima del 10% (39.9% vs. 56.8%, $p=0.060$) (Figura 2).

Tabla 3. Correlación de la sobreexpresión (expresión alta) de *WT1*, *PRAME* y *BAALC* con las características clínico-biológicas de los pacientes al diagnóstico. Se realizó una prueba estadística *T-Student* para las variables cuantitativas (edad, cifra de leucocitos y porcentaje de blastos por citometría) y una prueba *Chi-cuadrado* o de *Pearson* para las variables categóricas.

Variable	WT1			PRAME			BAALC		
	WT1 alto vs. n=89	WT1 bajo n=29	p	PRAME alto vs. n=51	PRAME bajo n=67	p	BAALC alto vs. n=50	BAALC bajo n=68	p
Edad, años (media±σ)	52.7(±14.9) vs.	59.4 (±15.8)	0.476	48.9(±16.9) vs.	54.6(±13.2)	0.046	52.8(±14.3) vs.	51.7(±15.7)	0.705
Leucocitos, 10 ⁹ /L (media±σ)	48.9(±51.9) vs.	27.8(±27.1)	0.009	35.9(±43.9) vs.	48.9(±49.5)	0.168	28.4(±39.9) vs.	52.2(±49.5)	0.009
Blastos, % (media±σ)	57.0 (±27.3) vs.	42.2(±26.3)	0.030	49.1(±25.9) vs.	57.1(±28.7)	0.171	42.6(±23.4) vs.	60.5(±28.1)	0.002
Sexo varón	60.7% (54/89) vs.	48.3% (14/29)	0.241	64.7%(33/51) vs.	52.2(35/67)	0.175	64.0%(32/50) vs.	52.9%(36/68)	0.230
FLT3-ITD mut	28.1% (25/89) vs.	17.2% (5/29)	0.244	17.6%(9/51) vs.	31.3%(21/67)	0.091	18.0%(9/50) vs.	30.9%(21/68)	0.112
NPM1 mut	48.31%(43/89) vs.	27.6%(8/29)	0.050	31.3%(16/51) vs.	52.2%(35/67)	0.023	4.0%(2/50) vs.	72.1%(49/68)	<0.001
Subtipo FAB			0.140			0.047			0.051
M0	2.2%(2/89) vs.	6.9%(2/29)		1.9%(1/51) vs.	4.5%(3/67)		2.0%(1/50) vs.	4.4%(3/68)	
M1	20.2%(18/89) vs.	13.8%(4/29)		7.8%(4/51) vs.	26.95(18/67)		14.0%(7/50) vs.	22.1%(15/68)	
M2	17.9%(16/89) vs.	20.7%(6/29)		31.4%(16/51) vs.	8.9%(6/67)		24.0%(12/50) vs.	14.7%(10/68)	
M3	3.4%(3/89) vs.	0% (0/29)		1.9%(1/51) vs.	2.9%(2/67)		0% (0/50) vs.	4.4%(3/68)	
M4	14.6%(13/89) vs.	6.9%(2/29)		9.8%(5/51) vs.	14.9%(10/67)		14.0%(7/50) vs.	11.8%(8/68)	
M4Eo	6.7%(6/89) vs.	6.9%(2/29)		9.8%(5/51) vs.	4.5%(3/67)		10.0%(5/50) vs.	4.4%(3/68)	
M5	8.9%(8/89) vs.	31.0%(9/29)		17.6%(9/51) vs.	11.9%(8/67)		6.0%(3/50) vs.	20.7%(14/68)	
M6	2.2%(2/89) vs.	3.4% (1/29)		1.9%(1/51) vs.	2.9%(2/67)		20%(1/50) vs.	2.9%(2/68)	
Riesgo citogenético			0.679			0.005			0.001
Favorable	13.5%(12/89) vs.	17.2%(5/29)		23.5%(12/51) vs.	7.5%(5/67)		26.0%(13/50) vs.	5.8%(4/68)	
Intermedio	70.8%(63/89) vs.	62.1%(18/29)		52.9%(27/51) vs.	80.6%(54/67)		44%(25/50) vs.	82.3%(56/68)	
Desfavorable	15.7%(14/89) vs.	20.7% (6/29)		23.5%(12/51) vs.	11.9%(8/67)		24.0%(12/50) vs.	11.7%(8/68)	

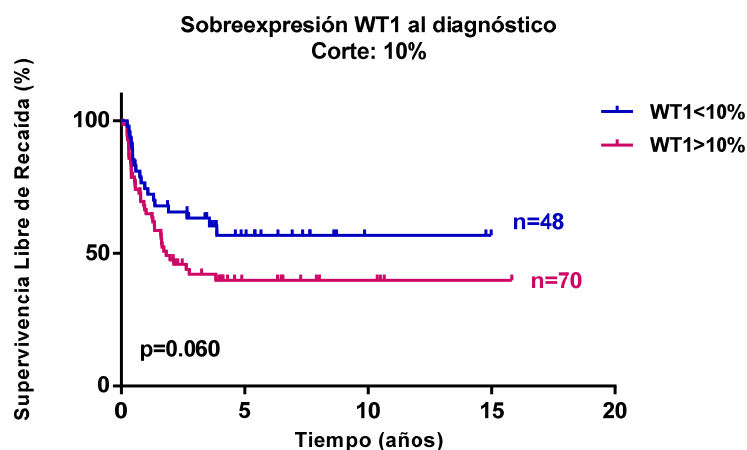


Figura 2: Supervivencia Libre de Recaída en 118 pacientes con LMA para los casos WT1 superior al 10% y WT1 inferior al 10% en el momento del diagnóstico.

PRAME: La sobreexpresión de PRAME al diagnóstico no permitió establecer diferencias significativas entre los pacientes. No obstante, se observó una tendencia a una SLR más larga en los pacientes que sobreexpresaron PRAME al diagnóstico, tanto en la serie global (todos los cariotipos) como en el grupo de cariotipos de riesgo intermedio (54.7% vs. 40.7%, $p=0.288$).

BAALC: Los pacientes con LMA y cariotipo de riesgo intermedio (LMA-CI) que sobreexpresaban el gen BAALC al diagnóstico, presentaron una SLR (5 años) significativamente más corta que aquellos que no sobreexpresaban (15.3% vs. 54.1%, $p=0.006^*$). Estas diferencias se mantuvieron en términos de supervivencia global, que fue de un 59.5% en los pacientes que resultaron negativos para BAALC, a diferencia de aquellos BAALC positivos, para los que se observó una SG del 0% ($p<0.001^*$) (Figura 3).

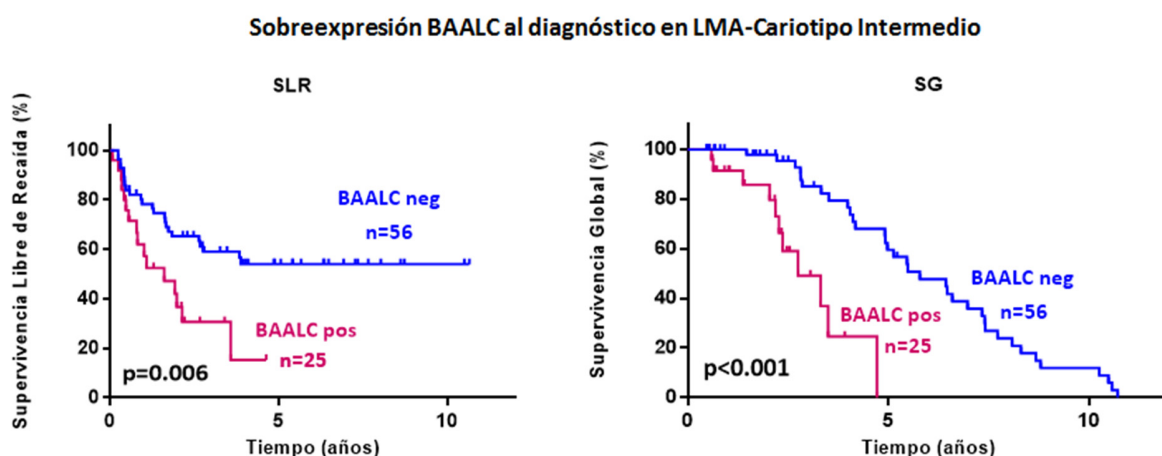


Figura 3: Influencia de la sobreexpresión de BAALC al diagnóstico en la Supervivencia Libre de Recaída y Supervivencia Global en pacientes con LMA de Cariotipo Intermedio (n=81)

4. Estudio de EMR mediante cuantificación de NPM1 mutada, WT1, PRAME y BAALC como marcadores de seguimiento

Se analizaron 452 muestras de seguimiento en distintos momentos post-tratamiento (post-inducción, post-consolidación, post-intensificación, pre-trasplante, post-trasplante +21, +56, +100, +180 días y +1 año) pertenecientes a 118 pacientes que sobreexpresaban alguno de los marcadores de estudio (WT1, PRAME y/o BAALC) al diagnóstico. Todas las muestras analizadas carecían de blastos tumorales mediante técnicas morfológicas (muestras en remisión completa hematológica). La expresión media de cada uno de los tres genes en las diferentes muestras de EMR se representa en la [Figura 4](#).

Estas muestras fueron analizadas mediante RQ-PCR para cuantificar la expresión de los genes de estudio *WT1*, *PRAME* y/o *BAALC*, además del marcador clásico de EMR *NPM1*.

Adicionalmente, se cuantificó la expresión de los genes de fusión *AML1-ETO*, *CBFB-MYH11* y *BCR-ABL1* en los pacientes que eran positivos al diagnóstico, con el objetivo de comparar su expresión con la de los genes de estudio (*WT1*, *PRAME* y *BAALC*) en los distintos momentos evolutivos. El marcador *MLL3-MLL* no se empleó en el estudio comparativo, ya que todos los pacientes fueron negativos en la post-inducción y no recayeron.

Se consideraron valorables las muestras de ARN en las que los genes control *GUS* y/o *ABL1* eran suficientemente amplificados en la RQ-PCR (Ct *ABL*:21.9-29.3; Ct *GUS*: 20.8-28.0, donde Ct es "threshold cycle" o ciclo umbral).

Todos los estudios de supervivencia se realizaron a 5 años.

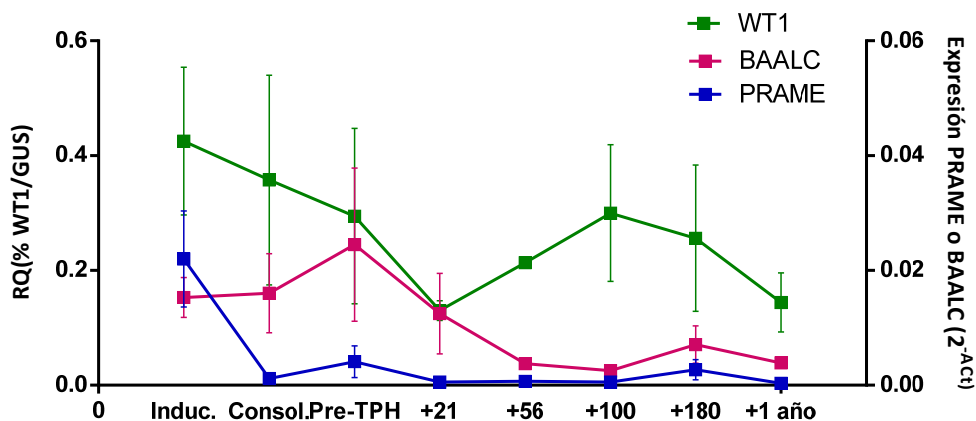


Figura 4. Niveles de expresión (media \pm desviación estándar) de los genes WT1, PRAME y BAALC en los distintos momentos post-tratamiento.

4.1 Niveles de expresión post-inducción

WT1: Se analizaron los niveles de expresión de WT1 tras el tratamiento de inducción, en 64 de los 89 pacientes que lo sobreexpresaban al diagnóstico. Se obtuvieron valores de expresión comprendidos entre 0.000% y 4.706% (mediana: 0.059%). El 20.31% (13/64) de los pacientes sobreexpresaban WT1 por encima del umbral fijado para muestras en remisión a partir de valores de expresión en donantes (umbral: 0.21%). Valores superiores a 0.21% se asociaron significativamente con un peor pronóstico en términos de Supervivencia Libre de Recaída (SLR) tanto en la serie global (23.1% vs. 54.0%, $p=0.007^*$) (Figura 5) como en el grupo de LMA de cariotipo intermedio ($p=0.008^*$).

PRAME: La expresión de PRAME en el momento post-inducción fue analizada en 30 de los 51 casos que sobreexpresaban el gen al diagnóstico. Considerando como punto de corte el valor fijado para muestras en RC (umbral: 0.0006), el 70% (21/30) de los pacientes presentaban PRAME positivo en la post-inducción. En este caso, se observó solo una tendencia a una SLR más corta en los pacientes PRAME positivos (83.3% vs. 49.1%, $p=0.181$). Sin embargo, el reducido número de casos negativos y el rango de valores de expresión en la post inducción (mediana: 0.0017, rango 0.0000-0.1731) sugieren una cinética más lenta de desaparición del gen PRAME tras el tratamiento de inducción con respecto a otros marcadores como WT1. Por ello, se mantuvo para este momento de estudio de EMR el mismo punto de corte que al diagnóstico (umbral: 0.006), valor más cercano a la mediana de expresión post-inducción, observándose una SLR a 5 años, más corta para los pacientes PRAME positivos, que suponían el 30% (10/30) de los casos (30.0% vs. 69.3%, $p=0.023^*$) (Figura 5).

BAALC: Se estudió la expresión de BAALC en 33 muestras post-inducción de los 50 pacientes que sobreexpresaban el gen al diagnóstico. La mediana de expresión fue de 0.069 (rango, 0.000-0.795). Tomando como punto de corte el establecido para BAALC en muestras en RC (umbral: 0.04), el 69.7% (23/33) de los pacientes presentaban una expresión alta de BAALC. Al igual que en el caso de PRAME, esto supone una proporción demasiado alta de pacientes con sobreexpresión del gen para muestras en RC, lo que podría indicar una cinética lenta de descenso del marcador. Sin embargo, en el caso de BAALC, cuando se consideraba el mismo umbral de expresión que para el diagnóstico (0.4) sólo tres pacientes mostraban valores superiores, poniendo de manifiesto que la expresión de BAALC en la post inducción oscila entre un rango de valores muy pequeño y no es un valor informativo por sí solo. Debido a ello, se decidió analizar la reducción de la expresión de BAALC tras el tratamiento de inducción con respecto a los niveles de expresión al diagnóstico. Se observaron SLR a 5 años más largas en el grupo de pacientes que redujo la expresión de BAALC más de 100 veces (6/29), comparado con aquellos pacientes que no alcanzaron dicha reducción (23/29) (100% vs. 31.7%, $p=0.020^*$).

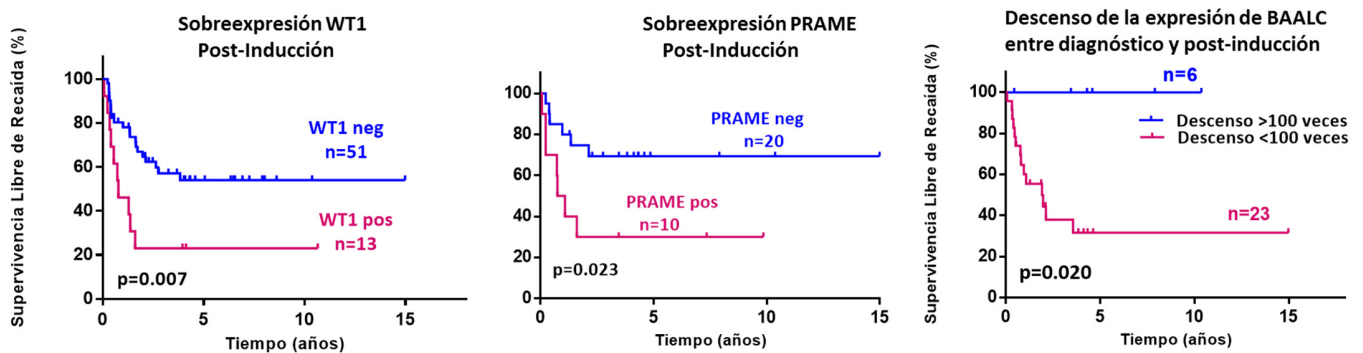


Figura 5: Curva de SLR para los casos WT1 positivos (>0.21%) y WT1 negativos (<0.21%), PRAME positivos (>0.006) y negativos (<0.006) y descenso de la expresión de BAALC mayor o menor de 100 veces tras el tratamiento de inducción. Serie global.

NPM1 mutada: se consideró positividad en caso de valores de expresión mayores de 0 copias normalizadas, para todas las muestras en RC, según lo establecido previamente (25). Se analizó la presencia de NPM1 mutada en muestras posteriores al tratamiento de inducción de 36 pacientes, siendo 30 positivos y solo 6 negativos. La mediana de expresión fue 16.02 copias de NPM1 mutada. Destaca la presencia de un elevado número de casos positivos (83.3%) debido probablemente a la lenta desaparición del clon tumoral con NPM1 mutado. No hubo diferencias significativas entre pacientes positivos y negativos en cuanto a SLR (49.6% vs. 44.4%, $p=0.978$).

4.2 Niveles de expresión post-consolidación

Después del tratamiento de consolidación, se cuantificaron los niveles de expresión de WT1 en 46 casos, PRAME en 20 casos, BAALC en 26 y NPM1 mutada en 28. Las medianas de los valores obtenidos fueron: 0.043% WT1 (0.000%-7.883%), 0.0004 PRAME (0.0000-0.0076), 0.0607 BAALC (0.0000-1.7500) y 1.54 copias NPM1 mutada (rango, 0.00-3798.19).

Los umbrales para distinguir entre sobreexpresión y expresión basal normal de los genes WT1, PRAME y BAALC fueron los fijados para muestras en RC en el caso de cada marcador a partir de la expresión analizada en donantes (WT1:0.21%, PRAME: 0.0006, BAALC: 0.04). Considerando estos puntos de corte, un 15.2% (7/46) de los pacientes sobreexpresaban WT1 tras el tratamiento de consolidación, un 40.0% (8/20) PRAME y un 53.8% (14/26) BAALC. El 57.1% (16/28) de los pacientes fueron NPM1mut positivos en el momento post-consolidación (analizado en muestras de MO).

En cuanto al valor pronóstico de la sobreexpresión de WT1, PRAME y BAALC, no se encontraron diferencias significativas en términos de SLR (WT1: $n=46$ $p=0.174$; PRAME: $n=20$ $p=0.286$; BAALC: $n=26$ $p=0.398$). No obstante, la sobreexpresión de cualquiera de los tres genes en la post-consolidación mostró una tendencia hacia una peor supervivencia. (Figura 6).

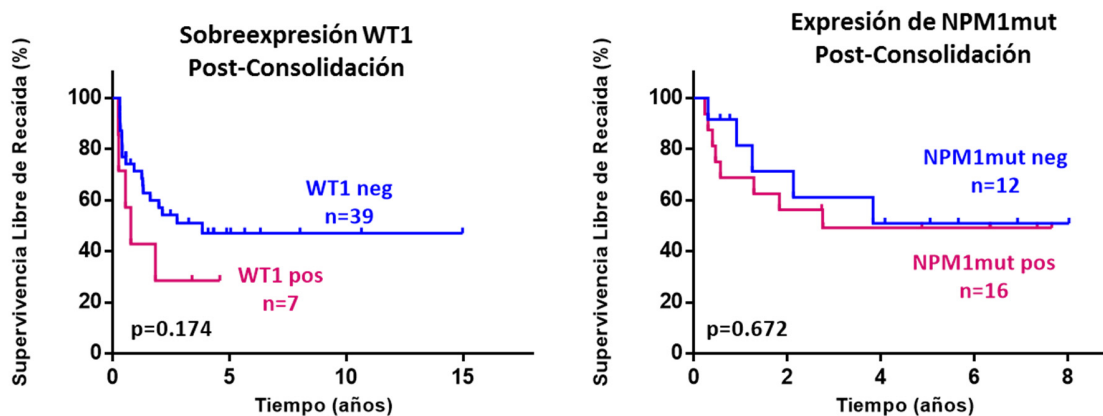


Figura 6. Curvas de SLR para los casos WT1 positivos (>0.21%) y WT1 negativos (<0.21%), y NPM1 positivos (>0 copias) y negativos (0 copias) tras el tratamiento de consolidación. (NPM1 en MO y SP)

4.4 Niveles de expresión pre y post-trasplante de progenitores hematopoyéticos

La expresión de los marcadores de estudio de EMR también se analizó en los distintos momentos pre- y post-trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (días: +21, +56, +100, +180 y +1 año).

De los 118 pacientes incluidos en este estudio, 93 (78.8%) fueron sometidos a TPH, 73 de ellos alogénicos y 20 autólogos. De estos 93 pacientes, 67 sobreexpresaron WT1 al diagnóstico, 40 PRAME y 39 BAALC. Quince pacientes habían sufrido una recaída antes del trasplante, por lo que fueron excluidos del estudio de EMR que se expone a continuación. Los 78 pacientes restantes se trasplantaron en primera remisión completa. De ellos, recayeron 26 (33.3%). Además, para el estudio de EMR en cada momento posterior al TPH, se fueron excluyendo en cada caso las muestras de pacientes que recaían entre el TPH y el momento post-TPH en estudio.

De los 26 pacientes que recayeron post-TPH, 2 lo hacían antes del día +21, 2 entre el día +21 y el +56, 3 entre el día +56 y +100, 8 casos entre el día +100 y +180 y 3 casos entre el día +180 y +1 año post-trasplante. Ocho de los pacientes recayeron en fechas posteriores al año post-TPH, por lo que sus valores de EMR fueron considerados en todas las muestras de este estudio. La mediana de seguimiento de los 52 pacientes trasplantados en primera RC que no experimentaron recaída fue de 4 años (rango, 29 días- 15 años).

4.4.1 EMR pre-trasplante

Se analizaron los niveles de PRAME pre-trasplante en 25 (14 alogénicos y 11 autólogos) de los 40 pacientes que habían sido PRAME positivos al diagnóstico. De ellos, 14 fueron positivos (umbral: 0.0006) y presentaron una SLR más corta que los pacientes negativos (49.0% vs. 90.9%, $p=0.022^*$). La mediana de expresión fue de 0.0008 (0.0000-0.0674) (Figura 7). Estas diferencias se mantuvieron al analizar exclusivamente los alo-TPH ($p=0.026$).

WT1, BAALC y NPM1 se cuantificaron en muestras pre-trasplante de 40, 22 y 25 pacientes respectivamente, sin que su positividad alcanzase valor pronóstico significativo en cuanto a SLR ($p=0.848$, $p=0.150$, $p=0.326$). Las medianas de los valores obtenidos fueron: 0.041% (0.000%-1.206%), 0.0392 (0.0000-1.4044) y 0.0000 (0.0000-14134.70).

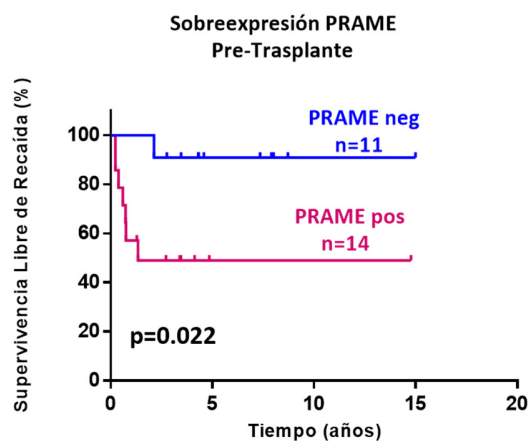


Figura 7: Curva de SLR para los casos PRAME positivos (>0.0006) y PRAME negativos (<0.0006) antes de recibir el trasplante alogénico.

4.4.2 EMR post-trasplante (post-TPH)

La expresión de *PRAME* fue estudiada en un total de 70 muestras pertenecientes a los distintos momentos post-trasplante de 31 pacientes. Solo 3 de estos pacientes sufrieron recaída posterior al TPH, por lo que no pudieron establecerse diferencias en cuanto al riesgo de recaída de los pacientes positivos.

A continuación, se explicará la influencia de la positividad de los genes de estudio WT1, BAALC y el marcador clásico NPM1mut en los diferentes momentos post-TPH. WT1 se analizó en 130 muestras de 48 pacientes, de los cuales recayeron 14 (29.2%); BAALC en 76 muestras de 24 pacientes, de los que recayeron 6 (25.0%) y NPM1mut en 66 muestras de 28 pacientes, 9 de los cuales sufrieron recaída (32.1%).

4.4.2.1 EMR post-TPH día +21:

El gen WT1 se cuantificó en muestras de 27 pacientes obtenidas 21 días después del TPH, siendo la mediana de expresión de 0.063% (0.010%-0.419%). El 11.1% (3/27) de estos pacientes presentó sobreexpresión de WT1, sin observarse ninguna diferencia de supervivencia con los pacientes WT1 negativos ($p=0.824$).

La expresión alta de BAALC, estudiada en 14 pacientes, mostró un valor pronóstico contrario a lo esperado. La SLR a cinco años resultó ser del 87.5% en los pacientes que sobreexpresaban BAALC (BAALC pos, $n=8$), frente a un

26.7% para el grupo de pacientes que no presentaba sobreexpresión de BAALC (BAALC neg, n=6) ($p=0.049^*$). La mediana de expresión fue de 0.045 (0.002-1.001) (Figura 8).

En el caso de la expresión de mutaciones en el gen *NPM1*, no se observaron diferencias, apareciendo una discreta tendencia a una SLR más corta para los pacientes positivos ($p=0.617$). Los valores de expresión variaron desde 0.00 hasta 32502.01 copias *NPM1mut* (mediana 3.07).

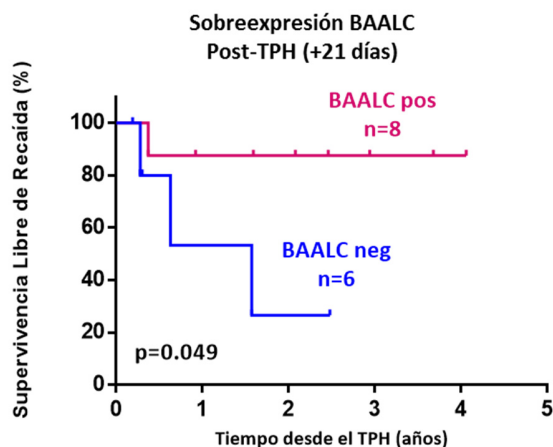


Figura 8: Curva de SLR para los casos BAALC positivos (>0.04) y BAALC negativos (<0.04) a los 21 días de recibir el trasplante.

4.4.2.2 EMR post-trasplante día +56:

Los niveles de expresión de WT1 se midieron en 28 pacientes tras 56 días desde el trasplante, para los que se obtuvo una mediana de 0.048% (0.0033%-2.9174%). El 17.8% (5/28) sobreexpresó el gen. Sin embargo, no hubo ninguna diferencia en cuanto a SLR con los pacientes negativos ($p=0.977$).

BAALC se encontró sobreexpresado en 10 de los 20 pacientes estudiados, presentando los casos positivos una SLR más larga que los casos negativos, siguiendo la misma inclinación observada en el día +21, aunque sin alcanzar significación estadística ($p=0.092$). La mediana de expresión fue 0.0227 (0.0000-0.1267).

El marcador *NPM1mut* fue positivo en 5 de los 14 pacientes analizados. La mediana fue 0.00 copias *NPM1mut* (rango 0.00-22064). De los 5 pacientes positivos, recayó uno (22064 copias); y de los 9 negativos recayeron 2 (0 copias).

4.4.2.3 EMR post-trasplante día +100 (3 meses):

WT1 se cuantificó en 28 pacientes, siendo la mediana de expresión de 0.065% (0.0054%-3.034%). La tasa de recaída posterior al trasplante en los 7 pacientes que sobreexpresaban WT1 fue significativamente mayor (6/7)

que en el grupo de 21 pacientes que no lo sobreexpresaban (2/21) (SLR 5 años, 14.3% vs. 85.3%, $p < 0.001^*$) (Figura 9). Estas diferencias se mantuvieron al analizar exclusivamente los 19 pacientes que recibieron alo-TPH ($p < 0.0001$).

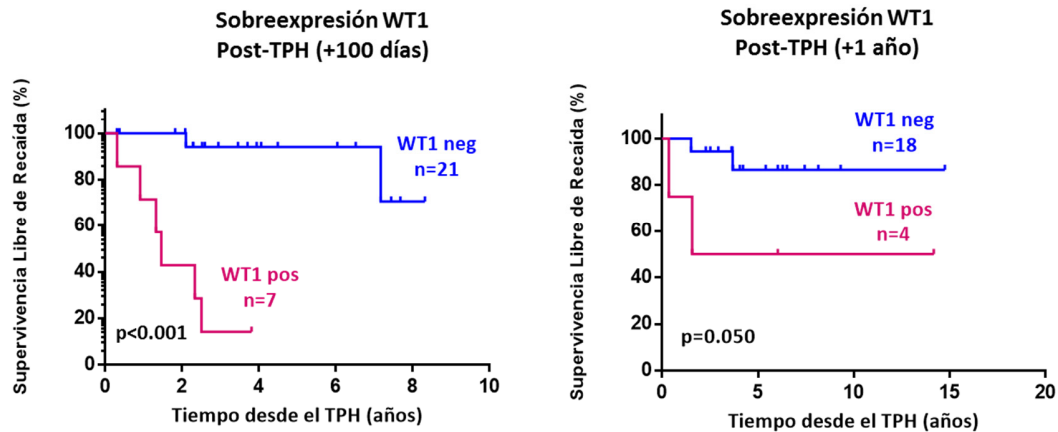


Figura 9. Curvas de SLR para los casos WT1 positivos ($> 0.21\%$) y WT1 negativos ($< 0.21\%$) a los cien días y al año desde la realización del trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Los valores de expresión de BAALC, estudiados en 16 pacientes, oscilaron entre 0.000 y 0.719 (mediana 0.017). De ellos, solo 3 fueron positivos (18.7%), sin poder observarse ninguna asociación con el pronóstico ($p = 0.469$).

En el caso de NPM1 mutada, de los 19 casos analizados fueron positivos 5 (26.3%). Los valores de expresión quedaron comprendidos entre 0.00 y 15.77 (mediana 0.00). De nuevo, la tendencia observada fue la esperada, encontrándose SLR más cortas en el grupo de pacientes NPM1 positivos ($p = 0.100$).

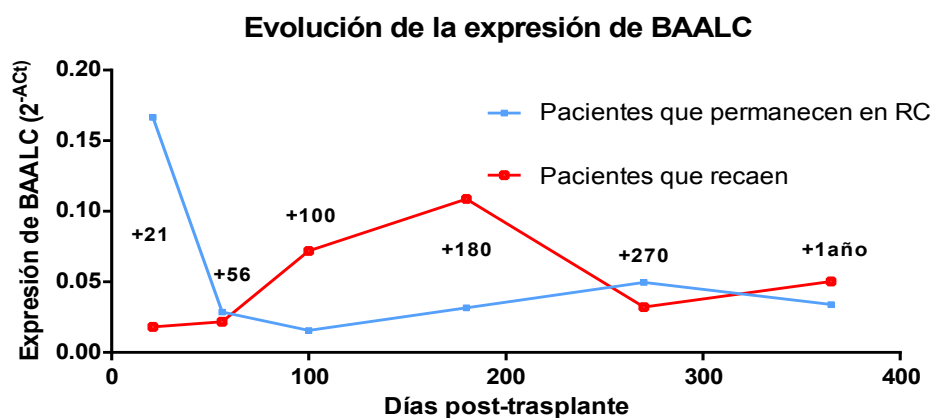


Figura 10. Representación de la expresión media del gen BAALC en los distintos momentos posteriores al trasplante. Rojo: niveles de expresión de BAALC en el grupo de pacientes que sufrió una recaída post-trasplante. Azul: Niveles de expresión de BAALC en el grupo de pacientes que no recayó después del trasplante (seguimiento: 5 años post-TPH).

4.4.2.4 EMR post-trasplante día +180 (6 meses):

Los niveles de WT1 se cuantificaron en 25 pacientes a los 6 meses del TPH, con una mediana de expresión de 0.046% (0.003%-2.642%) y una tasa de sobreexpresión del 24.0% (6/25). No hubo diferencias significativas en la SLR entre el grupo WT1 positivo y el negativo. En cuanto a la expresión de BAALC, al contrario de lo observado en los momentos anteriormente descritos (días +21 y +56), en el día +180 pudo apreciarse una mayor frecuencia de recaída en los 10 pacientes que sobreexpresaban BAALC (recaen 3/10, 30.0%) con respecto a los 12 negativos (recaen 2/12, 16.7%) (SLR 5 años 68.6% vs. 81.8%, $p=0.350$). La mediana de expresión fue 0.043 (0.000-0.517). En la [Figura 10](#) se observa cómo evolucionan los niveles post-TPH de BAALC en el grupo de pacientes que sufrieron recaída y en aquellos que permanecen en RC (seguimiento 5 años).

El nivel de NPM1 mutada fue analizado en 16 casos y fue positivo en 4 de ellos. Se conservó la misma tendencia observada en los momentos anteriores, aunque de nuevo, sin alcanzarse valor estadístico ($p=0.186$). La expresión de NPM1mut osciló entre 0.00 y 4.46 (mediana 0.00).

4.4.2.5 EMR post-trasplante día +1 año:

La expresión de WT1 se analizó en 22 pacientes un año después de someterse a trasplante (17 alogénicos y 5 autólogos), de los cuales, el 18.2% (4/22) fueron positivos. Los valores de WT1 obtenidos oscilaban entre 0.011% y 1.019% (mediana 0.048%). Al igual que en el caso del día +100, se encontraron diferencias significativas en cuanto a SLR (5 años) entre el grupo WT1 positivo y el negativo (50% vs. 86.6%, $p=0.050$). Estas diferencias no se mantuvieron al analizar exclusivamente los 17 pacientes que recibieron alo-TPH ($p=0.132$).

Los niveles de BAALC se cuantificaron en 11 casos, de los cuales solo 1 sufrió recaída, sin poder determinarse ninguna diferencia entre los 5 pacientes que sobreexpresaban el gen y los 5 negativos. La mediana de expresión fue 0.0305 (0.0005-0.0877).

En el caso de los 18 pacientes en los que se midió NPM1mut en este momento, se observó una vez más que el grupo NPM1mut negativo (0 copias) presentaba SLR más largas que el grupo NPM1mutada positivo (83.1% vs. 40%, $p=0.059$).

4.5 Niveles de expresión en la recaída

De los 118 pacientes del estudio, 58 (49.2%) sufrieron recaída. Diecisiete de ellos no fueron sometidos a TPH. De los 41 pacientes que sí se trasplantaron, 15 ya habían recaído antes de recibir el TPH (situación al trasplante: segunda RC o progresión de la enfermedad) y 26 recayeron en momentos posteriores al TPH (situación al trasplante: primera RC).

Para estudiar la estabilidad de la sobreexpresión de WT1, PRAME y BAALC entre los momentos del diagnóstico y la recaída, se cuantificó la expresión de los genes en muestras pareadas de 44 pacientes. Solo se analizó la expresión de un gen en la recaída si el paciente había sobreexpresado el mismo al diagnóstico. Se cuantificó WT1 en muestras de recaída de 35 pacientes, PRAME en 19 y BAALC en 15, obteniéndose medianas de expresión de 12.43%(0.28%-113.56%), 0.159 (0.006-2.828) y 0.927 (0.041-12.236) respectivamente.

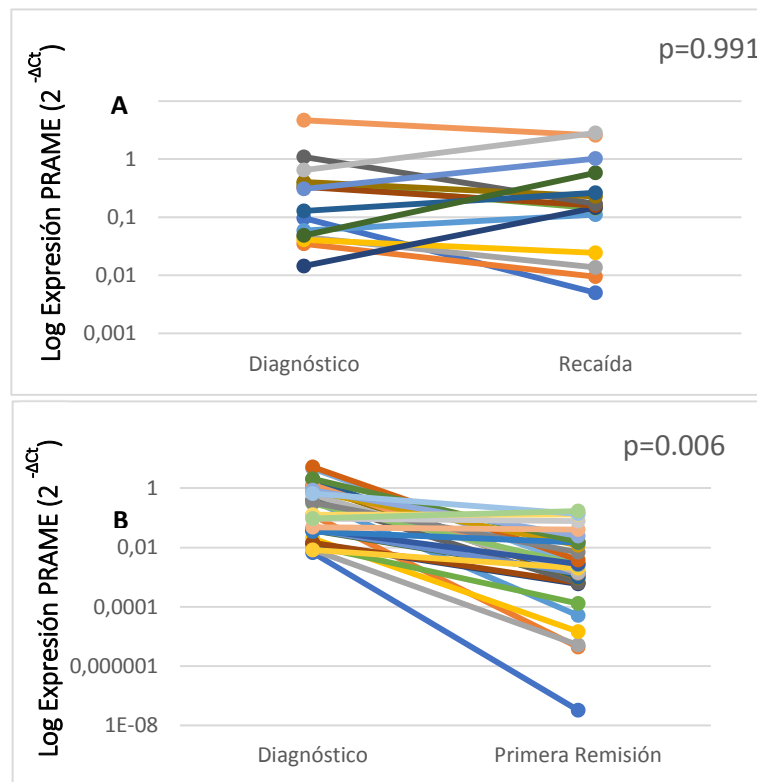


Figura 11. Pacientes con sobreexpresión de PRAME al diagnóstico. A) Niveles de expresión de PRAME al diagnóstico y en muestras de recaída. B) Comparación de la expresión de PRAME al diagnóstico y en muestras en remisión morfológica. Los p-valores se obtuvieron a partir de *test T-Student* para comparación de medias para muestras relacionadas.

Los tres genes estudiados mostraron valores de expresión en la recaída muy similares a los del diagnóstico, lo que demostró su estabilidad como marcador de EMR. Como ejemplo, se muestra el caso de PRAME en la figura 11.

Para WT1 la media de expresión fue de 34.46% ± 30.31% al diagnóstico y 26.48 ± 31.02 en muestras de recaída (p=0.207). Todas las recaídas en las que se cuantificó WT1 (n=35) presentaron niveles de expresión por encima del límite fijado para muestras en RC (umbral: 0.210%) y el 80% (28/35) de ellas se encontraban por encima del límite para muestras tumorales (umbral: 5%). En los 7 pacientes cuyos niveles eran inferiores a dicho umbral, el número de blastos osciló entre 1.8% y 20%. Uno de ellos, fue también NPM1 negativo (0 copias), lo que sugiere que se trataba de un clon distinto al del diagnóstico. De los 7, 3 pudieron estudiarse además en muestras previas

a la recaída, detectándose recaída molecular ($>0.21\%$ WT1) en 2 de los casos con una antelación de 37 y 87 días, como se detallará en el siguiente apartado. En el caso de PRAME, como se muestra en la Figura 11, tampoco se observaron diferencias significativas entre el diagnóstico (media: 0.556 ± 1.182) y la recaída (media: 0.553 ± 0.914) ($p=0.991$), superando en todos los casos el umbral fijado para muestras tumorales. BAALC se expresó a un nivel medio de 2.33 ± 2.34 al diagnóstico y 2.72 ± 3.87 en la recaída, sin diferencias entre ambos momentos ($p=0.673$). Los niveles de expresión de BAALC en la recaída superaron el umbral fijado para muestras en RC (umbral: 0.04) en todos los casos estudiados ($n=19$), y en el 73.7% (14/19) por encima del punto de corte fijado para muestras tumorales (umbral: 0.4). En los 5 casos cuyos niveles eran inferiores a dicho umbral, el número de blastos osciló entre 4.6% y 15%. En 3 de los 5 casos que no superaron el umbral tumoral de BAALC, se confirmó la positividad de BAALC en muestras en RC anteriores a la recaída con una antelación de 30, 74 y 183 días a pesar de sus bajos niveles de expresión en el momento de la recaída hematológica.

Sólo el 56.9% (33/58) de los pacientes que recayeron contaban con un marcador clásico de seguimiento de EMR en LMA: 23 tenían NPM1 mutada, 5 CBFβ-MYH11, 2 RUNX1-RUNX1T1 y 3 BCR-ABL1 minor. De ellos, se estudiaron muestras del momento de la recaída en 16 casos NPM1 mut, 4 CBFβ-MYH11, 2 RUNX1-RUNX1T1 y 2 BCR-ABL1 minor. En todos los casos estudiados, los marcadores NPM1mut o transcrito de fusión correspondiente fueron positivos en la recaída (valores mayores de cero), excepto un paciente que, a pesar de presentar NPM1 positiva al diagnóstico, fue negativo en la recaída (0 copias).

4.6 Muestras previas a la recaída: predicción de recaídas.

Para definir la capacidad de predicción de los distintos marcadores, se analizó su expresión en muestras de 34 pacientes previas a la recaída hematológica.

Al diagnóstico, 17 de los 34 (50%) pacientes estudiados fueron positivos para alguno de los marcadores clásicos de seguimiento (11 NPM1mut, 3 CBFβ-MYH11, 2 RUNX1-RUNX1T1 y 1 BCR-ABL1 minor). Todos ellos ($n=34$) presentaron sobreexpresión al diagnóstico de al menos uno de los tres marcadores de estudio (WT1, PRAME y/o BAALC). Llama la atención que todos los pacientes con NPM1 mutada al diagnóstico fueron negativos para BAALC. (Tabla 4).

En los 11 pacientes con **NPM1 mutada** como marcador, se estudiaron muestras entre 13 y 140 días previas a la recaída, siendo todas ellas positivas, con una mediana de expresión de 109.6 copias de NPM1 mutada (2.9-22063.8). En los pacientes NPM1 positivos que no sufrieron recaída ($n=26$), se observaron valores positivos en 21 casos (80%), con una mediana de 11.05 copias (0.3 -13444 NCN).

De los 3 pacientes con **CBFB-MYH11** al diagnóstico, dos fueron positivos en las muestras previas a la recaída (26 y 60 días), y el tercero fue negativo en la única muestra de que disponíamos 224 días (7 meses) antes de la recaída. Sin embargo, a pesar de ser un largo período de tiempo, sí que pudo detectarse sobreexpresión de BAALC en la misma muestra pre-recaída.

En los 2 pacientes con **RUNX1-RUNX1T1** como marcador se detectó la recaída de forma precoz, con un tiempo de antelación de 55 y 85 días. Lo mismo ocurrió con el caso **BCR-ABL1**, positivo 183 días antes de la recaída (Tabla 4).

En cuanto al gen **WT1**, se analizaron muestras previas a la recaída, en 28 pacientes, resultando 17 de ellos positivos (tasa de predicción de recaídas: 60.7%). Estos pacientes recayeron entre 8 y 183 días después de la detección molecular de la recaída. Por el contrario, 11 casos no sobreexpresaron el gen WT1 en la muestra pre-recaída pero recayeron entre los 18 y 224 días posteriores. Se tenían datos de citometría en 6 de estos 11 pacientes, todos ellos también negativos. Estos casos presentaron % de blastos en la recaída entre 1.8% y 62%. De estos 11 casos, 4 tenían además el marcador clásico NPM1mut, que predijo la recaída en todos los pacientes, y 2 casos presentaban el transcrito de fusión CBFB-MYH11, que ya han sido comentados anteriormente. De los 5 pacientes restantes en los que WT1 no predijo la recaída, 4 tenían también el marcador de estudio BAALC, que predijo 3 de las 4 recaídas, una de ellas detectada también con PRAME. Con respecto a los pacientes que no sufrieron recaída (n=43), se observaron valores positivos de WT1 en 12 casos (27.9%), aunque en ninguno de ellos se superó el umbral de expresión **RQ WT1>1%**.

La sobreexpresión de **PRAME** permitió detectar un 76.9% (10/13) de las recaídas con una antelación que osciló entre 17 y 198 días. Los 3 casos en los que PRAME no alcanzó niveles positivos en muestras previas a la recaída, recayeron entre 29 y 62 días después. Una de las recaídas no detectadas con PRAME (LMA6), fue positiva para NPM1mut, aunque con un número de copias reducido (2.9 copias), otra recaída fue positiva para WT1 (LMA21), y la tercera no pudo ser detectada por ninguno de los marcadores estudiados (LMA23). Con respecto a los pacientes que no sufrieron recaída (n=30) y tenían PRAME como marcador, se observaron valores positivos en 18 casos pre-recaída (60%), aunque en ninguno de ellos se superó el umbral de expresión de **PRAME >0.025**.

La tasa de predicción de recaídas mediante la sobreexpresión del gen **BAALC** fue del 81.3% (13/16), con una mediana de expresión de 0.079 (0.002-1.750), y una antelación entre 28 y 224 días. Sólo 3 casos fueron BAALC negativos en muestras anteriores a la recaída (antelación: 85-90 días), el caso LMA5, que tenía también PRAME y RUNX1-RUNX1T1 como marcadores, siendo ambos positivos previo a la recaída, el caso LMA18, que sí se detectó con PRAME, pero no con WT1, y un tercer caso, LMA32, que no presentó ningún otro marcador de estudio. Con

respecto a los pacientes que no sufrieron recaída (n=22) y tenían BAALC como marcador, se observaron valores positivos en 14 casos pre-recaída (63%), aunque en ninguno de ellos se superó el umbral de expresión de **BAALC >0.6**.

Tabla 4. Treinta y cuatro pacientes con LMA en los que se estudiaron muestras anteriores a la recaída hematológica. Se muestran los marcadores que presentaba cada paciente al diagnóstico y el estado (positivo/negativo) de cada marcador en las muestras pre-recaída.

ID paciente	Marcador EMR al diagnóstico				Marcador EMR en muestra pre-recaída				Antelación (días)
	Marcador estándar (NPM1mut o fusión)	WT1 Expresión alta	PRAME Expresión alta	BAALC Expresión alta	Marcador estándar (NPM1mut o fusión)	WT1 Expresión alta	PRAME Expresión alta	BAALC Expresión alta	
LMA1	CBFβ-MYH11 +	WT1+	PRAME-	BAALC+	CBFβ-MYH11 -	WT1-	-	BAALC +	224
LMA2	CBFβ-MYH11 +	WT1+	PRAME-	BAALC+	CBFβ-MYH11 +	WT1-	-	BAALC +	26
LMA3	CBFβ-MYH11 +	WT1+	PRAME-	BAALC-	CBFβ-MYH11 +	WT1+	-	-	60
LMA4	RUNX1-RUNX1T1 +	WT1+	PRAME+	BAALC+	RUNX1-RUNX1T1 +	WT1+	PRAME+	BAALC +	55
LMA5	RUNX1-RUNX1T1 +	WT1-	PRAME+	BAALC+	RUNX1-RUNX1T1 +	-	PRAME+	BAALC -	85
LMA6	NPM1mut +	WT1+	PRAME+	BAALC-	NPM1mut +	WT1-	PRAME -	-	62
LMA7	NPM1mut +	WT1+	PRAME+	BAALC-	NPM1mut +	WT1+	PRAME+	-	86
LMA8	NPM1mut +	WT1+	PRAME+	BAALC-	NPM1mut +	WT1+	PRAME+	-	107
LMA9	NPM1mut +	WT1+	PRAME-	BAALC-	NPM1mut +	WT1+	-	-	140
LMA10	NPM1mut +	WT1+	PRAME-	BAALC-	NPM1mut +	WT1+	-	-	61
LMA11	NPM1mut +	WT1+	PRAME-	BAALC-	NPM1mut +	WT1-	-	-	18
LMA12	NPM1mut +	WT1+	PRAME-	BAALC-	NPM1mut +	WT1+	-	-	13
LMA13*	NPM1mut +	WT1+	PRAME-	BAALC-	NPM1mut +	WT1-	-	-	140
LMA14	NPM1mut +	WT1+	PRAME-	BAALC-	NPM1mut +	WT1+	-	-	111
LMA15*	NPM1mut +	WT1+	PRAME-	BAALC-	NPM1mut +	WT1-	-	-	28
LMA16	NPM1mut +	WT1-	PRAME+	BAALC-	NPM1mut +	-	PRAME+	-	49
LMA17	BCR-ABLm +	WT1+	PRAME-	BAALC+	BCR-ABLm +	WT1+	-	BAALC +	183
LMA18*	Sin marcador	WT1+	PRAME+	BAALC+	-	WT1-	PRAME+	BAALC -	85
LMA19	Sin marcador	WT1+	PRAME+	BAALC+	-	WT1+	PRAME+	BAALC +	19
LMA20	Sin marcador	WT1+	PRAME+	BAALC+	-	WT1+	PRAME+	BAALC +	105
LMA21	Sin marcador	WT1+	PRAME+	BAALC-	-	WT1+	PRAME -	-	37
LMA22	Sin marcador	WT1+	PRAME+	BAALC-	-	WT1+	PRAME+	-	17
LMA23*	Sin marcador	WT1+	PRAME+	BAALC-	-	WT1-	PRAME -	-	29
LMA24*	Sin marcador	WT1+	PRAME-	BAALC+	-	WT1-	-	BAALC +	79
LMA25	Sin marcador	WT1+	PRAME-	BAALC+	-	WT1-	-	BAALC +	112
LMA26	Sin marcador	WT1+	PRAME-	BAALC+	-	WT1+	-	BAALC +	74
LMA27*	Sin marcador	WT1+	PRAME-	BAALC+	-	WT1-	-	BAALC +	75
LMA28	Sin marcador	WT1+	PRAME-	BAALC+	-	WT1+	-	BAALC +	11
LMA29	Sin marcador	WT1+	PRAME-	BAALC-	-	WT1+	-	-	36
LMA30	Sin marcador	WT1+	PRAME-	BAALC-	-	WT1+	-	-	8
LMA31	Sin marcador	WT1-	PRAME+	BAALC-	-	-	PRAME+	-	198
LMA32	Sin marcador	WT1-	PRAME-	BAALC+	-	-	-	BAALC -	90
LMA33	Sin marcador	WT1-	PRAME-	BAALC+	-	-	-	BAALC +	29
LMA34	Sin marcador	WT1-	PRAME-	BAALC+	-	-	-	BAALC +	28

*Los pacientes LMA13, LMA15, LMA18, LMA23, LMA24 y LMA27 no presentaron blastos por citometría en las muestras pre-recaída estudiadas.

4.7 Evolución de los niveles de WT1, PRAME y BAALC a lo largo de la enfermedad

Para estudiar cómo variaban los niveles de expresión de los genes WT1, PRAME y BAALC durante la enfermedad en los pacientes que sufrieron recaída, se compararon con los niveles de los marcadores estándar, NPM1 mutada y los transcritos de fusión, como puede observarse en los 7 casos representados en la Figura 9.

En cuanto a los cambios en la expresión de WT1 comparando con la NPM1, en el paciente LMA8 se puede ver como la expresión evolucionó de forma paralela, aumentando y superando el umbral antes de la recaída hematológica. Sin embargo, en 4 de los 10 casos que coexpresaban NPM1 y WT1 (LMA6, LMA11, LMA13 y LMA15) (Tabla 4), solamente la NPM1 mutada fue capaz de predecir la recaída con suficiente antelación, como puede observarse en la gráfica que corresponde al paciente LMA11 (Figura 9). Cuando se comparó la expresión de WT1 con la de RUNX1-RUNX1T1, se comprobó que evolucionaron de forma paralela, como en el paciente LMA4.

Del mismo modo, la evolución de la expresión de PRAME fue paralela a la de NPM1 mutada (LMA8), apreciándose un descenso más pronunciado tras el tratamiento de consolidación, momento en el cual PRAME fue negativo mientras que NPM1mut se mantuvo positiva. PRAME evolucionó también de forma equiparable a RUNX1-RUNX1T1 (LMA4 y LMA5).

Con respecto a la expresión de BAALC no pudo compararse con la de NPM1mut, ya que ninguno de los pacientes que recayó presentaba simultáneamente ambos marcadores. Sí fue posible compararlo con los niveles de RUNX1-RUNX1T1, observándose una evolución equivalente (pacientes LMA4 y LMA5).

Comparando las fluctuaciones en la expresión de los 3 marcadores entre sí, se observó una evolución paralela en líneas generales. No obstante, en el caso representado en la gráfica (LMA18) se muestra cómo sólo PRAME alcanzaba valores positivos (0.006) en la muestra más cercana previa a la recaída, a diferencia de WT1 (0.06) y BAALC (0.01). Por último, cabe destacar los dos casos LMA24 y LMA25, en los que la sobreexpresión de BAALC fue capaz de predecir la recaída con una antelación de 79 y 112 días respectivamente, mientras que los niveles de WT1 permanecieron negativos y evolucionaron de forma más lenta hasta el momento de la recaída, alcanzando valores de expresión de 113% y 8.3%.

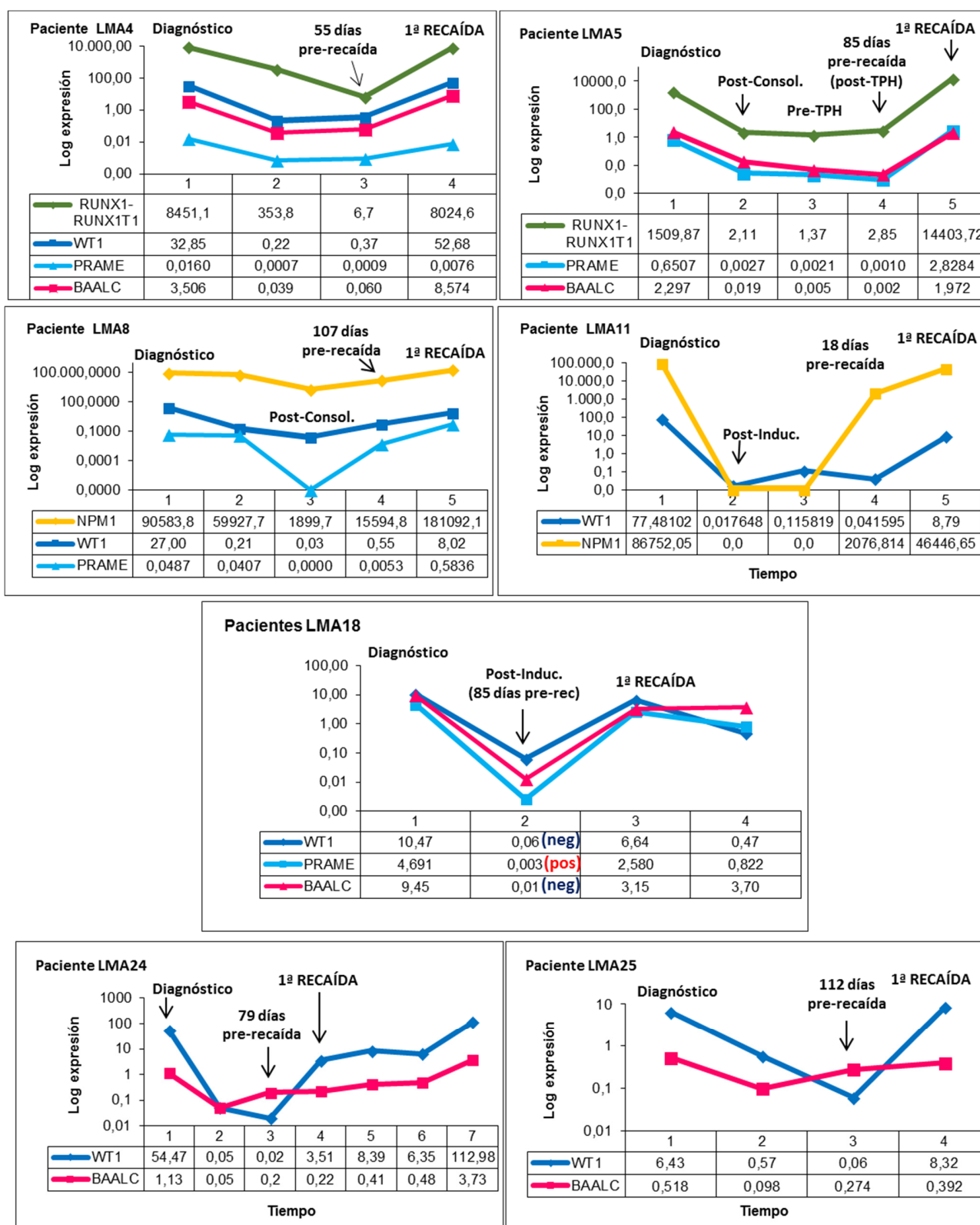


Figura 12. Análisis en paralelo de los niveles de WT1, PRAME, BAALC y otros marcadores de EMR en 7 pacientes con LMA que recayeron a lo largo de la enfermedad. Los valores de expresión se muestran en escala logarítmica.

Tabla 5. Tabla resumen de resultados: validez de la sobreexpresión de *WT1*, *PRAME* y *BAALC* como marcadores de EMR. *pos: positivo= sobreexpresión ; neg: negativo=no sobreexpresión (umbrales: Tabla2)

Marcador	% Aplicabilidad	Cuantificación	Valor pronóstico de la sobreexpresión: Influencia en la SLR (5 años)					Predicción recaídas (%)	Estabilidad en la recaída
			Diagnóstico pos vs.neg*	Post-Inducción pos vs.neg*	Post-Consolidación pos vs.neg*	Pre-TPH pos vs.neg*	Post-TPH pos vs.neg*		
<i>WT1</i>	75	Absoluta	no valor	23% vs. 54% (p=0.007)	no valor	no valor	día +100: 14% vs. 85% (p<0.0001) día +1 año: 50% vs. 87% (p=0.005)	61% >1% siempre recaída	sí 100% casos >0.21%
<i>PRAME</i>	43	Relativa	no valor	30% vs. 69% (p=0.023)	no valor	49% vs. 91% (p=0.022)	NR	77% >0.025 siempre recaída	sí 100% casos >0.0006
<i>BAALC</i>	42	Relativa	15% vs. 54% (p=0.006)	31% vs. 100% (p=0.020)	no valor	no valor	no valor	81% >0.6 siempre recaída	sí 100% casos >0.04

DISCUSIÓN:

A pesar de que la detección de enfermedad mínima residual (EMR) ha ido adquiriendo una importancia trascendental en la monitorización de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA), cerca del 40% carecen de un marcador molecular útil para el seguimiento. Este hecho refleja la necesidad de investigar sobre nuevos marcadores que permitan el estudio evolutivo de un porcentaje superior de casos (5,7). La sobreexpresión de genes constituye una prometedora diana potencialmente aplicable a un elevado número de pacientes, sin embargo, solamente el gen del tumor de Wilms (*WT1*) ha sido estudiado y validado en amplias series de pacientes (15,17,18), aunque presenta algunas limitaciones ya que no se sobreexpresa en un 10-20% de los casos y no es exclusivo de las células leucémicas. Por este motivo, hemos querido profundizar en la búsqueda de nuevos marcadores de EMR que permitan la monitorización de un mayor número de pacientes para identificar aquellos con alto riesgo de recaída, y por tanto subsidiarios de una terapia preventiva.

En el presente trabajo de tesis doctoral, hemos analizado los niveles de expresión del gen *WT1* además de otros dos genes, *PRAME* y *BAALC*, propuestos por algunos grupos, pero de los que prácticamente no se tiene información, en distintos momentos de la enfermedad (diagnóstico y post-tratamiento).

Dado que *WT1*, *PRAME* y *BAALC* se expresan en células sanas, el primer paso para trasladar su estudio a la clínica requiere establecer unos valores umbrales sobre los que considerar sobreexpresión, que permitan distinguir de los niveles basales normales. Son varios los métodos que se han propuesto hasta la fecha para definir estos umbrales, lo que aún continúa siendo todo un reto y una de las principales limitaciones de este tipo de dianas moleculares. Con el objetivo de decidir unos umbrales seguros, en este trabajo cuantificamos la expresión de los genes de estudio en muestras de médula ósea (MO) y de sangre periférica (SP) de donantes sanos (14 MO y 10 SP), confirmándose la baja expresión de los tres genes en células normales. Como ocurre con otras dianas moleculares de EMR, una de las principales cuestiones es el empleo de SP o de MO. Coincidiendo con lo descrito en trabajos previos (15,20,26), la expresión de *WT1* en SP de donantes sanos fue significativamente más baja que en MO, a diferencia de lo que ocurrió en el caso de *PRAME* y *BAALC*, donde no hubo distinción entre ambos tipos de muestras. Por este motivo, para definir sobreexpresión del gen *WT1* se fijaron dos umbrales distintos, uno en SP y otro en MO, y para los genes *PRAME* y *BAALC* se fijó un único umbral, independientemente del tipo de muestra. Debido a la mayor expresión basal de *WT1* en MO, Cilloni et al. (15) propusieron el estudio de este marcador preferentemente en SP. Sin embargo, aunque en nuestro trabajo se confirman estas diferencias entre donantes de SP y MO, en las muestras tumorales al diagnóstico de los pacientes, los niveles de expresión en SP y MO fueron completamente comparables. Por ello, en nuestro

estudio se emplearon indistintamente muestras de SP o MO, aplicándose en cada caso el umbral específico, lo que permitió eliminar las restricciones en cuanto al tipo de muestra.

El valor pronóstico de la expresión de *WT1* al diagnóstico es una cuestión sobre la que aún no existe consenso. Mientras que algunos autores afirman que los pacientes con altos niveles de expresión presentan un mayor riesgo de recaída o supervivencias más cortas (17,27), otros no encuentran ninguna relación entre la sobreexpresión de *WT1* antes del tratamiento y el pronóstico de los pacientes (15,28). En este trabajo se observó que la expresión por encima del 5% de ratio *WT1*/GUS no permitía diferenciar dos grupos de pacientes con distinto pronóstico. Por el contrario, y de acuerdo con los datos propuestos por otros grupos (29), la expresión de *WT1* por encima de un umbral mayor, en nuestro caso 10%, sí parecía influir en la SLR de los pacientes de forma negativa. Estos datos sugieren que el origen de la controversia podría residir en la diferencia de umbrales establecidos por los distintos grupos, lo que señala una vez más la necesidad de un trabajo de estandarización para fijar los puntos de corte de forma fiable.

Al contrario del controvertido papel de *WT1* al diagnóstico, hasta la fecha todos los trabajos publicados han confirmado el valor pronóstico de este gen en la reevaluación de la enfermedad tras el tratamiento con quimioterapia o tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (18). La conclusión común es que los niveles elevados de *WT1* en LMA en remisión son capaces de predecir un mayor riesgo de recaída o supervivencia libre de recaída (SLR) más cortas, resultados que se confirman también en nuestra serie. Uno de los primeros trabajos sobre la utilidad de *WT1* como marcador de EMR, fue el de Cilloni et al. (30), donde el estudio de 10 casos de LMA-CBF permitió definir un paralelismo entre la evolución de *WT1* y los transcritos de fusión leucémicos (CBFB-MYH11 y RUNX1-RUNX1T1), resultados similares a los hallados por Weisser et al., (31) y que han sido de nuevo confirmados en nuestro trabajo (Figura 12, Paciente LMA4). Posteriormente, el grupo ELN (European LeukemiaNet (ELN) (15) realizó un estudio comparativo para estandarizar el ensayo de RQ-PCR óptimo para la cuantificación de *WT1*, que ha sido el empleado en este trabajo. Hemos observado que la reducción de los niveles de *WT1* entre el diagnóstico y tras el tratamiento de inducción es un importante factor pronóstico, ya que los pacientes con alta expresión después del primer ciclo de quimioterapia presentaron una SLR más corta, tanto en la serie global como en el grupo de cariotipo normal, en concordancia con otros estudios (15). En cuanto al valor pronóstico de la sobreexpresión de *WT1* tras el tratamiento de consolidación, aunque algunos grupos sí han encontrado asociación con pronóstico desfavorable (32,33), nosotros no hemos confirmado este resultado, al igual que el estudio de Rossi et al (34), en el que comparan la cuantificación de la expresión de *WT1* con la citometría de flujo (CMF) para el estudio de EMR. Demostraron que, a pesar de que *WT1* permitió identificar recaídas con mayor precisión que la CMF tras el tratamiento de inducción, en las muestras de reevaluación de la consolidación la CMF tendría mayor valor predictivo que *WT1*, lo que concuerda con nuestros datos sobre la pérdida de valor de *WT1* en la post-consolidación. Estas observaciones sugieren la existencia de dianas óptimas (*WT1* vs. CMF) para cada uno de los momentos post-

tratamiento a lo largo de la enfermedad, lo cual podría deberse a las diferencias de sensibilidad entre técnicas y dianas.

Respecto al impacto de los niveles de *WT1* en el momento previo al trasplante, muy pocos trabajos han demostrado su utilidad. Zhao et al. observaron tasas más altas de recaída en caso de *WT1* positivo en el pre-TPH, aunque sin excluir a los pacientes que recibieron el TPH habiendo sufrido ya una recaída (segunda remisión completa-RC o progresión) (35). Resultados similares obtuvo el grupo de Pozzi, aunque en una serie más pequeña (16). En cambio, nuestros datos contradicen a estos trabajos, ya que nuestro análisis realizado en 40 pacientes trasplantados en primera RC, demuestran que la cuantificación de *WT1* antes del trasplante, no tiene valor pronóstico. En la línea de nuestros resultados, se encuentra el trabajo de Rossi et al, en el que observaron que la CMF resultaba más informativa en el momento pre-TPH, mientras que la cuantificación de *WT1* era de mayor utilidad en momentos post-TPH (36). Los estudios de *WT1* en pacientes trasplantados son menos numerosos. El primero fue el de Ogawa et al. (37) sobre el impacto de la expresión de *WT1* tras el TPH en 20 pacientes con leucemia (LMA, LLA, LMC), concluyendo que *WT1* era un marcador de gran utilidad en la predicción y manejo de la recaída post-TPH, a pesar de la heterogeneidad tanto de los pacientes como de los momentos post-TPH en los que se reevaluó la enfermedad en cada caso. Posteriormente, otros grupos han confirmado estos resultados (Zhao et al.) (35), Pozzi et al. En nuestra experiencia, la sobreexpresión de *WT1* fue un excelente predictor de la recaída en el día +100 después del TPH.

En cuanto a la experiencia sobre el empleo de otros genes en la detección de EMR, los trabajos publicados son muy escasos. Por ejemplo, en el caso del gen *PRAME*, existen datos contradictorios sobre el punto de corte para definir sobreexpresión, ya que estudios previos han afirmado que la expresión de *PRAME* en MO y SP es nula (38–40). Sin embargo, en el trabajo de Tajeddine et al, analizado la expresión de *PRAME* en un mayor número de muestras no tumorales de MO y SP, demostraron que existe una expresión basal y que, realizando una correcta normalización, *PRAME* podría ser un marcador fiable para seguimiento de EMR en aquellos pacientes que carecen de otro marcador específico.

En relación con la implicación clínica de *PRAME*, el trabajo de Greiner et al. en LMA adultas observó cierta relación entre la sobreexpresión de este marcador al diagnóstico y un mejor pronóstico (41). Sin embargo, al igual que en nuestro caso, a pesar de observarse una tendencia favorable, este trabajo no ha podido establecer diferencias significativas en LMA adultas. De forma destacable, la sobreexpresión de *PRAME* parece jugar un papel más importante al diagnóstico en el caso de las LMA pediátricas (21), y en las leucemias promielocíticas agudas (LPA) adultas (42). Estudios funcionales *in vitro* e *in vivo* han concluido que *PRAME* participa en la inducción de la apoptosis e inhibe la proliferación de las células leucémicas (20,43), lo que podría explicar el buen pronóstico que aporta este marcador. En el subgrupo de LPA, la sobreexpresión de *PRAME* ha demostrado tener una influencia especialmente favorable, ya que modula la vía de señalización del ácido

retinoico, aumentando la sensibilidad al tratamiento con ácido todo-trans retinoico (ATRA) (44). Estos datos sobre el papel de *PRAME* al diagnóstico sugieren que este gen constituye una posible diana en LMA para tratamientos basados en inmunoterapia (38,43).

Los escasos trabajos sobre la utilidad de *PRAME* como marcador de EMR, se han realizado en casos individuales o series de pacientes muy reducidas. Debido a ello, el valor pronóstico de los niveles del transcrito *PRAME* en MO o SP tras la quimioterapia de inducción y en muestras previas y posteriores al TPH, no ha sido evaluado. En nuestra serie, no pudieron analizarse los momentos post-TPH debido a la tasa de recaída post-TPH extremadamente baja de los pacientes que tenían *PRAME* como marcador. Sin embargo, sí se obtuvieron resultados significativos al analizar muestras posteriores al tratamiento de inducción y en el momento pre-TPH, demostrándose SLR más cortas en caso de sobreexpresión. Respecto al valor de *PRAME* en la predicción de recaídas, los trabajos de Paydas (38) y Tajeddine (20) propusieron la utilidad de *PRAME* como marcador de EMR, aunque estos resultados se limitaron al estudio de solo 7 y 13 muestras en RC respectivamente. Ambos estudios concluyen que la expresión de *PRAME* disminuye en RC y aumenta en caso de recaída, sin poder sacar más conclusiones. Posteriormente, Qing et al. (45), analizaron simultáneamente *WT1* y *PRAME* en muestras de seguimiento de 21 pacientes, y observaron que todos los casos que alcanzaban positividad de alguno de los marcadores acababan recayendo. En el estudio de Ding et al. (22), monitorizaron la EMR en 9 muestras en RC de LMA adultas posteriores a la quimioterapia, y vieron cómo *PRAME* fue capaz de detectar una recaída con 5 meses de antelación. Nuestros resultados en cuanto a la predicción de recaídas apoyan estos hallazgos, con una tasa de predicción del 76.9% (10/13 recaídas). Al igual que en nuestro caso (Figura 12. Pacientes LMA4 y LMA5), los estudios de Qing et al. y Tajeddine et al. demostraron una alta correlación de los niveles de *PRAME* con el marcador tumoral *RUNX1-RUNX1T1*. En el presente estudio confirmamos la estabilidad de la sobreexpresión de *PRAME* en la recaída en muestras pareadas diagnóstico-recaída de 19 pacientes, la mayor serie descrita hasta ahora (Figura 11).

En cuanto a empleo del gen *BAALC* como marcador de seguimiento, ningún estudio ha analizado su expresión en donantes de MO para demostrar una expresión basal y establecer el punto de corte. Algunos han fijado el umbral sin tener en cuenta los valores de expresión en donantes, apoyándose únicamente en la expresión relativa de *BAALC* dentro de la serie pacientes analizados (26,46,47). Otros han empleado como umbral un valor estimado mediante aproximaciones matemáticas (48). En nuestro estudio, hemos analizado *BAALC* en una serie de donantes tanto de SP como de MO, pudiendo establecer de forma más fiable los umbrales de expresión. Nuestros resultados en cuanto al valor pronóstico desfavorable de la expresión alta de *BAALC* al diagnóstico, ya habían sido descritos en estudios previos (23,49). La mayoría de ellos han observado diferencias en cuanto a SG y en el caso de Yoon et al., también en cuanto a SLR. Nuestros datos muestran tanto SLR como SG más cortas en el grupo de pacientes con LMA de cariotipo intermedio que presentaron expresión elevada de *BAALC*.

Mientras que el impacto pronóstico de la sobreexpresión de *BAALC* al diagnóstico ha sido más estudiado (50,51), pocos trabajos y con números de pacientes reducidos han evaluado los niveles de expresión durante el curso de la enfermedad (26,46–48). Weber et al. analizaron la influencia de *BAALC* tras el tratamiento de inducción en LMA con cariotipo normal (LMA-CN), demostrando peor pronóstico en caso de sobreexpresión. Por el contrario, Yoon et al. no encontraron ningún impacto pronóstico al analizar *BAALC* en este momento. En este contexto, es importante señalar que, en nuestra serie, los valores de expresión de *BAALC* en muestras en RC post-inducción oscilaban en un rango muy estrecho, sugiriendo que no son informativos por sí solos en series de LMA que incluyen más cariotipos, como la nuestra. Por ello, decidimos estudiar la reducción con respecto al diagnóstico, demostrando SLR más cortas en los pacientes que reducían los niveles de expresión de *BAALC* menos de cien veces con respecto al diagnóstico.

En cuanto al estudio de *BAALC* antes del TPH, un reciente trabajo (26) contrario al de Yoon et al. (47) y a nuestros resultados, propone que los niveles altos de *BAALC* en muestras pre-TPH aumentan el riesgo de sufrir una recaída post-TPH. Un aspecto destacable sobre el diseño del trabajo de Jentsch et al, es que *BAALC* no fue estudiado al diagnóstico, sino que su expresión fue analizada directamente en el momento pre-TPH, sin tener en cuenta si el clon leucémico de un paciente presentaba sobreexpresión de *BAALC* o no. Los autores de este estudio concluyen que, en caso de *BAALC* positivo previo al TPH, los pacientes presentan un peor pronóstico independientemente de su expresión al diagnóstico. Sin embargo, cuando en un análisis posterior eliminaron los pacientes sin sobreexpresión al diagnóstico, estos resultados perdieron significación estadística. Apoyándonos en nuestros resultados y en el trabajo de Weber et al. (46), donde analizan la evolución de *BAALC* en pacientes positivos y negativos al diagnóstico, consideramos que es importante estudiar la expresión de *BAALC* en muestras de seguimiento sólo en caso de que un paciente haya sobreexpresado el gen en el momento del diagnóstico. De otro modo, un resultado negativo de *BAALC* en muestras pre-TPH, podría significar que, simplemente, el clon tumoral del paciente analizado carece del marcador *BAALC*, como ocurre en el caso de otros marcadores de EMR.

Pocos trabajos han evaluado el papel de *BAALC* en pacientes trasplantados, por ejemplo, Yoon et al., encontraron SG y SLR significativamente más cortas en pacientes con expresión alta de *BAALC* el día +60 post-TPH, pero no vieron diferencias al estudiar el momento pre-TPH. En contraste, en nuestro estudio observamos un resultado destacable en cuanto a la expresión de *BAALC* post-TPH. En los momentos posteriores más cercanos a la infusión de progenitores hematopoyéticos, días +21 y +56, se observó una tendencia contraria a lo esperado: los pacientes que presentaban expresión alta de *BAALC* en estos momentos, tenían SLR más largas ($p=0.04$ y $p=0.09$). Esta tendencia, cambiaba a partir del día +100, como puede apreciarse en la Figura 10, confirmando la importancia de la monitorización molecular en los momentos post-TPH. La explicación de este fenómeno podría estar relacionada con el posible papel de *BAALC* en la regeneración de la médula ósea. Según estudios previos, la expresión de *BAALC* en MO y SP sanas se limita a

las células progenitoras (CD34+) y esta expresión disminuye con la diferenciación. De hecho, *BAALC* ha sido incluso propuesto como marcador de célula progenitora común a la línea mieloide, linfoide y eritroide (24). En cualquier caso, de acuerdo con nuestros datos y aunque estos resultados se han obtenido a partir de un reducido número de pacientes, la expresión alta de *BAALC* en los momentos cercanos posteriores al TPH no constituye una diana de seguimiento de EMR valorable.

Por otro lado, aunque las mutaciones en *NPM1* no se recomiendan como diana para seguimiento de EMR en todas las guías actuales (52), su uso está bastante extendido entre los laboratorios de rutina, ya que supone una opción de seguimiento para muchos pacientes que, de otro modo, no contarían con ningún marcador. Las mutaciones en *NPM1* han sido muy estudiadas ya que resultan un marcador molecular atractivo por su alta prevalencia en los pacientes con LMA, especialmente en LMA-CN, y a su estabilidad en la recaída (25). Algunos estudios revelan que su evaluación tras el tratamiento de inducción y/o consolidación identifica pacientes con alto riesgo de recaída (8,53). En nuestro estudio, dado que la mayoría de las muestras analizadas fueron de MO, el porcentaje de pacientes que presentó positividad de *NPM1* en la post-consolidación fue mayor que el reportado por Ivey et al. (2016), donde estudiaron SP. La muestra de SP parece la más adecuada para la monitorización de EMR por RQ-PCR en LMA-*NPM1*, ya que si se usa MO, podría haber en muchos casos una PCR positiva a niveles bajos, sin que ello significara una posterior recaída. De hecho, no está claro el punto de corte para afirmar que una muestra de MO es positiva (se sugiere entre 150 y 200 copias, pero estos resultados no están validados (54). Sin embargo, la positividad en SP (es decir ≥ 1 copia *NPM1* en al menos 10000 copias del gen control) tras la consolidación o en el seguimiento, se relaciona con una probabilidad de recaída muy alta, según el estudio de Ivey et al. En nuestro trabajo, aunque no se centra en el estudio de este marcador, no se confirmó el valor pronóstico significativo de *NPM1* en ninguno de los momentos postratamiento, pero sí se observó siempre una tendencia a una peor SLR en caso de positividad, que probablemente alcanzaría significación estadística al aumentar el número de pacientes analizados y en caso de analizar únicamente muestras de SP.

El estudio de predicción de recaídas presentado en este trabajo ha permitido conocer la utilidad de los genes *WT1*, *PRAME* y *BAALC* tanto en pacientes que no contaban con otro marcador para seguimiento de EMR, como en pacientes con marcadores específicos tumorales (*NPM1* mutada o transcrito de fusión). En estos últimos casos, la presencia de *NPM1* mutada fue capaz de predecir recaída en todos los casos, y sólo un paciente con LMA-CBF, fue CBFb-MYH11 negativo y *WT1* y *BAALC* positivo en una muestra 7 meses previa a la recaída. Además, este estudio nos ha permitido fijar unos umbrales de expresión génica para muestras en RC por encima de los cuales los pacientes siempre recayeron (*WT1* >1%, *PRAME* >0.025 y *BAALC* >0.6). *NPM1* fue positivo en un alto número de muestras en RC de pacientes que no recaían posteriormente (21/26), lo que pone de manifiesto la necesidad de estudios futuros que establezcan unos umbrales fiables para esta diana.

La expresión alta de WT1 como predictor de la recaída hematológica continúa siendo un aspecto controvertido sobre el que aún no existe consenso. Algunos autores han defendido su utilidad en este sentido (55), mientras que otros la han desmentido (56). Nuestros datos demuestran que la utilidad de WT1 en la predicción de recaídas, si bien es posible en un importante porcentaje de casos (60.7%), no puede decirse que constituya un marcador universal de EMR, dado que la recaída no pudo anticiparse en 11 pacientes. La gran mayoría de éstos (10/11), sí fueron positivos para los marcadores estándar NPM1 o CBFb-MYH11, e incluso para los marcadores en estudio PRAME o BAALC. En general, según nuestros datos, los transcritos PRAME y BAALC presentan tasas más altas de predicción de recaídas que WT1. Otros trabajos han aportado datos similares sobre WT1 (22,45,57). De hecho, Qing et al propusieron monitorizar la EMR con WT1 y PRAME simultáneamente para asegurar unos resultados más fiables, a pesar de los inconvenientes técnicos y económicos que pueda suponer.

Comparando la capacidad de predicción de los tres marcadores WT1, PRAME y BAALC, que fueron positivos en momento previos a la recaída en el 61%, 77% y 81% de los casos, respectivamente. Cabe destacar aquí, los 5 casos en los que WT1 no fue capaz de predecir una recaída hematológica que sí pudo ser determinada mediante BAALC (ejemplos: Figura 12, pacientes LMA1 y LMA2). De forma similar, PRAME aumentó su expresión en muestras previas a la recaída en dos casos que no consiguieron detectarse mediante la expresión de WT1 y/o BAALC (LMA5 y LMA18). Adicionalmente, cuando se estudió WT1 en muestras de recaída, se observaron siete casos cuyos niveles eran inferiores a lo esperado para un marcador de expresión estable. Entre ellos se encontraba el paciente cuya recaída si fue detectada tanto por CBFb-MYH11 como por BAALC, pero no por WT1 (LMA2). Aunque estas diferencias de expresión entre diagnóstico y recaída fueron moderadas, los cambios fueron menores en el caso de PRAME y BAALC, lo que apoyaría su valor como dianas tumorales potencialmente aplicables a la detección de recaídas en LMA. Estos datos, nos recuerdan la prioridad que supone una definición estandarizada de los umbrales de sobreexpresión de dianas moleculares, como las que se estudian aquí, cuyo valor es cuantitativo.

La expresión de WT1, PRAME y BAALC, resulta de especial interés en el caso de los pacientes que no tienen otro marcador para seguimiento de EMR. En este estudio, aunque de forma retrospectiva, hemos demostrado que la cuantificación de los niveles de WT1, PRAME y BAALC, además de los marcadores estándar (NPM1 mutado o transcrito de fusión), permitieron la detección precoz del 91.4% (31/34) de las recaídas analizadas con un rango de antelación de entre 8 y 224 días, siendo WT1 el marcador que permitía una menor tasa de predicción y BAALC el que predecía la recaída de una forma más precoz.

Además de la correcta definición de los umbrales, otro aspecto de gran relevancia en torno a la sobreexpresión de *WT1*, *PRAME* y *BAALC* es la influencia en su expresión de una médula ósea en proceso regenerativo. Esta regeneración ocurre impulsada por los progenitores hematopoyéticos sanos que son trasplantados al paciente

tras un tratamiento intensivo destinado a eliminar sus células tumorales. La expresión de WT1 en células sanas de MO y SP se limita a la población CD34+ (progenitores hematopoyéticos) a bajos niveles. Algunos autores defienden que esto podría conducir a niveles más elevados de WT1 en una médula ósea en regeneración, afectando a la sensibilidad (58). Sin embargo, son varios los trabajos que han desechado esta hipótesis, confirmando que su expresión en estas circunstancias sigue siendo baja (30,45). En cualquier caso, consideramos que este obstáculo podría salvarse definiendo un umbral lo suficientemente restrictivo, lo más alejado posible de los valores en MO sana, como el umbral seleccionado en el presente trabajo (media de expresión en donantes +3sd). En el caso de PRAME, también ha sido demostrado que los niveles en MO regenerativa continúan siendo lo suficientemente bajos (45). Por el contrario, sobre BAALC, cuya expresión en MO sana se restringe a la población CD34+, al igual que WT1, nuestros resultados apuntan a que los niveles post-TPH no pueden correlacionarse con los niveles de enfermedad. Son necesarios más estudios que confirmen los niveles de BAALC en MO regenerativa.

Como conclusión, hay que destacar la utilidad de este trabajo para su aplicación en la clínica, destacando la necesidad de una monitorización más estrecha de los pacientes con resultados positivos de *WT1*, *PRAME* o *BAALC* tras el tratamiento de inducción y la posibilidad de tomar decisiones terapéuticas de forma precoz. En segundo lugar, la evaluación del gen *PRAME* antes del TPH, podría guiar tratamientos preventivos, como regímenes de acondicionamiento más intensivos, que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes con altos niveles de expresión y mayor riesgo de recaída hematológica. Por último, un campo en el que se tiene más experiencia es la administración de infusión de linfocitos de donante en caso de positividad de *WT1* posterior al TPH alogénico (16,37). Pozzi et al observaron un mayor periodo entre la recaída molecular y la recaída hematológica en los pacientes a los que se les realizó esta intervención terapéutica. En este trabajo confirmamos el valor del estudio de *WT1* post-TPH, y además observamos que el momento más informativo para su determinación fue el día +100, por lo que la expresión *WT1* post-TPH podría ser un buen parámetro para seleccionar a los pacientes candidatos a este tipo de tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Freeman SD, Jovanovic J V, Grimwade D. Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 2008;35(4):388-400.
2. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 2016;127(1):29-42.
3. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(6):543-52.
4. Doubek M, Palasek I, Pospisil Z, Borsky M, Klabusay M, Brychtova Y, et al. Detection and treatment of molecular relapse in acute myeloid leukemia with RUNX1 (AML1), CBFβ, or MLL gene translocations: frequent quantitative monitoring of molecular markers in different compartments and correlation with WT1 gene expression. *Exp Hematol.* 2009;37(6):659-72.
5. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129:424-447.
6. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424-47.
7. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for «prime time»? *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* 2014;2014(1):222-33.
8. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic J V, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med.* 2016;374(5):422-33.
9. 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.
10. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506(7488):328-33.
11. Corces-Zimmerman MR, Hong W-J, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2548-53.
12. Warren M, Luthra R, Yin CC, Ravandi F, Cortes JE, Kantarjian HM, et al. Clinical impact of change of FLT3 mutation status in acute myeloid leukemia patients. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2012;25(10):1405-12.
13. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Kavelaars FG, Al Hinai ASA, Zeilemaker A, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Prospective Molecular MRD Detection By NGS: A Powerful Independent Predictor for Relapse and Survival in Adults with Newly Diagnosed AML. *Blood.* 2017;130:LBA-5
14. Ploen GG, Nederby L, Guldberg P, Hansen M, Ebbesen LH, Jensen UB, et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML. *Br J Haematol.* 2014;167(4):478-86.
15. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic J V., et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5195-201.
16. Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, Luchetti S, Grasso R, Colombo N, et al. Leukaemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: Predictive role of WT1 expression. *Br J Haematol.* 2013;160(4):503-9.
17. Nomdedeu JF, Hoyos M, Carricondo M, Bussaglia E, Estivill C, Esteve J, et al. Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leukemia.* 2013;27(11):2157-64.
18. Rossi G, Minervini MM, Carella AM, Melillo L, Cascavilla N. Wilms' Tumor Gene (WT1) Expression and Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. En: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. Brisbane (AU); 2016.
19. Bullinger L, Schlenk RF, Gotz M, Botzenhardt U, Hofmann S, Russ AC, et al. PRAME-induced inhibition of retinoic acid receptor signaling-mediated differentiation—a possible target for ATRA response in AML without t(15;17). *Clin Cancer Res.* 2013;19(9):2562-71.
20. Tajeddine N, Millard I, Gailly P, Gala JL. Real-time RT-PCR quantification of PRAME gene expression for monitoring minimal residual disease in acute myeloblastic leukaemia. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(5):548-55.
21. Steinbach D, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;138(1):89-91.
22. Ding K, Wang X-M, Fu R, Ruan E-B, Liu H, Shao Z-H. PRAME Gene Expression in Acute Leukemia and Its Clinical Significance. *Cancer Biol Med.* 2012;9(1):73-6.

23. Weber S, Alpermann T, Dicker F, Jeromin S, Nadarajah N, Eder C, et al. BAALC expression: a suitable marker for prognostic risk stratification and detection of residual disease in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e173.
24. Baldus CD, Tanner SM, Kusewitt DF, Liyanarachchi S, Choi C, Caligiuri MA, et al. BAALC, a novel marker of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003;31(11):1051-6.
25. Shayegi N, Kramer M, Bornhauser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*. 2013;122(1):83-92.
26. Jentzsch M, Bill M, Grimm J, Schulz J, Goldmann K, Beinicke S, et al. High BAALC copy numbers in peripheral blood prior to allogeneic transplantation predict early relapse in acute myeloid leukemia patients. *Oncotarget*. 2017;8(50):87944-54.
27. Galimberti S, Ghio F, Guerrini F, Ciabatti E, Grassi S, Ferreri MI, et al. WT1 expression levels at diagnosis could predict long-term time-to-progression in adult patients affected by acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes. *British journal of haematology*. 2010.149:451-4.
28. Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br J Haematol*. 2004;125(5):590-600.
29. SANZ EBJCPBSBGPFRCMJMSMA. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004;89:926-33.
30. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*. 2002;16(10):2115-21.
31. Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19(8):1416-23.
32. Martínez-Laperche C, Kwon M, Franco-Villegas AC, Chillón MC, Castro N, Anguita E, et al. Wilms Tumor 1 gene expression levels improve risk stratification in AML patients. Results of a multicentre study within the Spanish Group for Molecular Biology in Haematology. *Br J Haematol*. 2017;1-5.
33. Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Gottardi E, Fava M, et al. Early prediction of treatment outcome in acute myeloid leukemia by measurement of WT1 transcript levels in peripheral blood samples collected after chemotherapy. *Haematologica*. 2008;93(6):921-4.
34. Rossi G, Minervini MM, Melillo L, di Nardo F, de Waure C, Scalzulli PR, et al. Predictive role of minimal residual disease and log clearance in acute myeloid leukemia: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilm's tumor 1 levels. *Ann Hematol*. 2014;93(7):1149-57.
35. Zhao X-S, Jin S, Zhu H-H, Xu L-P, Liu D-H, Chen H, et al. Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(4):499-507.
36. Rossi G, Carella AM, Minervini MM, di Nardo F, Waure C, Greco MM, et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tu. *Leuk Res*. 2015;39(2):138-43.
37. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, Soma T, Kawakami M, Tsuboi A, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood*. 2003;101(5):1698-704.
38. Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, Disel U, Baslamisli F, Burgut R. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: Clinical importance and future prospects. *Am J Hematol*. 2005;79(4):257-61.
39. van Baren N, Chambost H, Ferrant A, Michaux L, Ikeda H, Millard I, et al. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1376-9.
40. Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O, Szmargowska A, Huebsch S, Maurer U, et al. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2000;28(12):1413-22.
41. Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A, et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood*. 2006;108(13):4109-17.
42. Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, et al. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2008;93(12):1797-805.
43. Xu Y, Yue Q, Wei H, Pan G. PRAME induces apoptosis and inhibits proliferation of leukemic cells in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):14549-55.
44. Redner RL. PRAMEing a picture of differentiation therapy for AML? *Clin Cancer Res*. 2013;19(9):2277-9.
45. Qin Y, Zhu H, Jiang B, Li J, Lu X, Li L, et al. Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease. *Leuk Res*. 2009;33(3):384-90.

46. Weber S, Haferlach T, Alpermann T, Haferlach C, Kern W. Feasibility of BAALC gene expression for detection of minimal residual disease and risk stratification in normal karyotype acute myeloid leukaemia. 2016;904-16.
47. Yoon JH, Kim HJ, Shin SH, Yahng SA, Lee SE, Cho BS, et al. BAALC and WT1 expressions from diagnosis to hematopoietic stem cell transplantation: Consecutive monitoring in adult patients with core-binding-factor-positive AML. *Eur J Haematol.* 2013;91(2):112-21.
48. Najima Y, Ohashi K, Kawamura M, Onozuka Y, Yamaguchi T, Akiyama H, et al. Molecular monitoring of BAALC expression in patients with CD34-positive acute leukemia. *Int J Hematol.* 2010;91(4):636-45.
49. Vardiman JW, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2008;114(5):937-52.
50. Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T, Hummel M, Sauerland M-C, Heinecke A, et al. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol.* octubre de 2009;27(30):5031-8.
51. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, Whitman SP, Paschka P, Mrozek K, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) st. *Blood.* junio de 2008;111(11):5371-9.
52. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, et al. Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* julio de 2017;15(7):926-57.
53. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia.* abril de 2017;31(4):798-807.
54. Kronke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschurtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol.* julio de 2011;29(19):2709-16.
55. Ommen HB, Nyvold CG, Braendstrup K, Andersen BL, Ommen IB, Hasle H, et al. Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. *Br J Haematol.* junio de 2008;141(6):782-91.
56. Hämäläinen MM, Kairisto V, Juvonen V, Johansson J, Aurén J, Kohonen K, et al. Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 2008;80(3):201-7.
57. Gaiger A, Schmid D, Heinze G, Linnerth B, Greinix H, Kalhs P, et al. Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia.* diciembre de 1998;12(12):1886-94.
58. Alonso-Dominguez JM, Tenorio M, Velasco D, Abalo L, Lozano S, Villarrubia J, et al. Correlation of WT1 expression with the burden of total and residual leukemic blasts in bone marrow samples of acute myeloid leukemia patients. Vol. 205, *Cancer genetics.* United States; 2012. p. 190-1.

The image features a vibrant, abstract composition of DNA-related motifs. Several double helix structures are depicted in various colors, including shades of teal, pink, purple, yellow, and grey. These helices are intertwined and layered, creating a sense of depth and complexity. In the lower right quadrant, a vertical sequence of small, semi-transparent circles in various colors (grey, pink, teal, yellow, orange) is arranged in a slightly curved path. The overall aesthetic is clean and modern, with a white background and a teal border. The word "CONCLUSIONES" is centered in a bold, black, sans-serif font.

CONCLUSIONES

PRIMER TRABAJO — En relación con la caracterización molecular de las LMA de bajo riesgo genético:

1. La tarjeta microfluídica basada en RQ-PCR de diseño propio resulta útil para la identificación de pacientes con alteraciones citogenéticas/moleculares de bajo riesgo mediante la detección de transcritos de fusión y de genes desregulados.
2. Los paneles de secuenciación masiva (NGS) basados en amplicones resultan útiles para detectar todas las mutaciones con relevancia clínica en las LMA, excepto en el caso de la alteración FLT3-ITD que debe ser analizada por técnicas convencionales.
3. **La presencia de un mayor número de mutaciones al diagnóstico** es un factor de mal pronóstico para los pacientes con LMA de bajo riesgo.
4. Las categorías funcionales de genes y su frecuencia de mutación difieren entre los distintos subgrupos de LMA de riesgo favorable (LPA, LMA-CBF, LMA-NPM1 y LMA-biCEBPA), reflejando procesos leucemogénicos distintos.
5. La presencia de ciertas alteraciones moleculares puede explicar la evolución más agresiva de algunos pacientes de bajo riesgo, como son la sobreexpresión de CD34 y las mutaciones de los genes de *splicing* en las LMA-NPM1 (sin FLT3-ITD) y las mutaciones de los genes del complejo de las cohesinas en las LMA-CBF.
6. Las mutaciones de sobreactivación de genes de la vía RAS al diagnóstico tienen una influencia negativa en la supervivencia libre de recaída de los pacientes con LMA-CBF y en aquellos con LPA de bajo riesgo, lo que podría plantear nuevos enfoques en el tratamiento post-remisión.
7. El perfil mutacional de las LPA difiere entre los tres grupos con distinto riesgo clasificados según las cifras de leucocitos y plaquetas, observándose una mayor incidencia de FLT3-ITD en el grupo de alto riesgo.

SEGUNDO TRABAJO — En relación con la nueva estrategia de secuenciación masiva para la detección de reordenamientos y mutaciones:

1. La estrategia de NGS basada en captura desarrollada y validada en el presente trabajo permite analizar en un solo test tanto mutaciones puntuales en los genes más relevantes en LMA, como los reordenamientos (traslocaciones e inversiones) a nivel de ADN que afectan recurrentemente a las células leucémicas.
2. La metodología de NGS basada en captura se postula como futura técnica de elección para una caracterización completa de la enfermedad al diagnóstico, ya que presenta alta concordancia con

las técnicas convencionales (citogenética, FISH, RQ-PCR y Sanger). Permite además, identificar otras alteraciones no detectadas por técnicas convencionales, como las traslocaciones t(1;17)-IRF2BP2/RARA y la t(3,21) RUNX1/LRRC34, no descritas hasta la fecha.

3. El algoritmo de libre acceso *Lumpy* resulta el más adecuado y fiable para la identificación de traslocaciones e inversiones en datos de NGS. Sin embargo, es necesario implementar herramientas bioinformáticas de análisis más eficaces y sencillas para el laboratorio clínico.

TERCER TRABAJO — En relación con el análisis genético de la LMA familiar:

1. Las alteraciones germinales en el gen RUNX1 son un factor de predisposición a LMA, sin embargo, no son suficientes para la leucemogénesis, siendo necesarias mutaciones en genes adicionales como TP53 para desarrollar el proceso maligno.
2. La incorporación de la NGS en la práctica clínica constituye una herramienta muy valiosa para mejorar el diagnóstico molecular en los casos de LMA familiar.
3. Existen casos de LMA familiar con mutaciones en RUNX1 sin antecedentes de trombopenia, en los que el estudio genético resulta de especial interés para asegurar un diagnóstico preciso a tiempo que permita eliminar la opción de trasplante alogénico emparentado.

CUARTO TRABAJO — En relación con la sobreexpresión de WT1, PRAME y

BAALC como marcadores de EMR:

1. La cuantificación de WT1, PRAME o BAALC tras el tratamiento de inducción permite distinguir pacientes con alto riesgo de recaída, lo que sugiere la necesidad de una monitorización más estrecha de los pacientes positivos.
2. La evaluación del gen PRAME antes del trasplante de progenitores hematopoyéticos podría guiar tratamientos preventivos, como regímenes de acondicionamiento más intensivos, que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes con altos niveles de expresión y mayor riesgo de recaída hematológica.
3. El estudio de WT1 en muestras posteriores al trasplante de progenitores hematopoyéticos resulta de gran utilidad para predecir recaídas, siendo el momento más informativo para su determinación el día +100.

4. Se han establecido unos umbrales de expresión alterada para WT1, PRAME y BAALC en los pacientes en remisión completa, por encima de los cuales existe una alta probabilidad de recaída.
5. La expresión elevada de WT1, PRAME y BAALC es estable entre el diagnóstico y la recaída, por lo que puede emplearse para monitorizar la EMR cuando no se dispone de otros marcadores más específicos. La cuantificación de estos genes permitió la detección precoz de la gran mayoría de las recaídas, siendo WT1 el marcador con mayor tasa de falsos negativos y BAALC el que predice con mayor antelación.

The image features a vibrant, abstract representation of DNA. Several double helix structures are shown in various colors, including shades of teal, pink, purple, yellow, and grey. The helices are intertwined and appear to be in motion. In the lower right quadrant, there is a vertical sequence of small, semi-transparent circles in various colors, including grey, pink, blue, and yellow, which likely represent a genetic sequence or data points. The entire composition is set against a white background with a dark teal border.

SUMMARY

I. FIRST PROJECT

GENOMIC CHARACTERIZATION OF GENETIC LOW-RISK ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS. IDENTIFICATION OF GENE ALTERATIONS ASSOCIATED WITH RELAPSE BY NEXT GENERATION SEQUENCING AND RQ-PCR

Background:

Not all acute myeloblastic leukemia (AML) patients with low cytogenetic/molecular risk have a good prognosis. In fact, up to 40% of patients with core binding factor (CBF) AML suffer relapse, half of patients with mutations in NPM1 relapse during the first 3 years, and biallelic mutations in CEBPA (biCEBPA), although they are a good prognosis factor, do not avoid a relapse rate of 44%. However, mutations responsible for the disease most aggressive behavior in these low-risk subgroups have not been clearly defined yet.

Regarding acute promyelocytic leukemia (APL), despite the notable improvements achieved with the targeted therapy, there are still cases that show resistance or relapse. Furthermore, although mutations potentially cooperating with PML-RARA fusion oncogene have been described, the mutational signature of each of the three APL groups with different risk of relapse is unknown (classification based on leukocyte and platelet count at diagnosis (score Sanz et al., 2000)).

Aims:

1) To compare the mutational profile (using next generation sequencing, NGS) and the gene expression pattern (using microfluidic cards) of the different subgroups of low-risk AML (CBF-AML, NPM1-AML, biCEBP α -AML and APL) to reveal the most affected cellular functional categories in each of them. 2) To investigate the presence at diagnosis of gene mutations associated with poor prognosis. 3) To define, in patients with APL, the mutational signature of the three risk subgroups, according to the initial leukocyte and platelet counts, as well as of the CD56 positive patients.

Material and methods:

We studied 198 patients with low cytogenetic/molecular risk AML: 32 CBF-AML, 32 NPM1-AML (without FLT3-ITD), 6 biCEBPA-AML and 128 APL (one case with inv (16) and two with biCEBPA also presented mutated NPM1). Patients with APL were classified into the 3 risk groups according to the leukocyte and platelet numbers. DNA from bone marrow was obtained to prepare libraries with 54 genes TruSight Myeloid Panel (Illumina), based on amplicon technology. Sequences were analyzed with Variant Studio v3.0 software, establishing a threshold of coverage $\geq 100X$ and variant allele frequency (VAF) $\geq 5\%$ as the limit for the

detection of variants. FLT3-ITD mutations were assessed by PCR and capillary electrophoresis (GeneScan). Finally, the expression profile was also evaluated in 112 of 198 patients using microfluidic cards.

Results:

In the global series (n = 198), we found 378 variants, located in 42 genes, in 162 patients, with sequencing depths between 101x and 61749x (median: 3720x). Thirty-six patients did not present mutations in any of the analyzed genes. In addition to NPM1 and CEBPA, the most frequently mutated genes were FLT3 (17%), NRAS (16%), DNMT3A (11%) and WT1 (10%). All mutations of NPM1 (n = 35) and CEBPA (12 mutations in 6 patients) that had been detected by conventional sequencing were also identified by NGS. In the case of FLT3 tandem duplication (FLT3-ITD), only 6 of 33 positive patients by GeneScan could be detected with NGS (size: 18-36 bp). All subsequent analyzes considered both the variants detected by NGS in 42 genes and the FLT3-ITD mutations identified by GeneScan (total: 405 mutations). The number of mutations additional to those of each subgroup was significantly lower in APL subgroup (1.5 mutations / patient) than in the rest of the subgroups: AML-NPM1 (2.5 mut / patient), AML-CBF (2.3 mut / patient) and AML-biCEBPA (3.0 mut / patient) (p<0.0001). The prognostic value of the number of mutations was studied by establishing a score with 3 groups: (1) patients with 0 mutations, (2) patients with 1 or 2 mutations and (3) patients with > 2 mutations. In the global series we found that a greater number of mutations correlated with shorter relapse-free survival (RFS): 50% vs. 77% and 95% for patients with > 2, 1 or 2 mutations, and without mutations, respectively (p<0.0001). These differences were also observed regarding overall survival (OS) (p = 0.013). In the multivariate analysis, the number of mutations was maintained as an independent prognostic factor in terms of RFS (p = 0.003).

The 42 affected genes were divided into 7 functional categories. In the global series, the most frequently altered functions were cell signalling (34%) and transcription (33%), and the least, the cell cycle control (TP53, PTEN, CDKN2A) (1.7%). Patients from the different low-risk AML groups had different mutation patterns. Genes involved in DNA methylation (DNMT3A, IDHs, TET2) were the most commonly mutated in AML-NPM1 (p<0.0001). Six of the 7 mutations in cell cycle control genes were found in APL, the subgroup with the lowest affectation of cohesin genes (p = 0.002).

VAF of methylation genes was significantly higher than VAF of mutations concerning other functions, such as signalling or transcription (p <0.0001), in most patients. Regarding the prognostic value of the variants found, it was observed that the presence of mutations in NRAS / KRAS in AML-CBF allowed to select a subgroup of patients with higher risk of relapse (RFS at 5 years, 36% vs. 86 %, p = 0.032). These differences were maintained in the multivariate analysis. Another remarkable genetic factor in AML-CBF were mutations in cohesin complex genes (STAG2, RAD21, SMC3). Mutated patients had shorter RFS and OS than those without mutations (RFS, 0% vs. 70%, p = 0.049; OS 0% vs. 89%, p <0.0001). The differences in OS were maintained in

the multivariate analysis. In the AML-NPM1 subgroup, the most notable genetic characteristic were mutations in splicing genes (SRSF2, SF3B1, ZRSR2). When present, RFS and OS rates were significantly shorter (RFS, 0% vs. 61%, $p = 0.001$; OS, 0% vs. 54% $p = 0.021$).

APL patients with available data ($n = 101$) were classified based on the platelet and leukocyte counts (Sanz et al., 2000 score) as follows: 29 low risk, 52 intermediate risk and 20 high risk. The mutational distribution was different between the three subgroups. The FLT3-ITD alteration was significantly more frequent in high-risk APL (13/20, 65%) ($p < 0.0001$). Among the thirteen APL patients who suffered relapse, three of them belonged to the APL low-risk subgroup and all three had missense mutations in the Ras domain of NRAS gene (p.Ser65Arg and Gln61Arg). The only patient in that group with mutated NRAS and who did not relapse had the mutation in a different region of the gene (p.Gln43Ter), causing a truncated protein. The presence of these mutations was associated with a shorter RFS (25% vs. 100%, $p < 0.0001$). The mutational profile was analyzed in 58 patients with flow cytometry data for CD56 (52 were negative and 6 positive). Five of the 6 (83%) APL CD56 + presented mutations in genes related to transcription (WT1, ETV6, CUX1), a significantly higher frequency than in CD56- (16/52, 31%) ($p = 0.011$).

Regarding the expression study with microfluidic cards carried out in 112 patients (53 LPA, 15 inv (16), 10 t (8; 21), 30 NPM1 and 4 biCEBPA), we found 4 fusion transcripts that had not been previously detected by conventional cytogenetic techniques. We identified genes able to discriminate the different subgroups of patients with great precision. Thus, AML with t (15; 17) overexpress HGF / FGF13 / VEGFA ($p < 0.0001$), AML with t (8; 21) overexpress RUNX1T1 / CD34 ($p = 0.001$) and BAALC / POU4F1 ($p = 0.007$), AML with inv (16) overexpress MYH11 / MN1 ($p < 0.0001$) and CLIP3 / SPARC / BAALC ($p = 0.003$), NPM1-AML overexpress HOXA9 ($p < 0.0001$) and MEIS1 / PIM1 / CXCR4 ($p = 0.003$), and biCEBPA-AML overexpress PROM1 / CEBPA ($p < 0.0001$) and CD34 ($p = 0.001$). Respecting the prognostic value of the expression profiles, in the AML-NPM1 subgroup, patients with overexpression of the CD34 surface antigen had shorter RFS and OS (RFS 0% vs. 62%, $p = 0.001$, and OS 29% vs 67%, $p = 0.005$). The independent prognostic value of this variable was confirmed in the RFS multivariate analysis ($p = 0.003$). In APL patients, the overexpression of MYC oncogene was more frequent in high-risk APL (54%) with respect to the intermediate (20%) and low risk (7%) subgroups ($p = 0.002$).

Discussion:

We have carried out a comprehensive genetic analysis of low-risk leukemias, combining the evaluation of somatic mutations by using a NGS panel with the massive analysis of gene expression with a customized RQ-PCR strategy. We have shown that NGS panels based on amplicons are useful to detect all mutations with clinical relevance in AML, except for the FLT3-ITD alteration, which must be concurrently analyzed by GeneScan. Moreover, we have validated the usefulness of the microfluidic cards for specific detection of

fusion transcripts, as well as of genes with deregulated expression (infra / overexpression) allowing to accurately identify the existence of low risk cytogenetic / molecular alterations.

Our study revealed that the higher the number of mutations, the worse is the prognosis of patients with low-risk AML. These results are in accordance with those previously described in myelodysplastic syndromes and intermediate karyotype AML and suggest that cases with a large number of mutations have a correlatively higher level of genomic instability.

Mutated genes in low-risk AML can be classified into a reduced number of functional categories, the most frequent are transcription and cell signalling, as in the classic "double hit" model. However, other more recently described cellular functions, such as epigenetics, splicing and the cohesin complex, can be frequently altered. Thanks to the analysis of mutant allelic frequencies provided by NGS, we identified that mutations in methylation genes (DNMT3A, ASXL1, TET2) occur early in leukemogenesis, although their clinical value has been questioned in very recent studies. In the four different low-risk subgroups, we found different mutational profiles, suggesting distinct leukemogenic processes.

Due to the treatment homogeneity in AML-NPM1 (without FLT3-ITD), mutations in splicing genes or CD34 overexpression could be some of the factors that contribute to the different prognosis of patients. In CBF-AML group, we observed that the presence of mutations in NRAS / KRAS at diagnosis had a negative influence on RFS, even higher than age. The same happened with mutations in genes of cohesin complex, whose alteration could deregulate the function of certain enhancers thus affecting the transcription process.

The mutational profile of APL differed among the three groups with different risk (low, intermediate and high), and the most remarkable difference was the higher incidence of FLT3-ITD in the high-risk group. As in the case of CBF-AML, the mutational status of NRAS gene could be used as a prognostic marker in APL, especially in the low-risk group, allowing a more precise classification of these patients with the aim of proposing new approaches in post-remission treatment.

II. SECOND PROJECT

DEVELOPMENT OF A NEW NEXT GENERATION SEQUENCING STRATEGY FOR SIMULTANEOUS EVALUATION OF MUTATIONS AND CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS

Background:

Nowadays, there is a growing interest in detecting with a single next generation sequencing (NGS) test the whole variety of alterations with diagnostic and prognostic value in acute myeloblastic leukaemias (AML), so that more and more laboratories are implanting this technology in the clinical routine for the management of AML. However, there are few approaches that study, in addition to gene mutations, the rest of AML genetic alterations. Since there are technical limitations for the detection of rearrangements, conventional methods are still essential. Therefore, it is necessary to improve the panels designs and simplify the computer analysis.

Aims:

1) To identify by capture-based NGS the most frequent genetic alterations in AML (substitutions, insertions / deletions and translocations / inversions), as well as new alterations not detected by conventional techniques. 2) To demonstrate the utility of NGS to establish the diagnosis and prognosis of patients with AML in clinical practice. 3) To compare four bioinformatic strategies for the analysis of structural variants characteristic of AML.

Material and methods:

We studied, genomic DNA from bone marrow (BM) samples collected at diagnosis in 30 patients (27 AML, 3 chronic myeloid leukemia-CML) with alterations previously detected by conventional techniques (karyotype, FISH and / or RQ-PCR) and one healthy donor as a control. To do this, we designed a custom capture-based panel (Nextera Custom Enrichment, Illumina) which included: 1) 32 genes recurrently mutated in myeloid neoplasms (complete exons and / or hotspot regions). 2) Intronic or exonic breakpoint regions previously identified for each partner of the most frequent translocations (PML-RARA, CBFb-MYH11, RUNX1-RUNX1T1, MLL-MLL2, BCR-ABL1). 3) Common breakpoint areas of one of the two genes involved in less frequent rearrangements (NUP98-NSD1, ETV6-PDGFRB, DEK-NUP214, etc.) or with several partners, such as MLL (KMT2A). DNA libraries were sequenced in a MiSeqDx (Illumina) sequencer. Sequences were analyzed using a pipeline that includes the 'Manta Structural Variant Caller' algorithm (included in Illumina's Enrichment software) for the detection of translocations, and the VariantStudio v3.0 software (Illumina) for the detection of somatic mutations. In addition to that, the effectiveness of four different algorithms designed for detection

of structural variants at DNA level (Manta, Lumpy, GASV and DELLY2) was compared. Finally, a gene expression study was carried out using microfluidic cards based on RQ-PCR (TaqMan Array Micro Fluidic Cards, ThermoFisher), designed also by our group, and which allows to study 96 markers simultaneously in each patient: 36 fusion genes, 57 genes with diagnostic / prognostic value in AML, and 3 control genes.

Results:

The mean sequencing coverage of all the samples was 819X (\pm 261x). We identified 41 mutations (33 substitutions and 8 indels) in 21/30 patients with an average of 1.4 mutations per patient. In a case with t (8; 21), we detected the mutation p.Asp816His in KIT gene, which is associated with poor prognosis and had not been identified by conventional techniques. In addition, we identified two of the three internal tandem duplications of FLT3 (FLT3-ITD) previously characterized (one of 30 bp and another of 36 bp), but not an ITD of 108 bp, and a FLT3-TKD mutation (p.Asp835Tyr) with a VAF of 3.6%. All the variants were validated with the TruSight Myeloid Panel (Illumina), based on amplicons (concordance: 100%).

Structural variants were also analyzed in the same data. First, we chose the Enrichment software (MANTA algorithm) because of its simplicity and potential applicability in the clinical laboratory. With this software, we could detect 18 of the 24 (75%) rearrangements identified by karyotype / FISH and / or RQ-PCR: t (15; 17) (4/4), inv (16) (3/5), t (8; 21) (1/3), t (9; 22) (4/5), MLL fusions (3/4), MLL-PTD (2/2) and t (1; 17) (1/1). Remarkably, we characterized a t (1; 17) -IRF2BP2 / RARA, captured and sequenced from the partner RARa, which had not been detected by conventional techniques. In addition, we were able to identify a new t (3; 21) translocation, involving the myeloid transcription factor gene RUNX1 (21q22.1) and the LRRC34 gene (3q26.2). The 6 negative discordant cases by NGS analyzed with Enrichment were 2 inv (16) CFBMYH11, 2 t (8; 21) RUNX1-RUNX1T1, 1 t (9; 22) BCR-ABL and 1 t (11; 19) MLL-MLLT1. Of these 6 cases, all but (11; 19) had been previously detected in RNA by RQ-PCR. Four of the 6 [2 inv (16) and 2 t (8; 21)] had a normal karyotype, two of them were also negative by FISH and, t (9; 22) was identified by both cytogenetics / FISH and by RQ-PCR. Then, we analysed the 6 false negatives by the Enrichment software using 3 own pipelines. The Lumpy algorithm allowed to detect 5 of the 6 cases (83%), being the most effective, compared to GASV and DELLY2 that identified 3/6 (50%) and 4/6 (67%) rearrangements respectively. The Lumpy algorithm was able to characterize both the false negative cases by cytogenetics and a patient with two alterations. The t (11; 19) could not be detected either by any of the four algorithms or by RQ-PCR.

The microfluidic cards study allowed the identification of characteristic gene expression patterns that predicted the existence of certain cytogenetic alterations, especially those that confer good prognosis, confirming our previous results (*Project 1*). Patients with t (15; 17) overexpressed HGF, FGF13 and VEGFA; patients with inv (16) overexpressed MYH11, CLIP3, SPARC, BAALC, CD34 and MN1 and those with t (8; 21) had higher levels of RUNX1T1, POU4F1, CD34, CAV1 and BAALC. As for patients with rearrangements in

11q23, their characteristic pattern with high expression of HOXA7, HOXA9 and MEIS1, did not allow, however, to (accurately) discriminate them from the rest.

Discussion:

In this work, we developed and validated a NGS capture-based strategy which allows to analyze, in a single test, point mutations in the most relevant genes in AML, as well as the recurrent rearrangements (translocations and inversions) of leukemic cells at a DNA level. One of the advantages of this strategy is that requires very little amount of starting DNA (50 ng), enabling to study all the translocations in a single sequencing reaction. We propose a simple method of analysis with two easy-to-use software in the clinical laboratory, i.e., VariantStudio for mutations, and Enrichment for rearrangements. However, it is still necessary to optimize the design of the analysis programs to detect certain structural alterations with higher reliability, minimizing the number of false negatives. Therefore, we validated the panel design with our own pipelines based on open access algorithms and we compared the usefulness of three different structural analysis tools for NGS data (Lumpy, GASV and DELLY2). We showed that Lumpy algorithm is the most suitable to identify translocations and inversions in NGS data. The next step will be to implement the algorithms of choice in manageable software that do not require the use of computer programming for its adaptation to the clinical diagnostic laboratory.

Our results show that this panel is able to identify all the genetic alterations previously detected by conventional cytogenetic / FISH and RQ-PCR techniques, both point mutations (substitutions and small indels) and inversions and translocations, except for one case with a t (11; 19) that was negative by RQ-PCR and that could not be detected by any of the four analysis algorithms. These data suggest that our design does not cover the breakpoint of the translocation in this particular case, because it is probably located outside the most frequently involved region (introns 6-11 and exons 7-11), included in this panel.

In cases with frequent translocations for which both partners were included in the design [t (15; 17), t (8; 21), inv (16) and t (9; 11)], we observed that the rearrangement was captured and sequenced from both sides, suggesting the possibility of reducing the size of the panel in future versions (including only one of the genes). Moreover, we were able to detect rearrangements from only one of the two partners, as in the case of a t (6; 11), captured from MLL, and a t (1; 17) -IRF2BP2 / RARA, not previously described, captured and sequenced from RARA, and that had been characterized by PCR-RACE. In addition, we detected a new translocation, the t (3; 21) -RUNX1 / LRRC34, also unidentified until now. This fact reflects the power of NGS techniques to interrogate tumour genomes in an efficient way and to identify different kind of alterations in multiplex sequencing data.

III. THIRD PROJECT

GENOMIC ANALYSIS OF GERMINAL AND SOMATIC VARIANTS IN A CASE OF FAMILIAL ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA

Background:

Familial hematologic malignancies, despite being increasingly frequent, are still underdiagnosed at the present time. The molecular basis of these neoplasms has recently begun to be elucidated, mainly due to the implementation of next generation sequencing (NGS) techniques in the last years, which have facilitated the discovery of an increasing number of family cases as well as the responsible genes. As for familial acute myeloblastic leukemia (AML), although there have been described cases with mutations in CEBPA, GATA2, RUNX1 and more recently in other genes (ANKRD26, DDX41), a complete molecular characterization and correct monitoring of healthy family members becomes difficult with conventional techniques.

Aims:

To perform a molecular study of a familial AML case with targeted NGS in order to identify candidate genes involved in malignant transformation that can help us to understand the mechanisms of susceptibility and progression to AML.

Material and methods:

We report the case of an 8-siblings family with 4 occurrences of AML secondary to myelodysplastic syndrome (MDS). The pedigree of this family is shown in Figure 1. A 63-year-old male patient (Fig. 1, II.4) was diagnosed with MDS AREBII 5q- in 2014. The patient rapidly evolved to AML and underwent hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from sibling donor (healthy younger sister II.6). At the time of transplantation, the patient was in complete remission (CR) with positive minimal residual disease (MRD) by flow cytometry. This patient relapsed five months after HSCT and finally died due to disease progression. Two of his brothers (II.1 and II.8) had previously died also due to AML, having been diagnosed at the age of 49 and 41.

One year later, the 58-year-old sister (II.5) of this patient was also diagnosed with MDS AREBII 5q- and, like her brother, suffered a rapid progression to AML. She received allogeneic HSCT from an unrelated donor in CR state with negative MRD. She relapsed four months after HSCT and finally died.

The twin brother of patient II.4 (II.3), a younger sister (II.7) and an older brother (II.2) are currently healthy (last date: April 2018). The parents died at an advanced age by causes not related to cancer. None of the 8

siblings had a history of thrombocytopenia or bleeding, or other symptoms that reflected a deficiency in platelet function.

DNA was extracted from bone marrow (BM) of patients II.4 and II.5 at diagnosis and relapse. Also, germinal samples from buccal swab of both patients (II.4, II.5) as well as of two of the healthy siblings (II.3, II.6), and peripheral blood (PB) from four alive healthy siblings (II.2, II.3, II.6, II.7) were recollected. An additional sample of PB of patient II.5 from a year before developing MDS/AML was available. In summary, there were a total of 13 samples: 4 BM tumour samples and 9 germinal samples (5 PB and 4 buccal swabs). All of them were obtained after informed consent. A total of 54 myeloid-related genes were studied with the TruSight myeloid sequencing panel (Illumina, CA).

Results:

Sequencing results of the family samples showed four different variants: one in the myeloid transcription factor RUNX1 and three in the tumour suppressor TP53. All of them were heterozygous single-nucleotide changes. The variant detected in RUNX1, c.167T>C (p.Leu56Ser), was located in the DNA binding domain (RHD domain). This mutation was present in the two patients with AML (II.4 and II.5) at the time of diagnosis, in the relapse sample of the sister with AML (II.5) and in PB samples of two of the four healthy brothers (II.2 and II.7). We confirmed the germinal origin of p.Leu56Ser mutation in RUNX1 by sequencing the DNA of buccal swab cells from both patients (II.4, II.5). The variant was present in DNA from epithelial oral cells with allelic frequencies (VAF) of 46% in the case of patient II.4, and 29% in patient II.5. In PB samples and buccal cells from healthy siblings II.3 and II.6, no mutation was identified in the 54 genes analyzed, including RUNX1 and TP53. As described previously, our data suggest that the mutation in RUNX1 gene is not enough to develop the leukemia. In addition to it, three mutations were found in TP53 gene. One of these mutations, p.Gly245Asp, was present in the patient who developed the leukemia at 58 years of age (II.5). The rest of mutations, p.Met246Val and p.Ile195Thr, were located in the same TP53 domain, the DNA binding domain, and appeared in the tumour DNA from her brother II.4, who developed the AML at 63 years. These TP53 mutations were not present in germinal cells from any patient, confirming their somatic origin. Mutations of both RUNX1 and TP53 were already present in the PB DNA from patient II.5 one year before her AML diagnosis. Patient II.4 relapsed 5 months after HSCT. The sample collected at this moment was a BM with 3.7% blasts by flow cytometry and 5q negative. At this time, the same two TP53 mutations that were observed in the diagnostic sample were identified, although at a low allelic frequency: 3% in the case of p.M246V, and 3.4% for the p.I195T mutation. This relapse occurred 5 months after the patient was transplanted with hematopoietic stem cells from his healthy sister II.6, who lacked the germline mutation in RUNX1. Therefore, the RUNX1 p.L56S mutation was not detected in the relapse sample from II.4, as expected. Chimerism was analyzed at several time points after transplantation, with complete chimerism observed in

pre-relapse samples and mixed chimerism with 8.2% of receptor cells at relapse. Patient II.5 relapsed 4 months after unrelated HSCT. The sample that was sequenced had 0.3% blasts by flow cytometry and complete chimerism, although with 2.7% hematopoietic cells of the receptor. Regarding the NGS results of this sample, the same mutations observed at diagnosis were found, but with lower allelic frequencies: 2.7% RUNX1 p.Leu56Ser and 2% TP53 p.G245D.

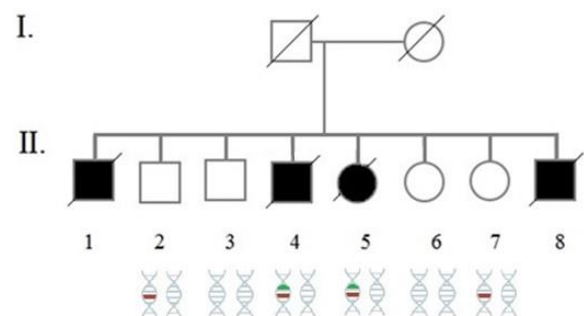
Discussion:

The case of familial AML that we present in this work increases the existing evidence of alterations in RUNX1 as a predisposition factor to AML (In summary, four people in this family presented the *RUNX1* L56S germline variant, however, what finally prompted the disease were the mutations in TP53, observed in the two siblings).

Knowledge of these syndromes allows us to provide proper genetic counselling, carry out appropriate tests and optimize the therapeutic approach. The incorporation of NGS into the clinical practice is a very valuable tool to improve the molecular diagnosis in cases of familial AML. In addition to the clinical implications, our study allowed us to establish a multistep model of leukemogenesis, in which the germline mutation in RUNX1 would constitute the first step, providing a favorable environment for the acquisition of new genetic alterations, in this case the point mutations in TP53 (different on each patient). Finally, the deletion of 5q chromosomal region would occur, initiating a phase of previous dysplasia that would rapidly lead to an overt leukemia.

As defined by the World Health Organization, familial AML cases with mutations in RUNX1 are classified into the category of family platelet syndrome with predisposition to AML (FPD / AML), although some individuals may not have a history of bleeding. As in the family studied in the present work, there have been described isolated cases in which several members of a family with FPD / AML and mutations in RUNX1 had a normal platelet count and function. This finding highlights the need of genetic tests to detect mutations in RUNX1 and / or other genes in all the members of a family with suspected familial AML, even in the absence of certain clinical symptoms, in order to propose an adapted therapeutic strategy avoiding the allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.

Figure 1. Family pedigree. Squares: men; circles: women. Black: affected with MDS / AML; white: not affected. Red bar on the chromosome: carrier of the RUNX1 mutation (germlinal). Two bars on the chromosome, one red and one green: RUNX1 and TP53 (acquired) mutated.



IV. FOURTH PROJECT

ASSESSMENT OF WT1, PRAME AND BAALC GENES AS MARKERS OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA

Background:

Minimal residual disease (MRD) assessment in AML is essential for the follow-up of patients and allows to predict an imminent relapse. However, at present, only 40-60% of AML cases have a robust MRD marker for PCR quantification (fusion transcripts or mutated NPM1), so it is necessary to identify new markers that allow monitoring the rest of the patients. The Wilm's tumor gene (WT1) expression has been widely studied as an MRD marker in AML, however, it is not expressed in 10-20% of the cases, and the results about its role as an early indicator of relapse are contradictory. Other genes considered to monitor MRD are PRAME and BAALC, but they have been less evaluated and there are no consistent data.

Aims:

To analyze the suitability of WT1, PRAME and BAALC gene expression (in order to cover all patients) for MRD quantification at the different post-treatment moments and to evaluate their validity as early indicators of relapse.

Material and methods:

Expression of WT1, PRAME and BAALC was analyzed by RQ-PCR in 118 patients with non-M3 AML at diagnosis and at different follow-up moments (post-induction, post-consolidation, pre- and post-transplant +21 +56 +100 +180 days and +1 year). Seventy-three (62%) patients had a standard marker (NPM1 or fusion transcript) for MRD quantification: 48 NPM1, 12 CBFb-MYH11, 6 AML1-ETO, 3 BCR-ABL1, 4 MLL-MLL3. The remaining 45 (38%) patients lacked a classical MRD marker. The expression evaluation of fusion transcripts and mutated NPM1 was carried out by absolute quantification. Standard curves and ABL1 as expression control gene were used. Quantification of WT1 was also performed by absolute quantification but PRAME and BAALC were studied by relative quantification. In all three cases, the GUS gene was used as a control. Since WT1, PRAME and BAALC are also expressed in normal hematopoietic cells, it is essential to establish the expression levels in control (non-tumor) samples, so bone marrow (n = 14) and peripheral blood (n = 10) samples from healthy donors were analyzed. Cut-off points to consider overexpression (positivity) were set based on the expression values in donors.

Results:

All patients (n = 118) presented overexpression of at least one of the study markers (WT1, PRAME and / or BAALC) at diagnosis: 89/118 (75.4%) patients overexpressed WT1 (WT1 positive), 51 (43.2%) PRAME (PRAME positive) and 50 (42.4%) BAALC (BAALC positive). AML patients with intermediate risk karyotype who were BAALC+ at diagnosis had 5-years RFS and OS shorter than those BAALC- (RFS 15% vs. 54%, p = 0.006; OS 0% vs. 59%, p < 0.001).

A total of 452 follow-up samples in complete morphological remission (CR) from different moments were analyzed with the marker that was positive for each patient at diagnosis. The overexpression of any of the three genes in the re-evaluation of induction treatment was found to be an adverse prognostic factor in terms of RFS. WT1 was overexpressed in 20% patients, who presented RFS shorter than those who did not (23% vs. 54%, p = 0.007). The same occurred in the 30% of the patients who overexpressed PRAME (RFS, 30% vs. 69%, p = 0.023). In the case of BAALC, longer RFS were observed in the group of patients whose BAALC expression was reduced more than 100 times compared to those who did not reach this reduction (100% vs. 32%, p = 0.020). In post-consolidation, overexpression of WT1, PRAME or BAALC showed a trend towards worse survival, although without reaching statistical significance. Ninety-three patients underwent hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), 73 allogeneic and 20 autologous. Pre-transplant PRAME levels were analyzed in 25 (14 allogeneic and 11 autologous) of the 40 patients PRAME+ at diagnosis. Fourteen of them were positive (threshold: 0.0006) and presented a shorter RFS than negative patients (49.0% vs. 90.9%, p = 0.022). These differences were maintained in allo-HSCT samples (p = 0.026). Overexpression of WT1 and BAALC in samples prior to HSCT showed no significant prognostic value. Regarding samples after HSCT, a worse prognosis in terms of RFS was observed in cases overexpressing WT1, especially on the day +100 and +1 year (+100: 14% vs. 85%, p < 0.0001; + 1 year: 50% vs. 87%, p = 0.005). The differences found on day +100 were maintained when analyzing exclusively allo-HSCT (p < 0.0001). In the case of PRAME and BAALC, no differences could be established regarding the risk of post-HSCT relapse.

Our study does not focus on the marker NPM1, and we could not confirm its prognostic value in any of the post-treatment moments, however, there was always a trend towards a worse RFS in case of positivity, which would probably reach statistical significance by increasing the number of patients and by analyzing only PB samples.

We evaluated the stability of WT1, PRAME and BAALC overexpression by studying paired diagnostic-relapse samples from 44 patients: 35 had WT1 as a marker, 19 PRAME and 15 BAALC. All three genes showed expression values at relapse very similar to those of the diagnosis, which demonstrated their stability as MRD

markers. In 100% of the relapses, values of WT1, PRAME and BAALC were higher than the thresholds established from donors expression for CR samples.

To define their predictive ability, the expression of WT1, PRAME and BAALC was analyzed in samples of 34 patients prior to the haematological relapse. Considering the thresholds set for CR samples, WT1 was able to predict 61% of relapses, PRAME 77% and BAALC 81%. Moreover, we observed that there were cut-off points above which patients always relapsed: > 1% for WT1, > 0.024 for PRAME and > 0.6 for BAALC. Quantification of WT1, PRAME and BAALC levels in addition to the standard markers (mutated NPM1 or fusion transcript) allowed the early detection of 91.4% (31/34) of the relapses () with a range of anticipation between 8 and 224 days, being WT1 the marker with the highest false negative rate and BAALC the one that predicts with greater advance.

Discussion:

In this work, we demonstrate that the overexpression of any of the three studied genes (WT1, PRAME or BAALC) after the induction treatment is an important prognostic factor, which allows selecting patients with higher risk of relapse. These findings would indicate the need for a closer monitoring of patients with positive results of WT1, PRAME or BAALC after the induction treatment and the possibility of making therapeutic decisions at an early stage.

We also prove the validity of PRAME as an indicator of post-transplant relapse when overexpressed in pre-transplant samples, which would suggest the use of preventive treatments with more intensive conditioning regimens on these patients, in order to improve the prognosis and lower the risk of hematologic relapse.

Regarding the prognostic value of these markers after HSCT, the most remarkable result was the high expression of WT1 on day +100, which proved to be an excellent predictor of relapse.

In summary, our data suggest that the quantification of WT1, PRAME and BAALC levels could be used in the absence of another MRD marker, thus allowing to monitor a significantly higher number of patients than that achieved only with the current classic targets. Finally, in order to improve patients outcome, strategies of parallel monitor several markers that combine the applicability of WT1 and its usefulness in post-HSCT monitoring, with the ability of PRAME and BAALC to anticipate the hematological relapse could be proposed.

V. CONCLUSIONS

FIRST PROJECT - In relation to molecular characterization of genetic low-risk acute myeloblastic leukemia (AML):

1. The custom-designed microfluidic card based on RQ-PCR is useful for the identification of patients with low risk cytogenetic/molecular alterations by detection of fusion transcripts and deregulated genes.
2. Next-generation sequencing (NGS) panels based on amplicons are useful to detect all mutations with clinical relevance in AML, except in the case of the FLT3-ITD alteration that should be analyzed by conventional techniques.
3. The presence of a greater number of mutations at diagnosis is a poor prognostic factor for patients with low-risk AML.
4. The functional categories of mutated genes and their frequency of mutation differ among the different AML subgroups of favorable risk (APL, CBF-AML, NPM1-AML and biCEBPA-AML), reflecting different leukemogenic processes.
5. The presence of certain molecular alterations may explain the more aggressive evolution of some low-risk patients, such as the overexpression of CD34 and the mutations of the splicing genes in AML-NPM1 (without FLT3-ITD) and the mutations of the cohesin complex genes in AML-CBF.
6. Activating RAS mutations at diagnosis have a negative influence on the relapse-free survival of patients with AML-CBF and those with low-risk APL, which could suggest new approaches in post-remission therapy.
7. The mutational profile of APL differs among the three groups with different risk, classified according to initial leukocyte and platelet counts, highlighting a higher incidence of FLT3-ITD in the high-risk group.

SECOND PROJECT - In relation to the new next-generation sequencing strategy for simultaneous detection of rearrangements and mutations

1. The capture-based NGS strategy developed and validated in the present study allows us in a single test to analyse both point mutations in the most relevant genes in AML, and rearrangements (translocations and inversions) at the DNA level that recurrently affect leukemic cells.

2. The NGS methodology based on capture is postulated as the future technique of choice for a complete characterization of the disease at diagnosis, since it presents high concordance with conventional techniques (cytogenetics, FISH, RQ-PCR and Sanger). It also allows identifying other alterations not detected by conventional techniques, such as translocations $t(1;17)$ -IRF2BP2 / RARA and $t(3,21)$ RUNX1 / LRRC34, not described to date.

3. *Lumpy* open access algorithm is the most suitable and reliable for the identification of translocations and inversions in NGS data. However, it is necessary to implement more efficient and simple bioinformatic analysis tools for clinical laboratory application.

THIRD PROJECT - In relation to the genetic analysis of familial AML:

1. The germline alterations in the RUNX1 gene are predisposing factors to AML, however, on their own they are not enough to initiate leukemogenesis. Alterations in additional genes such as TP53 are necessary to develop the malignant process.

2. The incorporation of NGS in clinical practice is a very valuable tool to improve molecular diagnosis in familial AML cases.

3. There are familial AML cases with mutations in RUNX1 and without a history of thrombocytopenia, in which the genetic study is especially interesting to ensure an accurate diagnosis and eliminate the option of a related allogeneic transplant.

FOURTH PROJECT - In relation to overexpression of WT1, PRAME and BAALC as minimal residual disease (MRD) markers:

1. The quantification of WT1, PRAME or BAALC after induction treatment allows distinguishing patients with high risk of relapse, which suggests the need for closer monitoring of positive patients.

2. The evaluation of PRAME gene before hematopoietic stem cell transplantation could guide preventive treatments, such as more intensive consolidation therapy, that improve the prognosis of patients with high expression levels and increased risk of hematologic relapse.

3. The study of WT1 in samples after transplantation of hematopoietic progenitors is very useful to predict relapse, and the most informative moment for its determination is on day +100.

4. We have been established altered expression thresholds for WT1, PRAME and BAALC in patients in complete remission, above which there is a high probability of relapse.

5. High expression of WT1, PRAME and BAALC is stable between diagnosis and relapse, so it can be used to monitor MRD when other more specific markers are not available. The quantification of these genes allowed early detection of the great majority of relapses, with WT1 being the marker with the highest false negative rate and BAALC the one that predicts with greater advance.

