

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGÍA



TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS MÉDICAS

**ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES PARA
EL PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA
ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN PACIENTES
CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA**

Carlos Manuel Santamaría Quesada

2009

D. Marcos González Díaz, Profesor Asociado de Hematología de la Facultad de Medicina y Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D Carlos Manuel Santamaría Quesada titulado "ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca, a 30 de enero del 2009.

Firmado: Dr. Marcos González Díaz, Doctor en Medicina y Cirugía.

Dña. M. Carmen Chillón Santos, Investigadora del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D Carlos Manuel Santamaría Quesada titulado "ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca, a 30 de enero del 2009.

Firmado: Dra. M. Carmen Chillón Santos, Doctora en Biología.

D. Ramón García Sanz, Profesor Asociado de Hematología de la Facultad de Medicina y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D Carlos Manuel Santamaría Quesada titulado "ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca, a 30 de enero del 2009.

Fdo.: Dr. Ramón García Sanz, Doctor en Medicina y Cirugía.

D. José Ignacio Paz Bouza, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo realizado bajo mi tutoría por D Carlos Manuel Santamaría Quesada titulado "ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL PRONÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en Salamanca, a 30 de enero del 2009.

Fdo.: Dr. José Ignacio Paz Bouza, Doctor en Medicina y Cirugía.

A Anamariela
A mis padres
A Ignacio, Gustavo y Marianela
Y para todos aquellos que pronto vendrán

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este intenso viaje, es difícil poder incluir en unas breves líneas todas aquellas personas que ayudaron positivamente para que este proyecto llegase a buen puerto. Por eso, de antemano mis disculpas por las abundantes omisiones que haré.

Al Dr. Marcos González, por ser mi guía permanente, por su incondicional apoyo, sus consejos y su gran dedicación para enseñarme las buenas artes de la investigación.

A la Dra. Carmen Chillón por su continua ayuda en la parte experimental y por convertirse en una buena amiga para los momentos dulces y aciagos.

A Dr. Ramón García-Sanz, por apoyarme en la redacción de los artículos, en el análisis estadístico y por motivarme a dar un poco más, siempre.

Al Prof. Jesús San Miguel, por mantener abiertas las puertas del Servicio de Hematología, por confiar en mis aptitudes y por ser un ejemplo a seguir para los que iniciamos estas lides.

Al Dr. Jose A. Pérez-Simón por sus buenas ideas, por creer en mí y por su fuerte determinación en traerme de vuelta a Salamanca.

A los Dres. Consuelo del Cañizo y Fermín Sánchez-Guijo por aceptarme en su grupo de trabajo y por su gran paciencia para que se pudiese culminar este proyecto.

Al Dr. Luis I. Sanchez-Abarca, por convertirse en un hermano mayor para mí y Mariela, por sus consejos, por acogernos en su hogar y por ser muy responsable de que estemos en Salamanca nuevamente.

A Montse, por su invaluable colaboración en la parte técnica y por ser mi confidente en las buenas y no tan buenas.

Al personal del laboratorio de Biología Molecular/HLA: Alejandra, Alicia, Ana, Feli, Isabel, Luis, Maru, Mercedes y Miguel, por su amistad y por enseñarme los secretos de un buen trabajo de laboratorio.

Al personal de la Sección de Cultivos Celulares: Belén, Carmen, Conchi, Luis, Sandra, Silvia, Graciela, Eva Lorenzo, Eva La Super, Eva Villarón, Manu, María, Nacho Graciani, Olga y Soraya, por integrame a este nuevo grupo de trabajo y aceptarme como nuevo inquilino en un densamente poblado laboratorio.

Al personal del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica, por facilitar y apoyar decididamente mi venida a Salamanca, particularmente a los Drs. Mario Vargas y Jaime Guevara.

A mis amigos Evan, Alex, Ricardo, Soraya, Carlos, Sandra, Juan, Wendy y muchos otros que han estado allí, haciendo más llevadero este tiempo lejos de la tierra y la familia.

A todas las instituciones que han dado soporte económico para este proyecto: Junta de Castilla y León, Instituto Costarricense contra el Cáncer, CENDEISSS, Fundación CR-USA y Fundación Netropica.

ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATRA	Ácido todo trans-retinoico
BAALC	<i>Brain and acute leukemia gene, cytoplasmatic</i>
CD	Grupo ("cluster") de diferenciación
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
dNTP	Deoxinucleótidos
ERM	Enfermedad Residual Mínima
ERG	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene-like (avian)</i>
EVI1	<i>Ecotropic viral integration site gene</i>
FAB	Clasificación morfológica Franco-Americano-Británica
FLT3	<i>Fms-related tyrosin kinase 3</i>
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
Hb	Hemoglobina
ITD	Duplicación interna en tándem
kb	Kilobase
KIT	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Kit (CD117)</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LPA	Leucemia promielocítica aguda
M3c	Forma morfológica clásica hipergranular de la LPA
M3v	Variante morfológica hipogranular de la LPA
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Mb	Megabase
mL	Mililitro
MLL	<i>Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>
mM	Milimolar
MN1	Gen del meningioma 1
MO	Médula ósea
ng	Nanogramo
N-RAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>

<i>NPM1</i>	Gen de la nucleofosmina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PRAME</i>	<i>Preferentially expressed antigen of melanoma</i>
RC	Remisión completa
<i>RHAMM</i>	<i>Receptor for hyaluronic acid mediated motility gene</i>
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
SP	Sangre periférica
<i>WT</i>	Gen del tumor de Wilms

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades sobre las leucemias mieloblásticas agudas (LMA)	
1.1 Definición de LMA	2
1.2 Clasificación de las LMA: morfológica FAB y OMS	2
1.3 Principales alteraciones citogenéticas de las LMA	4
1.3.1 LMA con t(8;21)(q22;q22) (<i>AML1/ETO</i>)	5
1.3.2 LMA con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22)(<i>CBFβ/MYH11</i>)	5
1.3.3 LMA con alteraciones de 11q23 (<i>MLL</i>)	6
1.3.4 LMA con t(15;17)(q22;q11.2-q12) y variantes moleculares (LPA/LMA-M3)	7
1.4 Valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas en LMA	8
1.5 Características clínicas de la LMA	
1.5.1 Presentación clínica de la LMA no M3	11
1.5.2 Presentación clínica de la LPA/LMA-M3	12
1.6 Tratamiento de las LMA	
1.6.1 Primera línea de tratamiento de las LMA no M3	13
1.6.2 Primera línea de tratamiento de la LPA/LMA-M3	14
1.6.3 Transplante de precursores hematopoyéticos	15
1.6.4 Tratamiento de la LMA en recaída	16
1.6.5 Nuevos fármacos en estudio	17
2. Alteraciones moleculares con valor pronóstico en LMA cariotipo normal	19
2.1 Mutaciones	
2.1.1 Alteraciones en el gen <i>FLT3</i>	21
2.1.2 Mutaciones en el gen <i>NPM1</i>	22
2.1.3 Duplicaciones parciales en tandem en el gen <i>MLL</i>	24
2.1.4 Mutaciones en el gen <i>CEBPA</i>	25
2.1.5 Mutaciones en los oncogenes <i>N-RAS</i> y <i>K-RAS</i>	25
2.1.6 Mutaciones en el gen <i>c-KIT</i>	26
2.2 Expresión génica aberrante	
2.2.1 Sobreexpresión del gen <i>BAALC</i>	26
2.2.2 Sobreexpresión del gen <i>ERG</i>	27
2.2.3 Sobreexpresión del gen <i>EVI1</i>	28
2.2.4 Sobreexpresión del gen <i>MN1</i>	29
2.2.5 Sobreexpresión del gen <i>PRAME</i>	29
2.2.6 Sobreexpresión del gen <i>RHAMM</i>	30
2.2.7 Sobreexpresión del gen <i>WT1</i>	31

2.3 Vía de señalización PI3/AKT/FOXO3a/p27	32
3. Alteraciones moleculares con valor pronóstico en LPA/LMA-M3	
3.1 Translocación <i>PML-RARα</i>	34
3.1.1 Fisiopatología del gen de fusión <i>PML-RARα</i>	34
3.1.2 Genes de los receptores de ácido retinoico	34
3.1.3 Variantes del gen de fusión <i>PML-RARα</i>	35
3.2 Detección del transcrito <i>PML-RARα</i>	
3.2.1 Morfología e inmunofenotipo	36
3.2.2 Citogenética e hibridación “in situ”	38
3.2.3 Detección de la proteína PML	38
3.2.4 RT-PCR cualitativa	39
3.2.5 RT-PCR cuantitativa (RQ-PCR) en tiempo real	40
3.3 Otras alteraciones moleculares de impacto pronóstico en LPA	
3.3.1 Sobreexpresión de <i>PML-RARα</i>	41
3.3.2 Sobreexpresión de <i>PRAME</i>	41
3.3.3 Alteraciones en <i>FLT3</i>	41
3.3.4 Sobreexpresión de <i>CXCR4</i>	42
3.3.5 Genes de resistencia a drogas	42
3.3.6 Otros genes de expresión aberrante	42
4. Estudios de Enfermedad Residual Mínima (ERM)	
4.1 Definición de ERM	43
4.2 Técnicas de evaluación moleculares	
4.2.1 RT-PCR cualitativa	44
4.2.2 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR)	44
4.2.3 Aspectos metodológicos de la evaluación de ERM.	45
4.3 Evaluación de la ERM en LMA no M3	
4.3.1 LMA no M3 con alteraciones recurrentes	46
4.3.2 LMA no M3 con cariotipo normal	46
4.4 Evaluación de la ERM en LPA	48
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	
Hipótesis	50
Objetivos	53
PACIENTES Y METODOS	
1. Sujetos de estudio	55

1.1 Pacientes con LMA cariotipo normal	55
1.2 Pacientes con LPA/LMA-M3	55
2. Protocolo de tratamiento	
2.1 Pacientes con LMA cariotipo normal	55
2.2 Pacientes con LPA/LMA-M3	56
3. Definición de remisión y recaída hematológica y molecular	56
4. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	57
5. RT-PCR cualitativa para <i>PML-RARα</i>	57
6. RQ-PCR cuantitativa para <i>PML-RARα</i> , <i>AML1-ETO</i> y <i>CBFβ-MYH11</i>	58
7. Detección de <i>FLT3-ITD</i>	58
8. Detección y cuantificación de mutaciones en <i>NPM1</i>	59
9. RQ-PCR para el análisis de expresión génica	59
10. Análisis estadístico	60

RESULTADOS

1. Marcadores con valor pronóstico en LMA cariotipo normal <i>Molecular Stratification Model For Prognosis In Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia (CN-AML) Enviado a Blood</i>	62
<i>High FOXO3A expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics (CN-AML). Enviado a Leukemia Research</i>	71
2. Marcadores con valor pronóstico en LPA/ LMA-M3 <i>The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2008; 93:1797-1805</i>	80
3. Enfermedad residual mínima (ERM) en LPA/ LMA-M3 <i>Using quantification of the PML-RARα transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2007; 92:315-322.</i>	90

DISCUSIÓN

1. Marcadores moleculares con valor pronóstico en LMA cariotipo normal	101
2. Marcadores moleculares con valor pronóstico en LPA/ LMA-M3	104
3. Enfermedad residual mínima (ERM) en LPA/ LMA-M3	106

CONCLUSIONES	109
---------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	111
---------------------	-----

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de las leucemias mieloblásticas agudas (LMA)

1.1 Definición de LMA

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) constituye un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas con diversas anomalías genéticas y marcadas diferencias en la respuesta al tratamiento. Representa la leucemia aguda más frecuente en adultos, con una incidencia aproximada de 2-3 casos/100000 al año, con un incremento progresivo con la edad, hasta alcanzar un pico de 12.6/100000 en pacientes mayores de 65 años (Lowenberg *et al*, 1999).

1.2 Clasificación de las LMA: morfológica FAB y OMS

Tradicionalmente, el diagnóstico y clasificación de las LMA se ha basado en criterios morfológicos y citoquímicos, dentro del sistema clásico Franco-Americano-Británico (FAB) (Cuadro 1) (Bennett *et al*, 1985). Sin embargo, los avances en el conocimiento y tratamiento de los últimos años han puesto de manifiesto la escasa utilidad clínica y significación pronóstica de este sistema, al incluir en un mismo subgrupo patologías de diversa etiología, pronóstico y tratamiento. En respuesta a este problema, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incorporó en su clasificación en 1999 las anomalías genéticas asociadas con los distintos subtipos de LMA, integrando la morfología, la citogenética y las alteraciones a nivel molecular para ser no sólo una herramienta útil desde el punto de vista del diagnóstico, sino también en el pronóstico y selección de tratamiento (Harris *et al*, 1999).

Cuadro 1. Clasificación FAB de las leucemias mieloblásticas agudas

Clasificación	Morfología	Frecuencia (%)
M0	LMA sin diferenciación	3
M1	LMA sin maduración	15-20
M2	LMA con maduración granulocítica	25-30
M3 y M3 variante	LPA hipergranular y LPA hipogranular	5-10
M4 y M4Eo	LMA mielomonocítica sin y con eosinófilos (Eo)	25-30
M5a y M5b	LMA monoblástica y LMA monocítica	2-10
M6	LMA eritroide	3-5
M7	LMA megacarioblástica	3-12

LMA: leucemia mieloblástica aguda; LPA: leucemia promielocítica aguda.

Las principales novedades del sistema de clasificación de la OMS es la reducción del porcentaje de blastos en la médula ósea necesario para realizar el diagnóstico de LMA, dejándolo en el 20%, y por primera vez la inclusión como entidades independientes de las leucemias con displasia multilineal o secundarias a un síndrome mielodisplásico y las leucemias con alteraciones citogenéticas recurrentes, fundamentalmente translocaciones e inversiones, dado su importante valor pronóstico (Harris *et al*, 1999).

Cuadro 2. Clasificación OMS de las leucemias mieloblásticas agudas

Clasificación	Subgrupo	Frecuencia (%)
LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes	LMA con t(8;21)(q22;q22)(<i>CBF-alpha/ETO</i>)	5-12
	LMA con t(15;17)(q22;q11-12) (<i>PML-RAR-alpha</i>) y variantes	10-15
	LMA con inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q11) (<i>CBF-beta/MYH11</i>)	5
	LMA con anomalías de 11q23 (<i>MLL</i>)	3-5
LMA con displasia multilineal	Con SMD previo	10-15
	Sin SMD previo	
LMA y SMD relacionados con tratamiento	Agentes alquilantes	5-10
	Inhibidores de la topoisomerasa II	
LMA no clasificables	LMA mínimamente diferenciada	40-50
	LMA sin maduración	
	LMA con maduración	
	Leucemia aguda mielomonocítica	
	Leucemia aguda monoblástica o monocítica	
	Leucemia aguda eritroide	
	Leucemia aguda megacarioblástica	
	Leucemia aguda basofílica	
Panmielosis aguda con mielofibrosis		
	Sarcoma mieloide	
Leucemia aguda bifenotípicas		<5

LMA: leucemia mieloblástica aguda; SMD: síndrome mielodisplásico.

1.3 Principales alteraciones citogenéticas de las LMA

El análisis citogenético de la LMA es considerado como uno de los factores diagnósticos y pronósticos más importantes (Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002). Estos estudios demostraron que las alteraciones citogenéticas tienen una marcada influencia en la presentación y evolución de la LMA. Así, los hallazgos a nivel del cariotipo o su contraparte molecular tienen un alto valor predictivo sobre las tasas de remisión completa (RC), la supervivencia libre de enfermedad (SLE) o riesgo de recaída (RR) y la supervivencia global (SG) (Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002) (Ver sección 1.4).

Son muchas las alteraciones descritas hasta la fecha, aunque en un buen porcentaje se desconoce su significado clínico, debido en cierto modo a su escasa incidencia. En el Cuadro 3 se enumeran las alteraciones más importantes descritas en las tres series de mayor relevancia, junto con su frecuencia.

Cuadro 3. Alteraciones citogenéticas más frecuentes en LMA

Alteración	MRC Grimwade <i>et al</i> , 1998 n = 1612 (%)	CALGB Byrd <i>et al</i> , 2002 n = 1213 (%)	SWOG/ECOG Slovak <i>et al</i> , 2000 n = 609 (%)
Normal	680 (42)	582 (48)	244 (40)
t(8;21)(q22;q22)	122 (8)	81 (7)	50 (8)
t(15;17) (q22;q11.2-q12)	198 (12)	18 (2)	27 (4)
inv(16)(p13q22) o t(16;16) (p13;q22)	57 (4)	96 (8)	53 (9)
Alteraciones en 11q23	60 (4)	54 (5)	42 (7)
Trisomía 8	48 (3)	41 (3)	25 (4)
t(6;9)(p23;q34)	--	8 (0,7)	11 (2)
t(9;22)(q34;q11)	--	--	7 (1)
Alteraciones en 3q	40 (3)	12 (1)	12 (2)
Alto riesgo*	163 (10)	248 (22)	106 (20)

MRC: Medical Research Council; CALGB: Cancer and Leukemia Group B; SWOG/ECOG: Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group.

* Alto riesgo: Incluye LMA con cariotipo complejo, deleciones de 5q, 7q, monosomías del 5, y 7, entre otras.

Algunas de estas alteraciones tienen especial importancia por su frecuencia, sus características clínicas y biológicas y su respuesta al tratamiento. A continuación se describen las más relevantes dentro de la clasificación de la OMS.

1.3.1 LMA con t(8;21)(q22;q22) (AML1/ETO)

Es una de las translocaciones recurrentes más frecuentes. Su prevalencia está entre el 5 y 12% de los casos de LMA. Desde el punto de vista morfológico se trata de una leucemia que suele mostrar maduración granulocítica, aunque se han descrito casos sin maduración o con diferenciación monocítica (Brunning, 2003; Downing, 1999). Puede presentarse en forma de sarcomas granulocíticos. La demostración de la alteración citogenética supone su catalogación como LMA, aunque el recuento de blastos en médula ósea sea menor al 20% (en ese caso no se consideraría como anemia refractaria con exceso de blastos –AREB-). Además de los marcadores mieloides suele expresar con frecuencia CD19 en una subpoblación de blastos. También pueden expresar CD56 y se ha sugerido que este marcador podría estar asociado con un peor pronóstico (Baer *et al*, 1997).

La traslocación t(8;21) involucra al gen *AML1*, conocido también como *RUNX1*, que codifica el “core binding factor- α ” (CBF α) de transcripción, y el gen *ETO* (ocho veintiuno, por su acrónimo en inglés) (Downing, 1999). Este tipo de LMA suele relacionarse con una buena respuesta a la quimioterapia y con una elevada tasa de remisión completa con supervivencia a largo plazo cuando se administra tratamiento con alta dosis de citarabina en la fase de consolidación. Las anomalías cromosómicas adicionales son comunes, por ejemplo, pérdida de un cromosoma sexual y del(9)(q22) (Downing, 1999).

1.3.2 LMA con inv(16)(p13q22) o t(16;16) (p13;q22)(CBF β /MYH11)

Comprende aproximadamente un 10-12% de todas las LMA. Se caracteriza morfológicamente por mostrar diferenciación monocítica y granulocítica y por la presencia de una población eosinófila anormal en la médula ósea que presenta gránulos eosinófilos inmaduros, más evidentes en los estadios de promielocito y mielocito. Estos gránulos muestran positividad a naftol ASD cloracetato esterasa.

Ocasionalmente se han reportado casos de LMA con inv(16) sin eosinofilia y mostrando sólo diferenciación mieloide o monocítica (Brunning, 2003; Marlton *et al*, 1995). De la misma manera que en la LMA con t(8;21), un recuento de blastos en médula ósea que no alcance el 20% es considerado como LMA ante la presencia de la correspondiente alteración citogenética. Tanto la inv(16) como la t(16;16)(p13;q22) resultan en la fusión de los genes *CBFβ* (16q22) y *MYH11* (16p13). En ocasiones, pacientes con características morfológicas sugestivas de este cuadro no presentan alteraciones del cromosoma 16 pero sí la contrapartida molecular *CBFβ/MYH11*. Los pacientes con inv(16) o t(16;16)(p13q22) tienen un pronóstico más favorable que otras LMA alcanzando altas tasas de RC y mayor SLE con esquemas que incluyen ARA-C a altas dosis (Grimwade *et al*, 1998; Bloomfield *et al*, 1998; Byrd *et al*, 2002).

1.3.3 LMA con alteraciones de 11q23 (gen *MLL*)

La LMA con anomalías en el 11q23 comprende del 4% al 7% de los casos de LMA y se relaciona, en general, con características monocíticas. Dos subgrupos clínicos de pacientes tienen una frecuencia alta de LMA con anomalías en el 11q23: LMA en los lactantes y LMA en relación con el tratamiento, en general después del tratamiento con inhibidores de la ADN-topoisomerasa (Archimbaud *et al*, 1998; Broeker *et al*, 1996). Estos pacientes pueden presentar coagulopatía intravascular diseminada (CID) y sarcomas monocíticos extramedulares o infiltración de los tejidos (gingiva, piel).

El gen *MLL* (Myeloid/Lymphoid leukemia) situado en 11q23 es un regulador del desarrollo y se ha observado fusionado con una gran variedad de genes en diversos cromosomas (Broeker *et al*, 1996; Shih *et al*, 2006a). En general, es difícil determinar las categorías de riesgo y los pronósticos para traslocaciones individuales de 11q23 debido a la falta de estudios realizados con números significativos de pacientes; no obstante, se ha observado que los pacientes con t(11;19)(q23;p13.1) tienen pronóstico adverso (Byrd *et al*, 2002).

1.3.4 LMA con t(15;17)(q22;q11.2-q12) y variantes moleculares (LPA/LMA-M3)

La leucemia promielocítica aguda (LPA) constituye aproximadamente un 15% de todas los casos de leucemias mieloides aguda (LMA), con una mayor incidencia (20-30%) en los países mediterráneos y en América Latina (Avvisati *et al*, 1991; Douer *et al*, 1996; Chillon *et al*, 2001). La LPA se caracteriza por un predominio de promielocitos malignos que muestran una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 15 y 17, t(15;17)(q22;q11.2-q12)(Figura 1) (Rowley *et al*, 1977; de The *et al*, 1990). Como consecuencia de esta translocación se produce una fusión del gen situado en el locus 15q22 (que recibe el nombre de *PML* - *ProMyelocytic Leukemia*-) con el gen que codifica para el receptor α del ácido retinoico (*RAR α*), localizado en 17q12-21. De esta manera, se forma un gen híbrido *PML-RAR α* , que está presente en el 92-95% de los casos de LPA y su recíproco, *RAR α -PML* que se presenta en el 60% de los casos (Grimwade & Lo-Coco, 2002; Lo-Coco *et al*, 1999). Además, en el 1-5 % de LPA se han descritos otras variantes moleculares, que afectan tanto al gen *RAR α* como al gen *PML* pero con puntos de rotura diferentes de los clásicos (Chillon *et al*, 2000; Grimwade *et al*, 2000) o bien otro gen distinto. Entre estos últimos se encuentra el gen *PLZF* (*promyelocytic zinc finger*), la nucleofosmina (*NPM1*) en menos de 1% y otros menos frecuentes como el *NuMA* (nuclear mitotic apparatus) o el *STATb* asociados con traslocaciones t(11;17)(q23;q21), t(5;17)(q35;q12-21), t(11;17)(q13;q21) y der(17) (Grimwade & Lo-Coco, 2002).

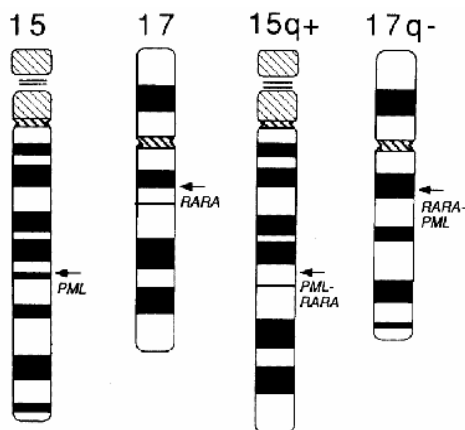


Figura 1. Representación esquemática de la fusión de los genes *PML* y *RAR α* .

La expresión del gen *PML-RAR α* produce una proteína que contiene los dominios de dimerización y de unión al DNA del *PML* nativo, y los dominios de unión al DNA y a otros ligandos del *RAR α* . Esta molécula quimérica actúa sobre la arquitectura nuclear del promielocito, produciendo la ruptura de los llamados cuerpos nucleares de la *PML* que contienen los dominios oncogénicos de *PML* (*POD*, por su acrónimo en inglés), que son componentes estructurales críticos para el desarrollo celular, provocando que la maduración del promielocito quede bloqueada y no pueda seguir la diferenciación celular mieloide (Piazza *et al*, 2001). Además, esta desorganización afectaría el reclutamiento de proteínas pro-apoptóticas en los *POD* y con ello se bloquearía el proceso apoptótico (Zelent *et al*, 2001).

1.4 Valor pronóstico de las alteraciones citogenéticas en LMA

La importancia de la citogenética en el pronóstico de las LMA ha sido demostrado en diversos estudios que evalúan un número elevado de enfermos, permitiendo estratificar a los pacientes con LMA en tres grupos de riesgo (favorable, intermedio y desfavorable) en función de las alteraciones encontradas en el cariotipo (Cuadro 4) (Grimwade *et al*, 1998; Byrd *et al*, 2002; Grimwade *et al*, 2001; Grimwade *et al*, 1998; Slovak *et al*, 1995; Slovak *et al*, 2000). Aunque la edad sigue siendo un factor pronóstico muy importante, la clasificación citogenética mantiene su valor en todos los grupos de edad en los que se aplica.

Estos grupos estratificados permiten establecer diferencias significativas en todos los índices de respuesta al tratamiento, incluyendo las tasas de remisión completa (RC), el riesgo de recaída (RR) y la supervivencia global (SG). Así, los trabajos del Medical Research Council (MRC) (Grimwade *et al*, 1998), Cancer and Leukemia Group B (CALGB) (Byrd *et al*, 2002) y el Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group (SWOG/ECOG) (Slovak *et al*, 2000) describen para el grupo de bajo riesgo una tasa de RC entre 84 y 91%, un RR a 5 años entre 21 y 35% y una supervivencia global (SG) entre 55 y 65% a los 5 años. Para el grupo intermedio dichos indicadores comprenden un rango de 76-86% (RC), 51-67% (RR) y 24-41% (SG); mientras que el grupo de pronóstico adverso sería de 32-63% (RC), 76-92% (RR) y 5-14% (SG).

Cuadro 4. Grupos de riesgo según los hallazgos citogenéticos. (Modificado de (Mrozek & Bloomfield, 2006))

Grupos de riesgo	Tipo de alteración	Descripción	
Favorable	Estructural balanceada	t(15;17)(q22;q12-21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	
Intermedio		Cariotipo normal*	
	Estructural balanceada	t(9;11)(p22;q23)†	
	Estructural no balanceada	del(7q) † del(9q) †	del(11q)/ Alteraciones en 11q23 † del(20q) †
	Numérica	-Y +8 +11	+13 +21 +22
Desfavorable		Cariotipo complejo¶	
	Estructural balanceada	inv(3)(q21q26) /t(3;3)(q21;q26) t(6;9)(p23;q34)	t(6;11)(q27;q23)** t(11;19)(q23;p13.1)** t(9;22)(q34;q11)
	Estructural no balanceada	Alteración en 3q del(5q) del(7q)	Alteración en 17p Alteración en 20q Alteración en 21q
	Numérica	-5	-7

Grupo de riesgo desfavorable: En negro las alteraciones en las que existen consenso entre las distintas clasificaciones (Slovak *et al*, 1995;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002).

* Ausencia de anormalidades clonales en 20 ó mas células de medula ósea en metafase.

† Clasificado como pronóstico adverso por algunos autores (Slovak *et al*, 1995;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002).

|| Clasificado como pronóstico adverso respecto a supervivencia global (Slovak *et al*, 1995;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002).

¶ Definido como la presencia de 3 o más anormalidades en el cariotipo, excluyendo inv(16), t(16;16), t(8;21), t(15;17) o t(9;11).

** Podría ser incluidas como riesgo intermedio, dentro de "alteraciones en 11q23" (Slovak *et al*, 1995;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002).

Dejando al margen la LPA, sólo dos alteraciones se asocian a un pronóstico favorable, la t(8;21) y la inv(16) (Slovak *et al*, 1995;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002). Ambas alteraciones codifican dos heterodímeros del "core binding factor", CBF α y CBF β (Nguyen *et al*, 2002;Delaunay *et al*, 2003). Prácticamente todos los pacientes con t(8;21) alcanzan RC (98%) y muestran

un RR y SG mejor que el resto de grupos (Slovak *et al*, 1995;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002). Las tasas de RC en los pacientes con inv(16) es más baja y no se diferencia significativamente de la observada en pacientes con cariotipo normal. Sin embargo, este fenómeno no se debe a un mayor número de casos que muestren resistencia al tratamiento, sino a una mayor mortalidad durante la inducción (12%), lo que probablemente guarda relación con la mayor tendencia a la hiperleucocitosis observada al diagnóstico en este tipo de leucemias (Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002). Parece que las alteraciones citogenéticas adicionales en pacientes con t(8;21) o inv16 no tienen una influencia importante en el pronóstico, aunque las mutaciones de los genes *FLT3* y *KIT* sí parece que inciden negativamente sobre el RR y la SG (Boissel *et al*, 2006).

De manera opuesta a los pacientes con t(8;21) e inv(16), los pacientes con alteraciones etiquetadas como de mal pronóstico muestran un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción, a lo que se suma una alta probabilidad de recidiva y en consecuencia una baja SG (Slovak *et al*, 1995;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 2000;Grimwade *et al*, 2001;Byrd *et al*, 2002).

En medio queda un grupo altamente heterogéneo, que comprende a la mayoría de pacientes con LMA y que está constituido fundamentalmente por los pacientes con cariotipo normal (Grimwade *et al*, 1998;Byrd *et al*, 2002;Grimwade *et al*, 2001;Grimwade *et al*, 1998;Slovak *et al*, 1995;Slovak *et al*, 2000). Junto a estos pacientes, aparecen otras mutaciones cuya correlación con el pronóstico es complicada, bien por la gran variabilidad de transcritos a que dan lugar, la asociación con otras alteraciones o la baja frecuencia con que aparecen. Como ejemplo de la primera situación están las anomalías de 11q23 que típicamente generan una disrupción del gen *MLL* que a su vez tiene múltiples dianas con las que fusionarse (Archimbaud *et al*, 1998;Muñoz *et al*, 2003;Shih *et al*, 2006a). Por otra parte, las alteraciones del grupo intermedio que vayan en compañía de alteraciones de buen pronóstico pasan a ser consideradas como favorables en esos casos y viceversa con las que se acompañan de alteraciones de mal pronóstico. Un ejemplo es la del(9q), la cual si aparece concomitante a la t(8;21), no modifica el buen pronóstico del paciente (Grimwade *et al*, 1998).

1.5 Características clínicas de la LMA

1.5.1 Presentación clínica de la LMA no M3

La LMA no M3 se caracteriza por la proliferación de células blásticas anormales de estirpe mieloide en la médula ósea y menor producción de células hemáticas normales, condicionando anemia y trombopenia. Comprende el 80 % de las leucemias agudas en adultos y del 15-20 % en niños (Pui *et al*, 2004). El riesgo aumenta diez veces a partir de los 30 años (cerca de un caso cada 100.000 personas) hasta la edad de 70 años (cerca de 1/10.000 personas) (Lowenberg *et al*, 1999).

Los pacientes con LMA no M3 cursan con una serie de síntomas inespecíficos, de aparición gradual o abrupta, como consecuencia de la pancitopenia (anemia, alteración en el número y funcionalidad de los leucocitos y trombocitopenia) que se produce por infiltración del clon tumoral en la médula ósea. En muchos casos esta sintomatología aparece al menos 3 meses antes de que la leucemia sea diagnosticada, con signos de fatiga, debilidad, anorexia o pérdida de peso. Además se puede documentar fiebre en un 10% de los casos, sangrados (5%), así como dolor de huesos, linfadenopatías, dolor de cabeza y diaforesis (Lowenberg *et al*, 1999). Ocasionalmente pueden existir síntomas meníngeos por infiltración del SNC (más frecuente en LMA-Monocíticas y LMA hiperleucocitarias) e hipertrofia gingival y lesiones cutáneas (más frecuente en LMA-Monocíticas) (Lowenberg *et al*, 1999).

Los hallazgos en la exploración física incluyen fiebre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatías y posibles focos de infección y hemorragias. Desde el punto de vista hematológico, se observa una anemia de leve a severa, por lo general normocítica normocrómica, debida generalmente a la eritropoyesis disminuida y ocasionalmente a sangrado. La mediana del conteo de leucocitos es de $15 \times 10^9/L$; 25-40% de los pacientes tiene conteos menores a $5 \times 10^9/L$, mientras que el 20% presentan conteos superiores a $100 \times 10^9/L$. Los recuentos plaquetarios en el 75% de los pacientes son menores de $100 \times 10^9/L$, observándose una trombocitopenia severa ($< 25 \times 10^9/L$) en cerca del 25% de los casos (Lowenberg *et al*, 2003; Lowenberg *et al*, 1999). Así, los factores clínico-biológicos cuyo impacto pronóstico desfavorable está ampliamente documentado en LMA no M3 son los recuentos leucocitarios superiores a $50 \times 10^9/L$ y la edad superior a 60 años (Lowenberg *et al*, 1999).

1.5.2 Presentación clínica de la LPA/LMA-M3

Los pacientes con LPA presentan un promedio de edad de aproximadamente 40 años, el cual es menor que el resto de leucemias mieloides agudas, aunque se puede encontrar casos tanto en niños como ancianos.

La característica clínica más relevante es la sintomatología hemorrágica (hematomas, sangrado en puntos de venopunción) y se caracteriza por una reducción importante de los factores de coagulación, especialmente fibrinógeno, producto de una acelerada fibrinólisis, que puede degenerar en una coagulopatía de consumo (Sanz *et al*, 2005b). De hecho, aunque su incidencia es baja (aproximadamente del 10%), las hemorragias cerebrales letales siguen siendo la causa de la mayor mortalidad durante la fase de inducción (Grimwade & Lo-Coco, 2002; Sanz *et al*, 2004). Inicialmente este síndrome se definía como una coagulación intravascular diseminada, pero los hallazgos de laboratorio (aumento de los productos de degradación de la fibrina y fibrinógeno, reducción en el número de plaquetas y niveles del inhibidor A₂ de la plasmina) apuntan a un proceso fibrinolítico-proteolítico alterado. El hallazgo que los promielocitos en la LPA expresan anexina II (un receptor de membrana para el plasminógeno y para el t-PA) lo que se traduce en una activación del plasminógeno a plasmina, confirma una fibrinólisis anormal con la correspondiente diátesis hemorrágica (Menell *et al*, 1999). Otras características clínicas importante son la leucopenia (80% de los casos) y con menor frecuencia, procesos infecciosos febriles (15-30% de los casos) y síntomas asociados a anemia (Sanz *et al*, 2005b).

Diversas características han sido asociadas con un peor pronóstico en los pacientes con LPA, entre los cuales se pueden mencionar la edad avanzada (Asou *et al*, 1998; Burnett *et al*, 1999; Sanz *et al*, 1999), el sexo masculino (Tallman *et al*, 2002a); así como ciertos parámetros clínicos como la morfología variante hipogranular de LMA-M3 (Gallagher *et al*, 1997; Tallman *et al*, 2002a), la isoforma V o S del *PML-RAR α* (Gonzalez *et al*, 2001; Jurcic *et al*, 2001), mutaciones en el gen *FLT-3* (Callens *et al*, 2005; Chillon *et al*, 2004; Gale *et al*, 2005; Yoo *et al*, 2006), ciertos marcadores de membrana como el CD56 (Baer *et al*, 1997; Murray *et al*, 1999; Ferrara *et al*, 2000), los recuentos de leucocitos elevados ($>10 \times 10^9/L$) (Ades *et al*, 2008; Burnett *et al*, 1999; Fenaux *et al*, 1999; Jurcic *et al*, 2001; Sanz *et al*, 1999; Tallman *et al*, 2002a) y la

presencia de trombopenia ($<40 \times 10^9/L$) (Sanz *et al*, 2004). Sin embargo, el único parámetro de consenso sobre una fuerte asociación con riesgo de recaída son los leucocitos por encima de $10 \times 10^9/L$ (Sanz *et al*, 2005b; Ades *et al*, 2008; Sanz *et al*, 2008).

1.6 Tratamiento de las LMA

1.6.1 Primera línea de tratamiento de las LMA no M3

El tratamiento de la LMA se basa en el uso de quimioterapia para la inducción a la remisión y una vez obtenida ésta, y con el fin de disminuir la probabilidad de recaída, se administra una terapia postremisión que puede adaptarse al riesgo con base fundamentalmente a las distintas alteraciones citogenéticas y moleculares existentes, así como a la enfermedad residual mínima (ERM). La edad y la comorbilidad son factores a tener en cuenta a la hora de iniciar y/o elegir el tipo de régimen quimioterapéutico. Así en pacientes >70 años con datos citogenéticos de mal pronóstico (Ej. delección del cromosoma 7), no estaría indicado iniciar tratamiento clásico y al paciente se debe proponer para tratamiento paliativo o bien su inclusión en ensayos terapéutico con nuevas drogas.

El esquema clásico para el tratamiento de inducción se basa en la combinación de arabinósido de citosina (ARA-C) y antraciclinas, en un régimen conocido como “3+7”, con la infusión continua de ARA-C, un agente que bloquea el ciclo celular en fase S, a 100 mg/m^2 por 7 días más la antraciclina daunorrubicina, administrado intravenosamente a $45\text{--}60 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ por 3 días. Con este régimen se alcanzan tasas de RC de 60-80% en paciente jóvenes ($\leq 55\text{--}60$ años) con SG a los 5 años (30-40%) (Tallman *et al*, 2005). En el grupo de mayor edad ($> 55\text{--}60$ años), los índices de RC son del 40%–55%, con una menor SG (10%–15%) (Tallman *et al*, 2005; Tallman, 2005). Aunque algunas estrategias como el “priming” o administración de citoquinas en los pacientes de riesgo intermedio o el uso de altas dosis de ARA-C en pacientes de alto riesgo podrían aportar algunas ventajas con respecto al esquema tradicional, la realidad es que no se ha observado mejoras sustanciales con esquemas quimioterapéuticos alternativos o con incrementos en las dosis de las fármacos tradicionales (Estey *et al*, 2001; Cassileth *et al*, 2005).

Durante la terapia postremisión o de consolidación, la intensificación del tratamiento con 3 ó 4 ciclos de ARA-C a altas dosis parece mejorar los resultados en pacientes jóvenes (<60 años), especialmente en aquellos con citogenética de pronóstico favorable; por el contrario, su beneficio es menor en pacientes con cariotipo de riesgo intermedio o alto, o bien con la presencia de mutaciones en *FLT3* (Tallman *et al*, 2005). En pacientes de más edad, varios estudios del CALGB (Cancer and Leukemia Group B) (Byrd *et al*, 2002), MRC (Medical Research Council) (Grimwade *et al*, 1998) y GAMLCOG (German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Oncology Group) (Buchner *et al*, 1999), no mostraron una mejoría en los resultados con el incremento de las dosis o del número de ciclos de ARA-C.

Dado los malos resultados de la quimioterapia convencional, en pacientes jóvenes se debe plantear la posibilidad de realizar un trasplante alogénico (ver Apartado 1.6.3) en primera remisión completa excepto en pacientes con citogenética de buen pronóstico y sin otros datos clínicos adversos (Ej. Hiperleucocitosis).

1.6.2 Primera línea de tratamiento de la LPA/LMA-M3

El tratamiento estándar de inducción de la LMA-M3 se basa en la administración continua de ATRA a dosis de 45mg/m²/día en combinación con una antraciclina hasta alcanzar remisión completa (RC) (Avvisati *et al*, 1996; Tallman *et al*, 2002a; Sanz *et al*, 1999), definida ésta como la normalización de los recuentos hematológicos en sangre periférica, así como la presencia de menos de un 5% de células blásticas en médula ósea (MO) (Sanz *et al*, 1999). El complemento de la antraciclina es para reforzar la inducción y prevenir el *síndrome ATRA* que consiste en un cuadro tóxico agudo con fiebre, disnea, aumento de peso, infiltrados pulmonares y efusiones pericárdicas o pleurales con o sin leucocitosis, que puede llegar a ser fatal sino se trata con dosis altas de esteroides tipo dexametasona (Sanz & Lo-Coco, 2005).

Una vez alcanzada la RC se han propuestos diferentes tratamientos de consolidación y de mantenimiento para conseguir la curación de estos pacientes. Entre los esquemas descritos, los propuestos por el grupo italiano GIMEMA (Avvisati *et al*, 1996; Martinelli *et al*, 1998) y español PETHEMA (Sanz *et al*, 1999; Sanz *et al*, 2004; Sanz *et al*, 2008) son dos ejemplos de muy buenos resultados. Ambos se basan

en la administración de tres ciclos de consolidación de quimioterapia basados en antraciclina seguidos de terapia de mantenimiento con ATRA (45mg/m²/día x 15 días cada 3 meses) combinado con mercaptopurina (100mg/m²/día) y metotrexato (10mg/m²/sem) durante 2 años. Estudios posteriores han permitido introducir algunos cambios que han mejorado los resultados iniciales. Los dos principales cambios son la necesidad de administrar Ara-C junto a la antraciclina en la consolidación pero sólo en los pacientes de alto riesgo y la adición de ATRA en los tres ciclos de mantenimiento en todos los pacientes independiente de sus factores de riesgo (Sanz *et al*, 2004). Posteriormente, los protocolos PETHEMA indican una terapia de mantenimiento con ATRA (45mg/m²/día x 15 días cada 3 meses) combinado con mercaptopurina (100mg/m²/día) y metotrexato (10mg/m²/sem) durante 2 años. Con estos esquemas de tratamiento global se logran resultados excelentes, con un riesgo de recidiva del 5-10% y una supervivencia libre de enfermedad a los 4 años del 90%, si bien estos resultados son diferentes según los grupos de riesgo establecidos por diferentes factores pronósticos -ver Apartado 1.5.2-(Sanz *et al*, 1999;Sanz *et al*, 2004).

1.6.3 Transplante de precursores hematopoyéticos

El transplante de precursores hematopoyéticos (TPH) alogénico constituye una parte muy importante dentro del esquema terapéutico de la LMA. Su efecto inmunogénico a través de la reacción injerto contra tumor contribuye a que este procedimiento se asocie a una tasa de recaídas inferior a la obtenida sólo con quimioterapia, con SLR a los 3 años entre 15 y 40% (Cornelissen & Lowenberg, 2005). Sin embargo, la mortalidad debida a toxicidad, infecciones o enfermedad del injerto contra el huésped hace que ese mayor efecto antileucemia no siempre se traduzca en una ventaja clínica real. Es por tanto necesario buscar la mejor relación riesgo/beneficio a la hora de indicar el TPH alogénico para el tratamiento de LMA (Perez-Simon *et al*, 2006).

En general se considera que el TPH alogénico de hermano HLA-idéntico en primera remisión completa es una opción adecuada para los pacientes LMA de riesgo intermedio y alto riesgo, dada la alta probabilidad de recaída (Cornelissen & Lowenberg, 2005). En los pacientes de alto riesgo y ante la ausencia de un familiar HLA-idéntico sería razonable el trasplante de donante no emparentado debido a los malos resultados

obtenidos con quimioterapia (Cornelissen & Lowenberg, 2005). En pacientes de citogenética favorable, y de forma general, no se recomendaría el TPH alogénico de hermano HLA-idéntico en primera línea, reservándose esta opción en caso de recaída (Cornelissen & Lowenberg, 2005; Sanz *et al*, 2007).

En el caso del TPH autólogo, se ha sugerido la administración de uno o dos ciclos de quimioterapia postremisión seguidos de un TPH autólogo podría ser una alternativa adecuada en pacientes jóvenes, aunque por el momento no esté del todo claro el papel del TPH autólogo frente a la quimioterapia sola (Breems & Lowenberg, 2007).

1.6.4 Tratamiento de la LMA en recaída

Diversos factores influyen de forma importante en el riesgo de recaída en los pacientes con LMA (Cuadro 5). Las diferentes opciones terapéuticas para dichos individuos incluyen la quimioterapia de rescate, el TPH y la utilización de fármacos en investigación. Con tratamiento de rescate se obtienen tasas de segunda RC que oscilan entre el 40-60%, con una de supervivencia global mediana entre 3-12 meses (Tallman, 2007). Las combinaciones terapéuticas incluyen habitualmente dosis altas de citarabina y sus resultados mejoran si se realiza posteriormente un TPH. Otro esquema es la utilización de fludarabina, dosis intermedias de citarabina y factor estimulante de colonias (G-CSF) (régimen FLAG) con SG a los 24 meses cercanas al 40% en pacientes de LMA mayores de 60 años (Ossenkoppele *et al*, 2004).

Cuadro 5. Factores de pronóstico adverso de recaída en pacientes con LMA¹

Edad (> 60 años)
Leucocitos al diagnóstico (> 50 × 10 ⁹ /L)
Citogenética de riesgo intermedio o alto
Mutaciones en el gen <i>FLT3</i>
Duración de la primera RC (< 12 meses)
Respuesta a la quimioterapia (morfológica, citogenética o detección de enfermedad residual mínima)

¹ Para LPA sólo aplica leucocitosis >10 × 10⁹/L como factor de riesgo de consenso, además de otros parámetros discutidos en el Apartado 1.5.2

En el caso de la LPA, los buenos resultados obtenidos con el tratamiento combinado de quimioterapia y ATRA no incluye a todos los pacientes, pues entre un 10-15% de ellos recaen siendo, por el contrario, excepcional que los enfermos sean refractarios primarios al tratamiento. Entre las posibles causas de recaída se ha propuesto, entre otras, que la administración oral crónica de ATRA produce un descenso progresivo de la concentración plasmática del fármaco, lo que puede condicionar la recidiva y resistencia en algunos pacientes. Además, el incremento de la dosis de ATRA en esta situación no es capaz de revertir la resistencia (Fenaux *et al*, 1999; Muindi *et al*, 1992; Tallman *et al*, 2002a). Para estos pacientes se han propuestos diversos tratamientos de rescate entre los que se incluyen la administración de quimioterapia que incluya Ara-C a dosis intermedias seguida de autotrasplante si el paciente logra negativizar la detección del gen de fusión *PML-RAR α* por RT-PCR o bien realizar un alotrasplante si el paciente es joven y dispone de donante HLA idéntico (Sanz *et al*, 2007). Más recientemente se ha incorporado al arsenal terapéutico el trióxido de arsénico (As_2O_3) que en la actualidad se considera el tratamiento de elección en los pacientes en recidiva o resistente al ATRA (Zhang *et al*, 2001; Zhou *et al*, 2005).

1.6.5 Nuevos fármacos en estudio

Un resumen de los nuevos fármacos que están siendo estudiados para su aplicación en pacientes con LMA se presenta en el Cuadro 6 (Tallman, 2005). De estas nuevas terapias merece especial atención el anticuerpo monoclonal gentuzumab ozogamicina (GO o Mylotarg[®]), por haber sido aprobado por la FDA como agente único para el tratamiento de la LMA en primera recaída en pacientes mayores de 60 años no candidatos a quimioterapia intensiva a la dosis de 9 mg/m² IV infundidos en 4 horas en los días 1 y 15 (Tallman, 2005; Tallman, 2007; Tsimberidou *et al*, 2006). GO es una inmunoglobulina (IgG₄) humanizada y sintetizada a partir de una línea celular de mieloma de mamífero, que se dirige frente al antígeno CD33. Esta inmunoglobulina se une covalentemente a un potente antibiótico antitumor semisintético denominado caliqueamicina. La unión de GO a CD33 se sigue de la endocitosis del anticuerpo, endocitosis que está en función del número de moléculas CD33 en la superficie celular. Una vez dentro, la caliqueamicina es liberada intracelularmente por un proceso de hidrólisis ácida en los lisosomas y causa detención en fase G2, fosforilación de Chk1/Chk2 y/o apoptosis a través de la activación de caspasas (Tallman, 2005; Tallman,

2007;Tsimberidou *et al*, 2006). En el caso de LPA, estudios in-vitro con líneas celulares NB4 (portadoras de la traslocación t(15;17)) resistentes a ATRA y arsénico y con células de pacientes LPA en recidivas, el GO indujo la apoptosis de las células tumorales con un efecto dependiente de dosis (Takeshita *et al*, 2005). Esta buena respuesta es reproducida en pequeñas series de 3, 8 y 16 pacientes LPA en recaída molecular (Aribi *et al*, 2007;Breccia *et al*, 2007;Lo-Coco *et al*, 2004). La toxicidad más importante que se ha detectado es la mielosupresión prolongada y hasta un 10% de casos de enfermedad venooclusiva hepática (Lo-Coco *et al*, 2004).

Cuadro 6. Nuevos agentes terapéuticos para pacientes con LMA. Revisado en (Tallman, 2005)

Actividad	Fármaco	Diana
Anticuerpos monoclonales	Gemtuzumab	CD33
Inhibidores de la resistencia a multidrogas	PSC-833, Ciclosporina A, Zosuquidar	MDR, Pgp
Inhibidores de la farnesil transferasa	Tipifarnib	Lamin A, HJJ-2 Rho B, CENP-E and CENP-F, lamins A and BRas
Inhibidores de tirosincinasa	CEP-701, PKC412, MLN518 y SU11248 Imatinib	FLT3-ITD c-Kit
Inhibidores de las histonas deacetilasas (HDAC)	Acido valproico Tricostatina A	HDAC
Agentes antiangiogénicos	Bevacizumab	VEGF
Inhibidores de apoptosis	Genasense	Bcl-2
Análogos de deoxi-adenosina	Clofarabine	ADN

Otras alternativas que han sido evaluadas para el tratamiento de la LMA son:

a) Los inhibidores de la FLT-3, algunos de los cuales se encuentran en estudios de fase clínica I-II [CEP-701 (Cephalon), MLN518 (Millenium), PKC412 (Novartis) y SU5416 (Sugen)], aunque ninguno es verdaderamente específico para el FLT-3 ya que inhiben otras tirosincinasas (Stirewalt & Radich, 2003) y los resultados preliminares están limitados a series pequeñas de LMA en recaída o refractaria (Brown *et al*, 2006;Smith *et al*, 2004) o líneas celulares de LLA (Brown *et al*, 2006;Smith *et al*, 2004).

b) Los inhibidores de la farnesil-transferasa, que actúan bloqueando la farnesilación de las proteínas RAS que éstas necesitan para anclarse a la membrana y ejercer sus acciones. Los compuestos más conocidos son R115777

(tipifarnib, ZarnestraTM) administrado por vía oral y BMS-214662 (i.v.) que se encuentran en estudio fase I-II en distintos centros (Cortes *et al*, 2005; Harousseau *et al*, 2007).

c) Los inhibidores de histona desacetilasa (HDAC): Los inhibidores de la HDAC tales como el ácido valproico logran restaurar la actividad transcripcional en células LMA, cuyo efecto es sinérgico a la administración de ATRA (Bug *et al*, 2005). Incluso, en células LPA resistentes a ATRA o portadoras del gen de fusión *PLZF-RAR α* son inducidas a diferenciarse con la adición de tricostatina A (Petti *et al*, 2002).

2. Alteraciones moleculares con valor pronóstico en LMA cariotipo normal

El desarrollo de la LMA conlleva una serie de alteraciones genéticas y cambios epigenéticos que afectan los mecanismos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Aunque las técnicas citogenéticas permiten establecer tres grupos de riesgo (Grimwade *et al*, 1998; Slovak *et al*, 2000; Grimwade *et al*, 2001; Byrd *et al*, 2002), dentro de cada clasificación existen subgrupos con un tipo de biología y evolución clínica diferente entre sí. Quizás el grupo más relevante son aquellos pacientes con LMA que presentan un cariotipo normal (LMA-CN), los cuales carecen de marcadores de diagnóstico diferencial o pronóstico (Grimwade *et al*, 1998; Slovak *et al*, 2000; Grimwade *et al*, 2001; Byrd *et al*, 2002). Por lo tanto, es importante integrar nuevos marcadores moleculares incluyendo genes con mutaciones recurrentes o variaciones en su expresión, que permitan establecer una clasificación más precisa de las LMA y estratificar adecuadamente aquellos pacientes que presenten un cariotipo normal (ver Cuadro 7) (Baldus *et al*, 2007b; Mrozek & Bloomfield, 2006; Mrozek *et al*, 2007; Haferlach *et al*, 2007)

Cuadro 7. Principales alteraciones moleculares en pacientes con LMA. Revisado en: (Baldus *et al*, 2007b; Mrozek & Bloomfield, 2006; Mrozek *et al*, 2007; Haferlach *et al*, 2007; Greiner *et al*, 2006; Steudel *et al*, 2003; Leroy *et al*, 2005b; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b)

Mutaciones					
Símbolo del gen	Nombre	Localización cromosómica	Incidencia en LMA	Incidencia en LMA-CN	Impacto pronóstico
<i>FLT3</i>	Fms-related tyrosin kinase 3	13q12	ITD=28-33% TKD=2-5%	ITD=40% TKD=5-14%	Adverso
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin	5q35	30-35%	46-62%	Favorable
<i>MLL</i>	Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage leukemia	11q23	PTD=5%	PTD=8-11%	Adverso
<i>CEBPA</i>	CCAAT/enhancer binding protein alpha	19q13.1	12%	15-19%	Favorable
<i>N-RAS</i>	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	1p13.2	10%	9%	Incierto
<i>KIT</i>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Kit (CD117)	4q11-q12	1-2%	6-10% en LMA t(8;21)	Adverso
Sobreexpresión					
Símbolo	Nombre	Localización cromosómica	Incidencia en LMA	Incidencia en LMA-CN	Impacto pronóstico
<i>BAALC</i>	Brain and acute leukemia gene, cytoplasmatic	8q22.3	---	65%	Adverso
<i>ERG</i>	v-ets erythoblastosis virus E26 oncogene-like (avian)	21q22.3	---	---	Adverso
<i>EVI1</i>	Ecotropic viral integration site	3q26	14%	---	Adverso
<i>MN1</i>	Meningioma 1	22q11-12.1	---	---	Adverso
<i>PRAME</i>	Preferentially expressed antigen of melanoma	22q11.22	30-64%	---	Favorable
<i>RHAMM</i>	Receptor for hyaluronic acid mediated motility	5q33.2	70%	---	??
<i>WT1</i>	Wilms tumor gene	11p13	80-93%	---	Adverso

LMA: leucemia mieloblástica aguda/ LMA-CN: LMA con cariotipo normal

2.1 Mutaciones

2.1.1 Alteraciones en el gen *FLT3*

El gen de la tirosin-cinasa (TK) 3 semejante al protooncogén FMS (*FLT3*) codifica un tipo de receptor tirosin-cinasa (TK) clase III que se expresa normalmente en la superficie de progenitores hematopoyéticos de médula ósea participando en la supervivencia y diferenciación de células pluripotenciales (Gilliland & Griffin, 2002). Su activación induce vías de señalización celular tipo STAT5, JAK2, RAS o MAPK, lo cual aumenta la capacidad proliferativa de células LMA *in vitro* (Small, 2006).

En 1996, Nakao y colaboradores reportaron las duplicaciones internas en tandem en el dominio yuxtamembrana del *FLT3* (*FLT3-ITD*) (Nakao *et al*, 1996). La inserción ocurre en los exones 14 y 15 e incluye de 3 a más de 400 nucleótidos, que en la gran mayoría de casos no implica una modificación en el marco de lectura (Schnittger *et al*, 2002) (ver Figura 2). La proteína anormal es un receptor activo constitucional y autofosforilable, independiente de su ligando, lo que induce directamente una serie de vías de proliferación, diferenciación y sobrevida (Stirewalt & Radich, 2003). *FLT3-ITD* constituye una de las alteraciones más frecuente en LMA pues se detecta en 28-33% de los casos (Frohling *et al*, 2002;Kainz *et al*, 2002;Schnittger *et al*, 2005;Whitman *et al*, 2001;Beran *et al*, 2004), siendo especialmente frecuente en pacientes con LMA de cariotipo normal y enfermos con LPA (Small, 2006). Además de la *FLT3-ITD*, se han descrito dos tipos de mutaciones puntuales: aquellas localizadas en el asa de activación del dominio TK (*FLT3-TKD*), detectadas en 5-14% de los pacientes con cariotipo normal (Frohling *et al*, 2002;Thiede *et al*, 2002;Schnittger *et al*, 2005) y aquellas localizadas en el dominio yuxtamembrana, observadas en 2% de las LMA (Reindl *et al*, 2006).

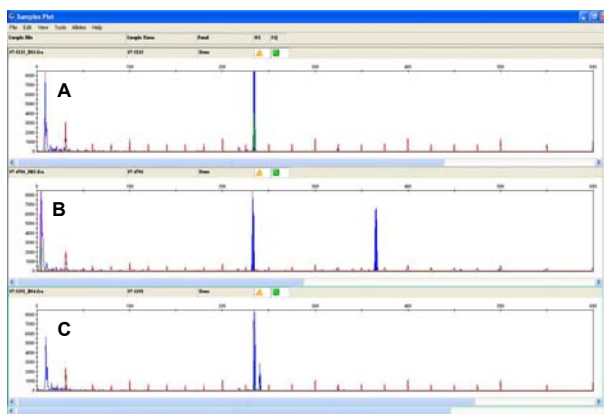


Figura 2. Análisis por *gene scanning* de duplicaciones internas en tandem del gen *FLT3* (*FLT3-ITD*). El alelo salvaje (A) presenta un tamaño de 234 nucleótidos (nt), mientras que el alelo mutado presenta una inserción en tripletas que no afecta el marco de lectura (B). Las ITD puede ser desde 3 (C) a más de 400 nt.

Los pacientes con LMA con cariotipo normal y *FLT3*-ITD positiva presentan hiperleucocitosis (por lo general mayor a $50 \times 10^9/L$) y mayor número de blastos en MO (Beran *et al*, 2004;Frohling *et al*, 2002;Whitman *et al*, 2001). Aunque las tasas de remisión completa no presentan diferencias significativas entre los pacientes con o sin *FLT3*-ITD, este marcador se considera un factor pronóstico independiente asociado a un menor duración de la RC, así como menor supervivencia libre de evento (SLE) y global (SG) (Frohling *et al*, 2002;Kainz *et al*, 2002;Schnittger *et al*, 2005;Whitman *et al*, 2001;Beran *et al*, 2004). Incluso, los pacientes que tienen ambos alelos mutados presentan menor SLE y SG (Whitman *et al*, 2001). Por el contrario, en las LPA diversos estudios han demostrado que la presencia de *FLT3*-ITD no tiene valor pronóstico independiente (Chillon *et al*, 2004;Gale *et al*, 2005).

Respecto a las mutaciones en el dominio TK (*FLT3*-TKD), los resultados no son concordantes. Mientras la mayoría de estudios no encuentran relación con un pronóstico adverso, ya sea en individuos con cariotipo normal (LMA-CN) (Frohling *et al*, 2002) o con riesgo intermedio (Thiede *et al*, 2005), un metaanálisis reciente asoció de forma independiente la *FLT3*-TKD con una menor SLE (Yanada *et al*, 2005). Sin embargo, el estudio que ha analizado más pacientes hasta la fecha (n=3082) no encontró influencia sobre el pronóstico en pacientes con LMA-CN, aunque si afectó negativamente en casos de LPA y en pacientes con alteración concomitante de *FLT3*-ITD o con duplicaciones en tandem del gen *MLL* y positivamente en casos de nucleofosmina positiva o *CEBPA* mutado (Bacher *et al*, 2008).

2.1.2 Mutaciones en el gen *NPM1*

La nucleofosmina (*NPM1*) es una fosfoproteína altamente conservada de 37 kDa, que se localiza en nucleolo, aunque puede migrar a núcleo y citoplasma (Borer *et al*, 1989;Cordell *et al*, 1999). Funciona como una chaperona que evita la agregación proteica en el nucleolo y regula el transporte de partículas preribosomales a través de la membrana nuclear (Borer *et al*, 1989). Es también una molécula diana del complejo CDK2-ciclina E durante la duplicación del centrómero (Okuda *et al*, 2000) y ha sido relacionado en la regulación de la vía de ARF-p53, teniendo una función potencial como gen supresor de tumores (Colombo *et al*, 2002).

El gen *NPM1* se localiza en 5q35 y se ha descrito como parte de ciertas proteínas de fusión observadas en linfoma anaplásico de células grandes [t(2;5)(p23;q35)*NPM1-ALK*] (Morris *et al*, 1995), y en un porcentaje pequeño (<1%) de LPA [t(5;17)(q35;q21)*NPM1-RAR α*] (Redner *et al*, 1996), y LMA [t(3;5)(q25;q34)*NPM1-MLF1*] (Yoneda-Kato *et al*, 1996;Falini *et al*, 2006a). Falini y colaboradores describen en 2005 que 208 de 591 pacientes (35.2%) con LMA presentaban una localización citoplasmática anormal de la proteína NPM (ver Figura 3) (Falini *et al*, 2005). Esta ubicación aberrante se explicaba por una inserción de cuatro pares de bases en el exón 12 del gen *NPM1*, lo que produce un cambio en el marco de lectura y el consecuente cambio de 7 aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína, eliminando dos residuos de triptofano (288 y 290) que son importantes para el anclaje de la proteína en la membrana nucleolar (Bolli *et al*, 2007;Falini *et al*, 2006b;Falini *et al*, 2005). Más del 95% de las mutaciones presentan una inserción de 4 nucleótidos en el residuo 956, siendo la duplicación de la secuencia TCTG o mutación tipo A la más frecuente (75-85%) (Falini *et al*, 2005;Schnittger *et al*, 2005;Suzuki *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005). Además se han descrito más de 20 inserciones diferentes que afectan a los nucleótidos 956 y 960, algunas de ellas de más de cuatro nucleótidos (Falini *et al*, 2007;Schnittger *et al*, 2005).

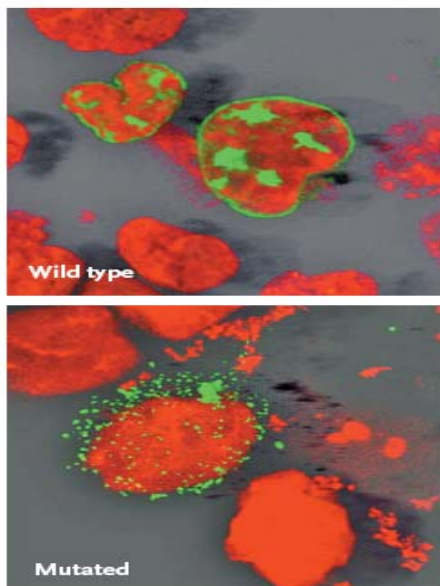


Figura 3. Reconstrucción tridimensional de micrografía confocal de células NIH-3T3 transfectadas con plásmidos codificando alelo salvaje o mutado de nucleofosmina (*NPM1*) y marcado con proteína fluorescente verde, el núcleo está contrateñido de rojo con yoduro de propidio. La proteína salvaje (*wild type*) está localizada en nucleolo y membrana nuclear, mientras que la *NPM1* mutada presenta localización citoplasmática (Tomado de(Falini *et al*, 2005))

Las mutaciones en *NPM1* ocurren con más frecuencia en pacientes con cariotipo normal (incidencias entre 45 y 61%) (Falini *et al*, 2005;Schnittger *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005) y se asocia a sexo femenino (Dohner *et al*, 2005;Schnittger *et al*, 2005), alto recuento de leucocitos y blastos en MO (Dohner *et al*, 2005;Schnittger *et al*, 2005;Boissel *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005); además de baja o nula expresión de CD34 y presencia de mutaciones en *FLT3* (tanto duplicaciones en tandem como mutaciones puntuales) (Dohner *et al*, 2005;Schnittger *et al*, 2005;Boissel *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005).

El valor como factor pronóstico favorable de las mutaciones en *NPM1* ha sido confirmado por varios estudios, particularmente en pacientes con cariotipo normal o citogenética de riesgo intermedio (Falini *et al*, 2005;Schnittger *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005;Falini *et al*, 2007;Suzuki *et al*, 2005). Sin embargo, pacientes con mutaciones en *FLT3*, que comprenden hasta el 40% de los casos con mutaciones en *NPM1*, tienen pronóstico adverso (Falini *et al*, 2005;Schnittger *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005;Falini *et al*, 2007;Suzuki *et al*, 2005). De esta forma, solo los pacientes con *NPM1* mutado pero *FLT3* no mutado tienen mejores tasas de remisión completa (Dohner *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005), supervivencia libre de evento (Schnittger *et al*, 2005), libre de recaída (Dohner *et al*, 2005), libre de enfermedad (Thiede *et al*, 2005) y global (Schnittger *et al*, 2005;Dohner *et al*, 2005;Thiede *et al*, 2005); por el contrario, las mutaciones en *NPM1* no modifican el mal pronóstico que tienen los pacientes con alteraciones en el gen *FLT3* (Schnittger *et al*, 2005;Falini *et al*, 2007).

2.1.3 Duplicaciones parciales en tandem en el gen *MLL*

El gen de leucemia de línea mixta o mielóide-linfoide (*MLL*), también identificado como *ALL1* o *HRX*, está localizado en 11q23, presenta un tamaño aproximado de 100 kb y codifica una proteína que regula de forma positiva la expresión de los genes *HOX*, involucrados en el desarrollo y diferenciación celular (Muñoz *et al*, 2003;Pajuelo-Gamez *et al*, 2007). Las duplicaciones parciales en tandem (*MLL*-PTD), son inserciones de una región genómica comprendida entre el exón 5 y 11 que se inserta en el intrón 4 (Caligiuri *et al*, 1994). Menos frecuente es que la región duplicada se encuentre entre los exones 5 y 12 (Caligiuri *et al*, 1998). Estas duplicaciones dan lugar a una proteína más larga que conserva todos sus dominios funcionales, incluyendo metilación de

histonas, de represión de la transcripción y de unión a citosinas no metiladas en islas CpG (Whitman *et al*, 2005). La presencia de *MLL*-PTD se asocia con represión del alelo salvaje en las células tumorales. Este mecanismo de silenciamiento monoalélico o haploinsuficiencia parece relacionarse a modificaciones en histonas y metilación de regiones del ADN promotoras del gen *MLL* (Whitman *et al*, 2005).

Las *MLL*-PTD se detectan en 5-10% de las LMA y en el 90% de las LMA con trisomía del 11 como alteración cromosómica única (Caligiuri *et al*, 1998). Entre 30 y 40% de las pacientes *MLL*-PTD positivos también son *FLT3*-ITD positivos (Dohner *et al*, 2002; Steudel *et al*, 2003), mientras que la coexistencia con mutaciones en *CEBPA* (Leroy *et al*, 2005b) o *NPM1* (Dohner *et al*, 2005; Schnittger *et al*, 2005) es rara. Al diagnóstico estos pacientes no presentan características clínicas diferentes y el porcentaje de remisiones completas y la supervivencia global no es significativamente diferente respecto de los pacientes sin *MLL*-PTD (Caligiuri *et al*, 1998; Dohner *et al*, 2002; Whitman *et al*, 2007). Sin embargo, algún trabajo apunta que tienen una menor duración de la remisión completa. (Dohner *et al*, 2002).

2.1.4 Mutaciones en el gen *CEBPA*

El gen *CEBPA* (CCAAT/enhancer-binding protein α), localizado en 19q13.1, codifica para un factor de transcripción de la familia bZIP, el cual juega un papel importante en la granulopoyesis (Pabst *et al*, 2001). Las mutaciones en gen *CEBPA* se encuentran en 15-19% de las LMA con cariotipo normal (Frohling *et al*, 2004; Bienz *et al*, 2005) y han sido asociadas a alto porcentaje de blastos en sangre, menor recuento plaquetario, menor compromiso extramedular y menor frecuencia de mutaciones en *FLT3* (Frohling *et al*, 2004). Estas alteraciones han sido relacionadas a un pronóstico favorable en los pacientes con citogenética de riesgo intermedio (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003a; Preudhomme *et al*, 2002) y particularmente con cariotipo normal, aunque sin diferencias significativas respecto a las tasas de RC (Frohling *et al*, 2004; Bienz *et al*, 2005).

2.1.5 Mutaciones en los oncogenes *N-RAS* y *K-RAS*

Diversas mutaciones de los oncogenes *N-RAS* y *K-RAS* han sido analizadas en los diferentes subgrupos de LMA, particularmente las leucemias positivas por *core-*

binding factor (CBF) (Bacher *et al*, 2007;Boissel *et al*, 2006;Goemans *et al*, 2005). Bacher y colaboradores reportan una incidencia de 10.3% de mutaciones en *N-RAS* en 2502 pacientes con LMA, con una incidencia similar en pacientes con cariotipo favorable [inv(16)/t(16;16)] y desfavorable [inv(3)/t(3;3)] ; por otro lado, estos pacientes no presentaron características clínicas ni pronósticas significativamente diferentes (Bacher *et al*, 2006). Estos datos son concordantes con los publicados previamente en otras series más pequeñas (Boissel *et al*, 2006;Goemans *et al*, 2005).

2.1.6 Mutaciones en el gen *c-KIT*

Las mutaciones en *c-KIT*, especialmente las detectadas en el exón 17 que codifica el asa de activación de su dominio kinasa, han sido relacionadas con peor pronóstico (menor SLE, SLR, SG y mayor riesgo de recaída) en el grupo de LMA con t(8;21)(q22;q22)(Boissel *et al*, 2006;Schnittger *et al*, 2006;Beghini *et al*, 2004), con una incidencia entre 6% (n=103) (Boissel *et al*, 2006) y 10.5% (1.7% de todas las LMA) (Schnittger *et al*, 2006). A pesar de su baja proporción estas mutaciones han tomado importancia en vista que el mesilato de imatinib (Glivec®), un potente inhibidor selectivo de tirosin-quinasas como *BCR-ABL*, tenga actividad in vitro en líneas celulares portadoras de mutaciones en *KIT* pero no en células con fenotipo salvaje (Scappini *et al*, 2001;Wang *et al*, 2005). Existen algunos reportes de casos con resultados beneficiosos con la aplicación de imatinib sólo o con quimioterapia (Cairoli *et al*, 2005;Kindler *et al*, 2003); sin embargo, estudios en fase II con Glivec® a dosis altas (600mg/día) en pacientes LMA refractarios a tratamiento (Kindler *et al*, 2004) o en combinación con bajas dosis de Ara-C en pacientes con LMA o SMD de alto riesgo no candidatos a terapia mieloablativa y/o enfermedad recurrente, no señalan una clara diferencia en cuanto eficacia terapéutica frente a la monoterapia con Ara-C (Kindler *et al*, 2004;Heidel *et al*, 2007).

2.2. Expresión génica aberrante

2.2.1 Sobreexpresión del gen *BAALC*

El gen *BAALC* (*brian and acute leukemia, cytoplasmatic*) se localiza en 8q22.3 y se expresa fundamentalmente en tejidos derivados del neuroectodermo y en precursores hematopoyéticos (Tanner *et al*, 2001). Se ha observado hiperexpresión de *BAALC* en LMA, LLA, crisis blásticas de LMC, pero no en fases crónicas de LMC o en

LLC (Tanner *et al*, 2001). Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de *BAALC* (estimada con base en el valor de la mediana) en pacientes menores de 60 años y cariotipo normal es un factor pronóstico desfavorable independiente en cuanto resistencia a la terapia de inducción, supervivencia global y riesgo de recaída (Baldus *et al*, 2003; Baldus *et al*, 2006; Bienz *et al*, 2005; Langer *et al*, 2008). Esta característica adversa se mantiene aún en el subgrupo de pacientes que no presenta *FLT3*-ITD o mutaciones en *CEBPA* (Bienz *et al*, 2005).

2.2.2 Sobreexpresión del gen *ERG*

El gen *ERG* (ETS-related gene) está involucrado en procesos de regulación de proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Fue descubierto en pacientes con cariotipo complejo y amplificación críptica del cromosoma 21 (Baldus *et al*, 2004), aunque también ha sido descrito en LMA con cariotipo normal (Marcucci *et al*, 2005a; Marcucci *et al*, 2007) y LLA-T (Baldus *et al*, 2007a). La sobreexpresión de *ERG*, definida como el percentil 25 de mayor expresión y evaluada en 84 pacientes LMA con cariotipo normal y menores de 60 años, fue asociada con una mayor incidencia acumulada de recaídas y una peor SG (Marcucci *et al*, 2005a). En el respectivo análisis multivariante, la alta expresión de *ERG* y la presencia de *FLT3*-ITD fueron factores independientes de menor SG. Sin embargo, esta asociación se mantuvo sólo en pacientes con baja expresión de *BAALC* (Marcucci *et al*, 2005a).

Respecto a su impacto pronóstico en las LMA-CN, Marcucci *et al* argumentan que el *ERG* es capaz de mejorar la clasificación molecular de riesgo dentro de las LMA-CN, ya que todos los pacientes CN-AML de pronóstico favorable (*FLT3* negativo, *NPM1* mutado) puede ser diferenciados en dos subgrupos pronósticos basados en los niveles de *ERG*, con esquemas de tratamiento diferenciados (Marcucci *et al*, 2007). Así, los pacientes con *FLT3* negativo, *NPM1* mutado y baja expresión de *ERG* podrían beneficiarse de esquemas que incluyan altas dosis de citarabina o bien trasplante de precursores hematopoyéticos, mientras que pacientes con un perfil *FLT3* negativo, *NPM1* mutado y alta expresión de *ERG* deberían ser considerados para tratamientos más agresivos o terapias alternativas por su pobre supervivencia (SLE a dos años menor del 40%) (Marcucci *et al*, 2007).

2.2.3 Sobreexpresión del gen *EVI1*

El gen *EVI1* (Ecotropic viral integration site) es un proto-oncogén localizado en 3q26, que codifica para una proteína de 145 kDa, la cual posee dominios en dedos de zinc, similar a los factores de transcripción (Lopingco & Perkins, 1996; Nucifora, 1997). El mecanismo exacto por el cual *EVI1* participa en el proceso leucémico no está bien definido, aunque se postula varios mecanismos para la represión anormal de genes asociados a maduración celular: reclutamiento de HDAC a través del correpresor CtBP, inhibición de los efectos de TGF- β por unión a sus transductores de señal (proteínas Smad), bloqueo de la cascada de JNK con lo cual se reprime la apoptosis inducida por estrés e inducción de proliferación celular por activación del promotor c-Fos (Mitani, 2004). Mediante *splicing* alternativo, *EVI1* puede formar un transcrito de fusión con el gen *MDS1*, cuyo producto resultante es la proteína EVI1 completa con una extensión N-terminal adicional (Fears *et al*, 1996). Aunque ambas proteínas están relacionadas, tienen funciones opuestas durante la hematopoyesis (Sitailo *et al*, 1999).

Un estudio en 319 pacientes con LMA de novo, evaluó la expresión de *EVI1* y *MDS-EVI1* por PCR en tiempo real (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b). En él, un 14% (n=44) de los casos expresaron altos niveles de *EVI1* (n=6), *MDS-EVI1* (n=26) o ambos (n=12). Quince de 32 pacientes (47%) con expresión de *EVI1* o *MDS-EVI1* presentaron cariotipo de mal pronóstico (-7,-7q, cariotipo complejo, entre otros) frente a 33/275 (12%) de pacientes *EVI1* negativo. De interés, sólo un 12% (4/32) de pacientes con sobreexpresión de *EVI1* tuvieron alteraciones en 3q26 (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b). La expresión aberrante de *EVI1* o *MDS-EVI1* fue un factor independiente de mal pronóstico, con SLE y SG inferiores respecto a los pacientes *EVI1* negativos (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b).

Asimismo, otro grupo investigador ha propuesto la ratio de expresión *MDS1-EVI1/EVI1* disminuye hasta 2 log cuando el paciente alcanza remisión hematológica completa y entre pacientes con recaída se observó un aumento en los niveles de expresión 29-93 días antes de los eventos hematológicos, lo que lo convierte en una diana interesante para análisis de enfermedad mínima residual (Weisser *et al*, 2007). Estos hallazgos han sido confirmados con un reciente trabajo donde se analizaron 534

pacientes con LMA de nuevo diagnóstico, en el cual reafirman el mal pronóstico de la sobreexpresión de *EVI1* y el ratio *MDS1-EVI1/EVI1* en cuanto menor SLR y SG (Lugthart *et al*, 2008).

2.2.4 Sobreexpresión del gen *MN1*

El gen de meningioma 1 (*MN1*) fue descrito por primera vez en un paciente con una translocación t(4;22)(p16;q11) (Lekanne Deprez *et al*, 1995). Posteriormente, se descubrió que la proteína de fusión MN1-TEL, producto de la translocación t(12;22), induce el crecimiento de progenitores hematopoyéticos en modelos murinos y que en asociación con *HOXA9* estos ratones desarrollan LMA (Kawagoe & Grosveld, 2005); estudios posteriores mostraron que la sola sobreexpresión de *MN1* por medio de transfección viral puede provocar LMA en ratones BALB-c (Heuser *et al*, 2007).

El gen *MN1* se encuentra sobreexpresado tanto en LMA como LLA, pero no en LMC o LLC (Heuser *et al*, 2006). Este oncogén funciona como inductor de proliferación pero a su vez como bloqueo de diferenciación en células hematopoyéticas (Heuser *et al*, 2007). En 142 pacientes LMA con cariotipo normal se evaluó la expresión del gen *MN1*, demostrando que los individuos con expresión de *MN1* superior a la mediana presentaron una mayor tasa de recaída y además una menor SLR y SG (Heuser *et al*, 2006). El mismo grupo de investigación observó que el *MN1* aumentaba hasta en 3000 veces la resistencia a la diferenciación inducida por ácido todo trans-retinoico (ATRA) en células hematopoyéticas in vitro; en este sentido, los pacientes LMA no-M3 mayores de 60 años, sometidos a tratamiento con ATRA y con baja expresión de *MN1* presentaron una mayor SLR y SG respecto a los pacientes con alta expresión de *MN1*. Incluso, los pacientes con baja expresión de *MN1* tenían mejor SLR y SG independiente de que recibieran o no tratamiento con ATRA. (Heuser *et al*, 2007).

2.2.5 Sobreexpresión del gen *PRAME*

El gen *PRAME* (*Preferentially expressed antigen of melanoma*) se identificó a partir de un clon de linfocitos T citotóxicos derivados de una línea celular de melanoma, el cual codificaba para un antígeno relacionado a HLA-A24 (Ikeda *et al*, 1997). La proteína resultante la componen 509 aminoácidos, cuya función es desconocida. La mayoría de tejidos no expresa *PRAME* bajo condiciones normales, aunque se ha visto

una expresión baja en testículos, placenta, endometrio, ovarios y glándulas adrenales (van Baren *et al*, 1998;Greiner *et al*, 2004). Este marcador se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tumores sólidos como melanomas (detectado hasta en el 88% de las lesiones primarias), carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma renal, tumores de cabeza y cuello, tumor de Wilms y linfoma de Hodgkin (Ikeda *et al*, 1997;Epping & Bernards, 2006).

En tumores hematológicos se ha descrito una incidencia de sobreexpresión de *PRAME* al diagnóstico del 17-42% en LLA, 30-64% en LMA (van Baren *et al*, 1998;Steinbach *et al*, 2002a;Greiner *et al*, 2006;Steinbach *et al*, 2002b;Paydas *et al*, 2005), 34% en leucemia mieloide crónica (LMC) y 28% en leucemia linfocítica crónica (LLC) (Paydas *et al*, 2007). Debido a su expresión antigénica específica de tumor, se ha estudiado la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos contra un péptido derivado de *PRAME* en 10 pacientes con LMA, de los cuales 7 presentaron una respuesta inmune específica (Greiner *et al*, 2006).

La expresión aberrante del gen *PRAME* se asocia en tumores sólidos con un estadio tumoral más avanzado, una mayor probabilidad de desarrollo de metástasis y una menor sobrevida (Ikeda *et al*, 1997;Oberthuer *et al*, 2004;Neumann *et al*, 1998;Epping & Bernards, 2006). Por el contrario, en LLA (Steinbach *et al*, 2002b) y en LMA, tanto pediátrica (Steinbach *et al*, 2002a) como de adultos (Greiner *et al*, 2006), altos niveles de *PRAME* se asociaron con buen pronóstico y mayor sobrevida. Además, en algunos trabajos la sobreexpresión de *PRAME* se presentó con mayor frecuencia en pacientes portadores de translocaciones con pronóstico favorable como la t(8;21), t(12;21) y t(15;17) (Greiner *et al*, 2006;van Baren *et al*, 1998). Sobre este hallazgo, algunos autores han cuestionado si el factor pronóstico de *PRAME* se deba a este fenotipo favorable o efectivamente su significado clínico es independiente de otros factores (Greiner *et al*, 2006).

2.2.6 Sobreexpresión del gen *RHAMM*

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicán que forma parte de la matriz extracelular y que participa activamente en la movilidad de células hematopoyéticas (linfocitos T y B, monocitos y timocitos), tanto normales como malignas, a través de su

interacción con el antígeno de membrana CD168 llamado RHAMM (receptor for hyaluronan (HA)-mediated motility). El gen *RHAMM* se ubica en 5q33.2.

El gen *RHAMM* se sobreexpresa en el 70% de las LMA, así como en mieloma múltiple y cáncer de mama pero no en células hematopoyéticas CD34+ sanas, aunque tiene una expresión residual en timo, placenta y testículos (Giannopoulos *et al*, 2006; Greiner *et al*, 2006). Debido a esta característica, se ha sugerido a *RHAMM* como potencial gen diana para inmunoterapia (Greiner *et al*, 2006). Se desconoce la implicación pronóstica de la sobreexpresión de este gen en las LMA.

2.2.7 Sobreexpresión del gen *WT1*

El tumor de Wilms (*WT1*), originalmente asociado con el nefroblastoma y el síndrome WAGR (Tumor de Wilms, aniridia, malformación genitourinaria y retardo psicomotor), es un gen localizado en 11q13 que codifica para un factor de transcripción tipo dedos de zinc (Saglio *et al*, 2005). Esta proteína presenta al menos 24 isoformas debido a modificaciones post-transcripcionales, con diversas ubicaciones subcelulares (Scharnhorst *et al*, 2001). *WT1* puede actuar como represor o activador transcripcional, dependiendo del tipo de isoforma involucrado, además de la interacción con otras isoformas y otros factores de transcripción. De esta forma, sus efectos biológicos involucran proliferación y diferenciación celular, así como regulación de apoptosis (Saglio *et al*, 2005; Scharnhorst *et al*, 2001).

A diferencia de otros genes supresores de tumores, como *p53* o *Rb1*, la expresión normal de *WT1* en tejidos adultos se limita básicamente a sistema genitourinario (Pritchard-Jones *et al*, 1990) y células CD34+ en médula ósea, que lo expresan en un nivel muy bajo (Menssen *et al*, 2002). En contraposición, diversos estudios han demostrado que en el 80-90% de las LMA (Barragán *et al*, 2004; Bergmann *et al*, 1997; Cilloni *et al*, 2006; Gaiger *et al*, 1998; Menssen *et al*, 2002; Weisser *et al*, 2005a) y entre 70-90% de las leucemias linfoblásticas agudas (Boublikova *et al*, 2006) hay una sobreexpresión de *WT1*, lo que ha sugerido su función como marcador “panleucémico” (Menssen *et al*, 2002). Aunque esta sobreexpresión ha sido relacionado con un pronóstico adverso (Bergmann *et al*, 1997; Barragán *et al*, 2004), otros estudios

no han podido confirmar esta asociación (Gaiger *et al*, 1998; Yanada *et al*, 2004; Greiner *et al*, 2006).

2.3 Vía de señalización PI3/AKT/FOXO3a/p27

La vía de trasducción de señales del fosfatidilinositol3-cinasa, que incluye la serina-treonina cinasa AKT (PI3K/AKT), ha sido ampliamente estudiada en diversas células tumorales. En LMA, dicha ruta se encuentra sobre-estimulada y esta activación excesiva induce mecanismos de supervivencia, proliferación y transformación leucémica en células mieloides tanto *in vitro* como *in vivo*. (Brandts *et al*, 2005; Grandage *et al*, 2005; Xu *et al*, 2003). A pesar de su importancia en la fisiopatología de la LMA, sólo existen publicados 3 reportes que analizan la relación entre la activación de PI3K/AKT y el pronóstico de pacientes con LMA, siendo sus resultados contradictorios entre sí. El primer estudio es una Carta al Editor de Min y colaboradores en el cual analizaron 61 pacientes con LMA, y cuya conclusión es que la fosforilación de la proteína AKT (pAKT o su forma activada) se asoció con una menor supervivencia global, pero no con la supervivencia libre de enfermedad (Min *et al*, 2003). Kornblau y colaboradores estudiaron diferentes vías de señalización como JAK/STAT, RAS/Raf/MEK/ERK y PI3K/AKT en 188 pacientes con LMA (Kornblau *et al*, 2006). Ellos demuestran que la activación de AKT se relacionaba a una menor supervivencia y que cuantas más vías de señalización estuviesen activadas, peor el pronóstico del paciente. El último es un reporte de 92 pacientes LMA en el cual contradicen los hallazgos previos, ya que encuentran que los pacientes con activación constitutiva de la vía PI3K/AKT tuvieron una mayor supervivencia global y libre de recaída (Tamburini *et al*, 2007). Los autores del último estudio justifican sus resultados en el sentido que el grupo de Kornblau no sometió las células tumorales a condiciones de estrés por lo que el porcentaje de blastos con pAKT era mucho mayor. Además, argumentan que la serie de pacientes era muy heterogénea pues incluía LMA secundarias a SMD o secundarias a quimioterapia. En el caso del primer estudio, mencionan que las muestras no eran comparables pues el grupo de Min fue incapaz de detectar AKT total en muestras que eran pAKT negativas, mientras que ellos sí podían detectarlo en muestras tratadas con un ligando de FLT3 (Tamburini *et al*, 2007).

Por otra parte, se ha descrito que uno de los mecanismos de acción más importantes del *FLT3*-ITD en LMA es la activación directa del AKT, el cual a su vez fosforila y retiene en citoplasma una serie de factores de transcripción como BAD y FOXO3a, lo cual bloquea su acción como factores de transcripción (Brandts *et al*, 2005; Zeng *et al*, 2006). El FOXO3a es un miembro de la familia de factores de transcripción FOX (de “*forkhead box*”), los cuales son ortólogos del gen DAF16 de *Caenorhabditis elegans* y funcionan como reguladores de ciclo celular y apoptosis. Una de las funciones principales del FOXO3a es inducir la transcripción del inhibidor de cinasa dependiente de ciclinas p27 (CDKN1B), el cual es un regulador negativo de proliferación celular en G1 (Martinez-Gac *et al*, 2004). De esta forma, el resultado teórico de un aumento en la expresión de AKT sería una represión del FOXO3a, lo cual a su vez incidiría en una menor expresión de p27 y en un aumento en la proliferación celular. Siendo el *FLT3*-ITD una alteración relativamente frecuente en las LMA-CN, resulta atractivo evaluar el nivel de expresión de los distintos genes involucrados en esta vía como eventuales marcadores pronósticos.

3. Alteraciones moleculares con valor pronóstico en la LPA/LMA-M3

3.1 Translocación *PML-RAR α*

3.1.1 Fisiopatología del gen de fusión *PML-RAR α*

La proteína derivada del gen de fusión *PML-RAR α* actúa como un receptor nuclear aberrante con capacidad para ligarse al ADN de forma alterada, uniéndose a la región promotora de los elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) en forma de homodímero, a diferencia de la proteína normal *RAR α* (Jansen *et al*, 1995). La característica principal de la proteína *PML-RAR α* es que, en ausencia de ATRA, inhibe la transcripción de forma mucho más potente que el *RAR α* normal (Rousselot *et al*, 1994), lo cual incide en un bloqueo de la diferenciación mieloide del RA a través de su receptor *RAR α* . Además, la proteína *PML-RAR α* provoca la deslocalización subcelular de la *PML* normal, inhibiendo así su actividad antiproliferativa y pro-apoptótica (Wang *et al*, 1998).

3.1.2 Genes de los receptores de ácido retinoico

Los receptores de ácido retinoico (*RAR*) son factores de transcripción que actúan inhibiendo o activando la transcripción de sus genes diana a través de los elementos RARE (Mangelsdorf & Evans, 1995). En ausencia del ligando adecuado, el *RAR α* generalmente actúa como un represor de la transcripción mediante el reclutamiento de un complejo de represión transcripcional N-CoR-Sin3-deacetilasa, el cual modifica la cromatina en las células normales impidiendo la transcripción, pero son suficientes concentraciones fisiológicas de ácido retinoico para desplazar dicho complejo y promover la expresión génica (Figura 4a). En el caso de la LPA, los promielocitos leucémicos muestran una mayor cantidad de complejo de represión, debido a la expresión aumentada del receptor *RAR α* involucrado en la translocación (Piazza *et al*, 2001). Por lo tanto, son necesarias concentraciones farmacológicas de RA, en forma de ácido todo-*trans*-retinoico –ATRA- o tretinoína, para permitir la activación de la transcripción y a su vez la inducción del catabolismo del *PML-RAR α* por la vía proteolítica SUMO y activación de caspasas (Zhu *et al*, 2001) (Figura 4b).

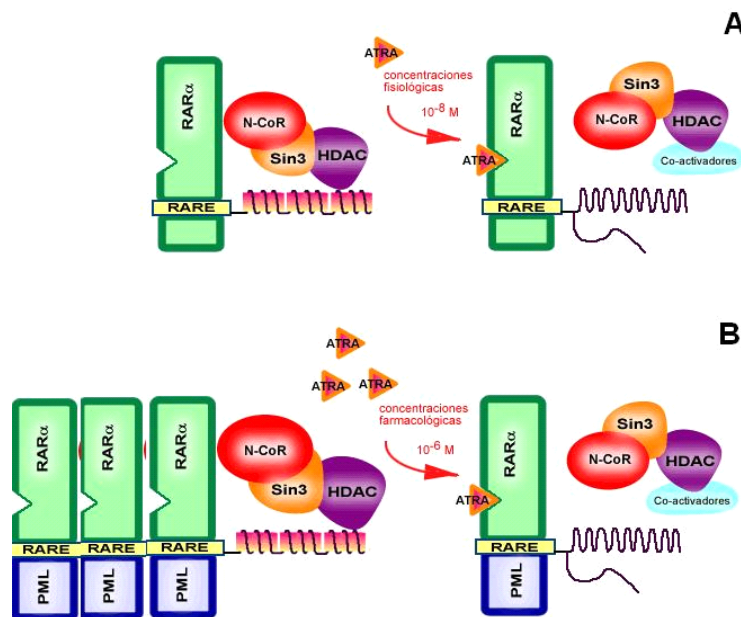


Figura 4. En condiciones fisiológicas, el receptor $RAR\alpha$ está fuertemente ligado al complejo de represión transcripcional N-CoR- Sin3-histona deacetilasa, el cual está unido al elemento de respuesta de ácido retinoico (RARE). El ácido retinoico (AR) a concentraciones fisiológicas induce la liberación del co-represor, provocando una activación de la transcripción **(A)**. En la LPA, la proteína quimérica ocasiona una mayor concentración del represor, por lo que se requiere concentraciones más altas de AR (en forma de ATRA) para activar el proceso **(B)**.

Este mecanismo también explica la resistencia al ATRA de la leucemia promielocítica producida por la translocación $t(11;17)(q23;q12-21)$ entre el $RAR\alpha$ y el gen PLZF. En este caso, la proteína quimérica contiene en el dominio correspondiente al PLZF un lugar de unión para un complejo de represión adicional. La unión del ATRA al receptor PLZF- $RAR\alpha$ produce, como antes, el desplazamiento del complejo de represión unido a la parte $RAR\alpha$ pero se sigue manteniendo el segundo complejo en la parte del PLZF (Grimwade & Lo-Coco, 2002).

3.1.3 Variantes del gen de fusión $PML-RAR\alpha$

El punto de rotura del gen $RAR\alpha$ es constante, afectando al intrón 2 en todos los casos de LPA. Por el contrario, en el gen PML se han descrito tres regiones de rotura, localizadas en el intrón 3 (bcr3), exón 6 (bcr2) e intrón 6 (bcr1) (Figura 5) (Longo *et al*, 1990; Pandolfi *et al*, 1992). En el tipo bcr3 se fusionan los exones 1, 2 y 3 del gen PML con el exón 3 del gen $RAR\alpha$, produciendo la forma corta S ("short") de la proteína PML-

$RAR\alpha$. El tipo *bcr1* contiene además los exones 4, 5 y 6 del gen *PML* resultando en una proteína de fusión más larga, la forma L (“long”). Los puntos de rotura en la región *bcr2* son variables y caen dentro del exón 6 del gen *PML*, manteniéndose el marco de lectura en el producto de fusión mediante la inserción de nucleótidos procedentes del intrón 2 del gen *RAR\alpha* (Grimwade *et al*, 1996) y produciendo finalmente una proteína de longitud variable e intermedia, la forma V (“variable”). La isoforma L es la más frecuente, expresándose en el 55% de los pacientes con LPA, mientras que las isoformas S y V se expresan aproximadamente en el 35% y 8% de los pacientes, respectivamente (van Dongen *et al*, 1999).

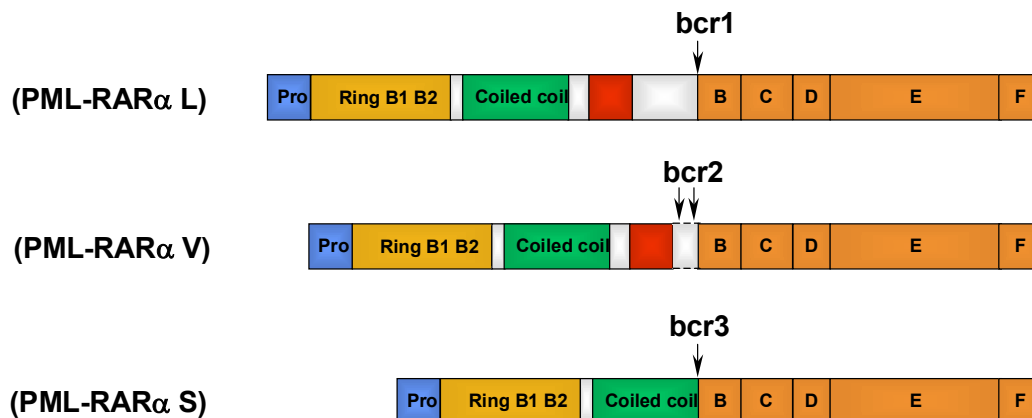


Figura 5. Representación esquemática de las diferentes isoformas *PML-RAR\alpha*. Las posiciones de los puntos de rotura del gen *PML* están indicadas.

3.2 Detección del transcrito *PML-RAR\alpha*

Para el diagnóstico de la LPA es imprescindible la demostración de la presencia de la alteración genética característica *PML-RAR\alpha* bien por técnicas de citogenética/hibridación in situ o molecular (RT-PCR). Sin embargo, se debe tener en cuenta que el diagnóstico debe ser integrado y por tanto considerar como necesaria la realización de técnicas morfológicas, fenotípicas y de citogenética/molecular.

3.2.1 Morfología e inmunofenotipo

La clasificación franco-americana-británica (FAB) define a la LPA como LMA tipo M3, con dos tipos morfológicos: uno hipergranular conocida como M3 clásica (80%) y

otro hipogranular, denominada M3 variante (15-20%) (Bennett *et al*, 1985). La forma clásica se caracteriza por la presencia de promielocitos patológicos con abundante coloración azurófila. Los núcleos tienen una forma irregular, presentando escotaduras o lobulaciones (Figura 6). Es característica la presencia de abundantes cuerpos de Auer formando astillas apiladas (Bennett *et al*, 1985). La variante hipogranular presenta las mismas características de la forma de los núcleos pero los gránulos son muy pequeños y no se pueden siempre ver con el microscopio óptico. Esta variante suele presentarse acompañada de hiperleucocitosis y está asociada a un peor pronóstico (Grimwade & Lo-Coco, 2002; Sanz *et al*, 2005b; Tallman *et al*, 2002b).

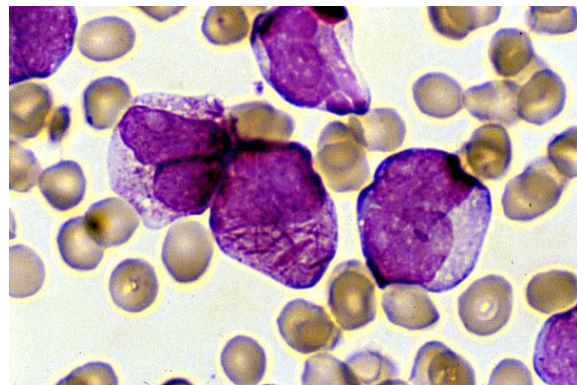


Figura 6. Tinción de hematoxilina-eosina de un frotis de sangre periférica de paciente con LPA, observándose las formas leucémicas características de la M3 clásica.

Desde el punto de vista inmunofenotípico los promielocitos en la LPA son fuertemente positivos para CD13 y CD33, mieloperoxidasa y CD9, con positividad débil para CD2 y negativos generalmente para CD34, CD7, HLA-DR, CD11b y CD14 (Orfao *et al*, 1999). En algunos pacientes se ha detectado la molécula de adhesión neural-celular CD56, cuya expresión ha sido asociada por algunos investigadores a un peor pronóstico (Baer *et al*, 1997; Murray *et al*, 1999; Ferrara *et al*, 2000), mientras otros autores han encontrado asociación entre la expresión de CD34 y CD2 y el subtipo morfológico M3v con un pronóstico adverso (Albano *et al*, 2006). Sin embargo, tanto el inmunofenotipo como la morfología presenta falsos positivos (principalmente LMA-M2 consideradas como LMA-M3) como negativos (LMA-M0 que realmente son LPA microgranulares) por lo que el diagnóstico de LPA implica necesariamente la demostración de la existencia de la translocación por técnicas citogenéticas/moleculares.

3.2.2 Citogenética e Hibridación “in situ”

El análisis de cariotipo forma parte de la rutina de diagnóstico de LPA, detectando el gen de fusión *PML-RAR α* a través de la translocación t(15;17)(q22;q21). Sin embargo, estudios multicéntricos han revelado que esta prueba falla hasta en un 15% de los casos, la mayoría de ellos por reordenamientos crípticos donde las inserciones en los cromosomas 15 y 17 pasan desapercibidos ya que estos cromosomas tienen un aspecto normal (Grimwade & Lo-Coco, 2002; Chillon *et al*, 2000). Otras posibles causas de falsos negativos son errores técnicos como poco tiempo de cultivo, mala calidad de las metafases o bajo porcentaje de células en metafase, lo que induce un informe de cariotipo erróneo ya que las únicas metafases valorables corresponden a las células normales residuales de médula ósea (Grimwade & Lo-Coco, 2002). A pesar que existen otras técnicas con una mayor sensibilidad y especificidad, la citogenética es una prueba obligada ya que permite detectar alteraciones cromosómicas adicionales (Ej. la trisomía del 8 está presente en el 30% de las LPA); si bien la presencia de estas alteraciones adicionales en la mayoría de los estudios no tiene valor pronóstico como inicialmente se había descrito (Slack *et al*, 1997; Grimwade & Lo-Coco, 2002).

La técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) es una alternativa importante a la citogenética convencional, con una serie de ventajas: puede utilizarse diversos tipos de muestras (SP, MO, citospin), no requiere células en metafase y la disponibilidad de kits comerciales con sondas estandarizadas que le confieren a la prueba mayor sensibilidad (Grimwade & Lo-Coco, 2002). Sin embargo, el tipo y tamaño de sondas empleadas pueden generar falsos negativos en casos de fusiones atípicas ó crípticas, además de falsos positivos por superposición de los cromosomas 15 y 17 cuando se utilizan células en interfase (Grimwade & Lo-Coco, 2002).

3.2.3 Detección de la proteína PML

El uso de técnicas de inmunofluorescencia empleando anticuerpos policlonales o monoclonales contra la proteína PML constituye una opción de emergencia cuando se requiere de un diagnóstico complementario a la morfología en menos de 4 horas. Esta metodología detecta el cambio estructural que sufre los POD en las células que poseen el gen de fusión *PML-RAR α* , lo cual se aprecia con un cambio de un patrón moteado de

fluorescencia a uno microgranular en las células leucémicas (Falini *et al*, 1997). A pesar de su rapidez y de la posibilidad de detectar fusiones crípticas, esta técnica no debe sustituir el estudio molecular pues tiene menor sensibilidad que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y no reconoce el tipo de transcrito que posee la célula (Grimwade & Lo-Coco, 2002).

3.2.4 RT-PCR cualitativa

En la LPA, como ocurre en la mayoría de las translocaciones de las leucemias agudas, los puntos de rotura de los cromosomas se localizan en una zona amplia del genoma (>2 Kb), lo que hace que su detección a partir de ADN no sea posible ya que habría que realizar múltiples reacciones de PCR para detectar todos los posibles puntos de rotura. Por suerte, en la mayoría de leucemias agudas los puntos de rotura son intrónicos por lo que su análisis se puede realizar a partir de ARN tras su transformación a ADNc mediante transcripción inversa y posterior amplificación por PCR (RT-PCR). Mediante esta tecnología se pueden detectar la mayoría de los transcritos leucémicos específicos de diferentes subtipos de leucemias agudas (van Dongen *et al*, 1999).

El análisis de genes aberrantes se basa en el diseño de oligonucleótidos que funcionan como cebadores (“primers”) y que se colocan en los extremos de la fusión, dando de esta forma especificidad sobre las células que contengan esta secuencia oncogénica en particular. Posterior a una serie de ciclos que incluyen desnaturalización de la doble hélice de ADNc, unión de los cebadores (“annealing”) y unión de nucleótidos con extensión de ambas hebras complementarias se obtiene la amplificación de ADNc hasta lograr su detección por la formación de una banda en un gel de agarosa, la cual se visualiza por la incorporación de bromuro de etidio al gen y posterior observación bajo luz ultravioleta. Mediante esta técnica se pueden detectar los diferentes transcritos de la fusión de los genes *PML-RAR α* característicos de la LPA. La sensibilidad que se alcanza con esta técnica empleando una PCR anidada es de aproximadamente 10^{-4} , que es ligeramente inferior a la sensibilidad alcanzada en la detección de otros genes de fusión (ej *AML1/ETO* típica de la LMA-M2 o *BCR/ABL* de la LMC) que puede llegar a 10^{-5} (van Dongen *et al*, 1999).

3.2.5 RT-PCR cuantitativa (RQ-PCR) en tiempo real

En la última década, varios estudios han señalado que la detección y cuantificación del número de copias del transcrito *PML-RAR α* utilizando la metodología de PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) constituye la mejor opción para el diagnóstico y posterior seguimiento de la respuesta del paciente con LPA al protocolo terapéutico dado (Gabert *et al*, 2003; Cassinat *et al*, 2000; Gallagher *et al*, 2003). Tanto los ensayos basados en sondas de hibridación (Light Cycler[®]) como en sondas de hidrólisis (TaqMan[®]) han demostrado ser altamente reproducibles y con una muy buena sensibilidad, detectando menos de 10 copias de plásmido del gen de fusión ó una célula positiva por *PML-RAR α* (línea celular NB4) en 10^4 - 10^5 células normales (línea celular HL-60) (Gabert *et al*, 2003). El programa de Europa contra el Cáncer (EAC) ha elaborado un protocolo de RQ-PCR basada en tecnología Taqman[®] para la detección de diversos genes de fusión, aplicando la metodología del Δ Ct, definiendo un Ct (ciclo umbral) como el primer ciclo de PCR durante el proceso en tiempo real donde la amplificación exponencial del ADNc supera en diez veces la señal del ruido de fondo. El Ct resultante se interpola en una curva de calibración hecha con diluciones de plásmidos de concentración conocida. Un resultado positivo sería cualquier valor de Ct que sea menor que el intercepto menos 1Ct (Gabert *et al*, 2003).

Con el fin de valorar la calidad del ARN de las muestras procesadas, es obligatorio realizar una cuantificación en paralelo de un gen control (“housekeeping gene”) que idealmente tenga un nivel de expresión y degradación similar al gen de fusión en estudio y que no presente pseudogenes o múltiples sitios de inicio de transcripción (Beillard *et al*, 2003). Dentro de los candidatos que se han valorado se pueden mencionar el gen Abelson (*ABL*), la beta-2 microglobulina (*β 2M*), el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (*GADPH*) o la beta-glucoronidasa (*GUS*), siendo el *ABL* el que reúne las mejores condiciones para servir como control a la expresión de *PML-RAR α* según los protocolos del grupo EAC (Beillard *et al*, 2003). De esta forma, los resultados se expresan en número de copias normalizado (NCN) que es el resultado de dividir el número de copias de *PML-RAR α* entre el número de copias del gen *ABL* y multiplicar el producto por 10000 (Gabert *et al*, 2003).

3.3 Otras alteraciones moleculares de impacto pronóstico en LPA

3.3.1 Sobreexpresión de *PML-RAR α*

El gen de fusión *PML-RAR α* es considerado en la actualidad el parámetro imprescindible para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con LPA (Sanz *et al*, 2005b). Sin embargo, los estudios que evalúan la posible relación entre el número de copias del transcrito al diagnóstico con el pronóstico del paciente, no son concluyentes (Gallagher *et al*, 2003; Schnittger *et al*, 2003)

3.3.2 Sobreexpresión de *PRAME*

Diversos trabajos han asociado altas expresiones de *PRAME* con la presencia de t(15;17); sin embargo, estas conclusiones se basan en un número reducido de pacientes con LPA (Bullinger *et al*, 2004; Greiner *et al*, 2006; van Baren *et al*, 1998). Incluso, algunos investigadores han sugerido que el buen pronóstico asociado a sobreexpresión de *PRAME* en LMA no M3 se podría deber más a condiciones intrínsecas de las leucemias, ya que la sobreexpresión de *PRAME* se asocia a LMA con cariotipos favorables como la t(8;21) (Greiner *et al*, 2006).

3.3.3 Alteraciones en *FLT3*

Las alteraciones del gen *FLT3*, ya sea duplicaciones en tandem (ITD) o mutaciones puntuales en el dominio tirosin-cinasa (TK), se encuentran entre un 25-43% de las LPA y su presencia se asocia a características adversas como recuentos de leucocitos $>10 \times 10^9/L$, morfología M3 variante o presencia de la variante corta (S) de *PML-RAR α* (Chillon *et al*, 2004; Gale *et al*, 2005; Shih *et al*, 2003; Kiyoi *et al*, 1997). Sin embargo, estos estudios no encontraron diferencias en cuanto tasas de remisión, SG o SLR entre los pacientes con o sin mutaciones en *FLT3* y sólo en un trabajo se menciona que los pacientes con *FLT3*-ITD tuvieron una mayor tasa de muertes en inducción (Gale *et al*, 2005).

Por otra parte, en LMA se ha propuesto que la sobre-expresión del gen *FLT3* o bien la longitud de la ITD pudiesen tener implicaciones pronósticas. Al respecto, Stirewalt *et al* encontraron una menor SG y SLR en los pacientes con LMA e ITD >40 nucleótidos respecto a pacientes con ITD <40 nucleótidos o sin alteraciones en *FLT3*

(Stirewalt *et al*, 2006); por el contrario, la sobre-expresión de *FLT3* en LMA (incluyendo un 8% de pacientes LPA) parece no tener significancia pronóstica (Kainz *et al*, 2005). Estas observaciones no han sido realizadas a la fecha en una cohorte exclusiva de LPA.

3.3.4 Sobreexpresión de *CXCR4*

El gen *CXCR4* actúa como receptor del ligando CXCL12 o *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) y la unión de estas moléculas promueve la progresión tumoral ya que estimula vías de crecimiento y supervivencia tumoral, así como el reclutamiento de células endoteliales para la formación de nuevos vasos sanguíneos (Burger & Kipps, 2006). La expresión de *CXCR4* en LMA se ha asociado a la presencia de mutaciones en *FLT3* así como una menor SG y SLR (Konoplev *et al*, 2007; Rombouts *et al*, 2004; Spoo *et al*, 2007), aunque hasta el momento no se han realizado estudios en pacientes con LPA.

3.3.5 Genes de resistencia a drogas

Las proteínas asociadas a resistencia a fármacos (MDR o *multidrug resistance*) son un conjunto de moléculas que en su mayoría participan en la membrana celular como bombas de eflujo para la eliminación de sustancias exógenas (fármacos), por lo que su sobre-expresión se asocia a resistencia a tratamiento y un peor pronóstico en LMA (Schaich *et al*, 2005; Galimberti *et al*, 2004). En el caso particular de la LPA, existen dos estudios que evaluaron la expresión de genes como p-glycoprotein (PGP), lung resistance-related protein (LRP) y multidrug resistance-associated protein (MRP1) en un número reducido de pacientes. Candoni *et al* analizaron 36 pacientes al diagnóstico y no encontraron diferencias en la expresión de estos genes entre los distintos grupos de riesgo del protocolo GIMEMA (Candoni *et al*, 2003), mientras que Michieli *et al* tampoco encuentran diferencias entre los pacientes que recaen de los que se mantienen en remisión, y aunque encuentran un aumento de la PGP en 3 de 4 casos con segundas recaídas, concluyen que el estudio de este tipo de genes no tienen valor pronóstico en LPA (Michieli *et al*, 2000).

3.3.6 Otros genes de expresión aberrante

Los estudios de perfil de expresión génica han permitido encontrar potenciales

genes diana que puedan servir para aspectos diagnósticos, pronósticos e incluso terapéuticos (Bullinger *et al*, 2004;Radmacher *et al*, 2006;Wilson *et al*, 2006). La LPA no ha sido la excepción, ya que diversos estudios han descrito una serie de genes con expresión diferencial entre los pacientes con t(15;17) (Gutierrez *et al*, 2005;Marasca *et al*, 2006;Haferlach *et al*, 2005). Entre las posibles dianas cabe destacar el *hepatocyte growth factor* (HGF), que actúa como un potente factor angiogénico y el fibroblast growth factor 13 (FGF13) (Gutierrez *et al*, 2005). Mientras que el primero ya había sido relacionado con la LPA por su sobreexpresión *in vitro* en la línea células HL-60 (portadora de la translocación t[15;17]) (Afford *et al*, 1995;Nishino *et al*, 1991), no existían reportes previos del FGF13 en LPA. Estos dos genes constituyen un punto de interés para analizar su impacto clínico en pacientes con LPA.

4. Estudios de Enfermedad Residual Mínima (ERM)

4.1 Definición de ERM

Las actuales estrategias terapéuticas de las hemopatías malignas consiguen una elevada tasa de remisiones completas (RC), definida como la incapacidad de detectar el tumor por técnicas de imagen o de identificar células tumorales mediante técnicas citomorfológicas clásicas (límite de detección del 5%). Sin embargo, muchos pacientes van a recaer de su enfermedad debido a la existencia de un pequeño número de células malignas que no son detectadas con la metodología convencional, que es lo que se denomina enfermedad residual mínima (ERM). Por esta razón, los enfermos son sometidos indistintamente a tratamientos de consolidación, incluido el trasplante de progenitores hematopoyéticos, para eliminar la ERM. Ello hace que algunos pacientes reciban más tratamiento del necesario, mientras que en otros es insuficiente. Por tanto, la detección de células leucémicas en pacientes en aparente remisión morfológica completa, ha ido adquiriendo en los últimos años una importancia trascendental en la detección y seguimiento de pacientes con mayor probabilidad de recaída y como consecuencia, un mal pronóstico a largo plazo (Kern *et al*, 2008;Sanz, 2006).

Existen diferentes técnicas de estudio para determinar y cuantificar la ERM, según el tipo de neoplasia: la citometría de flujo (CMF), la inmunocitología y técnicas moleculares como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la transcripción inversa

acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la cuantificación por medio de PCR en tiempo real (RQ-PCR). En tumores hematológicos, los métodos más útiles para detectar ERM por su alta sensibilidad (detección de una célula leucémica entre 10^4 y 10^6 células normales), y de las que se dispone de más información, son las técnicas de inmunofenotipo mediante citometría de flujo (Vidriales *et al*, 2003) y las técnicas moleculares (tanto RT-PCR como RQ-PCR) (van Dongen *et al*, 1999; Gabert *et al*, 2003).

4.2 Técnicas de evaluación moleculares

4.2.1 RT-PCR cualitativa

Desde su introducción a principios de la década pasada, la RT-PCR cualitativa ha sido la principal metodología empleada para el seguimiento de ERM por medio de la detección de distintos genes de interés y transcritos de fusión. Basado en técnicas de microdilución, el grupo europeo BIOMED-I ha establecido protocolos para la mayoría de genes de fusión recurrentes en leucemias, con una sensibilidad de 10^{-4} en la técnica de RT-PCR cualitativa, detectando una célula leucémica entre 10.000 células normales (van Dongen *et al*, 1999). Estas observaciones han llevado al concepto de remisión molecular (es decir negatividad en la prueba de RT-PCR) y de recaída molecular (momento en el que la prueba se hace positivo, sin evidencia hematológica de enfermedad) (Kern *et al*, 2008).

Sin embargo, esta prueba puede generar falsos positivos por contaminación durante el procesamiento; así como falsos negativos debido a una pobre calidad de ARN o fallos en la retrotranscripción de ARN o en la PCR (Grimwade & Lo-Coco, 2002; Lo-Coco *et al*, 1999). Asimismo, se ha observado una importante variabilidad entre los resultados de una muestra en diferentes laboratorios (Bolufer *et al*, 2001).

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

La técnica de PCR cuantitativa por tiempo real (RQ-PCR) ha surgido como una alternativa a la RT-PCR para el estudio de ERM, a partir de los estudios multicéntricos llevados a cabo en Estados Unidos con el *North American Cooperative Group* (Gallagher *et al*, 2003) y Europa, entre los que destacan *Europe against Cancer-EAC-program* (Gabert *et al*, 2003) y el *German Acute Myeloid Cooperative Group* (Schnittger

et al, 2003).

Comparando ambas metodologías, la RQ-PCR presenta una serie de ventajas teóricas relacionadas a aspectos técnicos como un alto rendimiento, parcial automatización del proceso y menor riesgo de falsos positivos debidos a contaminación cruzada. Sin embargo, la ventaja fundamental de la RQ-PCR es que a diferencia de la RT-PCR, que es una PCR a tiempo final en la que no es posible conocer con exactitud el número de células tumorales, la RQ-PCR realiza una medición de fluorescencia en forma continua, proporcionando una información dinámica en tiempo real del número de copias del transcrito tumoral en estudio. Además, esta metodología permite cuantificar un gen control interno para evaluar la integridad de la muestra que estamos analizando y por tanto el número de copias del gen problema se puede normalizar con el número de copias del gen control, eliminando así los cambios debido a errores en la cantidad y/o calidad de la muestra en estudio.

A semejanza con la RT-PCR, la alta sensibilidad alcanzada con esta técnica (sensibilidad de 10^{-4} - 10^{-5}) conlleva un inconveniente como lo son los resultados de ERM positivos que sin embargo son clínicamente irrelevantes ya que son pacientes que conservan su remisión hematológica (Gabert *et al*, 2003). Por esta razón es necesario establecer los umbrales que distingan los resultados clínicamente significativos de los que no son, en un protocolo debidamente estandarizado de RQ-PCR (Sanz *et al*, 2005b).

4.2.3 Aspectos metodológicos de la evaluación de ERM.

Independientemente de la técnica empleada, existen varios parámetros a tener en cuenta para la interpretación de resultados de ERM, como lo son el intervalo de tiempo entre la toma de las muestras, contexto terapéutico, marcador tumoral empleado y gen control, así como la sensibilidad de la técnica. Además, la posible estandarización interlaboratorio de la metodología debido a la gran cantidad de variables preanalíticas (tipo de muestra, tipo de separación de células, uso de ARN total o ARNm o metodología para la síntesis de ADNc) y analíticas (primers, tipos de sonda, métodos de cuantificación) (Gabert *et al*, 2003). La muestra más utilizada para el estudio de ERM es el aspirado de médula ósea (MO). Sin embargo, varios investigadores han demostrado

sensibilidades analíticas comparables entre MO y sangre periférica en la detección de *PML-RAR α* (Gallagher *et al*, 2003), *AML-ETO* y *CBF β -MYH11* (Stentoft *et al*, 2006; Leroy *et al*, 2005a; Yoo *et al*, 2006).

Las dianas moleculares para estudio de ERM incluyen tanto transcritos de genes de fusión, mutaciones cuantificables por medio de primers específicos y genes de expresión aberrante. Estas dianas idealmente deben ser específicas, con una alta expresión en células tumorales y baja o nula expresión 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 (Kern *et al*, 2008).

4.3 Evaluación de la ERM en LMA no M3

4.3.1 LMA no M3 con alteraciones recurrentes

Aunque las leucemias con fusiones de “*core binding factors*” (CBF) tienen un pronóstico favorable (tanto t[8;21] como inv16), existen un 10-30% de probabilidad de fallo de tratamiento, por lo que el seguimiento de la ERM resulta vital. Se ha demostrado que una reducción <2 log de *AML-ETO* o *CBF β -MYH11* posterior a la terapia de inducción es asociado a una menor SLE y a mayor riesgo de recaída (Marcucci *et al*, 2005b; Stentoft *et al*, 2006), aunque otro estudio sólo encuentra relevancia clínica en la cuantificación post-consolidación (Schnittger *et al*, 2003).

4.3.2 LMA con cariotipo normal

La ausencia de un marcador para ERM específico y la alta incidencia de LMA con cariotipo normal (LMA-CN) han convertido a este subgrupo en centro de estudio para nuevas dianas de seguimiento de ERM. Las mutaciones que han sido más ampliamente analizadas son las *FLT3-ITD*, *NPM1* y en menor medida *MLL-PTD* y *CEBPA*, lo cual abarcaría cerca de un 75% de las LMA-CN (Kern *et al*, 2008). En general, la mayoría de estos análisis son preliminares y fundamentalmente metodológicos, no existiendo en la actualidad estudios relevantes que demuestren o no, su utilidad clínica. A continuación se detallan los principales estudios que emplean estos marcadores como diana de estudio de ERM.

En un estudio con 97 pacientes, Schnittger *et al* describieron una técnica de RQ-

PCR con primers específicos de paciente para la cuantificación de *FLT3*-ITD (Schnittger *et al*, 2004). La técnica demostró ser efectiva pero muy laboriosa.

Con el gen *NPM1* se han obtenido los mejores resultados, en vista que con sólo dos primers específicos para la mutación A y la mutación B se detecta más del 90% de los casos con alteraciones en este gen y que el *NPM1* presenta una muy alta expresión en células tumorales pero no en sanas, lo que genera una sensibilidad importante de la técnica (10^{-5} - 10^{-6}) (Gorello *et al*, 2006). La *MLL*-PTD presenta datos más discretos debido a que se expresa en forma basal en MO y sangre periférica sanas (Schnittger *et al*, 1998), por lo que la sensibilidad que se obtiene es relativamente baja (10^{-3}) para estudios de ERM (Weisser *et al*, 2005b). Un panorama similar ocurre con el gen *CEBPA*, cuyas mutaciones son estables y útiles para el seguimiento de ERM (Shih *et al*, 2006b); pero la gran diversidad de éstas y la necesidad de utilizar primers específicos para cada paciente hacen poco práctica esta opción para el trabajo rutinario.

Otro grupo de genes diana son aquellos que se sobreexpresan de manera diferencial en células tumorales. La desventaja de éstos es que, a diferencia de los transcritos de fusión y las mutaciones, siempre existirá alguna expresión basal en tejidos sanos, con lo cual la sensibilidad es pobre (10^{-2}), con algunas excepciones (Kern *et al*, 2008). Dentro de éstos últimos se puede mencionar el *WT1*, el *EVI1* y el *PRAME*. Con el *WT-1* se alcanzan sensibilidades de 10^{-3} - 10^{-4} tanto en LMA de adultos como pediátricas (Weisser *et al*, 2005a; Lapillonne *et al*, 2006); sin embargo, diversos autores recomiendan este marcador sólo en caso de ausencia de otra molécula de seguimiento (Hamalainen *et al*, 2008; Kern *et al*, 2008). En el caso de *EVI1* y su gen de fusión *MDS-EVI1*, producto de un *splicing* alternativo, existen sólo dos referencias evaluando la aplicación de la ratio *EVI1/MDS-EVI1* en ERM, aunque de ellos se concluye que el marcador tiene alta sensibilidad ($>10^{-4}$) y que fue capaz de detectar 3 de 4 recaídas al menos 1 mes antes de la manifestación hematológica (Weisser *et al*, 2007).

Respecto al gen *PRAME*, varios autores han descrito características favorables para su utilización como marcador de ERM, entre las que se puede mencionar: sobreexpresión en un alto porcentaje de tumores sólidos y hematológicos, poca o nula expresión en tejidos normales (Ikeda *et al*, 1997; van Baren *et al*, 1998) y la

demostración clínica que en pacientes con LMA, *PRAME* disminuye a niveles basales cuando se alcanza la remisión completa y aumenta durante la recaída hematológica (Steinbach *et al*, 2006;Greiner *et al*, 2006). En la literatura existen análisis de ERM con *PRAME* mediante PCR semi-cuantitativas (Matsushita *et al*, 2003) o PCR en tiempo real (Steinbach *et al*, 2006;Greiner *et al*, 2006), demostrando que *PRAME* es un marcador útil para el seguimiento de un alto porcentaje de pacientes con LMA no M3.

4.4 Evaluación de la ERM en LPA

La evaluación periódica del transcrito de fusión *PML-RAR α* mediante RQ-PCR constituye el método de elección para el análisis de ERM en LPA (Lo-Coco *et al*, 2003;Sanz *et al*, 2005a). En el contexto de protocolos de tratamiento que emplean ATRA más quimioterapia (PETHEMA, AIDA, IRC), diversos estudios han llegado a similares conclusiones : i) El análisis precoz de ERM tanto en el momento en que se alcanza la remisión completa del paciente, que en la mayoría de los casos es en post-inducción, como los dos primeros ciclos de consolidación, no tiene valor pronóstico y por lo tanto no debe implicar modificaciones en el esquema de tratamiento aplicados (Gallagher *et al*, 2003;Lee *et al*, 2006;Sanz, 2006).ii) Una prueba positiva por RQ-PCR inmediatamente después del último ciclo de consolidación es razón suficiente para aplicar terapia de rescate para evitar una posterior recaída (Breccia *et al*, 2004;Gallagher *et al*, 2003;Grimwade & Lo-Coco, 2002;Lo-Coco *et al*, 2003;Sanz, 2006).iii) Los pacientes con prueba de ERM negativa se asocian a una mayor supervivencia en la mayoría de pacientes (Breccia *et al*, 2004;Gallagher *et al*, 2003;Grimwade & Lo-Coco, 2002;Sanz, 2006) pero deben ser evaluados periódicamente tomando en cuenta que hasta un 25% de ellos están en riesgo de una recurrencia de la enfermedad y que una recaída molecular está asociada a un altísimo riesgo de desarrollar una recaída hematológica (Gallagher *et al*, 2003;Sanz, 2006).

En este sentido, son interesantes los trabajos que demuestran la utilidad de aplicar un tratamiento tan pronto se detecta una recaída molecular, no solo por el mayor porcentaje de supervivencias en comparación con un tratamiento iniciado al observarse una recaída clínica, sino también por el hecho de que los pacientes tratados muy precozmente muestran una menor incidencia de mortalidad asociada a problemas hemorrágicos(Lo-Coco F. *et al*, 2007;Sanz, 2006).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis

El desarrollo de la leucemia mieloblástica aguda (LMA) implica la acumulación de una serie de alteraciones genéticas que afectan los mecanismos normales de crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Los hallazgos citogenéticos que se derivan de esta premisa han servido como marcadores diagnósticos para diversos subtipos de LMA dentro de la reciente clasificación de la Organización Mundial de la Salud, así como para establecer grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, con claras diferencias a nivel de tasas de remisión completa, riesgo de recaída y supervivencia libre de enfermedad y global.

Sin embargo, muchos de estos subgrupos con algún rasgo citogenético particular no son homogéneos, ya que dos leucemias incluidas en una misma clasificación pueden tener una evolución clínica completamente diferente. Cabe destacar el grupo de las LMA con cariotipo normal (LMA-CN), que comprende un 40-50% de todas las LMA del adulto y hasta 25% de LMA pediátricas. En los últimos 15 años, se han descubierto una serie de mutaciones y cambios en la expresión génica que condicionan la evolución clínica de las LMA-CN, tradicionalmente incluidas dentro del subgrupo de LMA con pronóstico intermedio.

Ejemplo de lo anterior es la detección de duplicaciones en tandem del gen *FLT3* (*FLT3-ITD*) o la sobreexpresión del gen del tumor de Wilms (*WT1*) que se asocian a peor pronóstico en las LMA-CN, o bien la aparición de mutaciones en los genes nucleofosmina (*NPM1*) y *CEBPA* que confieren un mejor pronóstico a las LMA-CN. Estos marcadores son parte de una amplia lista que incluye sobreexpresión de genes como *EVI1*, *PRAME*, *BAALC*, *MN1*, *ERG* y *RHAMM*, los cuales en su mayoría se asocian con pronóstico adverso, a excepción del *PRAME* que aparece sobreexpresado en LMA de buen pronóstico como la t(8;21) o la LPA. No obstante, a la fecha no se ha realizado un estudio que analice todos estos marcadores simultáneamente y su impacto diferencial en un número significativo de muestras de LMA al diagnóstico.

Otro campo de estudio para la detección de moléculas de valor pronóstico son aquellas vías de señalización que están activadas de forma anómala en las células leucémicas. Una de las vías más llamativas es la PI3K/AKT, ya que diversos estudios han señalado su relevancia en procesos de proliferación celular e inhibición de

apoptosis, por medio del eje FLT3-ITD/AKT7FOXO3a/p27(CDKN1B). Algunos estudios han analizado el impacto pronóstico de los distintos componentes de esta ruta, pero los resultados no son concluyentes. Además, a la fecha no existen trabajos que evalúen los niveles de expresión génica de estos marcadores en un cohorte importante de LMA-CN.

Respecto a la LPA, la presencia de la translocación t(15;17)(q22;q11-12) y su transcrito resultante *PML-RAR α* , ha permitido tener un excelente marcador para diagnóstico y seguimiento de la Enfermedad Residual Mínima (ERM). Sin embargo, este gen de fusión carece de valor pronóstico al diagnóstico o en la evaluación post-remisión, lo cual motiva a encontrar genes cuya expresión permita separar subgrupos pronósticos dentro de la LPA. Los estudios de perfiles de expresión génica han permitido señalar dianas de interés como el *HGF*, *FGF13*, el *CXCR4* y los genes de resistencia a drogas *MDR1* y *MRP*. Además, diversos trabajos han asociado altas expresiones de *PRAME* con la presencia de t(15;17), aunque estas conclusiones se basan en un número reducido de pacientes y a la fecha no existen estudios que evalúen el impacto clínico de este gen en una cohorte grande de pacientes con LPA.

En los últimos años, el tratamiento para pacientes con LPA basado en ácido todo trans-retinoico (ATRA) más quimioterapia ha logrado remisiones completas en más de un 80% de los casos. Sin embargo, existe un grupo importante de pacientes (15-20%), donde se observa una persistencia de clones resistentes que eventualmente condicionarían al paciente a una recaída. Para la valoración de esta ERM se emplea actualmente técnicas moleculares para la detección del gen de fusión *PML-RAR α* . La metodología más utilizada ha sido la retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa (RT-PCR). Existe abundante literatura que asocia un resultado de RT-PCR positivo, una vez finalizado el tratamiento de consolidación, con una alta probabilidad de recaída hematológica; mientras que un resultado negativo se relaciona con largas sobrevividas y un bajo riesgo de perder su remisión clínica. Sin embargo, esta técnica presenta una serie de inconvenientes como lo son que sólo proporciona información cualitativa o a lo sumo semicuantitativa y que el análisis del producto de PCR es a tiempo final por lo que no es posible conocer con exactitud el número de células tumorales existente en la muestra, además de presentar una importante variabilidad inter-laboratorios.

Recientemente, la cuantificación de número de copias normalizado (NCN) del

tránsito *PML-RAR α* basado en la técnica de PCR en tiempo real (RQ-PCR) ha tomado auge en el análisis de ERM en LPA. La RQ-PCR presenta una serie de ventajas respecto a la RT-PCR como son la evaluación cuantitativa de la cinética de remisión molecular; además de ser altamente reproducible. Aunque se han desarrollado diversos protocolos para este tipo de metodologías, actualmente no hay consenso sobre el nivel de NCN capaz de discriminar entre grupos de alto y bajo riesgo de recaída, así como la frecuencia en el análisis y el tipo de muestras adecuadas para el seguimiento de estos pacientes. Además, no hay estudios que comparen la eficacia para la detección temprana de recaídas entre la RT-PCR y la RQ-PCR o bien la inclusión de nuevos marcadores de ERM que pueden servir de complemento al gen de fusión *PML-RAR α* .

Objetivos

1. Marcadores de factor pronóstico en LMA con cariotipo normal

- 1.1. Analizar la incidencia y el impacto pronóstico de la sobreexpresión de los genes *ERG*, *EVI1*, *MN1*, *PRAME*, *RHAMM* y *WT-1* en muestras al diagnóstico de LMA no M3 con cariotipo normal.
- 1.2. Comparar el valor pronóstico de la sobreexpresión de estos genes en LMA de cariotipo normal en relación a la presencia o ausencia de mutaciones en *FLT3* y *NPM1*.
- 1.3. Evaluar el valor pronóstico de los genes *AKT*, *FOXO3a* y *p27* en muestras al diagnóstico de LMA no M3 con cariotipo normal con *FLT3*-ITD y no mutado.

2. Marcadores de factor pronóstico en LPA/ LMA-M3

- 2.1. Estudiar la incidencia y el impacto pronóstico de la sobre-expresión del gen *PRAME*.

3. Enfermedad residual mínima (ERM) en LPA/ LMA-M3

- 3.1. Analizar el impacto pronóstico del número de copias del gen *PML-RAR α* en las distintas etapas de tratamiento: post-inducción, post-consolidación, en terapia de mantenimiento y fuera de tratamiento.
- 3.2. Comparar el valor predictivo de la RQ-PCR respecto a la técnica cualitativa tradicional de PCR (RT-PCR).

PACIENTES Y METODOLOGÍA

1. Sujetos de estudio

1.1 Pacientes con LMA cariotipo normal

Para los estudios en LMA cariotipo normal (LMA-CN), se obtuvieron 121 muestras al diagnóstico recibidas en el laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario de Salamanca entre julio de 1995 y septiembre del 2007. Los pacientes fueron clasificados por los criterios morfológicos de la FAB (Bennett *et al*, 1985) e inmunofenotípicos (San-Miguel *et al*, 2002). Además, se les asignó un subgrupo de riesgo de acuerdo al análisis citogenético (Byrd *et al*, 2002; Grimwade *et al*, 1998; Slovak *et al*, 2000). En casos sospechosos, se realizó la detección de los genes de fusión *AML1-ETO* y *CBF β -MYH11* por medio de RT-PCR cualitativa (van Dongen *et al*, 1999) o bien RQ-PCR (Gabert *et al*, 2003). Sólo pacientes con cariotipo normal y RQ-PCR negativas para los transcritos de fusión fueron analizados en el presente apartado.

1.2 Pacientes con LPA/LMA-M3

De junio del 1996 a septiembre del 2005, 145 pacientes (límite de edad entre 8 y 84 años) fueron referidos al laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario de Salamanca. Todos ellos fueron diagnosticados como LPA basados en criterios morfológicos, inmunofenotípicos y citogenéticas (Bennett *et al*, 1985; Sanz *et al*, 1999), así como la detección de del gen de fusión *PML-RAR α* por RT-PCR (van Dongen *et al*, 1999) y RQ-PCR (Gabert *et al*, 2003). Asimismo, se analizaron muestras de post-inducción (PI) y post-consolidación (PC) por ambas técnicas, utilizando ADN copia (ADNc) a partir de ARN conservado a -80°C. Las muestras durante el tratamiento de mantenimiento o fuera de tratamiento fueron estudiadas por al menos una prueba molecular y cualquier resultado positivo fue confirmado, tanto por RT-PCR como RQ-PCR, empleando nuevo ADNc. Las muestras subsecuentes de esos pacientes fueron analizadas en paralelo por ambas metodologías para el *PML-RAR α* , con gene scanning para la detección de *FLT3-ITD* y RQ-PCR para el resto de marcadores.

2. Protocolo de tratamiento

2.1 Pacientes con LMA con cariotipo normal

Todos los pacientes con LMA-CN candidatos a recibir una quimioterapia intensiva recibieron un ciclo de inducción común con de 1-2 ciclos de antraciclina (60 mg/m²

daunorubicina or 12 mg/m² idarubicina) y arabinósido de citosina (ARA-C a 200 mg/m²) en esquema 3+7 para menores de 60 años y 2+5 para mayores de 60 años, según lo descrito en el protocolo español PETHEMA-LMA99. Posteriormente, los pacientes en remisión completa recibían un único ciclo índetico de consolidación, seguido de 2 ciclos de intensificación con ARA-C (3 g/m² cada 12 horas hasta un total de 8 dosis más antraciclina (daunorubicina -45 mg/m²- o idarubicina -12 mg/m²-) por 3 días. El tratamiento posterior de consolidación o intensificación variaba según la presencia de ERM al final de la inducción, posibilidad de realizar un tranplante de precursore hematopoyéticos, hallazgos moleculares y edad.

2.2 Pacientes con LPA/LMA-M3

Todos los pacientes evaluados antes de noviembre de 1999 recibieron el protocolo de tratamiento de PETHEMA-LPA96 (Sanz *et al*, 1999), mientras que posterior a esta fecha se aplicó el protocolo PETHEMA-LPA99 (Sanz *et al*, 2004). Ambos esquemas incluían una fase de inducción con ácido todo-trans retinoico (ATRA) más idarubicina; además de tres ciclos de consolidación de idarubicina, mitoxantrone y idarubicina, seguido de una fase de mantenimiento con ATRA, methotrexate y mercaptopurina por 2 años (Sanz *et al*, 1999). El protocolo LPA99 modificaba la fase de consolidación, usando ATRA más dosis altas de idarubicina en pacientes con recuento de leucocitos mayores a 10x10⁹/L y/o plaquetas menores a 40x10⁹/L, los cuales se consideran como de alto riesgo de recaída (Sanz *et al*, 2004).

3. Definición de remisión y recaída hematológica y molecular

La remisión hematológica fue definida cuando se detectaba en un aspirado de médula ósea (MO) <5% de células leucémicas y se observaba una normalización de los recuentos en sangre periférica (SP), por lo que una recaída hematológica se consideraba cuando en MO se encontrara ≥5% de células tumorales (Lowenberg *et al*, 1999;Sanz *et al*, 2004). En LPA, la remisión molecular (RM) se definió como la detección de menos de una copia del gen de fusión normalizada respecto al gen control *ABL* (<1 NCN) (Gabert *et al*, 2003). En LPA, una recaída molecular fue definida con la reaparición de un resultado positivo por cualquier método molecular, en dos muestras consecutivas de MO, analizadas posterior al tratamiento de consolidación (Sanz *et al*, 2000). Un resultado falso-positivo fue definido cuando un resultado positivo por

cualquiera de las técnicas moleculares aparecía en un paciente que, sin mediar ningún tratamiento quimioterápico, no desarrolló una recaída molecular en los 6 meses posteriores a la realización de dicha prueba.

4. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN se realizó a partir de leucocitos totales, utilizando el método de tiocianato-fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). La transcripción reversa fue realizada según se ha descrito previamente (van Dongen *et al*, 1999). Un μg de ARN total se agregó a una mezcla de 20 μL de volumen final conteniendo hexámeros random y 200 U de *Super Script Rnase H reverse transcriptase* (Invitrogen, California, EEUU). Se incubó a 42°C por 45 minutos, seguido de 3 minutos a 99°C y 30 minutos a 25°C. El ADNc fue almacenado a -20°C y las alícuotas sobrantes de ARN a -80°C para posteriores análisis.

5. RT-PCR cualitativa para *PML-RAR α*

Para amplificar el gen de fusión *PML-RAR α* , se realizó una RT-PCR en dos pasos o anidada "*nested*", según el protocolo del BIOMED I (van Dongen *et al*, 1999). Una alícuota de 5 μL (100ng) de ADNc fue diluída en 45 μL de una mezcla conteniendo una concentración final de 400 nM de *primers*, 2.5 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTP, buffer de PCR (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3) y 1.0 U de *TaqGold DNA polymerase*. El programa de PCR incluía una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, además de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Para la PCR anidada se empleó las mismas condiciones, excepto por el uso de 2.5 μL de producto de PCR y los respectivos cebadores internos. Finalmente, 25 μL del producto final de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. En cada experimento se incluyó dos controles negativos (uno con un ARN sin *PML-RAR α* y otro con agua destilada) y un control positivo (plásmido comercial ó línea celular NB4). La sensibilidad del ensayo fue establecida en 10^{-4} , utilizando técnica de microdilución (van Dongen *et al*, 1999). El control de calidad sobre la preparación del ADNc se evaluó a través de la amplificación del gen control *ABL*.

6. RQ-PCR cuantitativa para *PML-RAR α* , *AML1-ETO* y *CBF β -MYH11*

La cuantificación de los diferentes transcritos de fusión (*PML-RAR α* , *AML1-ETO* y *CBF β -MYH11*) se llevó a cabo en el equipo "ABI PRISM 7700 DNA Sequence Detection Systems" (Applied Biosystems Inc), según los protocolos de Europe against Cancer Group (EAC) (Gabert *et al*, 2003). Para la realización de la técnica se empleó 5 μ L (100ng) de ADNc, una concentración final de 300 nM de los *primers* y 200 nM de sonda. La cuantificación absoluta se realizó por medio del método de Δ Ct, comparando contra una curva patrón de distintas concentraciones de plásmidos comerciales y el gen *ABL* como control de la integridad del ARN en estudio (Beillard *et al*, 2003). Para que un resultado fuera válido, el ciclo umbral (Ct, "cycle threshold") del gen *ABL* debía estar entre 21.5 y 29.5 y tener al menos 2000 copias (Beillard *et al*, 2003). Además, se incluyó dos controles negativos: ARN de un donante sano (NAC) y agua destilada en lugar de ADNc (NTC). 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 (Δ Rn) y por debajo del valor del intercepto (Y) de la curva patrón menos 1. La sensibilidad del ensayo se estableció en 10^{-5} , utilizando diluciones de ARN de líneas celulares portadoras de la alteración cromosómica en ARN de una línea celular sin gen de fusión (HL-60) (Gabert *et al*, 2003). Todas las muestras fueron analizadas en triplicado y los resultados fueron reportados de acuerdo a las recomendaciones de EAC, es decir, en número de copias normalizadas (NCN), que es el resultado de dividir el número de copias del gen de fusión entre el número de copias del gen *ABL* y esto a su vez multiplicado por 10000 (Gabert *et al*, 2003).

7. Detección de *FLT3-ITD*

La duplicación en tandem del gen *FLT3* (*FLT3-ITD*) fue analizada en todos los pacientes mediante la amplificación por RT-PCR cualitativa de la región yuxta membrana, entre los exones 14 y 15 (Chillon *et al*, 2004) y confirmadas por análisis de *Genescanning*, en el cual el *primer* 5' fue marcado con fluoresceína (5-FAM) y el producto de la RT-PCR resultante fue sometido a una electroforesis en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) para definir el tamaño de su ITD (Thiede *et al*, 2002).

8. Detección y cuantificación de mutaciones en *NPM1*

La detección de mutaciones en el gen de nucleofosmina (*NPM1*) se determinó en muestras de pacientes con LMA no M3 siguiendo el protocolo descrito por Schnittger *et al* (Schnittger *et al*, 2005). En resumen, 2 μL (40ng) de ADNc se agregaron a una mezcla de 20 μL conteniendo 0.5 μM de primers, 0.75 μM de sonda de hibridación (TIB-MolBiol, Munich, Germany), MgCl 4mM y 2 μL de LightCycler-Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics). Las condiciones de termociclado fueron: 95°C-30seg; 40x (95°C-1seg, 55°C-10seg, 72°C-10seg) con una curva de *melting* final. Cuando se detectaba una temperatura de melting diferente a la muestra normal, se procedía a secuenciar el producto de PCR para describir el tipo de mutación en un equipo 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City,CA), según el protocolo de Falini *et al* (Falini *et al*, 2005). 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* (Gorello *et al*, 2006). Brevemente, 5 μL (100 ng) de ADNc se agregaban a una mezcla conteniendo 12.5 μL de Taq Man Universal PCR Master Mix, primers 18 nM, sonda TaqMan[®] 4 nM en un volumen final de 25 μL .

9. RQ-PCR para el análisis de expresión génica

La expresión de los genes descritos en el Cuadro 8 fue realizada en el equipo 7900 HT Fast Real-Time PCR System utilizando los ensayos comerciales TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). El número de identificación de cada ensayo se indica en el Cuadro 8. En resumen, 2 μL (40 ng) de ADNc se agregaban a una mezcla conteniendo 5 μL de TaqMan[®] Fast Master Mix, 0.5 μL del ensayo de expresión comercial en un volumen final de 10 μL . Las condiciones de termociclado fueron: 50°C-2min, 50x (95°C-15seg; 60°C-1min). El ciclo en el cual la reacción superaba un umbral determinado (C_t) servía para cuantificar la expresión del gen en estudio respecto a una gen control (*ABL1*), por medio de fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ donde $\Delta C_t = C_{t_{gen\ en\ estudio}} - C_{t_{ABL1}}$ y $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{Paciente}} - \Delta C_{t_{MO\ sana\ (mediana)}}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Cuadro 8. Genes estudiados por TaqMan® Gene Expression Assays

Nombre del gen	Identificación de ensayo
<i>AKT</i>	Hs00178289_m1
<i>BAALC</i>	Hs00227249_m1
<i>ERG</i>	Hs01554634_m1
<i>FOXO3a</i>	Hs00921424_m1
<i>EVI1</i>	Hs00602795_m1
<i>MLL-PTD</i>	Hs03043624_ft
<i>MN1</i>	Hs00159202_m1
<i>P27 (CKN1B)</i>	Hs00153277_m1
<i>PRAME</i>	Hs00196132_m1
<i>RHAMM</i>	Hs00234864_m1
<i>WT1</i>	Hs00240913_m1
<i>ABL1</i> (gen control)	Hs00245445_m1

10. Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete informático SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL). Para el análisis univariante de factores asociados a riesgo de recaída se utilizó la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher. La supervivencia libre de recaída (SLR) fue definida como el período de tiempo entre la remisión completa (RC) y la primera recaída, ya fuese molecular o hematológica, o la última muestra de seguimiento registrada. La supervivencia global (SG) fue definida como el período de tiempo entre la remisión completa y la fecha de muerte o la última muestra de seguimiento registrada. La probabilidad de SLR o SG fue calculada utilizando el método de Kaplan-Meier y comparándolo con la prueba de log-rank (Kaplan, 1958). El impacto de múltiples variables sobre la SLR fue analizada con el modelo de regresión de Cox (Cox D.R., 1972).

RESULTADOS

En este apartado los resultados obtenidos se irán presentando por los artículos generados para la presente Tesis Doctoral. Cada uno de ellos irá precedido de un breve resumen en español.

1. A Marcadores con valor pronóstico en LMA cariotipo normal

Molecular Stratification Model For Prognosis In Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia (CN-AML) Enviado a Blood

En el presente trabajo se ha analizado la expresión de ocho marcadores moleculares (*ERG*, *EVI1*, *MLL-PTD*, *MN1*, *PRAME*, *RHAMM* y *WT1*), así como mutaciones en los genes *FLT3* y *NPM1* en 121 pacientes LMA con cariotipo normal (LMA-CN). En el análisis multivariante, la alta expresión de *ERG* o *EVI1* y la baja expresión de *PRAME* se asociaron a una menor supervivencia global (SG) y libre de recaída (SLR). Con estos datos, se estableció un sistema de puntuación asignando un valor de 0 a los perfiles favorables (bajo *ERG*, bajo *EVI1* y alto *PRAME*) y 1 a los perfiles opuestos. Este modelo permitió distinguir 4 subgrupos (score 0 a 3) de diferente SG a dos años (79%, 65%, 46% y 27%; $p=0.001$) y SLR a 2 años (92%, 65%, 49% and 43%; $p=0.005$). Incluso, este modelo pudo segregar pacientes dentro de los grupos de alto riesgo del sistema de clasificación *FLT3/NPM1* respecto a SG ($p=0.001$) y SLR ($p=0.013$). De esta forma, se propone un nuevo sistema de puntuación molecular para pacientes con LMA-CN.

TITLE: MOLECULAR STRATIFICATION MODEL FOR PROGNOSIS IN CYTOGENETICALLY NORMAL ACUTE MYELOID LEUKEMIA (CN-AML)

AUTHORS: SANTAMARÍA C^{1,2}, CHILLÓN MC¹, GARCÍA-SANZ R^{1,2}, PÉREZ C³, CABALLERO D¹, RAMOS F⁴, GARCÍA DE COCA A⁵, ALONSO JM⁶, GIRALDO P⁷, BERNAL T⁸, QUEIZÁN JA⁹, RODRIGUEZ JN¹⁰, FERNÁNDEZ-ABELLÁN P¹¹, BÁREZ A¹², PEÑARRUBIA MJ¹³, VAZQUEZ L¹, BALANZATEGUI A¹, SARASQUETE ME¹, ALCOCEBA M¹, DÍAZ-MEDIAVILLA J³, SAN MIGUEL JF^{1,2} AND GONZALEZ M^{1,2}.

INSTITUTIONS:

- 1 - HOSPITAL UNIVERSITARIO, SALAMANCA, SPAIN.
- 2 - CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER-IBMCC (USAL-CSIC) OF SALAMANCA, SPAIN.
- 3 - HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS, MADRID, SPAIN
- 4 - COMPLEJO HOSPITALARIO DE LEÓN, SPAIN
- 5 - HOSPITAL CLÍNICO DE VALLADOLID, SPAIN
- 6 - HOSPITAL RÍO CARRIÓN DE PALENCIA, SPAIN
- 7 - HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA, SPAIN
- 8 - HOSPITAL CENTRAL DE ASTURIAS, OVIEDO, SPAIN
- 9 - HOSPITAL GENERAL DE SEGOVIA, SPAIN
- 10 - HOSPITAL JUAN RAMÓN JIMÉNEZ, HUELVA, SPAIN
- 11 - HOSPITAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE, SPAIN
- 12 - HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE SONSOLES, ÁVILA, SPAIN
- 13 - HOSPITAL RÍO HORTEGA, VALLADOLID, SPAIN

RUNNING TITLE: MOLECULAR STRATIFICATION IN CN-AML

ACKNOWLEDGEMENTS FOR RESEARCH SUPPORT:

This work has been partially supported with the grants PI061351 from the Spanish “Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social”, 89/A/06 from “Gerencia Regional de Salud, Junta Castilla y León”, and CIC, IBMCC (USAL-CSIC), Spain.

KEY WORDS: ACUTE MYELOID LEUKEMIA, REAL TIME QUANTITATIVE PCR, *ERG*, *PRAME*, *EVI1*

TOTAL TEXT WORD COUNT: 1193 WORDS; **ABSTRACT WORD COUNT:** 147 WORDS,

CONTACT ADDRESS: RAMÓN GARCÍA-SANZ, MD, PHD

DEPARTMENT OF HEMATOLOGY
UNIVERSITY HOSPITAL OF SALAMANCA
PASEO DE SAN VICENTE, 58-182
SALAMANCA, 37007 SPAIN
PHONE: +34-923-291384
FAX: +34-923-294624
E-MAIL: rgarcias@usal.es

1. ABSTRACT

We have evaluated nine new molecular markers (*ERG*, *EVI1*, *MLL*-PTD, *MN1*, *PRAME*, *RHAMM*, and *WT1* gene expression levels plus *FLT3* and *NPM1* mutations) in 121 de-novo cytogenetically normal acute myeloblastic leukemias (CN-AML). In the multivariate analysis, high *ERG* or *EVI1* and low *PRAME* expressions were associated with a shorter relapse free and overall survival (RFS & OS). A 0 to 3 score was given by assigning a value of 0 to favorable parameters (low *ERG*, low *EVI1* and high *PRAME*) and 1 to adverse parameters. This model distinguished four subsets of patients with different OS (2-yr OS of 79%, 65%, 46% and 27%; $p=0.001$) and RFS (2-yr RFS of 92%, 65%, 49% and 43%; $p=0.005$). Furthermore, this score identified patients with different OS ($p=0.001$) and RFS ($p=0.013$) even within the *FLT3/NPM1* intermediate/high-risk subgroups. Here we propose a new molecular score for CN-AML which could improve patient risk-stratification.

2. INTRODUCTION

Patients with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics (CN-AML) are usually categorized as an intermediate-risk group, with a 5-year survival rate varying between 24% and 42%. It is likely that differences in outcome reflect the molecular heterogeneity of CN-AML whose prognosis is influenced by several gene mutations or aberrant gene expression.^{1,2} *FLT3* internal tandem duplications (*FLT3*-ITD),³⁻⁵ *MLL* partial tandem duplication (*MLL*-PTD),⁶ and overexpression of *ERG*,⁷ *WT1*,⁸ and *MN1*⁹ have been associated with a poor prognosis in CN-AML, while *NPM1* gene mutations are associated with a favorable outcome.¹⁰⁻¹² Furthermore, in the intermediate and high-risk karyotypic groups, *EVI1* overexpression is associated with an adverse prognosis,¹³ whereas a high *PRAME* expression defines a good prognosis in several AML subtypes, especially those with favorable cytogenetic translocations.¹⁴⁻¹⁶

Although most studies in CN-AML patients have focused on one or two molecular markers, there is increasing evidence which suggests that possible outcomes based on single gene abnormalities are hard to predict, and a more accurate prediction can be obtained by identifying risk categories based on the information provided by two or more parameters.¹ For this reason, we have simultaneously evaluated 9 new molecular markers in 121 CN-AML patients, showing that *ERG*, *EVI1* and *PRAME* afford independent prognostic information and allow us to establish a simple score system for risk stratification.

3. MATERIAL AND METHODS

We have analyzed pre-treatment bone marrow (BM) samples from 121 adults diagnosed as novo AML and normal cytogenetics. All patients were treated according to the Spanish PETHEMA LAM-99 protocols.¹⁷ Ten patients (8.3%) died before they had reached complete remission (CR), ninety-one (75.2%) achieved CR with induction therapy and 20 (16.5%) were refractory to the standard induction treatment. Nine patients from this latter group achieved CR after salvage therapy. Finally, 43 of the 100

patients who achieved CR eventually relapsed during the evaluation period. The median follow-up for censored patients was 26 months (range 10-72). In addition, ten BM samples from healthy donors were processed as controls for gene expression analysis. Informed consent to use biological samples and clinical data was obtained in all cases.

Total RNA from diagnostic BM and subsequent reverse transcription was performed according to the protocols approved by the Europe against Cancer Group (EAC) program.¹⁸ All samples were analyzed for *FLT3*-ITD,⁵ mutations in *NPM1*,¹¹ and relative expression of the following genes: *ABL1* (as control gene), *ERG*, *EVI1*, *MLL-PTD*, *MN1*, *PRAME*, *RHAMM*, and *WT1*, using the TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). Relative quantification was calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta C_t}$, as previously described.¹⁶ The prognostic impact of the gene expression was evaluated using quartiles as cut-off points and selecting the one with the lowest p-value.

All tests were carried out using the SPSS 15.0 program (SPSS, Chicago, IL). For univariate analyses, the t-student test was performed to evaluate refractoriness to treatment and gene expression levels. The relapse free survival (RFS) and overall survival (OS) were calculated using the Kaplan-Meier method. The impact of multiple predictor variables on RFS and OS was assessed by multivariate analysis according to the Cox regression model (Forward Conditional method), as described elsewhere.¹⁶

4. RESULTS AND DISCUSSION

Patients with clinically adverse features, such as WBC counts $>50 \times 10^9/L$ and an age greater than 65, were associated with a poorer OS and RFS, whereas patients harboring a *FLT3* wild type (wt) and *NPM1* mutated phenotype were associated with a better prognosis (Table 1). In addition, molecular markers with a clinical impact upon OS were: *ERG* (50th percentile; $p=0.020$), *PRAME* (75th percentile; $p=0.035$), and *EVI1* (75th percentile; $p=0.042$). Similarly, the genes that showed significant influence on RFS were: *ERG* ($p=0.010$), *PRAME* ($p=0.017$) and *EVI1* ($p=0.051$). Interestingly, patients who were refractory to induction therapy showed higher *ERG* (1.0 ± 0.8 vs. 0.6 ± 0.6 ; $p=0.01$) and lower *PRAME* (29 ± 53 vs. 1641 ± 6102 ; $p=0.01$) levels compared to patients who achieved CR after the induction therapy.

Features selected in the multivariate analysis as having an independent prognostic value for a shorter OS were: WBC $>50 \times 10^9/L$ ($p<0.001$), age >65 years ($p=0.004$), high *ERG* expression ($p=0.024$) and high *EVI1* expression ($p=0.030$). Additionally, patients with no *FLT3*wt/*NPM1*mutated phenotype ($p=0.05$) and a low *PRAME* expression ($p=0.066$) showed a trend toward a poorer OS. Parameters with an independent prognostic value for a shorter RFS were: age >65 years ($p=0.006$), high *ERG* expression ($p=0.014$), low *PRAME* expression ($p=0.026$), WBC $>50 \times 10^9/L$ ($p=0.031$), no *FLT3*wt/*NPM1*mutated phenotype ($p=0.037$), and high *EVI1* expression ($p=0.050$). Our data confirm the adverse prognostic influence that has been shown for *ERG*^{7,19} and *EVI1*¹³ genes. Preliminary studies have suggested that *PRAME* overexpression is associated with a good prognosis in childhood AML, although this effect

might be due to its correlation with favorable cytogenetics [i.e. t(8;21)].¹⁵ Here, we show for the first time that the prognostic value of *PRAME* up-regulation is independent of other karyotypic abnormalities, since *PRAME* overexpression was associated with a better response to induction therapy and longer survival in our series, in which all patients had a normal cytogenetics.

Based on the results described above, we investigated whether the combination of the *ERG*, *EVI1* and *PRAME* markers could improve their individual prognostic significance. Thus, we drew up a molecular score by assigning a value of 1 point per gene expression associated with an adverse prognosis (high *ERG*, high *EVI1* and low *PRAME* RNA levels). By contrast, a value of 0 was assigned to a favorable expression profile (low *ERG* or low *EVI1* or high *PRAME*). This score allowed us to discriminate four different risk categories for both OS and RFS analysis, independently of other clinical-biological features. The 2-year OS for Scores 0, 1, 2 & 3 were 79%, 65%, 46% and 27% respectively (p=0.001; Figure 1A). Similarly, the 2-year RFS for the same subgroups were 92%, 65%, 49% and 43% (p=0.005; Figure 1B). Identical results were observed when the analysis was restricted to the 97 patients <65 years (Figure 1C-D). Multivariate analysis confirmed the findings in the complete series, since the features selected as having an independent prognostic value for either a shorter OS or RFS were: the proposed molecular score (p<0.001 and p<0.001), WBC counts >50x10⁹/L (p=0.002 and p=0.04) and age>65 years (p=0.007 and p=0.005). Furthermore, *FLT3wt/NPM1* mutated phenotype displayed an independent prognostic value in the multivariate analysis for better RFS (p=0.05) and a trend towards longer OS (p=0.09).

A further benefit of the proposed score was the discrimination between different prognostic categories within those patients considered as having an intermediate/high risk based on the *FLT3/NPM1* classification.¹⁰⁻¹² Thus, patients harboring *FLT3wt/NPM1wt* (n=47) or *FLT3-ITD/NPM1* mutated (n=20) or *FLT3-ITD/NPM1wt* (n=16) phenotype displayed differentiated OS (p=0.001; Figure 1E) and RFS (p=0.013; Figure 1F) according to score subgroup. It is worth noting that Scores 0-1 showed that 43% of patients (36/83) had a good prognosis, which could be considered as redefining their risk category.

Our score integrates three prognostic markers that could provide a more accurate stratification than single marker analysis^{7,9,13} and, unlike wide gene-expression profiling,^{14,20} it could be easily implemented within routine clinical laboratories. Nevertheless, since a molecular score based on gene expression levels could be less objective than mutation assessment,^{2,21} our score system needs to be validated in an independent series of patients before it is incorporated into clinical practice.^{20,22} In conclusion, we propose a score based on *ERG*, *EVI1* and *PRAME* gene expression that allows a greater distinction between CN-AML patients with significantly different outcomes.

5. AUTHOR CONTRIBUTION

Santamaría C. and **Chillón MC.** carried out all molecular studies and prepared the database for the final analysis. **Santamaría C.** performed the statistical analysis and prepared the initial version of the paper.

Garcia-Sanz R. helped in the design of the work, reviewed the database and contributed towards the statistical analysis. He provided the pre-approval of the final version.

Balanzategui A., Sarasquete ME., and **Alcoceba M.** participated in the generation of the molecular results.

Pérez C., Caballero D., Ramos F., García de Coca A., Alonso JM., Giraldo P., Bernal T., Queizán JA., Rodríguez JN., Fernández-Abellán P., Báñez A., Peñarrubia MJ., Vazquez L. and **Díaz-Mediavilla J.** were the clinicians responsible for the patients and those who ensured the application of protocol, sampling, and the collection of clinical data.

San Miguel JF., and **González M.** initially promoted the study and were responsible for securing financial support. Both were responsible for the group and were the persons responsible for the most important revision of the draft. **González M.** was the person who approved the final version to be sent to the editor.

6. BIBLIOGRAPHY

1. 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* 2007;109:431-448.
2. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N.Engl.J Med.* 2008;358:1909-1918.
3. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98:1752-1759.
4. Schnittger S, Schoch C, Dugas M et al. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002;100:59-66.
5. Thiede C, Steudel C, Mohr B et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326-4335.
6. Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T et al. The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood* 2005;106:345-352.

7. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:9234-9242.
8. Barragán E, Cervera J, Bolufer P et al. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89:926-933.
9. Heuser M, Beutel G, Krauter J et al. High meninoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* 2006;108:3898-3905.
10. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106:3740-3746.
11. Schnittger S, Schoch C, Kern W et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005;106:3733-3739.
12. Thiede C, Koch S, Creutzig E et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2005;107:4011-4020.
13. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Erpelinck C, van Putten WL et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003;101:837-845.
14. Bullinger L, Dohner K, Bair E et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N.Engl.J Med.* 2004;350:1605-1616.
15. Greiner J, Schmitt M, Li L et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood* 2006;108:4109-4117.
16. Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R 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;93:1797-1805.
17. Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ et al. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 2005;90:54-59.
18. Gabert J, Beillard E, van der Velden V et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318-2357.
19. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:3337-3343.
20. Metzeler KH, Hummel M, Bloomfield CD et al. An 86-probe-set gene-expression signature predicts survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;112:4193-4201.
21. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS et al. Wilms Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin.Oncol.* 2008;26:4595-4602.
22. Radmacher MD, Marcucci G, Ruppert AS et al. Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2006;108:1677-1683.

Table 1. Influence of clinical-biological characteristics and gene expression profile at diagnosis in 121 CN-AML patients regarding their relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS).

Clinical biological feature	OS (n=121)				RFS (n=100)			
	n	2-yr	Univariate	Multivariate	n	2-yr	Univariate	Multivariate
WBC at diagnosis ($\times 10^9/L$) ¹								
≤ 50.0	88	62%	0.001	<0.001	76	64%	0.018	0.031
> 50.0	33	35%			24	33%		
Age (years) ^{1,2}								
≤ 65	97	59%	0.003	0.004	84	62%	0.008	0.006
> 65	24	36%			16	28%		
FLT3/NPM1 phenotype								
FLT3wt/NPM1mutated	38	61%	0.070	0.055	34	70%	0.030	0.037
Other phenotypes	83	50%			66	49%		
Sex								
Male	61	47%	0.080	NS	49	48%	0.056	0.074
Female	60	60%			51	63%		
Platelets at diagnosis ($\times 10^9/L$) ³								
≤ 60	61	49%	NS	---	51	50%	NS	--
> 60	60	59%			49	62%		
Hemoglobin (g/dL) ³								
≤ 9.1	61	56%	NS	---	51	52%	NS	--
> 9.1	60	52%			49	60%		
PB blasts at diagnosis (%) ³								
≤ 44	61	55%	NS	---	52	56%	NS	--
> 44	60	53%			48	54%		
BM blasts at diagnosis (%) ³								
≤ 67	61	53%	NS	---	61	56%	NS	--
> 67	60	54%			60	55%		
Gene expression (quartiles) ⁴								
ERG expression (median)								
≤ 0.54	61	66%	0.020	0.024	54	67%	0.010	0.014
> 0.54	60	42%			46	45%		
PRAME (75 th percentile)								
≤ 150	91	51%	0.035	0.066	74	48%	0.017	0.026
> 150	30	63%			26	79%		
EVI-1 (75 th percentile)								
≤ 0.2	91	59%	0.042	0.030	77	60%	0.051	0.050
> 0.2	30	42%			23	46%		
MLL-PTD (75 th percentile)								
≤ 0.3	91	56%	NS	---	73	59%	0.061	NS
> 0.3	30	46%			27	46%		
WT1 (75 th percentile)								
≤ 374	91	56%	NS	---	75	59%	NS	---
> 374	30	46%			25	47%		
MN1 (median)								
≤ 50	61	59%	NS	---	54	58%	NS	---
> 50	60	47%			46	53%		
RHAMM (75 th percentile)								
≤ 1.3	91	55%	NS	---	75	57%	NS	---
> 1.3	30	47%			25	52%		

¹ Variables were dichotomized based on high risk criteria.

² Fifty-two out of 84(62%) patients <65 years in complete remission underwent an autologous stem cell transplantation (SCT), while 19 (23%) received an allogeneic-SCT.

³ Variables were dichotomized based on median value.

⁴ For each gene, the quartile providing the best separation of survival curves (lowest p-value) is shown. NS: not statically significant, p>0.100

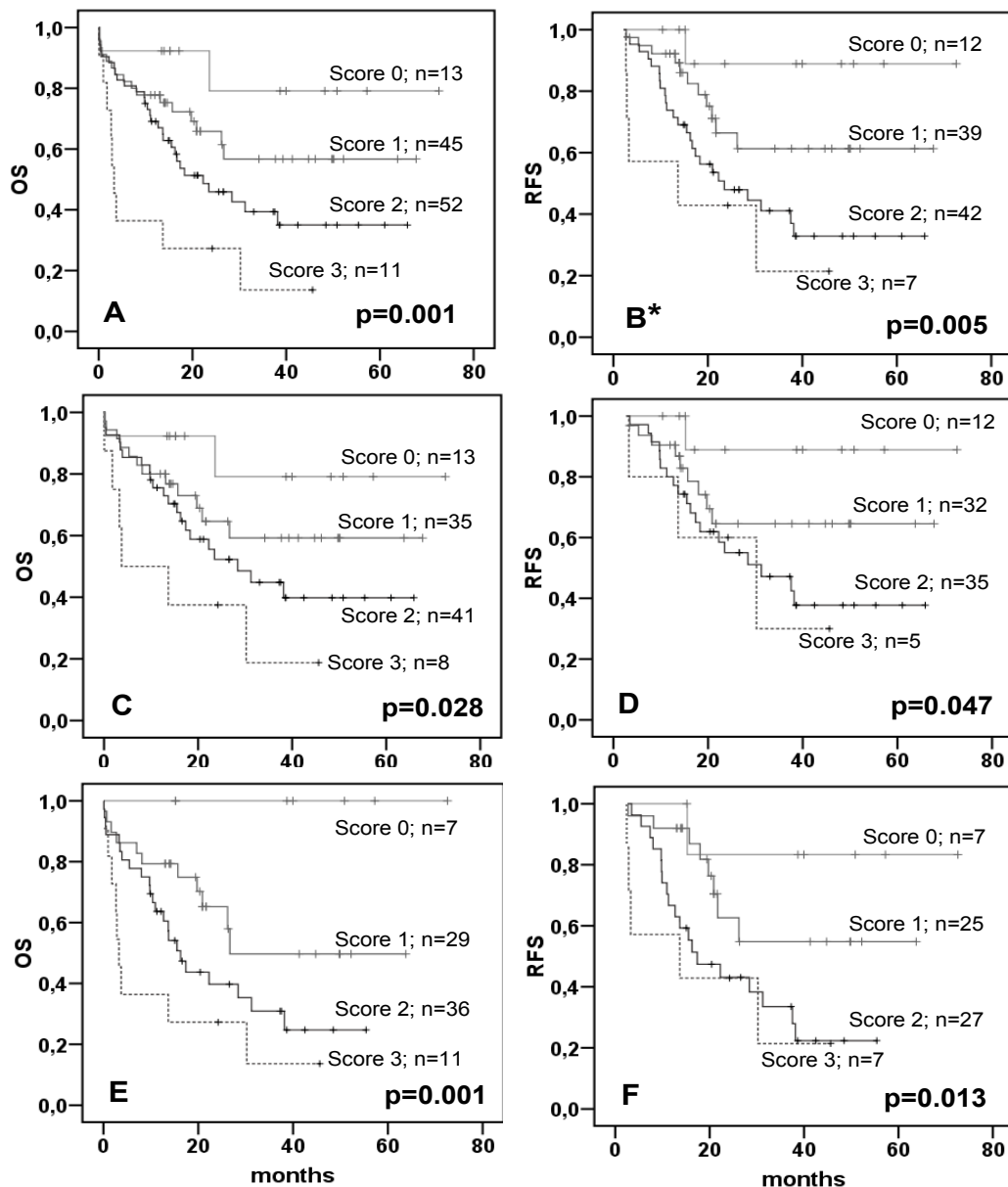


Figure 1. Overall survival (OS) and relapse free survival (RFS) of CN-AML patients based on *ERG/EVI1/PRAME* score. CN-AML patients were grouped according to favorable (low *ERG*, low *EVI1* or high *PRAME*) or adverse (high *ERG*, high *EVI1* or low *PRAME*) expression profile, according to the selected quartile in the individual analysis. Therefore, the proposed score was drawn up by assigning a value of 0 for each gene expressing a favorable RNA level and a value of 1 for each gene with an adverse expression profile. Panels **A** and **B** show RFS and OS for the 121 CN-AML patients, respectively. Panels **C** and **D** show survival analyses for 97 CN-AML patients younger than 65. Panels **E** and **F** show survival analyses for 83 CN-AML patients included within the *FLT3/NPM1* intermediate/high-risk subgroups [*FLT3wt/NPM1wt* (n=47), or *FLT3-ITD/NPM1* mutated (n=20) or *FLT3-ITD/NPM1wt* (n=16)]. A 2-year OS of 100%, 64%, 39% and 27% were observed for scores 0, 1, 2 & 3, respectively (p=0.001; Figure 1E), while the 2-year RFS for the same subgroups were 86%, 62%, 43% and 43% (p=0.013; Figure 1F). Similar results were observed for the other combinations of *FLT3* and *NPM1*, although statistically significant differences were achieved only in the *FLT3wt/NPM1wt* (OS: p=0.016 and RFS: p=0.019) due to the sample size in these subgroups. (*) p<0.001 if the analysis is restricted to non-refractory patients.

1. B Marcadores con valor pronóstico en LMA cariotipo normal

High FOXO3A expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics (CN-AML). Enviado a Leukemia Research

La vía de señalización PI3K/AKT está hiperactivada en leucemia aguda mieloblástica (LMA), pero su importancia pronóstica no está bien definida. En el presente trabajo se evaluó la expresión génica de *AKT* y de dos de sus sustratos (*FOXO3a* y *p27-CDKN1B*) en 110 LMA con citogenética normal (LMA-CN) tratados con los protocolos PETHEMA. Cuando los pacientes se agruparon por el valor de la mediana de expresión de *FOXO3a*, aquellos con mayor expresión presentaron menores SG a dos años que los pacientes con bajos niveles de *FOXO3a* (45% vs. 59%, respectivamente; $p=0.015$). De forma análoga, los pacientes con alta expresión de *FOXO3a* tuvieron menores SLR a los dos años respecto al grupo de baja expresión (34% vs. 62%, respectivamente; $p=0.048$). En el análisis multivariante, las características seleccionadas como de factor pronóstico adverso independiente fueron: leucocitos $>50 \times 10^9/L$, edad >65 años y alta expresión de *FOXO3a*. En conclusión, este trabajo demuestra por primera vez que la expresión del gen *FOXO3a* es un factor independiente de pronóstico en las LMA-CN, que eventualmente podría ayudar en la estratificación molecular de estos pacientes.

TITLE: HIGH *FOXO3A* EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH A POORER PROGNOSIS IN AML WITH NORMAL CYTOGENETICS (CN-AML)

AUTHORS: SANTAMARÍA C^{1,2}, CHILLÓN MC¹, GARCÍA-SANZ R^{1,2}, PÉREZ C³, CABALLERO D¹, RAMOS F⁴, GARCÍA DE COCA A⁵, ALONSO JM⁶, GIRALDO P⁷, BERNAL T⁸, QUEIZÁN JA⁹, RODRIGUEZ JN¹⁰, FERNÁNDEZ-ABELLÁN P¹¹, BÁREZ A¹², PEÑARRUBIA MJ¹³, VAZQUEZ L¹, BALANZATEGUI A¹, SARASQUETE ME¹, ALCOCEBA M¹, DÍAZ-MEDIAVILLA J³, SAN MIGUEL JF^{1,2} AND GONZALEZ M^{1,2}.

INSTITUTIONS: 1 - HOSPITAL UNIVERSITARIO, SALAMANCA, SPAIN.
2 - CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER-IBMCC (USAL-CSIC) OF SALAMANCA, SPAIN.
3 - HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS, MADRID, SPAIN
4 - COMPLEJO HOSPITALARIO DE LEÓN, SPAIN
5 - HOSPITAL CLÍNICO DE VALLADOLID, SPAIN
6 - HOSPITAL RÍO CARRIÓN DE PALENCIA, SPAIN
7 - HOSPITAL MIGUEL SERVET, ZARAGOZA, SPAIN
8 - HOSPITAL CENTRAL DE ASTURIAS, OVIEDO, SPAIN
9 - HOSPITAL GENERAL DE SEGOVIA, SPAIN
10 - HOSPITAL JUAN RAMÓN JIMÉNEZ, HUELVA, SPAIN
11 - HOSPITAL UNIVERSITARIO DE ALICANTE, SPAIN
12 - HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE SONSOLES, ÁVILA, SPAIN
13 - HOSPITAL RÍO HORTEGA, VALLADOLID, SPAIN

RUNNING TITLE: *FOXO3A* IN CN-AML

ACKNOWLEDGEMENTS FOR RESEARCH SUPPORT:

This work has been partially supported with the grants PI061351 from the Spanish “Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social”, 89/A/06 from “Gerencia Regional de Salud, Junta Castilla y León”, and CIC, IBMCC (USAL-CSIC), Spain.

KEY WORDS: ACUTE MYELOID LEUKEMIA, REAL TIME QUANTITATIVE PCR, *FOXO3A*, *AKT*

TOTAL TEXT WORD COUNT: 1189 WORDS; **ABSTRACT WORD COUNT:** 99 WORDS,

CONTACT ADDRESS: RAMÓN GARCÍA-SANZ, MD, PHD

DEPARTMENT OF HEMATOLOGY
UNIVERSITY HOSPITAL OF SALAMANCA
PASEO DE SAN VICENTE, 58-182
SALAMANCA, 37007 SPAIN+
PHONE: +34-923-291384
FAX: +34-923-294624

ABSTRACT

The PI3/AKT pathway is up-regulated in acute myeloid leukemia (AML), but its prognostic relevance in cytogenetically normal AML (CN-AML) is unclear. We evaluated RNA levels of AKT and two downstream substrates (FOXO3a-p27) in 110 de novo CN-AML, included into Spanish PETHEMA therapeutic protocols. Patients with high FOXO3a gene expression displayed shorter OS ($p=0.015$) and RFS ($p=0.048$) than low FOXO3a expressers. Features selected in the multivariate analysis as having an independent prognostic value for a shorter survival were: WBC $>50 \times 10^9/L$, age >65 years and high FOXO3a expression. We concluded that FOXO3a assessment could contribute to improve the molecular-based risk stratification in CN-AML.

INTRODUCTION

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway is frequently activated in AML and its aberrant activation mediate survival, proliferation and leukemic transformation of myeloid cells both in vivo and in vitro stage [1-3]. Despite its biological significance, only three previous studies have evaluated the prognostic impact of AKT network in AML patients and their results have been not concordant [4-6]. Moreover, they have evaluated heterogeneous populations, including AML secondary to chemotherapy or myelodysplastic syndrome and patients with different cytogenetic features. By contrast, no studies have been focused in a more defined subgroup, such as acute myeloid leukemia with normal cytogenetic (CN-AML).

The CN-AML subset represents 40 to 49% of adult de novo AML. Although this subgroup has usually been associated to an intermediate prognosis, several studies have shown a wide molecular heterogeneity in CN-AML patients. During the last decade, several gene mutations and changes in gene expression have been discovered that strongly affect clinical outcome of CN-AML patients (reviewed in [7]). Since the clinical impact of AKT, FOXO3a and p27 RNA levels in CN-AML is currently unknown, our aim in the present study was to assess the prognostic relevance of these gene expressions in a cohort of uniformly-treated CN-AML patients.

MATERIALS AND METHODS

We analyzed pre-treatment bone marrow (BM) samples from 110 adults with de novo AML and normal cytogenetic. All patients were uniformly treated according to the Spanish PETHEMA LAM-99 protocols [8]. Complete remission (CR) was defined by the criteria proposed by Cheson *et al* [9]. Additionally, ten BM samples from healthy donors were obtained as controls for gene expression

analysis. Informed consent to use biological samples and clinical data was obtained in all cases. Total RNA from diagnostic BM samples and subsequent cDNA synthesis was performed as previously described [10]. *FLT3*-ITD was examined by amplification of the juxtamembrane region spanning exons 14 and 15 using qualitative PCR [11] and Genescan analysis [12]. Screening for *NPM1* gene mutations was performed as previously described.[13] The quantification of the different genes was performed using the Step One Plus Real-Time PCR System and TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The assay IDs were: Hs00245445_m1 (*ABL1*, as control gene), Hs00178289_m1 (*AKT*), Hs00921424_m1 (*FOXO3a*) and Hs00153277_m1 (*p27/CDKN1B*). The cycle number at which the reaction crossed an arbitrarily placed threshold (Ct) was determined and the relative expression of each gene regarding the housekeeping gene *ABL1* was described using the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ where $\Delta Ct = Ct_{gene} - Ct_{ABL1}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Patient} - \Delta Ct_{Healthy BM}$ (mean) [14].

All tests were carried out using the SPSS 15.0 program (SPSS, Chicago, IL, USA). For univariate analyses, the χ^2 and t-student tests were performed to evaluate factors associated with RNA levels of different genes. Relapse-free survival (RFS) was defined as the time between the achievement of complete remission and the time of the hematological relapse or the last follow-up. Overall survival (OS) was defined as the time between the moment of diagnosis and death or the last follow-up. The probabilities of RFS and OS were calculated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. The impact of multiple predictor variables on OS and RFS was assessed by multivariate analysis according to the Cox regression model.

RESULTS AND DISCUSSION

Clinical and biological details of the 110 CN-AML patients are summarized in Table 1. The median follow-up time for present study was 14.5 months (range 0.3-68.6 months). Ninety-two patients (83.6%) achieved CR after induction therapy, 10 (9.1%) failed to achieve CR and 8 (7.3%) patients died within first month of treatment. Thirty-nine of 92 patients with CR eventually relapsed along the evaluation period. Assuming the mean expression from the 10 BM healthy donors as a value of 1, the median gene expression of the selected markers in CN-AML was: *AKT* 3.6 (range 0.6-15.3), *FOXO3a* 1.6 (0.3-12.6) and *p27* 2.6 (0.3-22.0). These results point out the increased activation of *AKT* pathway in AML cells in comparison to normal cells, which are necessary for survival and proliferation of leukemic cells [1,2].

We evaluated the prognostic impact of *AKT/FOXO3a/p27* RNA levels, using the median value as cut-off point. Overall survival (OS) for patients with high *FOXO3a* gene expression was significantly shorter than patients with low *FOXO3a* expression (45% vs. 59% at 2 years, respectively; $p=0.015$) (Figure 1A). By contrast, no significant difference in OS at 2-years was observed between patients with high and low *AKT* expression (49% vs. 55%, $p=0.4$) or between high and low *p27* expressers (51% vs. 52%; $p=0.9$). In order to confirm *FOXO3a* results, a multivariate analysis for OS was performed, including traditional prognostic features such as WBC counts, age, *FLT3*-ITD, *NPM1* mutation as well as *FOXO3a* gene expression. The parameters with an independent prognostic value for a shorter OS were: age >65 years ($p=0.004$), WBC $>50 \times 10^9/L$ ($p=0.005$) and *FOXO3a* RNA levels higher than median value ($p=0.007$).

Forty-three patients with high *FOXO3a* expression and 49 with low *FOXO3a* RNA levels achieved CR and were evaluated for relapse-free survival (RFS). The relapse rate was higher in the former group (22 out of 43; 51.2%) than the latter subset (17 out of 49; 34.7%; $p=0.08$). Thereby, the RFS at 2 years was significantly shorter in the high *FOXO3a* subgroup than the low *FOXO3a* subset (34% vs. 62% at 2 years, respectively; $p=0.048$) (Figure 1B). By contrast, no difference in RFS at 2 years was observed between high and low *AKT* expressers (46% vs. 56%, $p=0.5$) or between high and low *p27* expressers (48% vs. 53%; $p=0.7$). Multivariate analysis confirmed the univariate findings since age >65 years ($p=0.006$), WBC $>50 \times 10^9/L$ ($p=0.008$), male sex ($p=0.016$) and *FOXO3a* gene expression higher than median value ($p=0.038$) were the only parameters with a significantly statistical association with shorter RFS.

Regarding the correlations with other molecular markers, high *FOXO3a* gene expression subgroup displayed lower number of patients harboring a *NPM1* mutation (Table 1). Indeed, high *FOXO3a* expressers showed a lower incidence of the favorable phenotype *NPM1*mutated/*FLT3* wild type [13] than low *FOXO3a* expressers (22% vs. 40% respectively; $p=0.043$), which could explain partly the adverse prognosis of the former group. In addition, high *FOXO3a* expressers displayed higher *p27* RNA levels (median 3.2, range 0.5-22.0) than low *FOXO3a* expressers (median 2.2, range 0.3-11.7; $p=0.02$).

Interestingly, patients with high *FOXO3a* gene expression showed a trend toward *AKT* RNA over-expression (median 3.8, range 1.2-11.7) than low *FOXO3a* expressers (median 3.5, range 0.6-15.3; $p=0.06$). It seems to contradict the proteomic findings showing that activation of *AKT* protein promotes direct phosphorylation and subsequent export to cytoplasm and inhibition of *FOXO3a*

protein [15]. However, the lacking of FOXO3a activity could promote its RNA overexpression as a positive feedback mechanism of the cell in order to ameliorate the impaired function of the phosphorylated protein when AKT pathway is up-regulated. Therefore, the high FOXO3a RNA levels would be a result of a hyperproliferative stage of AML cells, which also could support the unfavorable prognosis of high FOXO3a gene expression subgroup described above.

In conclusion, the present study constitutes the first report regarding the adverse prognostic impact of high FOXO3a RNA levels in AML patients with normal karyotype. This molecular marker eventually could improve the molecular-based risk stratification in CN-AML.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Santamaría C. and **Chillón MC.** carried out all molecular studies and prepared the database for the final analysis. **Santamaría C.** performed the statistical analysis and prepared the initial version of the paper.

García-Sanz R. helped in the design of the work, reviewed the database and contributed towards the statistical analysis. He provided the pre-approval of the final version.

Pérez C., Caballero D., Ramos F., García de Coca A., Alonso JM., Giraldo P., Bernal T., Queizán J.A., Rodríguez JN., Fernández-Abellán P., Bárez A., Peñarrubia M.J., Vazquez L., and Díaz-Mediavilla J. were clinicians responsible for the patients who took care of the protocol accomplishment, sampling, and collection the clinical data.

Balanzategui A., Sarasquete ME., and Alcoceba M. participated in the generation of the molecular results.

San Miguel JF., and **González M.** were the initial persons promoting the study and were responsible for getting the financial support. Both were responsible of the group and were the persons responsible of the most important revision of the draft. González M. was the person who gave the final approval of the version to be sent to the editorial.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 2003;102:972-80.
- [2] Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* 2005;19:586-94.
- [3] Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwable J et al. Constitutive activation of Akt by FLT3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res* 2005;65:9643-50.
- [4] Min YH, Cheong JW, Kim JY, Eom JI, Lee ST, Hahn JS et al. Cytoplasmic mislocalization of p27Kip1 protein is associated with constitutive phosphorylation of Akt or protein kinase B and poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004;64:5225-31.
- [5] Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, Jackson CE, Chen W, Konopleva M et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2006;108:2358-65.
- [6] Tamburini J, Elie C, Bardet V, Chapuis N, Park S, Broet P et al. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood* 2007;110:1025-8.
- [7] 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* 2007;109:431-48.
- [8] Suarez L, Vidriales MB, Moreno MJ, Lopez A, Garcia-Larana J, Perez-Lopez C et al. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica* 2005;90:54-9.
- [9] Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:4642-9.
- [10] 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;93:1797-805.
- [11] Chillon MC, Fernandez C, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Ramos F, Fernandez-Calvo J et al. FLT3-activating mutations are associated with poor prognostic features in AML at diagnosis but they are not an independent prognostic factor. *Hematol J* 2004;5:239-46.
- [12] Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326-35.
- [13] 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;106:3733-9.
- [14] 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;25:402-8.
- [15] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857-68.

Table 1. Clinical and biological characteristics of CN-AML patients at diagnosis according to FOXO3a expression

Parameter	Total (n=110)	Low FOXO3a (n=55)	High FOXO3a (n=55)	p
Age, years, Median (Range)	56 (15-75)	57 (17-75)	55 (15-75)	.90
Sex Male, n (%)	55 (50)	27 (49.1)	28 (50.9)	.50
WBC, x10 ⁹ /L, Median (Range)	9.0 (0.2-337)	15.9 (0.6-337)	7.5 (0.2-213)	.13
Hemoglobin, g/L, Median (Range)	89 (40-150)	86 (40-150)	93 (45-128)	.86
Platelets, x10 ⁹ /L Median (Range)	60 (5-298)	60 (6-273)	65 (5-298)	.80
FAB Morphology, n (%)				.13
M0	8 (7.3)	2 (3.6)	6 (10.9)	
M1	30 (27.3)	19 (34.5)	11 (20.0)	
M2	26 (23.6)	14 (25.4)	12 (21.8)	
M4	19 (17.3)	7 (12.7)	12 (21.8)	
M5	18 (16.4)	7 (12.7)	11 (20.0)	
M6	4 (3.6)	3 (5.5)	1 (1.8)	
Not classified	5 (4.5)	3 (5.5)	2 (3.6)	
<i>FLT3</i> -ITD, n (%)	34 (30.9)	18 (32.7)	16 (29.1)	.42
<i>NPM1</i> mutated, n (%)	52 (47.3)	32 (58.2)	20 (36.4)	.02
<i>AKT</i> gene expression, Median (Range)	3.6 (0.6-15.3)	3.5 (0.6-15.3)	3.8 (1.2-11.7)	.06
<i>FOXO3a</i> gene expression, Median (Range)	1.6 (0.3-12.6)	---	---	---
<i>p27</i> gene expression, Median (Range)	2.6 (0.3-22.0)	2.2 (0.3-11.7)	3.2 (0.5-22.0)	.02
Complete remission, n (%)				.24
No	10 (9.1)	4 (7.3)	6 (10.9)	
Yes	92 (83.6)	49 (89.1)	43 (78.2)	
Death before CR	8 (7.3)	2 (3.6)	6 (10.9)	
Relapse, n (%)				.08
No	53 (57.6)	32 (65.3)	21 (48.8)	
Yes	39 (42.4)	17 (34.7)	22 (51.2)	
Exitus, n (%)				.06
No	61 (55.5)	35 (63.6)	26 (47.3)	
Yes	49 (44.5)	20 (36.4)	29 (52.7)	

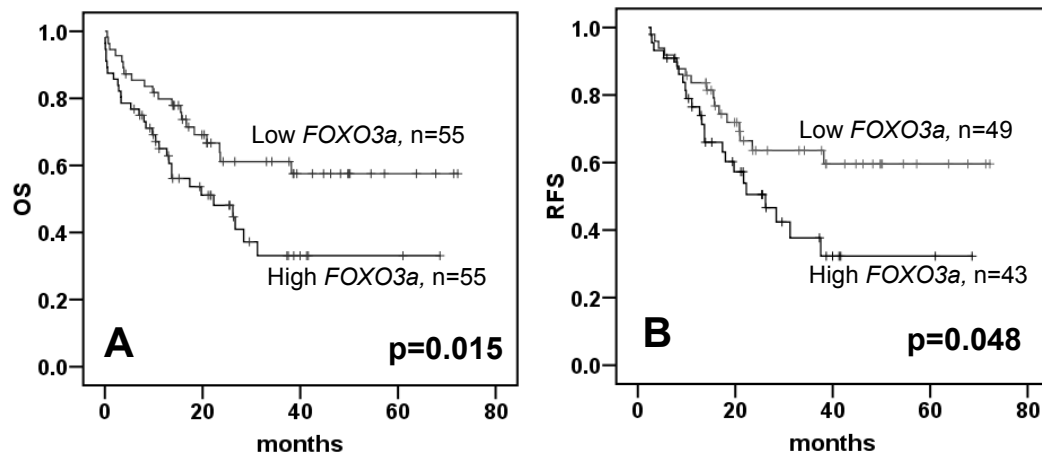


Figure 1. Overall survival (OS; Panel A) and relapse free survival (RFS; Panel B) of 110 CN-AML patients based on *FOXO3a* gene expression.

2. Marcadores con valor pronóstico en LPA/ LMA-M3

The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2008; 93:1797-1805.

La sobreexpresión del gen *PRAME* (*Preferentially expressed antigen of melanoma*) ha sido asociada con la presencia de la translocación t(15;17)(q22;q11-12), aunque su incidencia verdadera y su impacto clínico en un grupo grande de pacientes con LPA no ha sido establecido aún. En el presente trabajo se analizó la expresión del gen *PRAME* por medio de RQ-PCR en 125 pacientes con LPA que habían recibido tratamiento de los protocolos PETHEMA APL-96 (n=45) y APL-99 (n=80). La expresión de *PRAME* al diagnóstico fue significativamente superior en los pacientes con LPA respecto a los de LMA no M3 (n=213) y a donantes de médula ósea sanos (n=10). Además, los pacientes con LPA y alta expresión de *PRAME* (>100 veces la mediana de los controles sanos) se asoció con pronóstico favorable con una SLR a los 5 años de 85.9% vs. 74% (p=0.03) en pacientes con menor expresión. Esta correlación se mantuvo en el análisis multivariante, donde SLR más cortas se asociaron a conteos de leucocitos >10000/ μ L (p<0.001), porcentaje de blastos en MO >90% (p=0.001) y menor expresión de *PRAME* (p=0.009). Como marcador de ERM, el gen *PRAME* fue analizado en 225 muestras de 67 pacientes con LPA. En todos ellos, en la muestra de MO de la remisión completa se observó una disminución de *PRAME* a niveles similares a los controles de MO sanos, mientras que en las muestras en recaída se incrementaba de nuevo su expresión, con niveles incluso superiores a los del diagnóstico. Más aún, 12 de 13 muestras obtenidas dentro de los 6 meses previos a la recaída mostraron aumentos de más de 10 veces respecto a las muestras en remisión. Todos estos datos permiten concluir que el gen *PRAME* es un buen marcador para el pronóstico y seguimiento de ERM en pacientes con LPA.



The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia

Carlos Santamaría,¹ María Carmen Chillón,¹ Ramón García-Sanz,^{1,2} Ana Balanzategui,¹ María Eugenia Sarasquete,¹ Miguel Alcoceba,¹ Fernando Ramos,³ Teresa Bernal,⁴ José Antonio Queizán,⁵ María Jesús Peñarrubia,⁶ Pilar Giraldo,⁷ Jesús F. San Miguel,^{1,2} and Marcos Gonzalez^{1,2}

¹Hospital Universitario, Salamanca; ²Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC) of Salamanca; ³Complejo Hospitalario de León; ⁴Hospital Central de Asturias, Oviedo; ⁵Hospital General de Segovia; ⁶Hospital Rio Hortega, Valladolid, Spain and ⁷Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain

ABSTRACT

Background

The gene for preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) has been shown to be over-expressed in acute promyelocytic leukemia, but its actual incidence and clinical impact are still unknown.

Design and Methods

We studied PRAME expression at diagnosis using real-time quantitative polymerase chain reaction in 125 patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the Spanish PETHEMA-96 (n=45) and PETHEMA-99 (n=80) clinical trials. In addition, PRAME expression was evaluated as a marker of disease activity in 225 follow-up samples from 67 patients with acute promyelocytic leukemia.

Results

At diagnosis, PRAME expression in patients with acute promyelocytic leukemia was significantly higher ($p < 0.001$) than in patients with non-M3 acute myeloid leukemia (n=213) and in healthy controls (n=10). Furthermore, patients with acute promyelocytic leukemia with high PRAME expression had a favorable outcome. Thus, the 5-year relapse-free survival was better in patients with >100 -fold PRAME expression (86% vs. 74%; $p = 0.03$), and this cut-off established two sub-groups with different relapse-free survival rates among patients with a white cell count $<10^9/L$ (5-year relapse-free survival 94% vs. 80%, $p = 0.01$). This effect was similar in patients with a white cell count $>10^9/L$, although differences were not statistically significant. In multivariate analysis, white cell count $>10^9/L$ ($p < 0.001$), bone marrow blasts $>90\%$ ($p = 0.001$), and PRAME expression <100 -fold ($p = 0.009$) were associated with short relapse-free survival. Samples at remission showed PRAME levels similar to those in normal controls while samples at relapse over-expressed PRAME again. Furthermore, 12/13 samples collected within the 6-month period preceding relapse showed a >10 -fold increase in PRAME expression levels.

Conclusions

Low PRAME expression defines a subgroup of patients with acute promyelocytic leukemia with a short relapse-free survival. This marker could be useful as a secondary marker for monitoring patients with acute promyelocytic leukemia.

Key words: acute promyelocytic leukemia, PRAME, real-time quantitative PCR.

Citation: Santamaría C, Chillón MC, García-Sanz R, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M, Ramos F, Bernal T, Queizán JA, Peñarrubia MJ, Giraldo P, San Miguel JF, and Gonzalez M. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2008; 93:1797-1805. doi: 10.3324/haematol.13214

©2008 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Acknowledgments: the authors would like to thank M. Hernández, F. García and A. Antón for their technical support.

Funding: this work was partially supported by grants PI061351 from the Spanish "Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social", and 89/A/06 from the "Gerencia Regional de Salud, Junta Castilla y León", CIC, IBMCC (USAL-CSIC), Spain and by funding from the CR-USA Foundation-Spanish National Research Council (CSIC) Cooperative Agreement.

Manuscript received April 11, 2008. Revised version arrived July 2, 2008. Manuscript accepted July 4, 2008.

Correspondence: Ramon Garcia-Sanz, MD, PhD, Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Paseo de san Vicente, 58-182, Salamanca 37007 Spain. E-mail: rgarcias@usal.es

C. Santamaria et al.

Introduction

Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) was identified as a HLA-A24-restricted antigen peptide presented to an autologous tumor-specific cytolytic T lymphocyte clone derived from a melanoma cell line.¹ The *PRAME* gene encodes a putative protein of 509 amino acids with a function that remains unknown. Most normal tissues do not express *PRAME* but weak expression has been observed in testis, placenta, endometrium, ovary and adrenal glands.² By contrast, this tumor-associated antigen is frequently expressed in several solid tumors such as melanomas (88% of primary lesions), non-small cell lung carcinoma, breast carcinoma, renal cell carcinoma, head and neck cancer, Wilms' tumor and Hodgkin's lymphoma.^{2,3} *PRAME* is also expressed in 17-42% of acute lymphoid leukemias (ALL) and 30-64% of acute myeloid leukemias at diagnosis,^{3,4} as well as in chronic leukemias.⁹

In solid tumors, *PRAME* overexpression is associated with a more advanced tumor stage, increased probability of metastasis and a poor clinical outcome.^{12,10,11} By contrast, preliminary data suggest that high *PRAME* RNA levels correlate with good prognosis and prolonged survival in both adult⁴ and childhood AML,⁵ as well as pediatric acute lymphoid leukemias.⁸ Furthermore, this high expression has been associated with the presence of favorable translocations, such as t(8;21) and t(12;21).^{3,4} Given this particular tumor-specific expression, several authors have suggested that *PRAME* could be useful as a target for monitoring minimal residual disease (MRD) in acute leukemias.^{2,6,12-14} In the largest published series of MRD evaluation, Steinbach *et al.*¹⁵ showed, in 26 cases of childhood non-M3 AML, that *PRAME* expression decreased to control levels in patients who achieved a continuous complete remission. In addition, a rise in the expression level was observed in patients who eventually relapsed.¹²

Although some reports found higher *PRAME* expression when the t(15;17) was present, these data were based on small numbers of patients with acute promyelocytic leukemia (APL).^{3,4,13} The clinical impact of *PRAME* on the outcome of patients with APL has not, however, been evaluated yet. The aim of this study was to analyze *PRAME* expression and its relationship to survival and prognosis in a large series of uniformly treated APL patients, as well as to evaluate its potential value as a surrogate marker for MRD investigations.

Design and Methods

Patients

We analyzed pre-treatment bone marrow samples from 125 adult APL patients enrolled in the Spanish PETHEMA-96¹⁵ (n=45) and PETHEMA-99¹⁶ (n=80) treatment trials. Both protocols included an induction phase with all trans retinoic acid (ATRA) plus idarubicin and three consolidation courses with idarubicin,

mitoxantrone and idarubicin, followed by a maintenance phase with ATRA, methotrexate and mercaptopurine for 2 years.¹⁵ The PETHEMA-96 protocol was designed with a unique consolidation arm. By contrast, in the PETHEMA-99 protocol, the consolidation phase was modified by including ATRA plus higher doses of idarubicin for intermediate or high-risk patients¹⁶ [white blood cell (WBC) count $\geq 10 \times 10^9/L$ and/or platelet count $< 40 \times 10^9/L$]. The diagnosis of APL was confirmed according to standard criteria.¹⁶ After obtaining written consent, bone marrow samples were taken from ten healthy donors and used as controls for gene expression analysis. Additionally, 213 non-M3 bone marrow samples taken at diagnosis were analyzed as a reference group for *PRAME* expression. Informed consent to the use of biological samples and clinical data was obtained from all patients.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was obtained from unfractionated bone marrow samples (taken at diagnosis with $> 70\%$ blast cells) using the acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction method, as previously described.¹⁷ Reverse transcription was performed using the Europe against Cancer Group (EAC) protocol.¹⁸ Briefly, 1 μ g of total RNA was added to a 20- μ L volume containing random hexamers as primers and 100 U of SuperScript RNase H reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA). The mixture was incubated at 42°C for 60 min, followed by 3 min at 99°C and 2 min at 4°C. Aliquots were stored at -80°C prior to further analysis.

Quantification of PRAME expression

PRAME expression was quantified using the 7900 HT Fast Real-Time PCR System and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cycle number at which the reaction crossed an arbitrarily placed threshold (CT) was determined and the relative expression of *PRAME* regarding a housekeeping gene (*ABL1*), used as a control of RNA quality, was calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta CT}$ where $\Delta CT = CT_{PRAME} - CT_{ABL1}$ and $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{sample} - \Delta CT_{Healthy BM}$ (median).¹⁹ In order to carry out the $\Delta\Delta CT$ correction, we selected the median ΔCT value obtained in bone marrow samples from ten healthy donors. *PRAME* expression values were thus expressed as relative units (RU), where one RU is equivalent to the *PRAME* expression of the healthy donor bone marrow sample with the median ΔCT value. The assay ID were: *ABL1*, Hs00245445_m1, and *PRAME*, Hs00196132_m1.

Quantification of the PML-RARA fusion gene

Absolute quantification of *PML-RARA* transcripts was carried out by real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) using an ABI PRISM 7700 DNA Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the EAC protocol.^{18,20} *PML-RARA* transcript copy numbers were assessed in 5 μ L (100 ng) of cDNA, using commercial plasmids (Ipsogen Laboratories, Marseille,

France) to construct the standard curve. The house-keeping gene Abelson-1 (*ABL1*) was selected as a control gene for RNA expression as previously reported.²¹ A non-amplification control, containing RNA from a healthy donor and a non-template control with distilled water instead of human cDNA were included in each assay. All samples were analyzed in triplicate and results are reported according to EAC guidelines as the normalized copy number, which is derived by multiplying the *PML-RARA* copy number/*ABL1* copy number ratio by 10000.

Detection of FLT3 mutation

FLT3-ITD was examined by amplification of the juxtamembrane region spanning exons 14 and 15 with primers 11F and 12R, using qualitative PCR²² and Genescan analysis.²³ The up-stream primer in this latter approach was fluorescently labeled with 6-FAM to allow sizing of all products (Model 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Statistical analysis

All tests were carried out using the SPSS 15.0 program (SPSS, Chicago, IL, USA). For univariate analyses, the χ^2 and Student's *t* tests were performed to evaluate factors associated with *PRAME* expression. Relapse-free survival (RFS) was defined as the time between the achievement of complete remission and the time of the relapse or the last follow-up. Overall survival was defined as the time between the moment of diagnosis and death or the last follow-up. The probabilities of RFS and overall survival were calculated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.²⁴ RFS was estimated taking hematologic relapse as a censored event. Continuous variables were dichotomized according to either the median value or relapse-risk criteria described by Sanz *et al.*²⁷ The impact of multiple predictor variables on RFS was assessed by multivariate analysis according to the Cox regression model.²⁵

Results

Efficiency of PRAME RQ-PCR

The efficiency of the quantification method for *PRAME* and *ABL1* was examined by constructing standard curves made using cDNA from five APL bone marrow samples that were strongly positive for both markers with a 10-fold dilution in distilled water (1 to 10⁻⁴). Linear correlations between C_r values and expression levels were obtained for *PRAME* and *ABL1*, with median correlation coefficients of 0.996 (range 0.995 to 0.998) and 0.998 (range 0.997 to 0.999), respectively. The median value of amplification efficiency was 95.71% (range, 88.65 to 104.31%) for *PRAME* and 92.31% (range, 87.42 to 105.98%) for *ABL1*, indicating that the 2^{-ΔΔC_t} method used in our study for evaluating *PRAME* expression was indeed applicable.

PRAME expression in APL at diagnosis

PRAME expression was assessed in bone marrow samples taken at diagnosis from 125 APL patients treated within PETHEMA multicenter trial protocols. For the 2^{-ΔΔC_t} method we used bone marrow samples from ten healthy volunteers as a calibrator. The median ΔC_t (C_T^{PRAME}-C_T^{ABL1}) value in healthy samples was 12.06 (range, 9.51 to 15.75). For APL samples, the median ΔC_t value was 4.48 (range, -1.75 to 11.63). Accordingly, the median *PRAME* expression was 1.0 RU (range, 0.1-5.8) for healthy donors and 191.0 RU (range, 1.3-14301.6) for APL patients. As a reference, we also tested *PRAME* levels in 213 cases of newly diagnosed AML without t(15;17). In these latter patients, *PRAME* expression levels were significantly lower than in the APL cases (median value of 10.1 RU; range, 0.1-59531.2; *p*<0.001) (Figure 1). It is worth noting that the median *PRAME* value of non-M3 AML samples corresponds to the 15th percentile of the APL samples.

Characteristics of APL patients and PRAME expression

The main clinical and biological features of the 125 APL patients are summarized in Table 1. To define low and high *PRAME* expression in the series, we selected a cut-off value of 100 RU (2 logs). This cut-off was chosen because it represented the 10-fold level of the highest value observed in normal bone marrow samples and it was near to the median value in APL samples.

When we compared the clinical and biological characteristics of the two sub-groups of APL patients defined according to *PRAME* expression levels (low and high), no significant differences were observed, except for a trend towards a higher hemoglobin level (*p*=0.059) within the high-expression group than in the

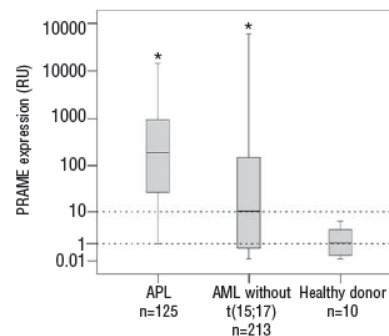


Figure 1. *PRAME* expression at diagnosis in APL and in patients with other AML. *PRAME* levels were estimated with the 2^{-ΔΔC_t} method, using *ABL1* as the control gene and bone marrow samples from ten healthy donors as calibrators. This latter group is also shown as a reference point. A significant difference was observed between all groups (**p*<0.001).

C. Santamaria et al.

low-expression group. It should be noted that the WBC and platelet counts as well as the *PML-RARA* normalized copy number were similar in both groups (Table 1).

Table 1. Clinical and biological characteristics of acute promyelocytic leukemia patients at diagnosis (n=125), divided according to *PRAME* expression.

Parameter	<i>PRAME</i> expression ≤100 RU (n=53)	<i>PRAME</i> expression >100 RU (n=72)	p
Age, years, median (range)	45 (12-76)	35 (9-81)	0.096
Sex, Male, n (%)	30 (56.6)	43 (59.7)	0.434
WBC, ×10 ⁹ /L, median (range)	2.6 (0.3-97.0)	2.6 (0.4-146.8)	0.238
Hemoglobin, g/dL, median (range)	9.0 (6.0-14.6)	10.0 (6.5-15.3)	0.059
Percentage of PB blasts, median (range)	36 (0-100)	38 (0-100)	0.945
Platelets, ×10 ⁹ /L, median (range)	26 (3-183)	22 (7-158)	0.502
Percentage of BM blasts, median (range)	90 (70-100)	88 (70-100)	0.827
<i>PML/RARA</i> <i>NCN1</i> , median (range)	3737 (827-15587)	2934 (839-19750)	0.728
<i>PML/RARA</i> isoform, n (%): Bcr1, n=77 Bcr2, n=5 Bcr3, n=43	37 (69.8) 2 (3.8) 14 (26.4)	40 (55.6) 3 (4.2) 29 (40.3)	0.256
FAB classification, n (%): M3, n=94 M3v, n=31	42 (79.2) 11 (20.8)	52 (72.2) 20 (27.8)	0.493
<i>FLT3-ITD</i> , n (%): No, n=82 Yes, n=43	38 (71.7) 15 (28.3)	44 (61.1) 28 (38.9)	0.298
Treatment protocol PETHEMA 96, n=45 PETHEMA 99, n=80	17 (32.1) 36 (67.9)	28 (38.9) 44 (61.1)	0.276
Relapse-risk group ^a , n (%): Low risk, n=26 Intermediate risk, n=64 High risk, n=35	15 (28.3) 26 (49.1) 12 (22.6)	11 (15.3) 38 (52.8) 23 (31.9)	0.172
Consolidation treatment arm ^b , n (%): Standard consolidation Reinforced consolidation + ATRA (PETHEMA 99)	25 (47.2) 28 (52.8)	36 (50.0) 36 (50.0)	0.448
Response to induction treatment, n (%): Complete remission, n=111 Death during treatment, n=14	48 (90.6) 5 (9.4)	63 (87.5) 9 (12.5)	0.406
ATRA syndrome, n (%): Absent, n=91 Indeterminate/present, n=34	39 (73.6) 14 (26.4)	52 (72.2) 20 (27.8)	0.516

NCN1: normalized copy number; *FAB*: French-American-British; *PB*: peripheral blood; *BM*: bone marrow; ^aaccording to Sanz et al., 2000.²³ According to Sanz et al., 2004.²⁴ This stratification was used only in the PETHEMA 99 protocol.

***PRAME* expression according to response to therapy and relapse status**

Of the 125 evaluated APL patients, 111 (88.8%) achieved complete remission after induction treatment (median 34 days after diagnosis; range, 22-88 days). The remaining 14 patients died during induction treatment due to hemorrhage (n=7), therapy-related infection (n=6) or ATRA syndrome (n=1) at a median of 14 days after diagnosis (range, 1-29 days). Regarding *PRAME* expression, no statistically significant difference was observed between patients who achieved complete remission (median 184.3 RU; range, 1.3-14301.6) and patients who died during induction therapy (median 460.6 RU; range, 7.0-11764.8; p=0.502).

Among patients achieving complete remission, we investigated *PRAME* RNA levels in order to discern whether these levels were different between patients who relapsed later (n=16) and those who did not (n=95). Interestingly, patients in continuous complete remission had significantly higher *PRAME* expression (median 207.6 RU; range, 1.3-14301.6) at diagnosis than had those patients who eventually relapsed (median 39.8 RU, range 1.5-5060.1; p=0.05).

Relapse-free survival and overall survival

When we compared the RFS of patients with low and high *PRAME* expression levels, defined according to the threshold previously mentioned (100 RU), we observed that the latter group of patients had a significantly

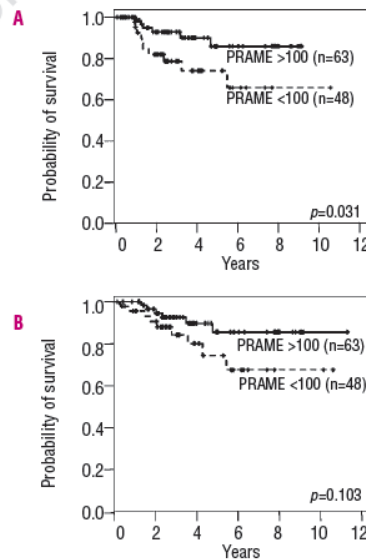


Figure 2. Relapse-free survival (A) and overall survival (B) of APL patients divided according to *PRAME* expression levels at diagnosis. Only patients who survived beyond the 34th day are included in this analysis.

longer RFS (RFS rates of 86% versus 74% at 5 years, $p=0.031$; Figure 2A). We evaluated the impact of the main biological and clinical features of patients on RFS using the Kaplan-Meier model as a univariate approach

Table 2. Influence of the clinical-biological characteristics of acute promyelocytic leukemia patients at diagnosis on their relapse-free survival (RFS).

	n	5-year RFS	Univariate	Multivariate
WBC at diagnosis ($\times 10^9/L$) ^a				
≤10	89	87%	0.002	0.003
>10	22	58%		
PRAME expression (RU)				
≤100	48	74%	0.031	0.011
>100	63	86%		
Bone marrow blasts at diagnosis (%) ^b				
≤86	56	92%	0.008	0.076
>86	55	69%		
FAB classification				
M3	88	84%	0.096	—
M3v	23	71%		
Peripheral blood blasts at diagnosis (%) ^b				
≤37	55	86%	NS	—
>37	56	75%		
Platelet count at diagnosis ($\times 10^9/L$) ^a				
≤40	83	83%	NS	—
>40	28	76%		
Sex				
Male	64	79%	NS	—
Female	47	81%		
Age (years) ^a				
≤39	56	81%	NS	—
>39	55	83%		
PML/RARA (Normalized copy number) ^b				
≤3093	56	77%	NS	—
>3093	55	85%		
PML/RARA isoform				
Bcr1	70	76%	NS	—
Bcr2	5	80%		
Bcr3	36	89%		
Hemoglobin (g/dL) ^a				
≤9.5	55	83%	NS	—
>9.5	56	79%		
FLT3-ITD, n (%)				
No	80	84%	NS	—
Yes	31	73%		
Treatment protocol				
PETHEMA 96	40	81%	NS	—
PETHEMA 99	71	82%		
Consolidation treatment arm ^c , n (%)				
Standard consolidation	56	82%	NS	—
Reinforced consolidation + ATRA (PETHEMA 99)	55	81%		
ATRA syndrome				
Absent	84	80%	NS	—
Indeterminate/present	27	83%		

NS: not statistically significant, $p>0.1$. ^aDichotomization based on criteria for high-risk patients from Sanz et al., 2000.²⁴ ^bDichotomization based on median value. According to Sanz et al., 2004.²⁴ ^cThis stratification was used only in the PETHEMA 99 protocol.

(Table 2). Multivariate analysis for RFS was carried out including the parameters with significant differences in the univariate analysis: WBC counts, PRAME expression level and bone marrow blasts. Only two of these variables were selected as having an independent prognostic value for a shorter RFS: WBC $>10 \times 10^9/L$ ($p=0.003$) and PRAME expression <100 RU ($p=0.011$).

In APL, the number of WBC has a marked prognostic impact and may determine treatment choices.^{26,29} Following a recent analysis by Adès et al. comparing the French-Belgian-Swiss and PETHEMA results,²⁹ we wanted to investigate the prognostic influence of the main clinical and biological features described in Table 2 in patients with WBC $<10 \times 10^9/L$ or WBC $\geq 10 \times 10^9/L$. In patients with low WBC, only PRAME expression (100 RU cut-off) could define two subgroups with significantly different RFS at 5 years (80% vs. 92% in low and high PRAME expression group, respectively; $p=0.032$; Figure 3A). The Kaplan-Meier curves were not statistically significantly different between subgroups by any of the other clinical and biological parameters. There were few patients ($n=22$) in the group with a high WBC count, so it is not surprising that there were no parameters associated with statistically significant differences in risk of relapse. Regarding the 100 RU cut-off, the two subgroups showed different RFS curves, but the differences were not statistically significant ($p=0.231$) (Figure 3B).

Because all deaths during induction therapy in the

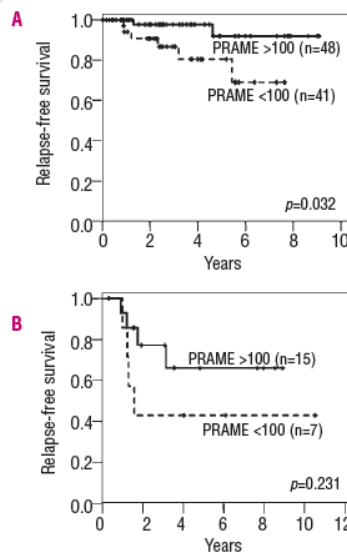


Figure 3. Relapse-free survival of APL patients based on PRAME expression among patients with a WBC count at diagnosis $<10 \times 10^9/L$ (A) or $\geq 10 \times 10^9/L$ (B) following the criteria used by Adès et al., 2008.²⁶

C. Santamaria et al.

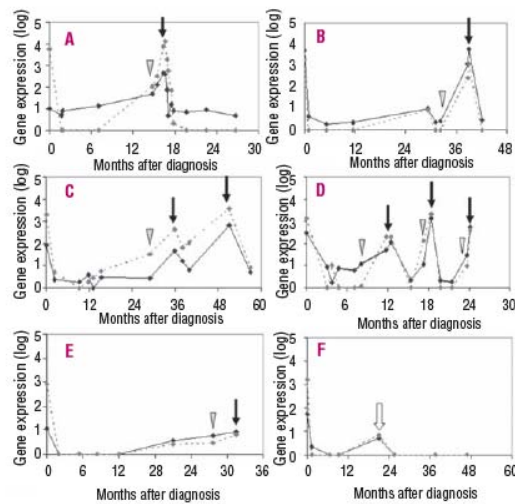


Figure 4. Comparison of minimal residual disease evaluated by *PML-RARA* and *PRAME* expression. Expression of *PML-RARA* (dotted lines) and *PRAME* (continuous lines) in follow-up samples from five patients (A-E) who relapsed and one patient (F) in continuous complete remission with one false-positive sample (open arrow). Relapses are indicated as closed arrows. Samples analyzed within 6 months before relapse are indicated as triangles. *PML-RARA* is expressed as normalized copy number on a log-scale and *PRAME* is expressed as a result of the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ equation (log-scale).

present series were due to early infectious or hemorrhagic complications and ATRA syndrome rather than to progressive disease, which is a competing risk in evaluating leukemia-related mortality, we carried out a landmark analysis beyond day 34 (the median day for achieving a response evaluation). In the analysis of the remaining patients we observed that those with high *PRAME* expression had a higher 5-year overall survival rate compared to patients with low *PRAME* expression (85.6% versus 74.4%, Figure 2B), although the difference did not reach statistical significance ($p=0.103$).

PRAME vs. *PML-RARA* fusion transcript expression

We analyzed 225 follow-up bone marrow samples from 67 patients who achieved complete remission: 53 patients who maintained a continuous complete remission and 14 patients who eventually relapsed. The follow-up for patients remaining in complete remission (median 3.13 years, range 0.5 to 10.6) was virtually the same as the follow-up for patients who eventually relapsed (median 3.17 years, range 1.3 to 11.3, $p=0.551$). When we compared the reduction of *PRAME* expression with that of *PML-RARA* expression from diagnostic to post-induction samples, a strong correlation was observed between the levels of expressions (Pearson's correlation coefficient of 0.689, $p<0.001$). We also analyzed both MRD markers in samples from patients who relapsed, finding a similar expression patterns between *PRAME* and *PML-RARA* in all of them. The evolution of these two markers is illustrated in Figure 4 (A-E) which shows five representative patients who eventually relapsed, together with one case who remained in continuous complete remission (F). In four relapsed patients, all the samples taken within 6 months before relapse showed an increase in at least one of the two markers to above 10 normalized copy numbers or 10 RU. The fifth

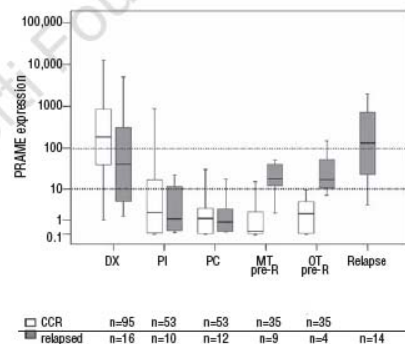


Figure 5. *PRAME*-based evaluation of minimal residual disease at different stages of disease. Patients in continuous complete remission (CCR) and patients who eventually relapsed were evaluated at diagnosis (DX), post-induction (PI), post-consolidation (PC), during maintenance therapy (MT) and out of therapy (OT). As regards patients who relapsed, we analyzed 13 pre-relapse samples (pre-R) during MT (n=9) and OT (n=4), which were collected within the 6-month period before relapse, as well as 14 samples taken during the relapses. Empty boxes correspond to patients in CCR, who had not relapsed at the time of evaluation (always >1 year of follow-up). Solid boxes correspond to patients who eventually relapsed.

patient (Figure 4E) was the only case who relapsed with no *PRAME* expression or *PML-RARA* increase (false-negative case). None of the three patients in continuous complete remission with a sample false-positive for MRD during maintenance and beyond (i.e. Figure 4F) showed either *PRAME* expression >10 RU or *PML-RARA* >10 normalized copy number in subsequent analyses.

PRAME expression and tumor burden evolution

Upon analyzing *PRAME* expression during different phases of therapy, a rapid decrease was observed from diagnosis to post-induction and post-consolidation treatment. However, there were no statistically significant differences in these reductions between patients in continuous complete remission and patients who eventually relapsed (Figure 5), indicating that the kinetics of this parameter has no predictive value for relapse detection at these two time-points.

Once the consolidation treatment was concluded, virtually all samples from patients in continuous complete remission continued to show very low *PRAME* expression levels during the maintenance phase (median 0.25 RU; range, 0-18) and out of treatment (median 2.7 RU; range, 0-11). Only three out of 70 samples (4.3%) from patients in continuous complete remission showed *PRAME* expression >10 RU during maintenance therapy and beyond. These were considered as false positive results, since all subsequent samples (at least two) had *PRAME* expression <10 RU (n=9, median value 0.4; range, 0-6) and none of patients relapsed (follow-up after the positive sample of 10, 22 and 27 months). By contrast, 11 out of 13 samples taken within 6 months preceding relapse (median 72; range 22, to 173 days) from patients who eventually relapsed had *PRAME* expression >10 RU (median 18.2 RU; range, 1.9 to 150.0).

Discussion

In this study we evaluated the biological and prognostic significance of *PRAME* expression in 125 patients with APL and demonstrated that overexpression of this tumor-related antigen is associated with a better outcome and longer RFS. In addition, the RNA levels of *PRAME* can be a useful method for monitoring MRD, since levels of expression are reduced during complete remission and increased several months preceding relapse.

High *PRAME* levels were initially correlated with an advanced tumor stage and poor clinical outcome for several solid tumors such as non-small cell lung, breast and renal cell carcinoma, Hodgkin's lymphoma, medulloblastoma and melanomas.^{12,10,11} By contrast, in hematologic neoplasias such as AML and acute lymphoid leukemia preliminary reports suggest that high *PRAME* expression is associated with a favorable prognosis.^{4,5,8} Only two previous studies have indicated that *PRAME* levels may be higher in AML patients with t(15;17) than in the rest of the AML subtypes; however, both studies only evaluated a limited number of t(15;17) AML cases using either conventional semi-qualitative RT-PCR (n=11)³ or gene expression arrays (n=12).²⁰ When these latter patients were reanalyzed using the SYBR Green RQ-PCR approach, a correlation between high expression of *PRAME* (defined as the median expression across all AML samples) and t(15;17) AML was observed.⁴

However, the authors argued that this correlation might have been secondary to its correlation with

favorable cytogenetics and they merely observed a trend towards longer overall survival in cases with higher *PRAME* expression.⁴ Based on a large cohort of APL patients, our data demonstrate that *PRAME* expression is an independent prognostic factor in APL since its over-expression is associated with prolonged RFS. Moreover, *PRAME* level contributes to defining two prognostic sub-groups within low-risk APL patients according to whether their WBC count is above or below $10 \times 10^9/L$.²⁶⁻²⁹

The biological explanation of why high *PRAME* expression is associated with a better prognosis is unclear. *PRAME* has been described to be a repressor of retinoic acid signaling, capable of inhibiting retinoic acid-induced differentiation, growth arrest and caspase-dependent apoptosis in F9 mouse embryonic carcinoma cells.³¹ Knock-down of *PRAME* by RNA interference in the retinoic acid-resistant A375 human melanoma cell line restores both retinoic acid receptor signaling and sensitivity to the antiproliferative effects of retinoic acid.³¹ However, some authors have shown that this effect could be tissue-specific, since *PRAME* expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in cells from primary AML.²² Furthermore, Tajeddine *et al.*³³ demonstrated that *PRAME* overexpression can induce caspase-independent cell death in CHO-K1 and HeLa cell lines. In addition, the repression of *PRAME* expression by a short interfering RNA increases the tumorigenicity of the K562 leukemic cell in BALB/c nude mice.³³ These latter findings would be fully concordant with a presumed beneficial effect of *PRAME* expression in the prognosis of APL.

Traditionally, MRD in APL patients is evaluated using levels of *PML-RARA*.^{16,20,34,35} In the post-induction phase, about one half of the patients in complete remission after ATRA plus chemotherapy, remain positive for *PML-RARA* in the bone marrow and this evaluation is clinically not informative. By contrast, studies carried out after completion of consolidation treatment are extremely relevant since a positive *PML-RARA* test is strongly predictive of relapse.^{20,25,34,36} In our series, RNA levels of *PRAME* at diagnosis were relatively lower than those of *PML-RARA*, but the kinetics of both transcripts after therapy seemed to be similar. *PRAME* levels in both the post-induction and post-consolidation phase did not have any prognostic impact. By contrast, in follow-up samples during maintenance treatment and out of therapy, we observed that an increasing level of *PRAME* was associated with impending relapse.

Accordingly, our results show that APL patients with a *PRAME* level 10-fold higher than normal values during maintenance therapy and beyond are at high-risk of relapse. *PRAME* and *PML-RARA* expression are strongly correlated and results after therapy were concordant, since a result of >10 normalized copy number during this period was almost equivalent to an immediate relapse.²⁰ However, it is unclear whether *PRAME* RNA levels give information additional to that provided by *PML-RARA* expression, suggesting that *PRAME* could be used only as a secondary marker during the

C. Santamaria et al.

follow-up of APL.

In conclusion, our data demonstrate that *PRAME* is a suitable indicator of prognosis in APL, since overexpression at diagnosis is associated with a better outcome and the levels were able to identify two subgroups with significantly different RFS within low-risk APL patients (i.e. those with a $WBC < 10 \times 10^9/L$).

Authorship and Disclosures

CS and MCC participated equally in designing the study, carrying out all molecular studies and preparing the database for the final analysis; CS prepared the initial version of the paper; RG-S conceived the study,

helped in the design of the work, reviewed the database and carried out the statistical analysis. He rewrote the paper and provided pre-approval of the final version; AB, MES and MA participated in the generation of the molecular results; FR, TB, JAO, MJP and PG were the clinicians responsible for the patients and took care of administering the treatment protocols, taking samples and collecting clinical data; JFS-M and MG promoted the study and obtained financial support. Both were responsible for the group of researchers and were responsible for the most important revision of the draft article; MG gave final approval of the version to be submitted. The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997;6:199-208.
- Epping MT, Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res* 2006;66:10639-42.
- 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;102:1376-9.
- 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;108:4109-17.
- Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. Clinical implications of *PRAME* gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;133:118-23.
- 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;79:257-61.
- Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Li L, Schmitt A, Shiku H, et al. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer* 2004;108:704-11.
- Steinbach D, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. *PRAME* gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;138:89-91.
- Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, Seydaoglu G. *PRAME* mRNA levels in cases with chronic leukemia: Clinical importance and review of the literature. *Leuk Res* 2007;31:365-9.
- Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M. The tumor-associated antigen *PRAME* is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2004;10:4307-13.
- Neumann E, Engelsberg A, Decker J, Storkel S, Jaeger E, Huber C, et al. Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens *RAGE-1*, *PRAME*, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies. *Cancer Res* 1998;58:4090-5.
- 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* 2006;12:2434-41.
- Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, Okamoto S, Ogasawara M, Ikeda Y, et al. Quantitative monitoring of the *PRAME* gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematol* 2001;112:916-26.
- 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;44:548-55.
- Sanz MA, Martin G, Rayon C, Esteve J, Gonzalez M, Diaz-Mediavilla J, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high anti-leukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RAR α -positive acute promyelocytic leukemia. *PETHEMA* group. *Blood* 1999;94:3015-21.
- Sanz MA, Martin G, Gonzalez M, Leon A, Rayon C, Rivas C, 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;103:1237-43.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901-28.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden V, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318-57.
- 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;25:402-8.
- Santamaria C, Chillon MC, Fernandez C, Martin-Jimenez P, Balanzategui A, Garcia-Sanz R, et al. Using quantification of the PML-RAR α transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2007;92:315-22.
- Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden V, Bi W, Dec R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2474-86.
- Chillon MC, Fernandez C, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Ramos F, Fernandez-Calvo J, et al. FLT3-activating mutations are associated with poor prognostic features in AML at diagnosis but they are not an independent prognostic factor. *Hematol J* 2004;5:239-46.
- Thiede C, Studel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99:4326-35.
- Kaplan EL. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
- Cox DR. Regression models and life

- tables. *J R Stat Soc B* 1972;34:187-220.
26. Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the randomized MRC trial. *Blood* 1999;93:4131-43.
 27. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Woods WG, et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* 2002;100:4298-302.
 28. Lo-Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:12-22.
 29. Ades L, Sanz MA, Chevret S, Montesinos P, Chevallier P, Raffoux E, et al. Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): a comparison of French-Belgian-Swiss and PETHEMA results. *Blood* 2008;111:1078-84.
 30. 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* 2004;350:1605-16.
 31. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernards R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 2005;122:835-47.
 32. Steinbach D, Pfaffendorf N, Wittig S, Gruhn B. PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;177:51-4.
 33. Tajeddine N, Gala JL, Louis M, Van SM, Tombal B, Gailly P. Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 2005;65:7348-55.
 34. Sanz MA, Tallman MS, Lo-Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005;105:3019-25.
 35. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003;102:2746-55.
 36. Grimwade D, Lo-Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:1959-73.
 37. Sanz MA, Lo-Coco F, Martin G, Avvisati G, Rayon C, Barbui T, 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;96:1247-53.

3. Enfermedad residual mínima (ERM) en LPA/ LMA-M3

Using quantification of the PML-RAR α transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2007; 92:315-322.

La detección del transcrito de fusión *PML-RAR α* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RQ-PCR) constituye una herramienta esencial para la evaluación de la enfermedad residual mínima en pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA). Sin embargo, el valor clínico de esta técnica en LPA aún se mantiene bajo análisis. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre el riesgo de recaída y los resultados de RQ-PCR en cada una de las fases de tratamiento de la LPA (inducción, consolidación, mantenimiento y fuera de tratamiento). Además, se compararon los valores de RQ-PCR con los datos obtenidos por RT-PCR cualitativa. Para ello, se analizaron un total de 1064 muestras de médula ósea (MO) y 145 muestras de sangre periférica (SP), obtenidas de 145 pacientes diagnosticados con LPA, con una mediana de 9 muestras por paciente (rango 4-39). La distribución de las muestras según el estadio terapéutico fue: 145 muestras al diagnóstico, 102 en post-inducción (PI), 122 en post-consolidación (PC), 442 durante la fase de mantenimiento (FM) y 398 fuera de tratamiento (FT). Todos los pacientes fueron tratados con los protocolos PETHEMA (ya sea LPA-96 o LPA-99) y las muestras fueron analizadas con las técnicas de RQ-PCR de *Europe Against Cancer program* y RT-PCR de *BIOMED-1 Concerted Action*.

Los resultados moleculares en la evaluación en PI no tuvieron impacto sobre el riesgo de recaída de los pacientes y tampoco implicaron modificaciones en los esquemas de tratamiento. Después del tercer ciclo de consolidación, dos de 3 pacientes con una prueba positiva por RQ-PCR recayeron, en comparación con 16 de 119 (13%) de los casos con prueba negativa por RQ-PCR. Cuando se analizó a los pacientes durante la FM y FT, todos los pacientes con más de 10 copias normalizadas (NCN) de *PML-RAR α* (n=19) en una sola muestra recayeron y que, por el contrario, todos los pacientes con <1 NCN se mantuvieron en remisión completa (RC) al final del estudio. En el grupo intermedio (NCN entre 1-10) la mayoría de individuos (6 de 9) continuaron en remisión completa. De esta forma, se pudo establecer claramente tres grupos con diferentes grado de riesgo de recaída según el NCN de *PML-RAR α* : <1 NCN, entre 1-10

NCN y >10 NCN, con una probabilidad de supervivencia libre de recaída (SLR) a los 3 años de 94%, 67% y 0%, respectivamente, en caso que la muestra fuera de FM y una SLR a los 5 años de 100%, 67% y 14% si la muestra fue tomada FT ($p < 0.001$). Con los resultados derivados de RQ-PCR, se pudo establecer una estratificación de riesgo de recaída (bajo, intermedio y alto) en pacientes con LPA, una vez finalizada de la terapia de consolidación y subsecuentemente. Cabe también señalar que al comparar la RT-PCR y la RQ-PCR en las distintas fases de tratamiento sólo hubo un 5.5% de discrepancias entre ambos métodos, principalmente con valores de RQ-PCR entre 1-10 NCN. La tercera observación de importancia es que todos los pacientes a los cuales se les analizó una muestra dentro de los 4 meses previos a su recaída, tuvieron la prueba de RQ-PCR positiva, lo cual refuerza el concepto de un seguimiento continuo de los pacientes con LPA, con al menos 3 revisiones moleculares al año.



Using quantification of the *PML-RAR α* transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia

Carlos Santamaría, María Carmen Chillón, Carina Fernández, Patricia Martín-Jiménez, Ana Balanzategui, Ramón García Sanz, Jesús F. San Miguel, Marcos-Gonzalez González

From the Servicio de Hematología, Hospital Universitario, Salamanca, Spain.

Acknowledgments: the authors would like to thank M. Hernández, F. García, A. Antón, and M. Anderson for their technical support.

Funding: this work was partially supported by grant 89/A/06 from Gerencia Regional de Salud. CS was partially supported by Grants from "Instituto Costarricense contra el Cáncer" and CENDEISSS.

Manuscript received September 6, 2006. Manuscript accepted January 26, 2007.

Correspondence:
Ramón García Sanz, MD, PhD,
Department of Hematology,
Hospital Universitario de
Salamanca, Paseo San Vicente 58-
182, 37007 Salamanca, Spain.
E-mail: rgarcias@usal.es

ABSTRACT

Background and Objectives

The detection of *PML-RAR α* by real-time polymerase chain reaction (RQ-PCR) is becoming an important tool for monitoring minimal residual disease (MRD) in patients with acute promyelocytic leukemia (APL). However, its clinical value remains to be determined. Our aim was to analyze any associations between the risk of relapse and RQ-PCR results in different phases of treatment, comparing these data with those yielded by conventional qualitative reverse transcriptase-PCR.

Design and Methods

Follow-up samples from 145 APL patients treated with the PETHEMA protocols were evaluated by the RQ-PCR protocol (Europe Against Cancer program) and by the RT-PCR method (BIOMED-1 Concerted Action). Hematologic and molecular relapses and relapse-free survival were recorded. We then looked for associations between relapse risk and RQ-PCR results.

Results

After induction therapy, no association was found between positive RQ-PCR results and relapse. The PCR result here did not imply any change in the scheduled therapy. After the third consolidation course, two out of three cases with positive RQ-PCR relapsed in contrast to 16 out of 119 (13%) patients with negative RQ-PCR. During maintenance therapy and out-of treatment, all patients with >10 *PML-RAR α* normalized copy number (NCN) ($n=19$) relapsed while all patients with <1 NCN at the end of the study remained in hematologic remission ($p<0.0001$). In the intermediate group (NCN 1-10) ($n=18$), the relapse-free survival at 5 years was 60%. Hematologic relapses were predicted if a positive RQ-PCR result had been obtained in a follow-up sample within the previous 4 months.

Interpretation and Conclusions

Based on the information provided by RQ-PCR in samples obtained after the end of consolidation and subsequently, a relapse risk stratification could be established for APL patients. This stratification divides patients into three groups: those at high risk of relapse, those with an intermediate risk and those with a low risk of relapse.

Key words: acute promyelocytic leukemia, RQ-PCR, minimal residual disease.

Haematologica 2007; 92:315-322

©2007 Ferrata Storti Foundation

C. Santamaria et al.

Combined treatment with anthracycline-based chemotherapy and all trans retinoic acid (ATRA) is highly successful in acute promyelocytic leukemia (APL), providing long-lasting remissions and probable cures in up to 70% of newly diagnosed patients.¹⁻⁵ Nevertheless, the persistence of resistant clones causing relapse and low survival still represents a problem in 15-25% of patients.^{6,9} Currently, detection of *PML/RAR α* transcripts by molecular techniques constitutes an important tool for monitoring minimal residual disease (MRD) and predicting evolution in APL patients.¹⁰ Conventional qualitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) has been widely used for genetic diagnosis and therapeutic monitoring of APL. Several reports have shown that RT-PCR positivity after consolidation treatment predicts hematologic relapse, whereas persistent RT-PCR negativity test is associated with long-term survival and a low relapse rate.^{11,12} However, this technique has several disadvantages such as the occurrence of false positive results due to cross-contamination and false negatives due to poor RNA quality or RT-PCR failures at different stages. In addition, the sensitivity of RT-PCR for measuring MRD is relatively low^{13,14} and the method is associated with significant inter-laboratory variability.¹⁵ Finally, qualitative RT-PCR requires significant post-PCR handling which is time and labor-consuming and often leads to contamination of samples.

Recently, quantification of the *PML/RAR α* copy number based on real-time PCR approaches (RQ-PCR) has become a new alternative for monitoring disease outcome. Although this approach suffers from some of the same problems as conventional RT-PCR, it has several advantages such as being highly sensitive, facilitating assessment of kinetics and being highly reproducible.^{15,16} Although several protocols have been developed for quantitative monitoring in APL,^{16,19} there is currently no consensus concerning threshold levels to discriminate between low and high relapse risk, and the optimum calendar for sampling remains to be defined.^{10,20} Moreover, the clinical value of these investigations still needs to be confirmed.¹⁰ In addition, comparisons between qualitative (RT-PCR) and quantitative (RQ-PCR) approaches as suitable techniques for predicting relapse have not been made. The present work analyzes the value of RQ-PCR for predicting relapse in APL and compares quantitative results with those of the conventional RT-PCR approach, according to treatment phase.

Design and Methods

Patients and samples

From June 1996 to September 2005, 145 patients (aged 8 to 84 years) were referred to our molecular diagnostic laboratory at the University Hospital of Salamanca. The diagnosis of APL was confirmed through morphological, immunophenotypic, and cytogenetic criteria,²¹ as well as

by both RT-PCR and RQ-PCR analysis for *PML/RAR α* rearrangements.^{16,22} Post-induction and post-consolidation samples were analyzed by both methods using cDNA samples from RNA stored at -80°C . Any positive result after consolidation therapy was confirmed in a second sample or a repeated analysis with new cDNA. Patients who died of a cause related to induction therapy were not included in the present study.

Treatment protocol

Treatment was carried out according to the PETHEMA-LPA 96 protocol (before November 1999)² or PETHEMA-LPA 99 (subsequently).²³ Both protocols included an induction phase with ATRA plus idarubicin and three consolidation courses with idarubicin, mitoxantrone and idarubicin, followed by a maintenance phase with ATRA, methotrexate and mercaptopurine for 2 years.² In the APL-99 protocol the consolidation phase was modified such that ATRA plus higher doses of idarubicin were given to patients with a white blood cell (WBC) count higher than 10000/ μL and/or platelets counts lower than 40000/ μL , who were considered as being at high-risk.²³

Remission and relapse definition

Hematologic remission was defined as normal bone marrow cellularity with <5% leukemic promyelocytes and normalization of peripheral blood counts. Consequently, hematologic relapse was defined as the reappearance of $\geq 5\%$ leukemic promyelocytes in the bone marrow.²⁴ Molecular remission (MR) was defined as the disappearance on an agarose gel stained with ethidium bromide of the *PML/RAR α* -specific band visualized at diagnosis, using a qualitative RT-PCR assay with a sensitivity level of 10^{-4} in any follow-up sample, after the end of consolidation therapy.^{6,22} Regarding the RQ-PCR assay, MR was defined as present when less than 1 *PML/RAR α* normalized copy number (NCN) was detected (sensitivity of 10^5).¹⁶ Molecular relapse was defined as the reappearance of a positive molecular result according to either method in two consecutive bone marrow samples at any time after consolidation therapy.⁶ A result was considered to be false-positive when a positive molecular result appeared by any method but hematologic relapse was not observed within the subsequent 6 months.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was obtained from leukocytes using the acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction method.²⁴ Reverse transcription was performed as previously described:²² 1-2 μg of total RNA were added to a 20- μL volume containing random hexamers as primers and 200 U of SuperScript RNase H reverse transcriptase (Invitrogen, California, USA). The mixture was incubated at 42°C for 60 min, followed by 3 min at 99°C and 2 min at 4°C . Aliquots were stored at -80°C prior to further analysis.

RT-PCR qualitative assays

To amplify the *PML/RAR α* fusion gene, a two step qualitative RT-PCR analysis was performed as previously described.^{22,25} A volume of 5 μ L (100 ng) of cDNA was diluted into 45 μ L of a PCR mixture containing a final concentration of 400 nM primers, 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3) and 1.0 U of TaqGold DNA polymerase. PCR cycles included an initial denaturation at 95°C for 10 minutes. Melting, annealing and extension were carried out at 95°C for 30 sec, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min, respectively, for a total of 35 cycles. Nested PCR was performed under the same conditions, but using 2.5 μ L of PCR product from previous reaction and internal primers. Finally, 25 μ L of the PCR product were analyzed in a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Two negative controls (one with non-*PML/RAR α* RNA and one with distilled water) and a NB4 cell line as a positive control were included in the experiments. The assay sensitivity was 10⁻⁴, using several 10-fold microdilutions.²² The quality control of the cDNA preparation was assessed by amplification of the normal *ABL* gene.

RQ-PCR (real time) assays

The different *PML-RAR α* transcripts were quantified using the ABI PRISM 7700 DNA Sequence Detection System according to the Europe against Cancer Group (EAC) protocol, in which our group has actively participated.¹⁶ *PML-RAR α* transcript copy numbers were assessed in 5 μ L (100 ng) of cDNA through the Δ Ct method, using commercial plasmids (Ipsogen Laboratories, Marseille, France) to construct the standard curve. Primers were designed as previously reported.¹⁶ The Abelson house-keeping gene (*ABL*) was selected as a control gene of RNA expression, as previously reported.²⁶ A valid result required an *ABL* Ct within a range of 21.8 to 29.5, with at least 2000 copies of the *ABL* gene in the sample.²⁶ A non-amplification control (NAC), containing RNA from a healthy donor and non-template control (NTC), with distilled water instead of human cDNA were included in each assay. A positive well was defined as a sigmoid amplification (log scale) with a Ct value below the Y-intercept value of the standard curve plus one Ct, as reported previously.¹⁶ A positive result was defined with at least two out of three wells. The sensitivity, established previously in our laboratory, was 10⁵ using dilutions of the NB4 cell line.¹⁶ All samples were tested in triplicate and results are reported according to EAC guidelines as the normalized copy number (NCN), derived by multiplying the *PML-RAR α* copy number/*ABL* copy number ratio by 10000.¹⁶ A result of <1 NCN was reported as RQ-PCR negative.

Statistical analysis

All tests were carried out with the SPSS 12.0 program (SPSS, Chicago, IL, USA). For univariate analyses, χ^2 and

Table 1. Clinical and biological characteristics of the APL patients at diagnosis.

Parameter	n (%)
Age	
Median	41
Range	8-82
Sex	
Male	83 (57.2)
Female	62 (42.8)
WBC at diagnosis ($\times 1000/\mu$ L)	
Median	2.3
Range	0.3-187.0
BM blasts at diagnosis (%)	
Median	85
Range	10-100
PB blasts at diagnosis (%)	
Median	34
Range	0-98
Platelets at diagnosis ($\times 1000/\mu$ L)	
Median	25.5
Range	3-183
PML/RAR α isoform	
Bcr1	89 (61.4)
Bcr2	8 (5.5)
Bcr3	48 (33.1)
FAB classification	
M3	107 (73.8)
M3v	38 (26.2)
Treatment protocol	
PETHEMA 96	62 (42.8)
PETHEMA 99	83 (57.2)
PML/RAR α at diagnosis (NCN)	
Median	3082
Range	1224-19750
Days to molecular remission	
Median	57
Range	24-141

NCN: normalized copy number; WBC: white blood cell count; BM: bone marrow; PB: peripheral blood; FAB: French-American-British.

Fisher's exact test were performed to evaluate factors associated with relapse. Relapse-free survival (RFS) for analysis after consolidation therapy was defined as the time between the achievement of complete remission and relapse or last follow-up. The probabilities of RFS and overall survival (OS) were calculated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.²⁷ RFS was estimated using either molecular or hematologic relapse as censored events. OS was defined as the time from achievement of complete remission to death or last follow-up. The impact of multiple predictor variables on RFS was assessed using a Cox regression model.²⁸

Results**Patients and samples**

A total of 1064 bone marrow aspirates and 145 peripheral blood samples obtained from 145 APL patients were

C. Santamaria et al.

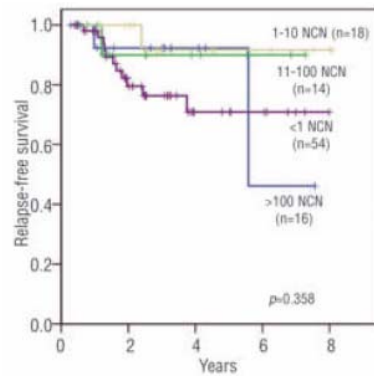


Figure 1. Kaplan-Meier analysis comparing relapse-free survival in 102 APL patients, according to *PML-RARα* normalized copy number (NCN) at the post-induction test. No NCN cut-off point was able to identify a group with a shorter RFS.

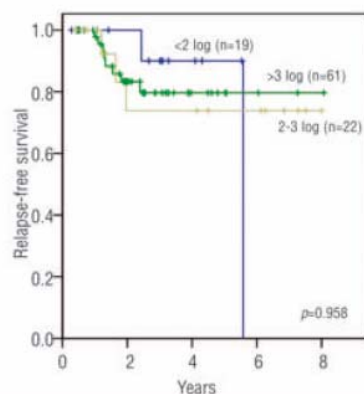


Figure 2. Kaplan-Meier analysis comparing relapse-free survival in 102 APL patients according to kinetics of *PML-RARα* normalized copy number (NCN) reduction assessed by RQ-PCR, in the post-induction phase with respect to at diagnosis. No correlation was found between any logarithmic cut-off point and shorter RFS.

included in the present study. There was a median of nine samples per patient (range, 4 to 39). The distribution of samples in different treatment phases was as follows: 102 samples were taken following induction therapy, 122 following consolidation therapy, 442 during maintenance therapy and 398 once maintenance treatment had finished. All 145 patients achieved hematologic remission with the therapeutic protocol, but 23 of them relapsed after the last consolidation course, 13 during maintenance therapy (median 18.3 months after diagnosis, range 8-23.5) and 10 out of treatment (median 40 months after diagnosis, range 28.3-70). Two additional patients had a

second relapse after salvage treatment. Patients testing PCR-positive at the end of induction therapy received therapy as scheduled.

Characteristics at presentation and influence on survival

The main clinical characteristics of patients at diagnosis are summarized in Table 1. The 3-year probabilities of RFS and OS were 83.3% and 89.3%, respectively. When we evaluated the impact of the clinical features on RFS, APL FAB M3 variant subtype ($p=0.016$) and WBC count higher than 10000/ μL ($p=0.021$) at diagnosis were the only parameters associated with a shorter RFS (Table 2). Multivariate analysis showed that a high WBC count was the only independent factor associated with poor RFS ($p=0.026$). By contrast, other parameters such as number of blast cells in bone marrow or peripheral blood, platelets counts and *PML/RARα* isoform had no prognostic impact on relapse risk (Table 2).

RQ-PCR in different phases of treatment and influence on survival

At diagnosis, all samples showed >1000 NCN (median 3082, range 1224-19750) by RQ-PCR. After induction therapy, 48 out of 102 (47%) patients in hematologic remission displayed a positive result, which was not correlated with the probability of relapse (71% and 80% RFS at 5 years in the negative and positive RQ-PCR groups, respectively; $p=0.105$). Several cut-off points were evaluated to determine the prognostic value of the NCN on RFS but none of them correlated with a shorter survival (Figure 1). In addition, the kinetics of tumor burden reduction (log reduction in NCN between diagnosis and post-induction) did not predict clinical outcome (Figure 2).

Such results contrast with those obtained after the third consolidation course, when only three out of 122 patients were RQ-PCR positive and two of them, with NCN of 10 and 133, relapsed 3 and 4.5 months later, respectively. The third patient (NCN of 4) received salvage therapy and remains in continuous molecular remission after maintenance therapy (follow-up of 19 months). With regards to the group with $\text{NCN}<1$ according to RQ-PCR, 16 out of 119 patients had a hematologic relapse (13.4%) at a median of 19.2 months after hematologic remission (range 8-70). According to these results, the RFS curves were markedly different with a probability of remaining in continuous complete remission at 5 years of 33% in the $\text{NCN}\geq 1$ group versus 84% in the $\text{NCN}<1$ group at the end of the consolidation therapy ($p<0.0001$).

During the maintenance phase, 442 samples from 96 patients were analyzed. In 75 patients (78.1%), all samples were constantly negative, while in 21 patients at least one positive sample was detected. Within this latter group, 12 had >10 NCN and the remaining nine had between 1 and 10 NCN. The RFS at 3 years was 94%, 67% and 0% for the $\text{NCN}<1$, $\text{NCN}1-10$ and $\text{NCN}>10$ groups, respectively

Table 2. Influence of clinical and biological characteristics at diagnosis on relapse-free survival (RFS) in patients with APL.

	n	RFS	
		Univariate	Multivariate
Age (years) ¹			
≤ 60	117	NS	NS
> 60	28		
Sex			
Male	83	NS	NS
Female	62		
WBC at diagnosis (x1000/ μ L) ¹			
≤ 10.0	111	0.021	0.026
> 10.0	34		
BM blasts at diagnosis (%) ²			
≤ 85	73	NS	NS
> 85	72		
PB blasts at diagnosis (%) ²			
≤ 34	74		
> 34	71	NS	NS
Platelets at diagnosis (x1000/ μ L) ¹			
≤ 40	104	NS	NS
> 40	41		
PML/RAR α Isoform			
Bcr1	89		
Bcr2	8	NS	NS
Bcr3	48		
FAB classification			
M3	107	0.016	0.119
M3v	38		
Treatment protocol			
PETHEMA 96	62	NS	NS
PETHEMA 99	83		
Days to molecular remission ²			
≤ 57	74	NS	NS
> 57	71		

NS: not statistically significant; NCN: normalized copy number; ¹based on criteria of high-risk patients from Sanz et al., 2004; ²based on median value. WBC: white blood cell count; BM: bone marrow; PB: peripheral blood; FAB: French-American-British.

Table 3. RQ-PCR results of patients during maintenance treatment and out of treatment.

	Maintenance		Out of treatment	
	n	Relapse n (%)	n	Relapse n (%)
All samples negative	75	8 ^a (10.7)	62	0 (0)
At least one positive sample	21	15 (71.4)	16	10 (62.5)
At least one sample 1-10 NCN	9	3 (33.3)	9	3 (33.3)
At least one sample 11-50 NCN	5	5 (100)	0	—
At least one sample 51-100 NCN	3	3 (100)	1	1 (100)
At least one sample more than 100 NCN	4	4 (100)	6	6 (100)
TOTAL	96	23 (23.9)	78	10 (12.8)

^aAll eight patients relapsed during the period out of treatment.

Seventy-eight patients were monitored after the end of the treatment, through the investigation of a total of 398 samples. Sixty-two patients had continuously negative RQ-PCR tests while 16 had at least one positive result. All patients from the first group remained in complete remission until the end of this study (Table 3) while ten from the second group had already relapsed, which provides 5-year RFS probabilities of 100% and 38% for patients with negative vs. positive results, respectively ($p < 0.0001$). Analogous to the findings during maintenance therapy, all patients with NCN > 10 ($n = 7$) relapsed at a median of 45 days (range, 0-107) after the positive test, while most of patients who had NCN between 1 and 10 (six out of nine) remained in complete remission (Table 3). Accordingly, three groups with different probabilities of RFS could be established based on the PML/RAR α NCN: <1 NCN, 1-10

(Figure 3a). Relapses occurred in all patients with NCN > 10 within the 4 months following a positive molecular result (median 41 days, range 0-153 days).

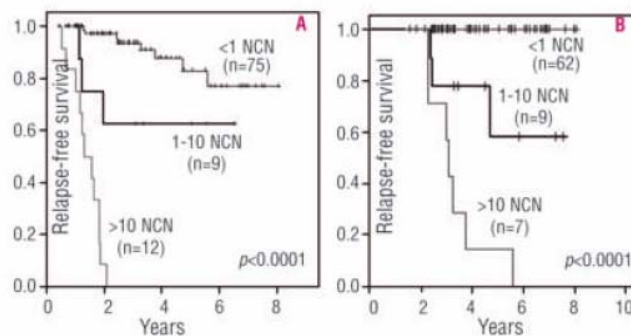


Figure 3. Kaplan-Meier analysis of RFS in APL patients according to relapse-risk stratification, based on PML-RAR α normalized copy number (NCN) during maintenance therapy (A) and out of treatment (B), and reported according to the Europe against Cancer (EAC) protocol. A well-defined stratification of relapse-risk was obtained during maintenance therapy and after treatment: patients with a RQ-PCR result higher than 10 NCN formed a high-risk group, those with RQ-PCR results between 1 and 10 NCN formed an intermediate-risk group and those with RQ-PCR results lower than 1 NCN constituted the low-risk group.

C. Santamaria et al.

Table 4. Comparison between RQ-PCR and RT-PCR results in samples according to therapeutic phase.

	Qualitative RT-PCR									Discrepancies (%) TOTAL
	Post-Induction n=102		Post-consolidation n=122		Maintenance n=156		Out of treatment n=127		TOTAL	
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG		
< 1 NCN	0	60	1	118	2	106	2	87	5/376 (1.3)	
1-10 NCN	6	5	2	0	9	8	11	10	23/51 (45)	
> 10 NCN	31	0	1	0	31	0	17	0	0/80 (0)	
TOTAL	37	65	4	118	42	114	30	97	28/507 (5.5)	

Table 5. Comparison between RQ-PCR and RT-PCR results in patients under maintenance therapy or out of treatment.

RQ-PCR	RT-PCR	Patients (Relapses/Total)		
		Maintenance	Out of treatment	TOTAL
< 1 NCN	Negative	0/51	0/48	0/99
< 1 NCN	Positive	0/1	0/1	0/2
1-10 NCN	Negative	1/5	0/5	1/10
1-10 NCN	Positive	2/4	3/4	5/8
> 10 NCN	Positive	12/12	7/7	19/19

NCN and >10 NCN: these groups had 5-year RFS probabilities of 100%, 67% and 14%, respectively ($p < 0.0001$, Figure 3B). All patients with positive results by RQ-PCR in two consecutive samples during maintenance therapy or out of treatment, finally relapsed ($n=23$). By contrast, all patients with a result that was initially positive but negative in the confirmatory sample, remained in hematologic remission until the end of the study ($n=12$, median follow-up of 37.9 months; range, 8.3-57.0).

Furthermore, we analyzed 130 paired bone marrow and peripheral blood samples (66 from 21 patients in continuous complete remission and 64 from 7 patients who finally relapsed). Regarding the second group, no significant differences were observed in NCN by RQ-PCR between bone marrow samples (median, 45 NCN: range, 6-697) and peripheral blood samples (median, 21 NCN: range, 4-343) ($p=0.365$). However, in three out of seven patients the molecular relapse was detected in bone marrow 24, 28 and 35 days earlier than in peripheral blood. These data suggest that bone marrow samples could be more suitable than peripheral blood for RQ-PCR follow-up. Alternatively, if peripheral blood samples are used, the monitoring should be performed more frequently. However, the reduced number of samples mean that these results should be considered preliminary.

Comparison between RQ-PCR vs. RT-PCR assays

Overall, 507 samples taken during different phases of treatment were analyzed in parallel by both methods (Table 4). Results were concordant in 479 samples (94%)

(both positive in 108 samples and both negative in 371 samples). In 28 samples, however, discrepant results were obtained: 23 samples were positive by RQ-PCR but negative by RT-PCR, while in five samples the opposite was observed. As shown in Table 4, most of these discrepancies occurred in the group of samples with 1-10 NCN. It should be noted that five out of eight patients with RQ-PCR results between 1-10 NCN and positive RT-PCR relapsed, whereas only one out of ten patients with 1-10 NCN by RQ-PCR and negative RT-PCR relapsed (Table 5). This difference was statistically significant ($p=0.04$). Regarding discrepant cases we observed that while RQ-PCR yielded false positive results (12 cases), particularly when the NCN was lower than 10, RT-PCR was associated with both false positive (five cases) and false negative (one case) results.

Finally, it should be noted that in 11 patients the hematologic relapse was not predicted by molecular techniques (neither RQ-PCR nor RT-PCR). In all these cases, the final molecular analysis was consistently performed >5 months before relapse occurred (median 260 days, range 153-368). This indicates that the design of an optimal calendar for investigating of MRD in APL should be based on sampling intervals between 4-5 months.

Discussion

In the present study, we analyzed the prognostic value of a well-standardized RQ-PCR protocol (Europe Against Cancer program)¹⁶ in APL patients during different phases of treatment. Our results indicate that this approach is a robust alternative for assessing MRD and a relapse-risk stratification can be established based on the *PML-RAR α* normalized copy number.

As previously reported for both RQ-PCR and RT-PCR, no correlation was found between a positive test immediately after induction therapy and outcome.^{2,4,19} Actually, no significant differences in *PML-RAR α* NCN values post-induction were observed between relapsed patients and those who remained in continuous complete remission, as also reported by other groups.^{19,29-30} Similarly, the kinetics

of tumor burden reduction (log-reduction in NCN between diagnosis and post-induction) did not correlate with disease outcome. These results contrast with the picture in other leukemic disorders such as t(9;22) acute lymphoblastic leukemia²¹ or t(8;21) acute myeloid leukemia, in which successful induction chemotherapy produces a reduction of 2 to 3 log in the level of *AML1-MTG8*, followed by a further 2 to 3 log after consolidation/intensification chemotherapy.²² Such differences could be explained in part by the type of therapy, since ATRA, unlike other cytotoxic treatments, promotes the differentiation of APL cells to a maturative stage instead of quickly eliminating leukemic cells.²³ Furthermore, in contrast to other acute myeloid leukemias, induction treatment of APL can be associated with delayed leukemic clearance.¹⁰

Regarding post-consolidation analysis, it is generally accepted that there is a correlation between positive RQ-PCR assays and a high risk of relapse,^{2,13,19,20} especially when the third course of chemotherapy has been completed. However, in our series, as well as in other studies^{7,23} the low number of positive cases detected at the end of consolidation limits the utility of this parameter. Interestingly, in a recent study that evaluated samples by RQ-PCR at the end of each consolidation course, there was a significant correlation between an MRD level $>10^{-2}$ after first consolidation and poor clinical outcome.²⁰ This value is equivalent to the 10 NCN threshold in the present study.

During maintenance therapy and beyond the end of treatment, a positive RQ-PCR test was associated with a higher relapse risk and shorter survival. Moreover, three well-defined risk groups could be established according to the *PML-RAR α* NCN assessed with the Europe Against Cancer protocol.¹⁶ Patients with <1 NCN had a very favorable RFS, especially when the test was performed during follow-up, post-maintenance therapy. By contrast, patients with >10 NCN had a very poor prognosis since all these patients finally relapsed. These results are similar to preliminary data communicated by Cassinat *et al.*, showing that no relapse occurred in patients with <10 copies, whereas the relapse rate observed in patients with more than 100 copies was 100%.²⁴ The discrepancies in the thresholds could be related to methodological differences such as the control gene used (*PBGD* vs *ABL*) for the normalization of the *PML-RAR α* copy number.

An interesting group with intermediate-risk was detected in our series. This group included patients with at least one positive result between 1 and 10 NCN during maintenance and out of treatment. There was a very high probability of relapse within this group if either a second confirmatory positive sample or RT-PCR positive assay was found. If not, this low positivity can be considered a false positive result, since all 11 patients with this pattern and negative RT-PCR remained in continuous complete remission. On the other hand, no false negative results were

observed by RQ-PCR of samples taken in the post-maintenance phase. In contrast, RT-PCR can produce both false positive and false negative results in a few patients (three and two, respectively). These data suggest that RT-PCR could be used as a complementary assay for the RQ-PCR approach, especially within the subgroup with 1-10 NCN. A good correlation between RT-PCR and RQ-PCR results has recently been found in 31 newly APL diagnosed patients.²⁵ Furthermore, it is important to note that the relatively high specificity of RT-PCR assay is not reason enough to substitute a highly sensitive, standardized and high through-put technology such as RQ-PCR.

Interestingly, all patients who had a positive molecular result, by both techniques, had a hematologic relapse within 4 months. This emphasizes the need for frequent sampling (at least every 4 months) in order to predict impending relapses. Since our data include patients monitored not only during maintenance therapy but also out of treatment, and we have observed a similar pattern of rapid relapse in these latter cases, we can conclude that the recent recommendation to monitor MRD every 3 months during maintenance therapy^{9,11,19} could be prolonged to the 2 years following treatment, although during this period sampling could be slightly less frequent (every 4-5 months). In addition, patients with adverse features such as WBC counts $>10,000/\mu\text{L}$ at diagnosis should be monitored more closely, for example every 2 or 3 months.¹⁰ It is important to note that our recommendations about levels and frequencies of sample collection should be considered within the framework of treatment schedules similar to the PETHEMA protocol used here.

In conclusion, we propose a relapse-risk stratification based on quantification of *PML-RAR α* NCN, to evaluate APL patients during their maintenance therapy and beyond the end of treatment. Nevertheless, RT-PCR remains a complementary and valuable technique, particularly for patients with only one low positive RQ-PCR result. Finally, our data show that a positive molecular result with >10 NCN or reconfirmed positivity by RT-PCR is predictive of rapid clinical relapse within the subsequent 4 months.

Authors' Contributions

MG and MCC were the initial designers of the study; CS, MCC and CF carried out all molecular studies and prepared the database for the final analysis; CS developed the statistical analysis and prepared the initial version of the paper; PM-J and AB helped in the molecular analysis and data collection; RG-S reviewed the conception and design of most of the work, made the database and supervised the statistical analysis, re-wrote the paper and provided the pre-approval of the final version; FR, MCR and MJP were clinicians responsible for the patients who took care of the protocol accomplishment, sampling and collection of the clinical data; JFSM and MG were responsible for the group and the final revision of the draft. They gave final approval of the version to be published.

Conflict of Interest

The authors reported no potential conflicts of interest.

C. Santamaria et al.

References

- Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Woods WG, et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* 2002;100:4298-302.
- Sanz MA, Martín G, Rayón C, Estevez J, González M, Díaz-Mediavilla J, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RAR α positive acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:3015-21.
- Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pellicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:12-22.
- Burnett AK, Grimwade D, Solomon E, Wheatley K, Goldstone AH. Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the randomized MRC trial. *Blood* 1999;93:4131-3.
- Fenaux P, Chastang C, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, et al. A randomized comparison of all trans retinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1192-200.
- Sanz MA, Lo Coco F, Martín G, Avvisati G, Rayón C, Barbui T, 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;96:1247-53.
- Breccia M, Diverio D, Noguera NI, Visan G, Santero A, Locatelli F, et al. Clinico-biological features and outcome of acute promyelocytic leukemia patients with persistent polymerase chain reaction-detectable disease after the AIDA front-line induction and consolidation therapy. *Haematologica* 2004;89:29-33.
- Tobal K, H Moore H, M Macheta M, Liu Yin JA. Monitoring minimal residual disease and predicting relapse in APL by quantitating PML-RAR α transcripts with a sensitive competitive RT-PCR method. *Leukemia* 2001;15:1060-5.
- Juric JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell RP Jr, Miller WH Jr. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR α isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2001;98:2651-6.
- Sanz MA, Tallman MS, Lo Coco F. Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2005;105:3019-25.
- Diverio D, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F, et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML-RAR α fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial. *Blood* 1998;92:784-9.
- Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, Luciano A, Barbui T, Bernasconi C, et al. Molecular remission in PML/RAR α -positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood* 1997;90:1014-21.
- Grimwade D, Lo Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:1959-73.
- Gameiro P, Vieira S, Carrara P, Silva AL, Diamond J, De Sousa B, et al. The PML-RAR α transcript in long-term follow-up of acute promyelocytic leukemia patients. *Haematologica* 2001;86:577-85.
- Bolufer P, Lo Coco F, Grimwade D, Barragán E, Diverio D, Cassinat B, et al. Variability in the levels of PML-RAR α fusion transcripts detected by laboratories participating in an external quality control program using several reverse transcription polymerase chain reaction protocols. *Haematologica* 2001;86:570-6.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Grimwade D, Pallisgaard N, Garbany G, 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;12:2318-57.
- Cassinat B, Zassadowski E, Baltrand N, Barbey C, Rain JD, Fenaux P, et al. Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia* 2000;14:324-8.
- Slack JL, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Yu M, Clark M, et al. Pre-clinical validation of a novel, highly sensitive assay to detect PML-RAR α using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2001;3:141-9.
- Gallagher RE, Yeap BY, Bi W, Livak KJ, Beaubier N, Rao S, et al. Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR α mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood* 2006;101:2521-8.
- Gallagher RE, Schachter-Tokarz E, Liao K, Jones D, Estey E. MRD monitoring in acute promyelocytic leukemia: unresolved issues in 2005. *Haematologica Reports* 2005;1:76-9.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Hlandin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-5.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13:1901-28.
- Sanz M, Martín G, Gonzalez M, Leon A, Rayon C, Rivas C, 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;103:1237-43.
- Chomczynski T, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- Gonzalez M, Barragan E, Bolufer P, Chillon C, Colomer D, Borstein R, et al. Pretreatment characteristics and clinical outcome of acute promyelocytic leukemia patients according to the PML-RAR alpha isoforms: a study of the PETHEMA group. *Br J Haematol* 2001;114:99-103.
- Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dec R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;12:2474-86.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457.
- Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B* 1972;34:187-220.
- Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RAR α , AML1-ETO, or CBFB-MYH11 acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood* 2003;102:2746-55.
- Lee S, Kim YJ, Eom KS, Min CK, Kim HJ, Cho SG, et al. The significance of minimal residual disease kinetics in adults with newly diagnosed PML-RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia: results of a prospective trial. *Haematologica* 2006;91:671-4.
- Pane F, Cimino G, Izzo B, Camera A, Vitale A, Quintarelli C, et al. Significant reduction of the hybrid BCR/ABL transcripts after induction and consolidation therapy is a powerful predictor of treatment response in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005;19:628-35.
- Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, et al. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 2000;95:815-9.
- Zhu J, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RAR α catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene* 2001;20:7257-65.
- Cassinat B, De Botton S, Ades L, Raffoux E, Escoffre-Barbe M, Baruchel A, et al. Assessment of PML-RAR α real-time quantitative PCR for definition of molecular relapse in APL patients (results of the APL Study Group). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005;106: [abstract 672].
- Liu YF, Zhu YM, Shen SH, Shen ZX, Li JM, Chen SJ, et al. Molecular response in acute promyelocytic leukemia: a direct comparison of regular and real-time RT-PCR. *Leukemia* 2006;20:1393-9.

DISCUSIÓN

1. Marcadores moleculares con valor pronóstico en LMA cariotipo normal

En los últimos años, muchos estudios han descrito gran cantidad de mutaciones y cambios en la expresión génica que afectan la evolución clínica de los pacientes con LMA-CN (revisado en (Mrozek *et al*, 2007)). Además del valor pronóstico de las mutaciones de *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA*, la sobreexpresión de *BAALC*, (Langer *et al*, 2008) *ERG*, (Marcucci *et al*, 2005a) *EVI1*, (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b) *MLL-PTD*, (Whitman *et al*, 2007) *MN1* (Heuser *et al*, 2006) y *WT1*, (Barragán *et al*, 2004) se han reportado como factores de mal pronóstico, mientras que los niveles altos de *PRAME* y *RHAMM* se han asociado en un estudio previo como de buen pronóstico en las LMA (Greiner *et al*, 2006).

Nuestros datos sugieren que los genes *ERG* y *PRAME* son excelentes indicadores de respuesta a la terapia de inducción (antraciclina+ARA-C) y que ambos genes, junto con el gen *EVI1*, son marcadores útiles para identificar pacientes con diferente supervivencia global y supervivencia libre de recaída en pacientes con LMA-CN. Aunque el gen *ERG* parece no tener una expresión específica en células tumorales, su valor pronóstico es indudable, ya que los pacientes con una alta expresión de este marcador presentan una alta tasa de refractariedad al tratamiento y una pobre SG y SLR. Estas observaciones coinciden con dos estudios de Marcucci y colaboradores en 84 y 76 pacientes LMA-CN menores de 60 años (Marcucci *et al*, 2005a; Marcucci *et al*, 2007). La hiperexpresión del gen *EVI1*, así como su transcrito de fusión *MDS-EVI1*, se han asociado como factor independiente de mal pronóstico (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b; Lugthart *et al*, 2008). Este hallazgo se ha descrito fundamentalmente en grupos de pacientes con características citogenéticas desfavorables, y aunque los estudios disponibles incluyen algunos pacientes con LMA cariotipo normal (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al*, 2003b; Lugthart *et al*, 2008), no existen trabajos que evalúen su impacto pronóstico en este grupo de pacientes. Así, nuestros resultados sugieren por primera vez que la sobreexpresión del gen *EVI1* está asociada a un peor pronóstico en las LMA con citogenética normal. Respecto al gen *PRAME*, su sobreexpresión se ha asociado con un mejor pronóstico tanto en LPA como LMA en general (Greiner *et al*, 2006). Sin embargo, algunos autores comentan que esta asociación sería secundaria por la mayor expresión de este marcador en LMA de buen pronóstico como las t(8;21) o las LPA (Greiner *et al*, 2006).

Nuestros datos demuestran que los altos niveles de *PRAME* se asocian a una mejor respuesta a la terapia convencional de inducción y que la expresión por encima del percentil 75 está relacionada a una mayor SG y SLR. Este trabajo constituye así el primer reporte que confirma al *PRAME* como un factor independiente de pronóstico en las LMA-CN.

Con base en los resultados descritos, se evaluó si la combinación de *ERG*, *EVI1* y *PRAME* mejoraba su valor pronóstico en las LMA-CN. Para ello, se diseñó un modelo de puntuación (*score*) que asignaba un valor de 1 por cada perfil de expresión de características adversas (alto *ERG*, alto *EVI1* y bajo *PRAME*), mientras que se daba un valor de 0 para los perfiles de expresión favorables (bajo *ERG*, bajo *EVI1* y alto *PRAME*). Este *score* permitió distinguir cuatro subgrupos (de 0 a 3) con SG y SLR significativamente diferentes ($p=0.001$ y $p=0.005$) e independiente de otros parámetros clínico-biológicos. Así, el *score ERG/EVI1/PRAME* alto fue el único factor independiente, además de las características adversas tradicionales en LMA (leucocitos $>50 \times 10^9/L$ y edad >65 años) (Lowenberg *et al*, 1999; Mrozek *et al*, 2007), asociado a una menor SG y SLR en el análisis multivariante.

Este *score* molecular permitió identificar un subgrupo de pacientes (*Score* 0), que representa un 10.7% (13/121) de LMA-CN con SLR a dos años del 92% y SG a dos años del 79%. Esto supone la identificación de pacientes con uno de los pronósticos más favorables descritos para LMA. Como referencia, el subgrupo de mejor pronóstico en LMA basado en los marcadores *FLT3* y *NPM1* (*FLT3* no mutado [nm]/*NPM1* mutado[mut]) alcanza SLR a dos años entre 60-70% y SG a dos años entre 55-65% (Schnittger *et al*, 2005; Dohner *et al*, 2005; Thiede *et al*, 2005). Por el contrario, los *score* 2 y 3 agrupan pacientes con pronóstico muy adverso, particularmente el *score* 3 con SG inferior al 30% a los 2 años, lo cual los hace candidatos a terapias más agresivas o tratamientos alternativos. Por otro lado, destacar que la buena estratificación del *score ERG/EVI1/PRAME* se mantuvo para aquellos pacientes catalogados como de pronóstico desfavorable con base en *FLT3* y *NPM1* (*FLT3*nm/*NPM1*nm, *FLT3*-ITD/*NPM1*mut y *FLT3*-ITD/*NPM1*nm) (Schnittger *et al*, 2005; Dohner *et al*, 2005; Thiede *et al*, 2005). Así, en conjunto, este grupo de pacientes (83/121) presentaron una SG a dos años de 100%, 64%, 39% y 27% para los *score* 0, 1, 2 y 3 respectivamente ($p=0.001$). Igualmente, la SLR a 2 años fue de 86%, 62%, 43% y 43% para los mismos subgrupos ($p=0.013$). Además, cabe destacar que un porcentaje significativo de enfermos (43%) se

incluyeron dentro de los subgrupos favorables de score 0 y 1, lo cual podría ser tomado en cuenta para redefinir su categoría de riesgo.

En resumen, estos resultados avalan la necesidad de incorporar la determinación de estos genes (*ERG/EVI1/PRAME*) en la estratificación pronóstica de las LMA-CN; sin embargo, esta información debe ser validada en otras series antes de ser incorporados a la clínica práctica rutinaria.

Otra área de interés para la búsqueda de nuevos marcadores pronósticos en LMA-CN son las rutas de señalización afectadas durante el desarrollo neoplásico. Un ejemplo clásico es la vía de fosfoinositol 3-fosfato kinasa/AKT (PI3K/AKT), la cual se ha descrito está activada de forma aberrante en la LMA en general (Xu *et al*, 2003;Grandage *et al*, 2005;Brandts *et al*, 2005). La relación entre la activación de esta vía y el curso clínico de la LMA no está clara, pues mientras dos estudios lo asocian a mal pronóstico (Min *et al*, 2004;Kornblau *et al*, 2006), un reporte reciente lo asocia a mayor SG y SLR (Tamburini *et al*, 2007). Además, hasta la fecha no existen estudios a nivel de expresión de los distintos genes involucrados en esta vía. Los resultados de nuestro estudio demuestran que en más del 50% de los pacientes hay sobreexpresión de los genes *AKT*, *FOXO3a* y *p27*, lo cual refleja la mayor actividad proteica del eje *AKT/FOXO3a/p27* en comparación con células normales (Xu *et al*, 2003;Grandage *et al*, 2005).

Al analizar el valor pronóstico de los niveles de *AKT/FOXO3a/p27*, usando el valor mediano como punto de corte, se observó una SG y una SLR significativamente inferior en aquellos pacientes con alta expresión de *FOXO3a* ($p=0.004$ y $p=0.048$, respectivamente). Además, el análisis multivariante confirmó el valor pronóstico adverso independiente de la hiperexpresión de *FOXO3a* tanto para la SG como para la SLR ($p=0.007$ y $p=0.038$, respectivamente). Por el contrario, ni la expresión de *AKT* ni *p27* se asociaron a diferente SG y/o SLR. En la actualidad con los datos biológicos y experimentales disponibles, no es posible explicar de forma definitiva estos hallazgos. Estudios previos han mostrado que las células leucémicas presentan activación constitutiva de la vía AKT y que la proteína AKT produce fosforilización de la proteína FOXO3a desplazándola del núcleo al citoplasma celular produciendo por tanto su inactivación. Así una posible explicación para nuestros hallazgos sería que la pérdida de actividad de FOXO3a induciría la sobreexpresión de su ARN, como un mecanismo

de compensación celular para contrarrestar el mal funcionamiento de la proteína FOXO3a fosforilada. De esta forma, la sobreexpresión de FOXO3a podría ser el resultado de una mayor actividad proliferativa de las células tumorales vía AKT, lo cual podría justificar en parte el mal pronóstico de los pacientes LMA-CN con alta expresión de FOXO3a. Sin embargo, no es posible descartar que alteraciones de otras vías de activación celular provoquen hipereexpresión de FOXO3a (Ghaffari *et al*, 2003;Ticchioni *et al*, 2007). En resumen, nuestros datos sugieren que el análisis de la expresión de FOXO3a tiene valor en la identificación de pacientes con diferente pronóstico pero este resultado debe ser confirmado en otras series de enfermos antes de su aceptación como marcador pronóstico independiente.

2. Marcadores moleculares con valor pronóstico en LPA/ LMA-M3

El buen pronóstico de las LPA y la relativa uniformidad de la enfermedad hacen que el estudio de factores pronósticos moleculares esté menos analizado en la LPA en comparación con las LMA-CN. Sin embargo, persiste un porcentaje de casos que recaen y aunque existen factores clínicos que permiten estratificar los pacientes (Sanz *et al*, 2005b;Ades *et al*, 2008;Sanz *et al*, 2008), se pueden documentar recaídas incluso en pacientes de buen pronóstico. Estudios preliminares indican que el gen *PRAME* puede tener importancia pronóstica en LMA y su expresión parece correlacionarse con la traslocación t(15;17) , lo que sugiere que su estudio tenga interés en los pacientes con LPA (Bullinger *et al*, 2004). La sobreexpresión del gen *PRAME* se ha asociado con estadios avanzados y peor pronóstico en diversos tumores sólidos como carcinoma de células pequeñas de pulmón, carcinoma renal y de mama, linfoma de Hodgkin, meduloblastoma y melanomas en general (Ikeda *et al*, 1997;Epping & Bernards, 2006;Oberthuer *et al*, 2004;Neumann *et al*, 1998). Por el contrario, la alta expresión de esta marcador en LMA y LLA se ha relacionado a un mejor pronóstico (Greiner *et al*, 2006;Steinbach *et al*, 2002a;Steinbach *et al*, 2002b). Respecto a LPA, solamente dos estudios previos han sugerido una relación entre la presencia de t(15;17) y sobreexpresión de *PRAME*, sin embargo; dichos trabajos han evaluado pocos casos de LPA ya sea por RT-PCR semicualitativa (n=11) (van Baren *et al*, 1998) o por arrays de expresión (n=12) (Bullinger *et al*, 2004). Cuando este último grupo fue re-analizado con

SYBR Green RQ-PCR, se observó una tendencia entre alta expresión de *PRAME* y mayor SG, aunque los mismos autores argumentaban que dicha observación podría ser secundaria a la asociación entre altos niveles de RNA codificante de *PRAME* y citogenética favorable (Greiner *et al*, 2006). Nuestros resultados en un número significativo de pacientes demuestran por primera vez que la expresión de *PRAME* es un factor pronóstico independiente en LPA, asociado a una mejor SLR. Además, el gen *PRAME* define dos subgrupos pronósticos dentro de las LPA consideradas como de bajo riesgo (leucocitos $10 \times 10^9/L$) (Burnett *et al*, 1999; Tallman *et al*, 2002a; Lo-Coco *et al*, 1999; Ades *et al*, 2008; Sanz *et al*, 1999), presentando los pacientes con alta expresión de *PRAME* una SLR significativamente mayor.

No se sabe con exactitud cuál es el efecto biológico de la sobreexpresión de *PRAME* en la célula. Se ha descrito que *PRAME* actúa como un represor de la activación por ácido retinoico (AR), inhibiendo la diferenciación y la apoptosis dependiente de caspasas en células embrionarias murinas (Epping *et al*, 2005). Al silenciar este gen en la línea celular de melanoma humano A375 por ARN de interferencia, la célula se vuelve sensible a los efectos antiproliferativos del AR (Epping *et al*, 2005). No obstante, estos efectos parecen ser específicos de tumor, ya que la expresión de *PRAME* no afecta en forma directa las señales inducidas por AR en células primarias de LMA (Steinbach *et al*, 2007). Incluso, Tajeddine y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de *PRAME* induce muerte celular independiente de caspasas en las líneas celulares CHO-K1 y HeLa (Tajeddine *et al*, 2005). Además, la represión de *PRAME* por siRNA aumentó la capacidad tumoral de las células leucémicas K562 en ratones desnudos BALB/c (Tajeddine *et al*, 2005). Estos últimos hallazgos concuerdan con el aparente efecto beneficioso que tiene la sobreexpresión de *PRAME* en el pronóstico de las LPA, según los datos obtenidos con nuestros pacientes.

3. Enfermedad residual mínima (ERM) en LPA/ LMA-M3

Tradicionalmente, la ERM en LPA es evaluada con los niveles del transcrito de fusión *PML-RAR α* (Gabert *et al*, 2003; Sanz *et al*, 2005b; Schnittger *et al*, 2003). El valor de dicha cuantificación varía en función de la etapa de tratamiento en la cual se encuentre el paciente. Así, en la fase de post-inducción no se han encontrado diferencias en el número de copias normalizado (NCN) de *PML-RAR α* entre los pacientes en RC continua o pacientes que al final recaerán (Burnett *et al*, 1999; Gallagher *et al*, 2003; Lee *et al*, 2006; Sanz *et al*, 1999; Tobal *et al*, 2001). Tampoco resulta informativa la reducción de la masa tumoral calculada por la diferencia en NCN entre la post-inducción y el diagnóstico, a diferencia de lo que ocurre con otro tipo de leucemias como la LLA Philadelphia positivo o la LMA con t(8;21) donde una reducción mayor de dos logs del número de copias postinducción identifica los pacientes con mejor supervivencia global y libre de enfermedad (Tobal & Liu Yin, 2006). La falta de utilidad clínica de este parámetro en postinducción, se puede atribuir en parte al tipo de terapia, ya que el ATRA, a diferencia de otros tratamientos citotóxicos, promueve la maduración de células LPA en lugar de su eliminación (Zhu *et al*, 2001; Sanz, 2006).

Respecto al análisis post-consolidación, existe consenso sobre el alto riesgo de recaída en los pacientes con una prueba de RQ-PCR positiva, particularmente al finalizar el tercer ciclo de consolidación (Grimwade & Lo-Coco, 2002; Lee *et al*, 2006; Lo-Coco *et al*, 1999; Sanz *et al*, 2005b). Sin embargo, el bajo número de casos positivos al final de la consolidación limita su utilidad práctica, tal y como lo señala nuestro estudio y otras series de pacientes publicadas (Breccia *et al*, 2004; Sanz *et al*, 2004). Cabe destacar un trabajo de Lee y colaboradores donde se cuantifica el *PML-RAR α* al finalizar cada ciclo de consolidación y de esta forma demuestran que un nivel de ERM superior a 10^{-3} después del primer ciclo de consolidación se asocia a un peor pronóstico (Lee *et al*, 2006). Este dato es equivalente al valor de 10 NCN en nuestro estudio.

Durante la terapia de mantenimiento o después de finalizada la misma, una prueba de RQ-PCR positiva, se asoció a una mayor probabilidad de recaída y menor supervivencia. En estas fases, se pudo establecer tres grupos de riesgo según el valor de NCN de *PML-RAR α* con base en los protocolos de Europe Against Cancer (Gabert *et al*, 2003). Aquellos pacientes con NCN<1 durante mantenimiento o fuera de tratamiento presentaron un pronóstico muy favorable. Por el contrario, los pacientes con NCN>10 se asociaron a un pronóstico adverso, ya que todos ellos recayeron. Estos resultados coinciden con los datos comunicados en forma preliminar por Cassinat y colaboradores (American Society of Hematology 2006, Abstract 2206), los cuales demuestran que los pacientes LPA con <10 copias no recayeron, mientras que el 100% de los casos con más de 100 copias sí recayeron. Las discrepancias en el punto de corte se pueden deber a que la normalización del número de copias de *PML-RAR α* se hizo con dos genes control diferentes (*PBGD* vs *ABL*).

Además de los subgrupos antes descritos, en nuestro estudio observamos un tercer subgrupo de riesgo intermedio que incluía pacientes con al menos una prueba molecular con NCN entre 1 y 10 en la fase de mantenimiento o una vez concluido el tratamiento. Dentro de este grupo hubo un alto riesgo de recaída si la prueba positiva se confirmaba con una segunda muestra o se detectaba una prueba positiva por RT-PCR cualitativa. Si la primera prueba positiva no se confirmaba, se podía considerar un falso positivo, ya que los 11 casos bajo esta condición se mantuvieron en remisión completa. Asimismo, cabe destacar que con la RQ-PCR no se observaron falsos negativos durante mantenimiento o posterior a esta fase. Por el contrario, sí se observaron casos de falsos positivos (n=3) y falsos negativos (n=2) con la RT-PCR cualitativa. Aunque en términos generales, tanto en nuestro estudio como en un reporte reciente con 31 pacientes LPA (Liu *et al*, 2006), se observó una buena correlación entre RQ-PCR y RT-PCR, es importante recalcar que la mayor especificidad y la fácil estandarización de la RQ-PCR sugieren que esta técnica sería la de elección en el estudio de ERM.

Cabe destacar que todos aquellos pacientes con resultados positivos por ambas técnicas, presentaron una recaída hematológica en el transcurso de los siguientes 4

meses. Esto reafirma la necesidad de un seguimiento frecuente (al menos cada 4 meses) en los pacientes LPA. Debido a que el presente estudio analizó tanto pacientes en fase de mantenimiento como fuera de tratamiento, y en ambos casos se encontró el mismo patrón de rápidas recaídas posterior a pruebas moleculares positivas, se puede concluir que la recomendación consenso sobre evaluar ERM cada 3 meses durante mantenimiento (Diverio *et al*, 1998;Gallagher *et al*, 2003;Jurcic *et al*, 2001;Sanz *et al*, 2005b) se debería extender a los dos años posteriores al tratamiento, aunque para este período la evaluación podría hacerse menos frecuentemente (cada 4 o 5 meses). Esta recomendación excluye a aquellos pacientes con conteos de leucocitos mayores a $50 \times 10^9/L$ al diagnóstico, cuyo seguimiento debe ser más estricto, por ejemplo cada 2 o 3 meses (Sanz *et al*, 2005b). Finalmente, es importante acotar que las observaciones aquí expresadas deben ser consideradas en el marco de esquemas de tratamiento similares a los protocolos LPA-96 y LPA-99 del grupo PETHEMA.

CONCLUSIONES

1. Con relación a los marcadores moleculares con valor pronóstico en LMA cariotipo normal

1.1. La sobreexpresión del gen *PRAME* define un grupo de mejor pronóstico dentro las LMA de cariotipo normal, mientras que la sobreexpresión de los genes *ERG* y *EVI1* confieren un pronóstico adverso en el mismo grupo de pacientes.

1.2. El diseño de un sistema de puntuación basado en la expresión de los genes *ERG*, *EVI1* y *PRAME* permite establecer una estratificación de riesgo en los pacientes con LMA de cariotipo normal. Estos datos avalan la determinación de estos tres marcadores en la valoración pronóstica de los pacientes con LMA cariotipo normal.

1.3. La sobreexpresión del gen *FOXO3a* identifica un grupo de pacientes con LMA de cariotipo normal de pronóstico adverso, lo cual eventualmente podría servir para mejorar la estratificación de riesgo de estos pacientes basada en marcadores moleculares

2. Con relación a los marcadores moleculares con valor pronóstico en Leucemia Promielocítica aguda (LPA)

2.1. La sobreexpresión del gen *PRAME* al diagnóstico es un factor pronóstico favorable e independiente en LPA, identificando subgrupos pronósticos incluso dentro de los casos de LPA de bajo riesgo.

3. Con relación al estudio de enfermedad residual mínima (ERM) en LPA/LMA-M3

3.1. La cuantificación del número de copias normalizado (NCN) del gen *PML-RAR α* en LPA permite establecer una estratificación de riesgo de recaída, particularmente durante la terapia de mantenimiento y fuera de tratamiento, donde una prueba de RQ-PCR mayor a 10 NCN o bien cualquier prueba positiva confirmada con una segunda muestra, es altamente sugestivo de una recaída hematológica en los siguientes 4 meses.

BIBLIOGRAFÍA

- Ades,L., Sanz,M.A., Chevret,S., Montesinos,P., Chevallier,P., Raffoux,E., Vellenga,E., Guerci,A., Pigneux,A., Huguet,F., Rayon,C., Stoppa,A.M., de la,S.J., Cahn,J.Y., Meyer-Monard,S., Pabst,T., Thomas,X., De,B.S., Parody,R., Bergua,J., Lamy,T., Vekhoff,A., Negri,S., Ifrah,N., Dombret,H., Ferrant,A., Bron,D., Degos,L., & Fenaux,P. (2008) Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): a comparison of French-Belgian-Swiss and PETHEMA results. *Blood*, 111, 1078-1084.
- Afford,S.C., Kakoullis,T., Oates,J., Crocker,J., & Strain,A.J. (1995) Effects of hepatocyte growth factor on differentiation and cMET receptor expression in the promyelocytic HL60 cell line. *Clin.Mol.Pathol.*, 48, M23-M27.
- Albano,F., Mestice,A., Pannunzio,A., Lanza,F., Martino,B., Pastore,D., Ferrara,F., Carluccio,P., Nobile,F., Castoldi,G., Liso,V., & Specchia,G. (2006) The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. *Haematologica*, 91, 311-316.
- Archimbaud,E., Charrin,C., Magaud,J.P., Campos,L., Thomas,X., Fiere,D., & Rimokh,R. (1998) Clinical and biological characteristics of adult de novo and secondary acute myeloid leukemia with balanced 11q23 chromosomal anomaly or MLL gene rearrangement compared to cases with unbalanced 11q23 anomaly: confirmation of the existence of different entities with 11q23 breakpoint. *Leukemia*, 12, 25-33.
- Aribi,A., Kantarjian,H.M., Estey,E.H., Koller,C.A., Thomas,D.A., Kornblau,S.M., Faderl,S.H., Laddie,N.M., Garcia-Manero,G., & Cortes,J.E. (2007) Combination therapy with arsenic trioxide, all-trans retinoic acid, and gemtuzumab ozogamicin in recurrent acute promyelocytic leukemia. *Cancer*, 109, 1355-1359.
- Asou,N., Adachi,K., Tamura,J., Kanamaru,A., Kageyama,S., Hiraoka,A., Omoto,E., Akiyama,H., Tsubaki,K., Saito,K., Kuriyama,K., Oh,H., Kitano,K., Miyawaki,S., Takeyama,K., Yamada,O., Nishikawa,K., Takahashi,M., Matsuda,S., Ohtake,S., Suzushima,H., Emi,N., & Ohno,R. (1998) Analysis of prognostic factors in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. Japan Adult Leukemia Study Group. *J.Clin.Oncol.*, 16, 78-85.
- Avvisati,G., Lo,C.F., Diverio,D., Falda,M., Ferrara,F., Lazzarino,M., Russo,D., Petti,M.C., & Mandelli,F. (1996) AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. *Blood*, 88, 1390-1398.
- Avvisati,G., Mele,A., Stazi,M.A., Vegna,M.L., Pasquini,P., & Mandelli,F. (1991) Epidemiology of acute promyelocytic leukemia in Italy. APL Collaborating Group. *Ann.Oncol.*, 2, 405-408.
- Bacher,U., Haferlach,C., Kern,W., Haferlach,T., & Schnittger,S. (2008) Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood*, 111, 2527-2537.
- Bacher,U., Haferlach,T., Kern,W., Haferlach,C., & Schnittger,S. (2007) A comparative

- study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 92, 744-752.
- Bacher,U., Haferlach,T., Schoch,C., Kern,W., & Schnittger,S. (2006) Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*, 107, 3847-3853.
- Baer,M.R., Stewart,C.C., Lawrence,D., Arthur,D.C., Byrd,J.C., Davey,F.R., Schiffer,C.A., & Bloomfield,C.D. (1997) Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Blood*, 90, 1643-1648.
- Baldus,C.D., Liyanarachchi,S., Mrozek,K., Auer,H., Tanner,S.M., Guimond,M., Ruppert,A.S., Mohamed,N., Davuluri,R.V., Caligiuri,M.A., Bloomfield,C.D., & de la,C.A. (2004) Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101, 3915-3920.
- Baldus,C.D., Martus,P., Burmeister,T., Schwartz,S., Gokbuget,N., Bloomfield,C.D., Hoelzer,D., Thiel,E., & Hofmann,W.K. (2007a) Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. *J.Clin.Oncol.*, 25, 3739-3745.
- Baldus,C.D., Mrozek,K., Marcucci,G., & Bloomfield,C.D. (2007b) Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br.J.Haematol.*, 137, 387-400.
- Baldus,C.D., Tanner,S.M., Ruppert,A.S., Whitman,S.P., Archer,K.J., Marcucci,G., Caligiuri,M.A., Carroll,A.J., Vardiman,J.W., Powell,B.L., Allen,S.L., Moore,J.O., Larson,R.A., Kolitz,J.E., de la,C.A., & Bloomfield,C.D. (2003) BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*, 102, 1613-1618.
- Baldus,C.D., Thiede,C., Soucek,S., Bloomfield,C.D., Thiel,E., & Ehninger,G. (2006) BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J.Clin.Oncol.*, 24, 790-797.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Erpelinck,C., Meijer,J., van,O.S., van Putten,W.L., Valk,P.J., Berna,B.H., Tenen,D.G., Lowenberg,B., & Delwel,R. (2003a) Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. *Hematol.J.*, 4, 31-40.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Erpelinck,C., van Putten,W.L., Valk,P.J., van der Poel-van de Luytgaarde, Hack,R., Slater,R., Smit,E.M., Beverloo,H.B., Verhoef,G., Verdonck,L.F., Ossenkoppele,G.J., Sonneveld,P., de Greef,G.E., Lowenberg,B., & Delwel,R. (2003b) High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood*, 101, 837-845.
- Barragán,E., Cervera,J., Bolufer,P., Ballester,S., Martin,G., Fernandez,P., Collado,R., Sayas,M.J., & Sanz,M.A. (2004) Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia.

- Haematologica*, 89, 926-933.
- Beghini,A., Ripamonti,C.B., Cairoli,R., Cazzaniga,G., Colapietro,P., Elice,F., Nadali,G., Grillo,G., Haas,O.A., Biondi,A., Morra,E., & Larizza,L. (2004) KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica*, 89, 920-925.
- Beillard,E., Pallisgaard,N., van der Velden,V., Bi,W., Dee,R., van der Schoot,E., Delabesse,E., Macintyre,E., Gottardi,E., Saglio,G., Watzinger,F., Lion,T., van Dongen,J.J., Hokland,P., & Gabert,J. (2003) 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*, 17, 2474-2486.
- Bennett,J.M., Catovsky,D., Daniel,M.T., Flandrin,G., Galton,D.A., Gralnick,H.R., & Sultan,C. (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.*, 103, 620-625.
- Beran,M., Luthra,R., Kantarjian,H., & Estey,E. (2004) FLT3 mutation and response to intensive chemotherapy in young adult and elderly patients with normal karyotype. *Leuk.Res.*, 28, 547-550.
- Bergmann,L., Miething,C., Maurer,U., Brieger,J., Karakas,T., Weidmann,E., & Hoelzer,D. (1997) High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*, 90, 1217-1225.
- Bienz,M., Ludwig,M., Leibundgut,E.O., Mueller,B.U., Ratschiller,D., Solenthaler,M., Fey,M.F., & Pabst,T. (2005) Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin.Cancer Res.*, 11, 1416-1424.
- Bloomfield,C.D., Lawrence,D., Byrd,J.C., Carroll,A., Pettenati,M.J., Tantravahi,R., Patil,S.R., Davey,F.R., Berg,D.T., Schiffer,C.A., Arthur,D.C., & Mayer,R.J. (1998) Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res.*, 58, 4173-4179.
- Boissel,N., Leroy,H., Brethon,B., Philippe,N., de Botton,S., Auvrignon,A., Raffoux,E., Leblanc,T., Thomas,X., Hermine,O., Quesnel,B., Baruchel,A., Leverger,G., Dombret,H., & Preudhomme,C. (2006) Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia*, 20, 965-970.
- Boissel,N., Renneville,A., Biggio,V., Philippe,N., Thomas,X., Cayuela,J.M., Terre,C., Tigaud,I., Castaigne,S., Raffoux,E., de Botton,S., Fenaux,P., Dombret,H., & Preudhomme,C. (2005) Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*, 106, 3618-3620.
- Bolli,N., Nicoletti,I., De Marco,M.F., Bigerna,B., Pucciarini,A., Mannucci,R., Martelli,M.P., Liso,A., Mecucci,C., Fabbiano,F., Martelli,M.F., Henderson,B.R., & Falini,B. (2007) Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different

- strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants. *Cancer Res.*, 67, 6230-6237.
- Bolufer,P., Lo,C.F., Grimwade,D., Barragan,E., Diverio,D., Cassinat,B., Chomienne,C., Gonzalez,M., Colomer,D., Gomez,M.T., Marugan,I., Roman,J., Delgado,M.D., Garcia-Marco,J.A., Bornstein,R., Vizmanos,J.L., Martinez,B., Jansen,J., Villegas,A., de Blas,J.M., Cabello,P., & Sanz,M.A. (2001) Variability in the levels of PML-RAR alpha fusion transcripts detected by the laboratories participating in an external quality control program using several reverse transcription polymerase chain reaction protocols. *Haematologica*, 86, 570-576.
- Borer,R.A., Lehner,C.F., Eppenberger,H.M., & Nigg,E.A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56, 379-390.
- Boublikova,L., Kalinova,M., Ryan,J., Quinn,F., O'Marcaigh,A., Smith,O., Browne,P., Stary,J., McCann,S.R., Trka,J., & Lawler,M. (2006) Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia*, 20, 254-263.
- Brandts,C.H., Sargin,B., Rode,M., Biermann,C., Lindtner,B., Schwable,J., Buerger,H., Muller-Tidow,C., Choudhary,C., McMahon,M., Berdel,W.E., & Serve,H. (2005) Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res.*, 65, 9643-9650.
- Breccia,M., Cimino,G., Diverio,D., Gentilini,F., Mandelli,F., & Lo,C.F. (2007) Sustained molecular remission after low dose gemtuzumab-ozogamicin in elderly patients with advanced acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*, 92, 1273-1274.
- Breccia,M., Diverio,D., Noguera,N.I., Visani,G., Santoro,A., Locatelli,F., Damiani,D., Marmont,F., Vignetti,M., Petti,M.C., & Lo,C.F. (2004) Clinico-biological features and outcome of acute promyelocytic leukemia patients with persistent polymerase chain reaction-detectable disease after the AIDA front-line induction and consolidation therapy. *Haematologica*, 89, 29-33.
- Breems,D.A. & Lowenberg,B. (2007) Acute myeloid leukemia and the position of autologous stem cell transplantation. *Semin.Hematol.*, 44, 259-266.
- Broeker,P.L., Super,H.G., Thirman,M.J., Pomykala,H., Yonebayashi,Y., Tanabe,S., Zeleznik-Le,N., & Rowley,J.D. (1996) Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood*, 87, 1912-1922.
- Brown,P., Levis,M., McIntyre,E., Griesemer,M., & Small,D. (2006) Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia*, 20, 1368-1376.
- Brunning,R.D. (2003) Classification of acute leukemias. *Semin.Diagn.Pathol.*, 20, 142-153.

- Buchner,T., Hiddemann,W., Wormann,B., Loffler,H., Gassmann,W., Haferlach,T., Fonatsch,C., Haase,D., Schoch,C., Hossfeld,D., Lengfelder,E., Aul,C., Heyll,A., Maschmeyer,G., Ludwig,W.D., Sauerland,M.C., & Heinecke,A. (1999) Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood*, 93, 4116-4124.
- Bug,G., Ritter,M., Wassmann,B., Schoch,C., Heinzl,T., Schwarz,K., Romanski,A., Kramer,O.H., Kampfmann,M., Hoelzer,D., Neubauer,A., Ruthardt,M., & Ottmann,O.G. (2005) Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer*, 104, 2717-2725.
- Bullinger,L., Dohner,K., Bair,E., Frohling,S., Schlenk,R.F., Tibshirani,R., Dohner,H., & Pollack,J.R. (2004) Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N.Engl.J Med.*, 350, 1605-1616.
- Burger,J.A. & Kipps,T.J. (2006) CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107, 1761-1767.
- Burnett,A.K., Grimwade,D., Solomon,E., Wheatley,K., & Goldstone,A.H. (1999) Presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission predict prognosis in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid: result of the Randomized MRC Trial. *Blood*, 93, 4131-4143.
- Byrd,J.C., Mrozek,K., Dodge,R.K., Carroll,A.J., Edwards,C.G., Arthur,D.C., Pettenati,M.J., Patil,S.R., Rao,K.W., Watson,M.S., Koduru,P.R., Moore,J.O., Stone,R.M., Mayer,R.J., Feldman,E.J., Davey,F.R., Schiffer,C.A., Larson,R.A., & Bloomfield,C.D. (2002) 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*, 100, 4325-4336.
- Cairolì,R., Beghini,A., Morello,E., Grillo,G., Montillo,M., Larizza,L., & Morra,E. (2005) Imatinib mesylate in the treatment of Core Binding Factor leukemias with KIT mutations. A report of three cases. *Leuk.Res.*, 29, 397-400.
- Caligiuri,M.A., Schichman,S.A., Strout,M.P., Mrozek,K., Baer,M.R., Frankel,S.R., Barcos,M., Herzig,G.P., Croce,C.M., & Bloomfield,C.D. (1994) Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res.*, 54, 370-373.
- Caligiuri,M.A., Strout,M.P., Lawrence,D., Arthur,D.C., Baer,M.R., Yu,F., Knuutila,S., Mrozek,K., Oberkircher,A.R., Marcucci,G., de la,C.A., Elonen,E., Block,A.W., Rao,P.N., Herzig,G.P., Powell,B.L., Ruutu,T., Schiffer,C.A., & Bloomfield,C.D. (1998) Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res.*, 58, 55-59.
- Callens,C., Chevret,S., Cayuela,J.M., Cassinat,B., Raffoux,E., de Botton,S., Thomas,X., Guerci,A., Fegueux,N., Pigneux,A., Stoppa,A.M., Lamy,T., Rigal-Huguet,F., Vekhoff,A., Meyer-Monard,S., Ferrand,A., Sanz,M., Chomienne,C., Fenaux,P., & Dombret,H. (2005) Prognostic implication of FLT3 and Ras gene mutations in

- patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. *Leukemia*, 19, 1153-1160.
- Candoni,A., Damiani,D., Michelutti,A., Masolini,P., Michieli,M., Michelutti,T., Geromin,A., & Fanin,R. (2003) Clinical characteristics, prognostic factors and multidrug-resistance related protein expression in 36 adult patients with acute promyelocytic leukemia. *Eur.J.Haematol.*, 71, 1-8.
- Cassileth,P.A., Lee,S.J., Litzow,M.R., Miller,K.B., Stadtmauer,E.A., Tallman,M.S., Lazarus,H.M., Bennett,J.M., Paietta,E., Dewald,G.W., & Rowe,J.M. (2005) Intensified induction chemotherapy in adult acute myeloid leukemia followed by high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation: an Eastern Cooperative Oncology Group trial (E4995). *Leuk.Lymphoma*, 46, 55-61.
- Cassinat,B., Zassadowski,F., Balitrand,N., Barbey,C., Rain,J.D., Fenaux,P., Degos,L., Vidaud,M., & Chomienne,C. (2000) Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia*, 14, 324-328.
- Chillon,C.M., Garcia-Sanz,R., Balanzategui,A., Ramos,F., Fernandez-Calvo,J., Rodriguez,M.J., Rodriguez-Salazar,M.I., Corrales,A., Calmuntia,M.J., Orfao,A., Gonzalez,M., & San Miguel,J.F. (2001) Molecular characterization of acute myeloblastic leukemia according to the new WHO classification: a different distribution in Central-West Spain. *Haematologica*, 86, 162-166.
- Chillon,M.C., Fernandez,C., Garcia-Sanz,R., Balanzategui,A., Ramos,F., Fernandez-Calvo,J., Gonzalez,M., & Miguel,J.F. (2004) FLT3-activating mutations are associated with poor prognostic features in AML at diagnosis but they are not an independent prognostic factor. *Hematol.J.*, 5, 239-246.
- Chillon,M.C., Gonzalez,M., Garcia-Sanz,R., Balanzategui,A., Gonzalez,D., Lopez-Perez,R., Mateos,M.V., Alaejos,I., Rayon,C., Arbeteta,J., Hernandez,J.M., Orfao,A., & San,M.J. (2000) Two new 3' PML breakpoints in t(15;17)(q22;q21)-positive acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes.Cancer*, 27, 35-43.
- Chomczynski,P. & Sacchi,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, 162, 156-159.
- Cilloni,D., Gottardi,E., & Saglio,G. (2006) WT1 overexpression in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Methods Mol.Med.*, 125, 199-211.
- Colombo,E., Marine,J.C., Danovi,D., Falini,B., & Pelicci,P.G. (2002) Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat.Cell Biol.*, 4, 529-533.
- Cordell,J.L., Pulford,K.A., Bigerna,B., Roncador,G., Banham,A., Colombo,E., Pelicci,P.G., Mason,D.Y., & Falini,B. (1999) Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells. *Blood*, 93, 632-642.
- Cornelissen,J.J. & Lowenberg,B. (2005) Role of allogeneic stem cell transplantation in current treatment of acute myeloid leukemia.

- Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.*, 151-155.
- Cortes,J., Faderl,S., Estey,E., Kurzrock,R., Thomas,D., Beran,M., Garcia-Manero,G., Ferrajoli,A., Giles,F., Koller,C., O'Brien,S., Wright,J., Bai,S.A., & Kantarjian,H. (2005) Phase I study of BMS-214662, a farnesyl transferase inhibitor in patients with acute leukemias and high-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin.Oncol.*, 23, 2805-2812.
- Cox D.R. (1972) Regression models and life tables. *J R Stat Soc B*, 34, 187-220.
- de The,H., Chomienne,C., Lanotte,M., Degos,L., & Dejean,A. (1990) The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*, 347, 558-561.
- Delaunay,J., Vey,N., Leblanc,T., Fenaux,P., Rigal-Huguet,F., Witz,F., Lamy,T., Auvrignon,A., Blaise,D., Pigneux,A., Mugneret,F., Bastard,C., Dastugue,N., Van den,A.J., Fiere,D., Reiffers,J., Castaigne,S., Leverger,G., Harousseau,J.L., & Dombret,H. (2003) Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood*, 102, 462-469.
- Diverio,D., Rossi,V., Avvisati,G., De,S.S., Pistilli,A., Pane,F., Saglio,G., Martinelli,G., Petti,M.C., Santoro,A., Pelicci,P.G., Mandelli,F., Biondi,A., & Lo,C.F. (1998) Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial. *Blood*, 92, 784-789.
- Dohner,K., Schlenk,R.F., Habdank,M., Scholl,C., Rucker,F.G., Corbacioglu,A., Bullinger,L., Frohling,S., & Dohner,H. (2005) Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, 106, 3740-3746.
- Dohner,K., Tobis,K., Ulrich,R., Frohling,S., Benner,A., Schlenk,R.F., & Dohner,H. (2002) Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J.Clin.Oncol.*, 20, 3254-3261.
- Douer,D., Preston-Martin,S., Chang,E., Nichols,P.W., Watkins,K.J., & Levine,A.M. (1996) High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. *Blood*, 87, 308-313.
- Downing,J.R. (1999) The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br.J.Haematol.*, 106, 296-308.
- Epping,M.T. & Bernards,R. (2006) A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res.*, 66, 10639-10642.
- Epping,M.T., Wang,L., Edel,M.J., Carlee,L., Hernandez,M., & Bernards,R. (2005) The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*, 122, 835-847.

- Estey,E.H., Thall,P.F., Cortes,J.E., Giles,F.J., O'Brien,S., Pierce,S.A., Wang,X., Kantarjian,H.M., & Beran,M. (2001) Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood*, 98, 3575-3583.
- Falini,B., Bigerna,B., Pucciarini,A., Tiacci,E., Mecucci,C., Morris,S.W., Bolli,N., Rosati,R., Hanissian,S., Ma,Z., Sun,Y., Colombo,E., Arber,D.A., Pacini,R., La Starza,R., Verducci,G.B., Liso,A., Martelli,M.P., Diverio,D., Pelicci,P.G., Lo,C.F., & Martelli,M.F. (2006a) Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukaemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia*, 20, 368-371.
- Falini,B., Bolli,N., Shan,J., Martelli,M.P., Liso,A., Pucciarini,A., Bigerna,B., Pasqualucci,L., Mannucci,R., Rosati,R., Gorello,P., Diverio,D., Roti,G., Tiacci,E., Cazzaniga,G., Biondi,A., Schnittger,S., Haferlach,T., Hiddemann,W., Martelli,M.F., Gu,W., Mecucci,C., & Nicoletti,I. (2006b) Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*, 107, 4514-4523.
- Falini,B., Flenghi,L., Fagioli,M., Lo,C.F., Cordone,I., Diverio,D., Pasqualucci,L., Biondi,A., Riganelli,D., Orleth,A., Liso,A., Martelli,M.F., Pelicci,P.G., & Pileri,S. (1997) Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukemia (M3) with the monoclonal antibody PG-M3 (anti-PML). *Blood*, 90, 4046-4053.
- Falini,B., Mecucci,C., Tiacci,E., Alcalay,M., Rosati,R., Pasqualucci,L., La Starza,R., Diverio,D., Colombo,E., Santucci,A., Bigerna,B., Pacini,R., Pucciarini,A., Liso,A., Vignetti,M., Fazi,P., Meani,N., Pettrossi,V., Saglio,G., Mandelli,F., Lo-Coco,F., Pelicci,P.G., & Martelli,M.F. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N.Engl.J.Med.*, 352, 254-266.
- Falini,B., Nicoletti,I., Martelli,M.F., & Mecucci,C. (2007) Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*, 109, 874-885.
- Fears,S., Mathieu,C., Zeleznik-Le,N., Huang,S., Rowley,J.D., & Nucifora,G. (1996) Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 1642-1647.
- Fenaux,P., Chastang,C., Chevret,S., Sanz,M., Dombret,H., Archimbaud,E., Fey,M., Rayon,C., Huguet,F., Sotto,J.J., Gardin,C., Makhoul,P.C., Travade,P., Solary,E., Fegueux,N., Bordessoule,D., Miguel,J.S., Link,H., Desablens,B., Stamatoullas,A., Deconinck,E., Maloisel,F., Castaigne,S., Preudhomme,C., & Degos,L. (1999) A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood*, 94, 1192-1200.
- Ferrara,F., Morabito,F., Martino,B., Specchia,G., Liso,V., Nobile,F., Boccuni,P., Di,N.R., Pane,F., Annunziata,M., Schiavone,E.M., De,S.M., Guglielmi,C., Del,V.L., & Lo,C.F. (2000) CD56 expression is an indicator of poor clinical outcome in

- patients with acute promyelocytic leukemia treated with simultaneous all-trans-retinoic acid and chemotherapy. *J.Clin.Oncol.*, 18, 1295-1300.
- Frohling,S., Schlenk,R.F., Breittruck,J., Benner,A., Kreitmeier,S., Tobis,K., Dohner,H., & Dohner,K. (2002) 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*, 100, 4372-4380.
- Frohling,S., Schlenk,R.F., Stolze,I., Bihlmayr,J., Benner,A., Kreitmeier,S., Tobis,K., Dohner,H., & Dohner,K. (2004) CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J.Clin.Oncol.*, 22, 624-633.
- Gabert,J., Beillard,E., van der Velden,V., Bi,W., Grimwade,D., Pallisgaard,N., Barbany,G., Cazzaniga,G., Cayuela,J.M., Cave,H., Pane,F., Aerts,J.L., De Micheli,D., Thirion,X., Pradel,V., Gonzalez,M., Viehmann,S., Malec,M., Saglio,G., & van Dongen,J.J. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 17, 2318-2357.
- Gaiger,A., Schmid,D., Heinze,G., Linnerth,B., Greinix,H., Kalhs,P., Tisljar,K., Priglinger,S., Laczika,K., Mitterbauer,M., Novak,M., Mitterbauer,G., Mannhalter,C., Haas,O.A., Lechner,K., & Jager,U. (1998) Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 12, 1886-1894.
- Gale,R.E., Hills,R., Pizzey,A.R., Kottaridis,P.D., Swirsky,D., Gilkes,A.F., Nugent,E., Mills,K.I., Wheatley,K., Solomon,E., Burnett,A.K., Linch,D.C., & Grimwade,D. (2005) Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 106, 3768-3776.
- Galimberti,S., Guerrini,F., Carulli,G., Fazzi,R., Palumbo,G.A., Morabito,F., & Petrini,M. (2004) Significant co-expression of WT1 and MDR1 genes in acute myeloid leukemia patients at diagnosis. *Eur.J.Haematol.*, 72, 45-51.
- Gallagher,R.E., Willman,C.L., Slack,J.L., Andersen,J.W., Li,Y.P., Viswanatha,D., Bloomfield,C.D., Appelbaum,F.R., Schiffer,C.A., Tallman,M.S., & Wiernik,P.H. (1997) Association of PML-RAR alpha fusion mRNA type with pretreatment hematologic characteristics but not treatment outcome in acute promyelocytic leukemia: an intergroup molecular study. *Blood*, 90, 1656-1663.
- Gallagher,R.E., Yeap,B.Y., Bi,W., Livak,K.J., Beaubier,N., Rao,S., Bloomfield,C.D., Appelbaum,F.R., Tallman,M.S., Slack,J.L., & Willman,C.L. (2003) Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR alpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood*, 101, 2521-2528.
- Ghaffari,S., Jagani,Z., Kitidis,C., Lodish,H.F., & Khosravi-Far,R. (2003) Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100, 6523-

- 6528.
- Giannopoulos,K., Li,L., Bojarska-Junak,A., Rolinski,J., Dmoszynska,A., Hus,I., Greiner,J., Renner,C., Dohner,H., & Schmitt,M. (2006) Expression of RHAMM/CD168 and other tumor-associated antigens in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int.J.Oncol.*, 29, 95-103.
- Gilliland,D.G. & Griffin,J.D. (2002) Role of FLT3 in leukemia. *Curr.Opin.Hematol.*, 9, 274-281.
- Goemans,B.F., Zwaan,C.M., Miller,M., Zimmermann,M., Harlow,A., Meshinchi,S., Loonen,A.H., Hahlen,K., Reinhardt,D., Creutzig,U., Kaspers,G.J., & Heinrich,M.C. (2005) Mutations in KIT and RAS are frequent events in pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 19, 1536-1542.
- Gonzalez,M., Barragan,E., Bolufer,P., Chillon,C., Colomer,D., Borstein,R., Calasanz,M.J., Gomez-Casares,M.T., Villegas,A., Marugan,I., Roman,J., Martin,G., Rayon,C., Deben,G., Tormo,M., az-Mediavilla,J., Esteve,J., Gonzalez-San,M.J., Rivas,C., Perez-Equiza,K., Garcia-Sanz,R., Capote,F.J., Ribera,J.M., Arias,J., Leon,A., & Sanz,M.A. (2001) Pretreatment characteristics and clinical outcome of acute promyelocytic leukaemia patients according to the PML-RAR alpha isoforms: a study of the PETHEMA group. *Br.J.Haematol.*, 114, 99-103.
- Gorello,P., Cazzaniga,G., Alberti,F., Dell'Oro,M.G., Gottardi,E., Specchia,G., Roti,G., Rosati,R., Martelli,M.F., Diverio,D., Lo,C.F., Biondi,A., Saglio,G., Mecucci,C., & Falini,B. (2006) Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*, 20, 1103-1108.
- Grandage,V.L., Gale,R.E., Linch,D.C., & Khwaja,A. (2005) PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia*, 19, 586-594.
- Greiner,J., Ringhoffer,M., Taniguchi,M., Li,L., Schmitt,A., Shiku,H., Dohner,H., & Schmitt,M. (2004) mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int.J.Cancer*, 108, 704-711.
- Greiner,J., Schmitt,M., Li,L., Giannopoulos,K., Bosch,K., Schmitt,A., Dohner,K., Schlenk,R.F., Pollack,J.R., Dohner,H., & Bullinger,L. (2006) Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood*, 108, 4109-4117.
- Grimwade,D., Biondi,A., Mozziconacci,M.J., Hagemeijer,A., Berger,R., Neat,M., Howe,K., Dastugue,N., Jansen,J., Radford-Weiss,I., Lo,C.F., Lessard,M., Hernandez,J.M., Delabesse,E., Head,D., Liso,V., Sainty,D., Flandrin,G., Solomon,E., Birg,F., & Lafage-Pochitaloff,M. (2000) 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 BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic

- Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood*, 96, 1297-1308.
- Grimwade,D., Howe,K., Langabeer,S., Davies,L., Oliver,F., Walker,H., Swirsky,D., Wheatley,K., Goldstone,A., Burnett,A., & Solomon,E. (1996) Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. *Br.J.Haematol.*, 94, 557-573.
- Grimwade,D. & Lo-Coco,F. (2002) Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 16, 1959-1973.
- Grimwade,D., Walker,H., Harrison,G., Oliver,F., Chatters,S., Harrison,C.J., Wheatley,K., Burnett,A.K., & Goldstone,A.H. (2001) 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*, 98, 1312-1320.
- Grimwade,D., Walker,H., Oliver,F., Wheatley,K., Harrison,C., Harrison,G., Rees,J., Hann,I., Stevens,R., Burnett,A., & Goldstone,A. (1998) 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*, 92, 2322-2333.
- Gutierrez,N.C., Lopez-Perez,R., Hernandez,J.M., Isidro,I., Gonzalez,B., Delgado,M., Ferminan,E., Garcia,J.L., Vazquez,L., Gonzalez,M., & San Miguel,J.F. (2005) Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 19, 402-409.
- Haferlach,T., Bacher,U., Kern,W., Schnittger,S., & Haferlach,C. (2007) Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach. *Ann.Hematol.*, 86, 311-327.
- Haferlach,T., Kohlmann,A., Schnittger,S., Dugas,M., Hiddemann,W., Kern,W., & Schoch,C. (2005) AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes Chromosomes.Cancer*, 43, 113-127.
- Hamalainen,M.M., Kairisto,V., Juvonen,V., Johansson,J., Auren,J., Kohonen,K., Remes,K., Salmi,T.T., Helenius,H., & Pelliniemi,T.T. (2008) Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Eur.J Haematol.*, 80, 201-207.
- Harousseau,J.L., Lancet,J.E., Reiffers,J., Lowenberg,B., Thomas,X., Huguet,F., Fenaux,P., Zhang,S., Rackoff,W., De Porre,P., & Stone,R. (2007) A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*, 109, 5151-5156.
- Harris,N.L., Jaffe,E.S., Diebold,J., Flandrin,G., Muller-Hermelink,H.K., Vardiman,J., Lister,T.A., & Bloomfield,C.D. (1999) 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. *J.Clin.Oncol.*, 17, 3835-3849.
- Heidel,F., Cortes,J., Rucker,F.G., Aulitzky,W., Letvak,L., Kindler,T., Huber,C., Dohner,H., Kantarjian,H., & Fischer,T. (2007) Results of a multicenter phase II trial for older patients with c-Kit-positive acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (HR-MDS) using low-dose Ara-C and Imatinib. *Cancer*, 109, 907-914.
- Heuser,M., Argiropoulos,B., Kuchenbauer,F., Yung,E., Piper,J., Fung,S., Schlenk,R.F., Dohner,K., Hinrichsen,T., Rudolph,C., Schambach,A., Baum,C., Schlegelberger,B., Dohner,H., Ganser,A., & Humphries,R.K. (2007) MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood*, 110, 1639-1647.
- Heuser,M., Beutel,G., Krauter,J., Dohner,K., von Neuhoff,N., Schlegelberger,B., & Ganser,A. (2006) High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood*, 108, 3898-3905.
- Ikeda,H., Lethe,B., Lehmann,F., van Baren,N., Baurain,J.F., de Smet,C., Chambost,H., Vitale,M., Moretta,A., Boon,T., & Coulie,P.G. (1997) Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity.*, 6, 199-208.
- Jansen,J.H., Mahfoudi,A., Rambaud,S., Lavau,C., Wahli,W., & Dejean,A. (1995) Multimeric complexes of the PML-retinoic acid receptor alpha fusion protein in acute promyelocytic leukemia cells and interference with retinoid and peroxisome-proliferator signaling pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 7401-7405.
- Jurcic,J.G., Nimer,S.D., Scheinberg,D.A., DeBlasio,T., Warrell,R.P., Jr., & Miller,W.H., Jr. (2001) Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 98, 2651-2656.
- Kainz,B., Fonatsch,C., Schwarzinger,I., Sperr,W.R., Jager,U., & Gaiger,A. (2005) Limited value of FLT3 mRNA expression in the bone marrow for prognosis and monitoring of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 90, 695-696.
- Kainz,B., Heintel,D., Marculescu,R., Schwarzinger,I., Sperr,W., Le,T., Weltermann,A., Fonatsch,C., Haas,O.A., Mannhalter,C., Lechner,K., & Jaeger,U. (2002) Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). *Hematol.J.*, 3, 283-289.
- Kaplan,E.L.M.P. (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*, 53, 457-481.
- Kawagoe,H. & Grosveld,G.C. (2005) Conditional MN1-TEL knock-in mice develop acute myeloid leukemia in conjunction with overexpression of HOXA9. *Blood*, 106, 4269-4277.
- Kern,W., Haferlach,C., Haferlach,T., & Schnittger,S. (2008) Monitoring of minimal

- residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer*, 112, 4-16.
- Kindler,T., Breitenbuecher,F., Marx,A., Beck,J., Hess,G., Weinkauff,B., Duyster,J., Peschel,C., Kirkpatrick,C.J., Theobald,M., Gschaidmeier,H., Huber,C., & Fischer,T. (2004) Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit-positive acute myeloid leukemia. *Blood*, 103, 3644-3654.
- Kindler,T., Breitenbuecher,F., Marx,A., Hess,G., Gschaidmeier,H., Gamm,H., Kirkpatrick,C.J., Huber,C., & Fischer,T. (2003) Sustained complete hematologic remission after administration of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in a patient with refractory, secondary AML. *Blood*, 101, 2960-2962.
- Kiyoi,H., Naoe,T., Yokota,S., Nakao,M., Minami,S., Kuriyama,K., Takeshita,A., Saito,K., Hasegawa,S., Shimodaira,S., Tamura,J., Shimazaki,C., Matsue,K., Kobayashi,H., Arima,N., Suzuki,R., Morishita,H., Saito,H., Ueda,R., & Ohno,R. (1997) Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia*, 11, 1447-1452.
- Konoplev,S., Rassidakis,G.Z., Estey,E., Kantarjian,H., Liakou,C.I., Huang,X., Xiao,L., Andreeff,M., Konopleva,M., & Medeiros,L.J. (2007) Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Cancer*, 109, 1152-1156.
- Kornblau,S.M., Womble,M., Qiu,Y.H., Jackson,C.E., Chen,W., Konopleva,M., Estey,E.H., & Andreeff,M. (2006) Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 108, 2358-2365.
- Langer,C., Radmacher,M.D., Ruppert,A.S., Whitman,S.P., Paschka,P., Mrozek,K., Baldus,C.D., Vukosavljevic,T., Liu,C.G., Ross,M.E., Powell,B.L., de la,C.A., Koltz,J.E., Larson,R.A., Marcucci,G., & Bloomfield,C.D. (2008) High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*, 111, 5371-5379.
- Lapillonne,H., Renneville,A., Auvrignon,A., Flamant,C., Blaise,A., Perot,C., Lai,J.L., Ballerini,P., Mazingue,F., Fasola,S., Dehee,A., Bellman,F., Adam,M., Labopin,M., Douay,L., Leverger,G., Preudhomme,C., & Landman-Parker,J. (2006) High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J.Clin.Oncol.*, 24, 1507-1515.
- Lee,S., Kim,Y.J., Eom,K.S., Min,C.K., Kim,H.J., Cho,S.G., Lee,J.W., Min,W.S., & Kim,C.C. (2006) The significance of minimal residual disease kinetics in adults with newly diagnosed PML-RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia: results of a prospective trial. *Haematologica*, 91, 671-674.
- Lekanne Deprez,R.H., Riegman,P.H., Groen,N.A., Warringa,U.L., van Biezen,N.A., Molijn,A.C., Bootsma,D., de Jong,P.J., Menon,A.G., Kley,N.A., & . (1995) Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene*, 10, 1521-1528.

- Leroy,H., De,B.S., Grardel-Duflos,N., Darre,S., Leleu,X., Roumier,C., Morschhauser,F., Lai,J.L., Bauters,F., Fenaux,P., & Preudhomme,C. (2005a) Prognostic value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). *Leukemia*, 19, 367-372.
- Leroy,H., Roumier,C., Huyghe,P., Biggio,V., Fenaux,P., & Preudhomme,C. (2005b) CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*, 19, 329-334.
- Liu,Y.F., Zhu,Y.M., Shen,S.H., Shen,Z.X., Li,J.M., Chen,S.J., Chen,Z., & Jiong,H.U. (2006) Molecular response in acute promyelocytic leukemia: a direct comparison of regular and real-time RT-PCR. *Leukemia*, 20, 1393-1399.
- Livak,K.J. & Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lo-Coco F., Ammatuna,E., & Sanz,M.A. (2007) Current treatment of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*, 92, 289-291.
- Lo-Coco,F., Breccia,M., & Diverio,D. (2003) The importance of molecular monitoring in acute promyelocytic leukaemia. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.*, 16, 503-520.
- Lo-Coco,F., Cimino,G., Breccia,M., Noguera,N.I., Diverio,D., Finolezzi,E., Pogliani,E.M., Di,B.E., Micalizzi,C., Kropp,M., Venditti,A., Tafuri,A., & Mandelli,F. (2004) Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as a single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 104, 1995-1999.
- Lo-Coco,F., Diverio,D., Falini,B., Biondi,A., Nervi,C., & Pelicci,P.G. (1999) Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 94, 12-22.
- Longo,L., Pandolfi,P.P., Biondi,A., Rambaldi,A., Mencarelli,A., Lo,C.F., Diverio,D., Pegoraro,L., Avanzi,G., Tabilio,A., & . (1990) Rearrangements and aberrant expression of the retinoic acid receptor alpha gene in acute promyelocytic leukemias. *J.Exp.Med.*, 172, 1571-1575.
- Lopingco,M.C. & Perkins,A.S. (1996) Molecular analysis of Evi1, a zinc finger oncogene involved in myeloid leukemia. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 211, 211-222.
- Lowenberg,B., Downing,J.R., & Burnett,A. (1999) Acute myeloid leukemia. *N.Engl.J.Med.*, 341, 1051-1062.
- Lowenberg,B., Griffin,J.D., & Tallman,M.S. (2003) Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol.Educ.Program.*, 82-101.
- Lugthart,S., Drunen,E.V., Norden,Y.V., Hoven,A.V., Erpelinck,C.A., Valk,P.J., Beverloo,H.B., Lowenberg,B., & Delwel,R. (2008) High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*, 111, 4329-4337.
- Mangelsdorf,D.J. & Evans,R.M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83, 841-850.

- Marasca,R., Maffei,R., Zucchini,P., Castelli,I., Saviola,A., Martinelli,S., Ferrari,A., Fontana,M., Ravanetti,S., & Torelli,G. (2006) Gene expression profiling of acute promyelocytic leukaemia identifies two subtypes mainly associated with flt3 mutational status. *Leukemia*, 20, 103-114.
- Marcucci,G., Baldus,C.D., Ruppert,A.S., Radmacher,M.D., Mrozek,K., Whitman,S.P., Kolitz,J.E., Edwards,C.G., Vardiman,J.W., Powell,B.L., Baer,M.R., Moore,J.O., Perrotti,D., Caligiuri,M.A., Carroll,A.J., Larson,R.A., de la,C.A., & Bloomfield,C.D. (2005a) Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J.Clin.Oncol.*, 23, 9234-9242.
- Marcucci,G., Maharry,K., Whitman,S.P., Vukosavljevic,T., Paschka,P., Langer,C., Mrozek,K., Baldus,C.D., Carroll,A.J., Powell,B.L., Kolitz,J.E., Larson,R.A., & Bloomfield,C.D. (2007) High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J.Clin.Oncol.*, 25, 3337-3343.
- Marcucci,G., Mrozek,K., Ruppert,A.S., Maharry,K., Kolitz,J.E., Moore,J.O., Mayer,R.J., Pettenati,M.J., Powell,B.L., Edwards,C.G., Sterling,L.J., Vardiman,J.W., Schiffer,C.A., Carroll,A.J., Larson,R.A., & Bloomfield,C.D. (2005b) 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.*, 23, 5705-5717.
- Marlton,P., Keating,M., Kantarjian,H., Pierce,S., O'Brien,S., Freireich,E.J., & Estey,E. (1995) Cytogenetic and clinical correlates in AML patients with abnormalities of chromosome 16. *Leukemia*, 9, 965-971.
- Martinelli,G., Ottaviani,E., Testoni,N., Visani,G., Diverio,D., D'Elia,G., Mandelli,F., & Tura,S. (1998) Disappearance of PML/RAR alpha acute promyelocytic leukemia-associated transcript during consolidation chemotherapy. *Haematologica*, 83, 985-988.
- Martinez-Gac,L., Alvarez,B., Garcia,Z., Marques,M., Arrizabalaga,M., & Carrera,A.C. (2004) Phosphoinositide 3-kinase and Forkhead, a switch for cell division. *Biochem.Soc Trans.*, 32, 360-361.
- Matsushita,M., Yamazaki,R., Ikeda,H., & Kawakami,Y. (2003) Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in the development of diagnostic and therapeutic methods for hematological malignancies. *Leuk.Lymphoma*, 44, 439-444.
- Menell,J.S., Cesarman,G.M., Jacovina,A.T., McLaughlin,M.A., Lev,E.A., & Hajjar,K.A. (1999) Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *N.Engl.J.Med.*, 340, 994-1004.
- Menssen,H.D., Siehl,J.M., & Thiel,E. (2002) Wilms tumor gene (WT1) expression as a panleukemic marker. *Int.J.Hematol.*, 76, 103-109.
- Michieli,M., Damiani,D., Ermacora,A., Geromin,A., Michelutti,A., Masolini,P., & Baccarani,M. (2000) P-glycoprotein (PGP), lung resistance-related protein (LRP)

- and multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in acute promyelocytic leukaemia. *Br.J.Haematol.*, 108, 703-709.
- Min,Y.H., Cheong,J.W., Kim,J.Y., Eom,J.I., Lee,S.T., Hahn,J.S., Ko,Y.W., & Lee,M.H. (2004) Cytoplasmic mislocalization of p27Kip1 protein is associated with constitutive phosphorylation of Akt or protein kinase B and poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.*, 64, 5225-5231.
- Min,Y.H., Eom,J.I., Cheong,J.W., Maeng,H.O., Kim,J.Y., Jeung,H.K., Lee,S.T., Lee,M.H., Hahn,J.S., & Ko,Y.W. (2003) Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia*, 17, 995-997.
- Mitani,K. (2004) Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1. *Oncogene*, 23, 4263-4269.
- Morris,S.W., Kirstein,M.N., Valentine,M.B., Dittmer,K., Shapiro,D.N., Look,A.T., & Saltman,D.L. (1995) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 267, 316-317.
- Mrozek,K. & Bloomfield,C.D. (2006) Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.*, 169-177.
- Mrozek,K., Marcucci,G., Paschka,P., Whitman,S.P., & Bloomfield,C.D. (2007) 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*, 109, 431-448.
- Muindi,J., Frankel,S.R., Miller,W.H., Jr., Jakubowski,A., Scheinberg,D.A., Young,C.W., Dmitrovsky,E., & Warrell,R.P., Jr. (1992) Continuous treatment with all-trans retinoic acid causes a progressive reduction in plasma drug concentrations: implications for relapse and retinoid "resistance" in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 79, 299-303.
- Muñoz,L., Nomdedeu,J.F., Villamor,N., Guardia,R., Colomer,D., Ribera,J.M., Torres,J.P., Berlanga,J.J., Fernandez,C., Llorente,A., Queipo de Llano,M.P., Sanchez,J.M., Brunet,S., & Sierra,J. (2003) Acute myeloid leukemia with MLL rearrangements: clinicobiological features, prognostic impact and value of flow cytometry in the detection of residual leukemic cells. *Leukemia*, 17, 76-82.
- Murray,C.K., Estey,E., Paietta,E., Howard,R.S., Edenfield,W.J., Pierce,S., Mann,K.P., Bolan,C., & Byrd,J.C. (1999) CD56 expression in acute promyelocytic leukemia: a possible indicator of poor treatment outcome? *J.Clin.Oncol.*, 17, 293-297.
- Nakao,M., Yokota,S., Iwai,T., Kaneko,H., Horiike,S., Kashima,K., Sonoda,Y., Fujimoto,T., & Misawa,S. (1996) Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10, 1911-1918.
- Neumann,E., Engelsberg,A., Decker,J., Storkel,S., Jaeger,E., Huber,C., & Seliger,B. (1998) Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.*, 58, 4090-4095.

- Nguyen,S., Leblanc,T., Fenaux,P., Witz,F., Blaise,D., Pigneux,A., Thomas,X., Rigal-Huguet,F., Lioure,B., Auvrignon,A., Fiere,D., Reiffers,J., Castaigne,S., Leverger,G., Harousseau,J.L., Socie,G., & Dombret,H. (2002) 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*, 99, 3517-3523.
- Nishino,T., Kaise,N., Sindo,Y., Nishino,N., Nishida,T., Yasuda,S., & Masui,Y. (1991) Promyelocytic leukemia cell line, HL-60, produces human hepatocyte growth factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 181, 323-330.
- Nucifora,G. (1997) The EVI1 gene in myeloid leukemia. *Leukemia*, 11, 2022-2031.
- Oberthuer,A., Hero,B., Spitz,R., Berthold,F., & Fischer,M. (2004) The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin.Cancer Res.*, 10, 4307-4313.
- Okuda,M., Horn,H.F., Tarapore,P., Tokuyama,Y., Smulian,A.G., Chan,P.K., Knudsen,E.S., Hofmann,I.A., Snyder,J.D., Bove,K.E., & Fukasawa,K. (2000) Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 103, 127-140.
- Orfao,A., Chillon,M.C., Bortoluci,A.M., Lopez-Berges,M.C., Garcia-Sanz,R., Gonzalez,M., Tabertero,M.D., Garcia-Marcos,M.A., Rasillo,A.I., Hernandez-Rivas,J., & San Miguel,J.F. (1999) The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements. *Haematologica*, 84, 405-412.
- Ossenkoppele,G.J., Graveland,W.J., Sonneveld,P., Daenen,S.M., Biesma,D.H., Verdonck,L.F., Schaafsma,M.R., Westveer,P.H., Peters,G.J., Noordhuis,P., Muus,P., Selleslag,D., van der,H.B., Delforge,M., Lowenberg,B., & Verhoef,G.E. (2004) The value of fludarabine in addition to ARA-C and G-CSF in the treatment of patients with high-risk myelodysplastic syndromes and AML in elderly patients. *Blood*, 103, 2908-2913.
- Pabst,T., Mueller,B.U., Zhang,P., Radomska,H.S., Narravula,S., Schnittger,S., Behre,G., Hiddemann,W., & Tenen,D.G. (2001) Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat.Genet.*, 27, 263-270.
- Pajuelo-Gamez,J.C., Cervera,J., Garcia-Casado,Z., Mena-Duran,A.V., Valencia,A., Barragan,E., Such,E., Bolufer,P., & Sanz,M.A. (2007) MLL amplification in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 174, 127-131.
- Pandolfi,P.P., Alcalay,M., Fagioli,M., Zangrilli,D., Mencarelli,A., Diverio,D., Biondi,A., Lo,C.F., Rambaldi,A., Grignani,F., & . (1992) Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*, 11, 1397-1407.
- Paydas,S., Tanriverdi,K., Yavuz,S., Disel,U., Baslamisli,F., & Burgut,R. (2005) PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future

- prospects. *Am.J.Hematol.*, 79, 257-261.
- Paydas,S., Tanriverdi,K., Yavuz,S., & Seydaoglu,G. (2007) PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: Clinical importance and review of the literature. *Leuk.Res.*, 31, 365-369.
- Perez-Simon,J.A., Sanchez-Abarca,I., Diez-Campelo,M., Caballero,D., & San,M.J. (2006) Chronic graft-versus-host disease: Pathogenesis and clinical management. *Drugs*, 66, 1041-1057.
- Petti,M.C., Fazi,F., Gentile,M., Diverio,D., De,F.P., De Propriis,M.S., Fiorini,R., Spiriti,M.A., Padula,F., Pelicci,P.G., Nervi,C., & Lo,C.F. (2002) Complete remission through blast cell differentiation in PLZF/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo studies. *Blood*, 100, 1065-1067.
- Piazza,F., Gurrieri,C., & Pandolfi,P.P. (2001) The theory of APL. *Oncogene*, 20, 7216-7222.
- Preudhomme,C., Sagot,C., Boissel,N., Cayuela,J.M., Tigaud,I., De,B.S., Thomas,X., Raffoux,E., Lamandin,C., Castaigne,S., Fenaux,P., & Dombret,H. (2002) Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*, 100, 2717-2723.
- Pritchard-Jones,K., Fleming,S., Davidson,D., Bickmore,W., Porteous,D., Gosden,C., Bard,J., Buckler,A., Pelletier,J., Housman,D., & . (1990) The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*, 346, 194-197.
- Pui,C.H., Schrappe,M., Ribeiro,R.C., & Niemeyer,C.M. (2004) Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol.Educ.Program.*, 118-145.
- Radmacher,M.D., Marcucci,G., Ruppert,A.S., Mrozek,K., Whitman,S.P., Vardiman,J.W., Paschka,P., Vukosavljevic,T., Baldus,C.D., Kolitz,J.E., Caligiuri,M.A., Larson,R.A., & Bloomfield,C.D. (2006) Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*, 108, 1677-1683.
- Redner,R.L., Rush,E.A., Faas,S., Rudert,W.A., & Corey,S.J. (1996) The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*, 87, 882-886.
- Reindl,C., Bagrintseva,K., Vempati,S., Schnittger,S., Ellwart,J.W., Wenig,K., Hopfner,K.P., Hiddemann,W., & Spiekermann,K. (2006) Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood*, 107, 3700-3707.
- Rombouts,E.J., Pavic,B., Lowenberg,B., & Ploemacher,R.E. (2004) Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 104, 550-557.
- Rousselot,P., Hardas,B., Patel,A., Guidez,F., Gaken,J., Castaigne,S., Dejean,A., de,T.H., Degos,L., Farzaneh,F., & . (1994) The PML-RAR alpha gene product of

- the t(15;17) translocation inhibits retinoic acid-induced granulocytic differentiation and mediated transactivation in human myeloid cells. *Oncogene*, 9, 545-551.
- Rowley, J.D., Golomb, H.M., & Dougherty, C. (1977) 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*, 1, 549-550.
- Saglio, G., Carturan, S., Grillo, S., Capella, S., Arruga, F., Defilippi, I., Rosso, V., Rauco, M., Marina, L.A., & Cilloni, D. (2005) WT1 overexpression: a clinically useful marker in acute and chronic myeloid leukemias. *Hematology*, 10 Suppl 1, 76-78.
- San-Miguel, J.F., Vidriales, M.B., & Orfao, A. (2002) Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.*, 15, 105-118.
- Sanz, M.A. (2006) Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program.*, 147-155.
- Sanz, M.A., Labopin, M., Gorin, N.C., de la Rubia, J., Arcese, W., Meloni, G., Bacigalupo, A., Alessandrino, P., Carreras, E., Iriando, A., Novitzky, N., Jacobs, P., Bandini, G., Lo-Coco, F., Frassoni, F., & Rocha, V. (2007) Hematopoietic stem cell transplantation for adults with acute promyelocytic leukemia in the ATRA era: a survey of the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 39, 461-469.
- Sanz, M.A. & Lo-Coco, F. (2005) Standard practice and controversial issues in front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*, 90, 840-845.
- Sanz, M.A., Lo-Coco, F., Martin, G., Avvisati, G., Rayon, C., Barbui, T., az-Mediavilla, J., Fioritoni, G., Gonzalez, J.D., Liso, V., Esteve, J., Ferrara, F., Bolufer, P., Bernasconi, C., Gonzalez, M., Rodeghiero, F., Colomer, D., Petti, M.C., Ribera, J.M., & Mandelli, F. (2000) 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*, 96, 1247-1253.
- Sanz, M.A., Martin, G., Gonzalez, M., Leon, A., Rayon, C., Rivas, C., Colomer, D., Amutio, E., Capote, F.J., Milone, G.A., de la Serna, J., Roman, J., Barragan, E., Bergua, J., Escoda, L., Parody, R., Negri, S., Calasanz, M.J., & Bolufer, P. (2004) Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*, 103, 1237-1243.
- Sanz, M.A., Martin, G., Rayon, C., Esteve, J., Gonzalez, M., Díaz-Mediavilla, J., Bolufer, P., Barragan, E., Terol, M.J., Gonzalez, J.D., Colomer, D., Chillon, C., Rivas, C., Gomez, T., Ribera, J.M., Bornstein, R., Roman, J., Calasanz, M.J., Arias, J., Alvarez, C., Ramos, F., & Deben, G. (1999) A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia. PETHEMA group. *Blood*, 94, 3015-3021.
- Sanz, M.A., Montesinos, P., Vellenga, E., Rayon, C., de la, S.J., Parody, R., Bergua, J.M., Leon, A., Negri, S., Gonzalez, M., Rivas, C., Esteve, J., Milone, G., Gonzalez, J.D., Amutio, E., Brunet, S., Garcia-Larana, J., Colomer, D., Calasanz, M.J., Chillon, C.,

- Barragan,E., Bolufer,P., & Lowenberg,B. (2008) Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: long-term outcome of the LPA 99 multicenter study by the PETHEMA Group. *Blood*, 112, 3130-3134.
- Sanz,M.A., Tallman,M.S., & Lo-Coco,F. (2005a) Practice points, consensus, and controversial issues in the management of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Oncologist*, 10, 806-814.
- Sanz,M.A., Tallman,M.S., & Lo-Coco,F. (2005b) Tricks of the trade for the appropriate management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 105, 3019-3025.
- Scappini,B., Onida,F., Kantarjian,H.M., Dong,L., Verstovsek,S., Keating,M.J., & Beran,M. (2001) Effects of signal transduction inhibitor 571 in acute myelogenous leukemia cells. *Clin.Cancer Res.*, 7, 3884-3893.
- Schaich,M., Soucek,S., Thiede,C., Ehninger,G., & Illmer,T. (2005) MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br.J.Haematol.*, 128, 324-332.
- Scharnhorst,V., van der Eb,A.J., & Jochemsen,A.G. (2001) WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*, 273, 141-161.
- Schnittger,S., Kohl,T.M., Haferlach,T., Kern,W., Hiddemann,W., Spiekermann,K., & Schoch,C. (2006) KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*, 107, 1791-1799.
- Schnittger,S., Schoch,C., Dugas,M., Kern,W., Staib,P., Wuchter,C., Loffler,H., Sauerland,C.M., Serve,H., Buchner,T., Haferlach,T., & Hiddemann,W. (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood*, 100, 59-66.
- Schnittger,S., Schoch,C., Kern,W., Hiddemann,W., & Haferlach,T. (2004) FLT3 length mutations as marker for follow-up studies in acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol.*, 112, 68-78.
- Schnittger,S., Schoch,C., Kern,W., Mecucci,C., Tschulik,C., Martelli,M.F., Haferlach,T., Hiddemann,W., & Falini,B. (2005) Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*, 106, 3733-3739.
- Schnittger,S., Weisser,M., Schoch,C., Hiddemann,W., Haferlach,T., & Kern,W. (2003) New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood*, 102, 2746-2755.
- Schnittger,S., Wormann,B., Hiddemann,W., & Griesinger,F. (1998) Partial tandem duplications of the MLL gene are detectable in peripheral blood and bone marrow of nearly all healthy donors. *Blood*, 92, 1728-1734.

- Shih,L.Y., Kuo,M.C., Liang,D.C., Huang,C.F., Lin,T.L., Wu,J.H., Wang,P.N., Dunn,P., & Lai,C.L. (2003) Internal tandem duplication and Asp835 mutations of the FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) gene in acute promyelocytic leukemia. *Cancer*, 98, 1206-1216.
- Shih,L.Y., Liang,D.C., Fu,J.F., Wu,J.H., Wang,P.N., Lin,T.L., Dunn,P., Kuo,M.C., Tang,T.C., Lin,T.H., & Lai,C.L. (2006a) Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia*, 20, 218-223.
- Shih,L.Y., Liang,D.C., Huang,C.F., Wu,J.H., Lin,T.L., Wang,P.N., Dunn,P., Kuo,M.C., & Tang,T.C. (2006b) AML patients with CEBPalpha mutations mostly retain identical mutant patterns but frequently change in allelic distribution at relapse: a comparative analysis on paired diagnosis and relapse samples. *Leukemia*, 20, 604-609.
- Sitailo,S., Sood,R., Barton,K., & Nucifora,G. (1999) Forced expression of the leukemia-associated gene EVI1 in ES cells: a model for myeloid leukemia with 3q26 rearrangements. *Leukemia*, 13, 1639-1645.
- Slack,J.L., Arthur,D.C., Lawrence,D., Mrozek,K., Mayer,R.J., Davey,F.R., Tantravahi,R., Pettenati,M.J., Bigner,S., Carroll,A.J., Rao,K.W., Schiffer,C.A., & Bloomfield,C.D. (1997) Secondary cytogenetic changes in acute promyelocytic leukemia--prognostic importance in patients treated with chemotherapy alone and association with the intron 3 breakpoint of the PML gene: a Cancer and Leukemia Group B study. *J.Clin.Oncol.*, 15, 1786-1795.
- Slovak,M.L., Kopecky,K.J., Cassileth,P.A., Harrington,D.H., Theil,K.S., Mohamed,A., Paietta,E., Willman,C.L., Head,D.R., Rowe,J.M., Forman,S.J., & Appelbaum,F.R. (2000) Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*, 96, 4075-4083.
- Slovak,M.L., Kopecky,K.J., Wolman,S.R., Henslee-Downey,J.P., Appelbaum,F.R., Forman,S.J., & Blume,K.G. (1995) Cytogenetic correlation with disease status and treatment outcome in advanced stage leukemia post bone marrow transplantation: a Southwest Oncology Group study (SWOG-8612). *Leuk.Res.*, 19, 381-388.
- Small,D. (2006) FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.*, 178-184.
- Smith,B.D., Levis,M., Beran,M., Giles,F., Kantarjian,H., Berg,K., Murphy,K.M., Dausess,T., Allebach,J., & Small,D. (2004) Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 103, 3669-3676.
- Spoos,A.C., Lubbert,M., Wierda,W.G., & Burger,J.A. (2007) CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 109, 786-791.
- Steinbach,D., Hermann,J., Viehmann,S., Zintl,F., & Gruhn,B. (2002a) Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia.

- Cancer Genet.Cytogenet.*, 133, 118-123.
- Steinbach,D., Pfaffendorf,N., Wittig,S., & Gruhn,B. (2007) PRAME expression is not associated with down-regulation of retinoic acid signaling in primary acute myeloid leukemia. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 177, 51-54.
- Steinbach,D., Schramm,A., Eggert,A., Onda,M., Dawczynski,K., Rump,A., Pastan,I., Wittig,S., Pfaffendorf,N., Voigt,A., Zintl,F., & Gruhn,B. (2006) Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin.Cancer Res.*, 12, 2434-2441.
- Steinbach,D., Viehmann,S., Zintl,F., & Gruhn,B. (2002b) PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 138, 89-91.
- Stentoft,J., Hokland,P., Ostergaard,M., Hasle,H., & Nyvold,C.G. (2006) Minimal residual core binding factor AMLs by real time quantitative PCR--initial response to chemotherapy predicts event free survival and close monitoring of peripheral blood unravels the kinetics of relapse. *Leuk.Res.*, 30, 389-395.
- Studel,C., Wermke,M., Schaich,M., Schakel,U., Illmer,T., Ehninger,G., & Thiede,C. (2003) Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes.Cancer*, 37, 237-251.
- Stirewalt,D.L., Kopecky,K.J., Meshinchi,S., Engel,J.H., Pogossova-Agadjanyan,E.L., Linsley,J., Slovak,M.L., Willman,C.L., & Radich,J.P. (2006) Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 107, 3724-3726.
- Stirewalt,D.L. & Radich,J.P. (2003) The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat.Rev.Cancer*, 3, 650-665.
- Suzuki,T., Kiyoi,H., Ozeki,K., Tomita,A., Yamaji,S., Suzuki,R., Kodera,Y., Miyawaki,S., Asou,N., Kuriyama,K., Yagasaki,F., Shimazaki,C., Akiyama,H., Nishimura,M., Motoji,T., Shinagawa,K., Takeshita,A., Ueda,R., Kinoshita,T., Emi,N., & Naoe,T. (2005) Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*, 106, 2854-2861.
- Tajeddine,N., Gala,J.L., Louis,M., Van,S.M., Tombal,B., & Gailly,P. (2005) Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo. *Cancer Res.*, 65, 7348-7355.
- Takeshita,A., Shinjo,K., Naito,K., Matsui,H., Sahara,N., Shigeno,K., Horii,T., Shirai,N., Maekawa,M., Ohnishi,K., Naoe,T., & Ohno,R. (2005) Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells. *Leukemia*, 19, 1306-1311.
- Tallman,M.S. (2005) New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.*, 143-150.
- Tallman,M.S. (2007) Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia.

- Best.Pract.Res.Clin.Haematol.*, 20, 57-65.
- Tallman,M.S., Andersen,J.W., Schiffer,C.A., Appelbaum,F.R., Feusner,J.H., Woods,W.G., Ogden,A., Weinstein,H., Shepherd,L., Willman,C., Bloomfield,C.D., Rowe,J.M., & Wiernik,P.H. (2002a) All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood*, 100, 4298-4302.
- Tallman,M.S., Gilliland,D.G., & Rowe,J.M. (2005) Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 106, 1154-1163.
- Tallman,M.S., Nabhan,C., Feusner,J.H., & Rowe,J.M. (2002b) Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood*, 99, 759-767.
- Tamburini,J., Elie,C., Bardet,V., Chapuis,N., Park,S., Broet,P., Cornillet-Lefebvre,P., Lioure,B., Ugo,V., Blanchet,O., Ifrah,N., Witz,F., Dreyfus,F., Mayeux,P., Lacombe,C., & Bouscary,D. (2007) Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood*, 110, 1025-1028.
- Tanner,S.M., Austin,J.L., Leone,G., Rush,L.J., Plass,C., Heinonen,K., Mrozek,K., Sill,H., Knuutila,S., Kolitz,J.E., Archer,K.J., Caligiuri,M.A., Bloomfield,C.D., & de la,C.A. (2001) BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98, 13901-13906.
- Thiede,C., Koch,S., Creutzig,E., Steudel,C., Illmer,T., Schaich,M., & Ehninger,G. (2005) Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 107, 4011-4020.
- Thiede,C., Steudel,C., Mohr,B., Schaich,M., Schakel,U., Platzbecker,U., Wermke,M., Bornhauser,M., Ritter,M., Neubauer,A., Ehninger,G., & Illmer,T. (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, 99, 4326-4335.
- Ticchioni,M., Essafi,M., Jeandel,P.Y., Davi,F., Cassuto,J.P., Deckert,M., & Bernard,A. (2007) Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*, 26, 7081-7091.
- Tobal,K. & Liu Yin,J.A. (2006) Diagnosis and monitoring of AML1-MTG8 (ETO)-positive acute myeloid leukemia by qualitative and real-time quantitative RT-PCR. *Methods Mol.Med.*, 125, 149-161.
- Tobal,K., Moore,H., Macheta,M., & Yin,J.A. (2001) Monitoring minimal residual disease and predicting relapse in APL by quantitating PML-RARalpha transcripts with a sensitive competitive RT-PCR method. *Leukemia*, 15, 1060-1065.
- Tsimberidou,A.M., Giles,F.J., Estey,E., O'Brien,S., Keating,M.J., & Kantarjian,H.M. (2006) The role of gemtuzumab ozogamicin in acute leukaemia therapy. *Br.J.Haematol.*, 132, 398-409.

- van Baren,N., Chambost,H., Ferrant,A., Michaux,L., Ikeda,H., Millard,I., Olive,D., Boon,T., & Coulie,P.G. (1998) PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br.J.Haematol.*, 102, 1376-1379.
- van Dongen,J.J., Macintyre,E.A., Gabert,J.A., Delabesse,E., Rossi,V., Saglio,G., Gottardi,E., Rambaldi,A., Dotti,G., Griesinger,F., Parreira,A., Gameiro,P., Diaz,M.G., Malec,M., Langerak,A.W., San Miguel,J.F., & Biondi,A. (1999) Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 13, 1901-1928.
- Vidriales,M.B., San-Miguel,J.F., Orfao,A., Coustan-Smith,E., & Campana,D. (2003) Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.*, 16, 599-612.
- Wang,Y.Y., Zhou,G.B., Yin,T., Chen,B., Shi,J.Y., Liang,W.X., Jin,X.L., You,J.H., Yang,G., Shen,Z.X., Chen,J., Xiong,S.M., Chen,G.Q., Xu,F., Liu,Y.W., Chen,Z., & Chen,S.J. (2005) AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102, 1104-1109.
- Wang,Z.G., Delva,L., Gaboli,M., Rivi,R., Giorgio,M., Cordon-Cardo,C., Grosveld,F., & Pandolfi,P.P. (1998) Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science*, 279, 1547-1551.
- Weisser,M., Haferlach,C., Haferlach,T., & Schnittger,S. (2007) Feasibility of using the combined MDS-EVI1/EVI1 gene expression as an alternative molecular marker in acute myeloid leukemia: a report of four cases. *Cancer Genet.Cytogenet.*, 177, 64-69.
- Weisser,M., Kern,W., Rauhut,S., Schoch,C., Hiddemann,W., Haferlach,T., & Schnittger,S. (2005a) Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 19, 1416-1423.
- Weisser,M., Kern,W., Schoch,C., Hiddemann,W., Haferlach,T., & Schnittger,S. (2005b) Risk assessment by monitoring expression levels of partial tandem duplications in the MLL gene in acute myeloid leukemia during therapy. *Haematologica*, 90, 881-889.
- Weisser,M., Kern,W., Schoch,C., Tschulik,C., Hiddemann,W., Haferlach,T., & Schnittger,S. (2006) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction based quantification of the combined MDS-EVI1/EVI1 gene in acute myeloid leukemia. *Leuk.Lymphoma*, 47, 2645-2647.
- Whitman,S.P., Archer,K.J., Feng,L., Baldus,C., Becknell,B., Carlson,B.D., Carroll,A.J., Mrozek,K., Vardiman,J.W., George,S.L., Kolitz,J.E., Larson,R.A., Bloomfield,C.D., & Caligiuri,M.A. (2001) 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.*, 61, 7233-7239.
- Whitman,S.P., Liu,S., Vukosavljevic,T., Rush,L.J., Yu,L., Liu,C., Klisovic,M.I., Maharry,K., Guimond,M., Strout,M.P., Becknell,B., Dorrance,A., Klisovic,R.B., Plass,C., Bloomfield,C.D., Marcucci,G., & Caligiuri,M.A. (2005) The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood*, 106, 345-352.
- Whitman,S.P., Ruppert,A.S., Marcucci,G., Mrozek,K., Paschka,P., Langer,C., Baldus,C.D., Wen,J., Vukosavljevic,T., Powell,B.L., Carroll,A.J., Kolitz,J.E., Larson,R.A., Caligiuri,M.A., & Bloomfield,C.D. (2007) Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*, 109, 5164-5167.
- Wilson,C.S., Davidson,G.S., Martin,S.B., Andries,E., Potter,J., Harvey,R., Ar,K., Xu,Y., Kopecky,K.J., Ankerst,D.P., Gundacker,H., Slovak,M.L., Mosquera-Caro,M., Chen,I.M., Stirewalt,D.L., Murphy,M., Schultz,F.A., Kang,H., Wang,X., Radich,J.P., Appelbaum,F.R., Atlas,S.R., Godwin,J., & Willman,C.L. (2006) Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood*, 108, 685-696.
- Xu,Q., Simpson,S.E., Scialla,T.J., Bagg,A., & Carroll,M. (2003) Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*, 102, 972-980.
- Yanada,M., Matsuo,K., Suzuki,T., Kiyoi,H., & Naoe,T. (2005) Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*, 19, 1345-1349.
- Yanada,M., Terakura,S., Yokozawa,T., Yamamoto,K., Kiyoi,H., Emi,N., Kitamura,K., Kohno,A., Tanaka,M., Tobita,T., Takeo,T., Sao,H., Kataoka,T., Kobayashi,M., Takeshita,A., Morishita,Y., Naoe,T., & Sugiura,I. (2004) Multiplex real-time RT-PCR for prospective evaluation of WT1 and fusion gene transcripts in newly diagnosed de novo acute myeloid leukemia. *Leuk.Lymphoma*, 45, 1803-1808.
- Yoneda-Kato,N., Look,A.T., Kirstein,M.N., Valentine,M.B., Raimondi,S.C., Cohen,K.J., Carroll,A.J., & Morris,S.W. (1996) The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene*, 12, 265-275.
- Yoo,S.J., Park,C.J., Jang,S., Seo,E.J., Lee,K.H., & Chi,H.S. (2006) Inferior prognostic outcome in acute promyelocytic leukemia with alterations of FLT3 gene. *Leuk.Lymphoma*, 47, 1788-1793.
- Zelent,A., Guidez,F., Melnick,A., Waxman,S., & Licht,J.D. (2001) Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20, 7186-7203.
- Zeng,Z., Samudio,I.J., Zhang,W., Estrov,Z., Pelicano,H., Harris,D., Frolova,O., Hail,N., Jr., Chen,W., Kornblau,S.M., Huang,P., Lu,Y., Mills,G.B., Andreeff,M., & Konopleva,M. (2006) Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial

- dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.*, 66, 3737-3746.
- Zhang,T.D., Chen,G.Q., Wang,Z.G., Wang,Z.Y., Chen,S.J., & Chen,Z. (2001) Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene*, 20, 7146-7153.
- Zhou,G.B., Zhao,W.L., Wang,Z.Y., Chen,S.J., & Chen,Z. (2005) Retinoic acid and arsenic for treating acute promyelocytic leukemia. *PLoS.Med.*, 2, e12.
- Zhu,J., Lallemand-Breitenbach,V., & de,T.H. (2001) Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene*, 20, 7257-7265.