

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Medicina Clínica



**LEUCEMIA AGUDA MIELOIDE NPM1+: ESTUDIO,  
SUPERVIVENCIA A LARGO PLAZO, SUPERVIVENCIA LIBRE  
DE EVENTO Y FACTORES PRONÓSTICOS.**

**TESIS DOCTORAL REALIZADA POR:**

D<sup>a</sup>. Carmen Botella Prieto

**DIRIGIDA POR LOS PROFESORES DOCTORES:**

D. Pascual Fernández Abellán.

D. Ernesto Cortés Castell.

**San Juan de Alicante, 2017**



D. Francisco Javier Fernández Sánchez, Director del  
Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo “LEUCEMIA  
AGUDA MIELOIDE NPM1+: ESTUDIO, SUPERVIVENCIA A LARGO PLAZO,  
SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTO Y FACTORES PRONÓSTICOS“  
realizado por D<sup>a</sup> Carmen Botella Prieto bajo la dirección del Prof. Dr. D.  
Pascual Fernández Abellán y D. Ernesto Cortés Castell.

Lo que firmo en Sant Joan d' Alacant a cinco de junio de Dos Mil  
Diecisiete.

Prof. Francisco Javier Fernández Sánchez  
Director del Departamento de Medicina Clínica



D. Pascual Fernández Abellán y Ernesto Cortés Castell, como  
Directores de Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo “LEUCEMIA AGUDA MIELOIDE NPM1+: ESTUDIO, SUPERVIVENCIA A LARGO PLAZO, SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTO Y FACTORES PRONÓSTICOS “ realizado por D<sup>a</sup>. Carmen Botella Prieto ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firman para los oportunos efectos en Sant Joan d' Alacant a cinco de junio de dos mil diecisiete.

D. Pascual Fernández Abellán  
Director de Tesis Doctoral.

D. Ernesto Cortés Castell.  
Director de Tesis Doctoral.





***A mis directores de tesis , por su dedicación.***

***A mi familia, por quererme tanto.***

***A mis amigos, por su apoyo y amistad.***





# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 HEMATOPOYESIS</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 CITOGÉNÉTICA.</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4 BIOLOGÍA MOLECULAR.</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL</b> .....	<b>29</b>
<b>1.6 MUTACIONES DE NPM1.</b> .....	<b>30</b>
<b>2. JUSTIFICACION</b> .....	<b>35</b>
<b>3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. HIPÓTESIS.</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2. OBJETIVOS</b> .....	<b>40</b>
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 POBLACION A ESTUDIO</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO Y PARTICIPANTES</b> .....	<b>45</b>
<b>4.3 VARIABLES</b> .....	<b>46</b>
<b>4.4 MEDIDAS</b> .....	<b>49</b>
<b>4.5 CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL</b> .....	<b>52</b>
<b>4.6 ANALISIS ESTADISTICO</b> .....	<b>53</b>
<b>4.7 CUESTIONES ÉTICAS</b> .....	<b>54</b>
<b>4. RESULTADOS.</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2 MUTACIÓN NPM1 CON EL RESTO DE VARIABLES</b> .....	<b>63</b>
<b>4.3 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA</b> .....	<b>65</b>
<b>4.4 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICOS</b> .....	<b>78</b>
<b>5. DISCUSION.</b> .....	<b>79</b>
<b>5.1 RESUMEN</b> .....	<b>81</b>
<b>5.2 FORTALEZAS Y LIMITACIONES</b> .....	<b>83</b>
<b>5.3 COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS</b> .....	<b>84</b>
<b>5.4 IMPLICACIONES PARA LA INVESTIGACION Y LA PRACTICA</b> .....	<b>94</b>

<b>6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>95</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>97</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>107</b>



# 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso fisiológico de generación de los diferentes linajes celulares de la sangre para garantizar la homeostasis y las distintas funciones de las células maduras. Es un proceso dinámico, equilibrado y controlado por distintos factores de crecimiento que estimulan la proliferación y señalización celular, así como por factores de transcripción que permiten la diferenciación en los distintos tipos celulares que se derivan de la célula madre hematopoyética.

Las "hematopoyetic stem cell" o células madre hematopoyéticas (HSC) tienen capacidad de auto-renovación y diferenciación en células más maduras de cualquier linaje. En su división generan las células progenitoras multipotenciales (MPP) que pierden dicha capacidad de auto-renovación, pero siguen diferenciándose en un progenitor común linfoide (CLP) y otro mieloide (CMP). Ésta última diferenciación continuará dando lugar a los progenitores eritroides megacariocíticos (MEP) o progenitores granulocíticos monocíticos (GMP), que darán lugar a los distintos tipos de células sanguíneas.

El desequilibrio entre la proliferación y diferenciación dará lugar a la aparición de la leucemia.

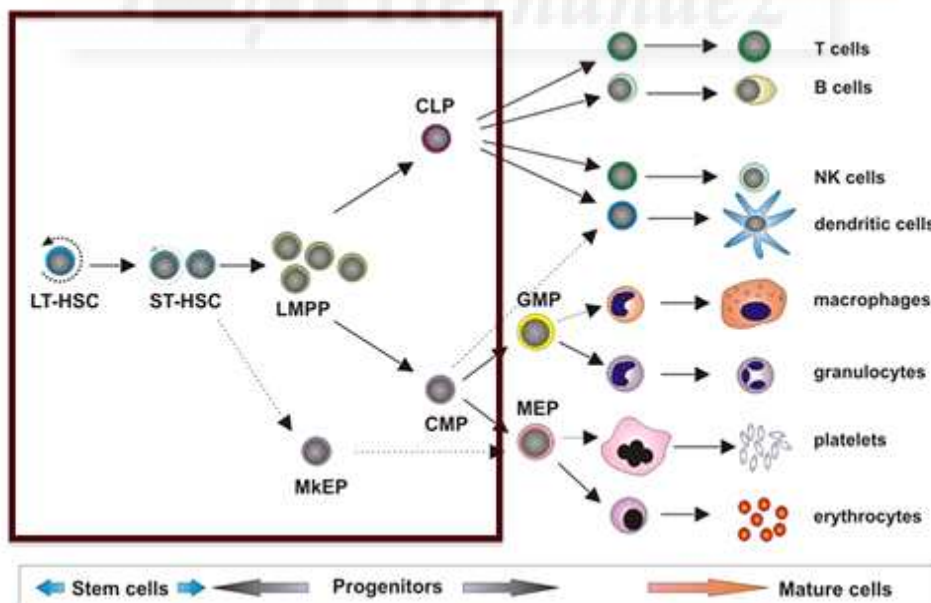


Figura 1. Modelo de hematopoyesis normal. (Schuringa, 2012).

## 1.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad clonal heterogénea resultante de la transformación maligna de células madre hematopoyéticas. Se caracteriza por la presencia de diversas alteraciones genéticas adquiridas en células de estirpe mieloide que alteran sus mecanismos normales de auto-renovación, proliferación y diferenciación celular (Fröhling et al, 2005). Como consecuencia, en la médula ósea se acumulan precursores mieloides inmaduros con capacidad de replicación, pero sin capacidad de diferenciación hacia células hematopoyéticas maduras. De este modo, el espacio medular es ocupado por células tumorales que impiden una hematopoyesis normal, provocando una insuficiencia medular y las consecuencias clínicas que de ello se derivan.

### 1.2.1 INCIDENCIA

La LMA representa aproximadamente el 25% de todas las leucemias del adulto en la población occidental y es el segundo tipo de leucemia más frecuente después de la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC). La incidencia estimada de la LMA *de novo* es de  $3,6/10^5$  habitantes/año aumentando progresivamente con la edad, llegando a ser de  $11,9/10^5$  habitantes/año en adultos mayores de 65 años. Asimismo, la incidencia de la LMA es mayor en hombres que en mujeres, siendo de  $5,6/10^5$  habitantes/año en hombres y de  $2,98/10^5$  habitantes/año en mujeres (*SEER Cancer Statistics Review 1975-2013*, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013)).

Con los tratamientos actuales, aproximadamente se curan un 35-40% de los pacientes de 60 años o menos, y en torno al 5-15% de los pacientes mayores de 60 años (Longo et al, 2015).

### 1.2.2 ETIOLOGÍA

La leucemia aguda es de etiología desconocida y en la mayoría de los casos, aparece de forma esporádica.

Los posibles agentes etiológicos descritos, que pueden estar relacionados con las leucemias en torno 1-2% de los casos, incluyen virus, radiaciones ionizantes, quimioterapia y benceno (WHO Classification of tumors, 2008).

### 1.2.3 LEUCEMOGÉNESIS

Durante muchos años, el modelo aceptado de leucemogénesis es el “two-hit hypothesis” que postula que son necesarias **dos tipos de mutaciones** para dar lugar a la célula leucémica:

- Mutaciones de clase I: que confieren ventaja proliferativa y de supervivencia a la célula, pero que no intervienen en la diferenciación. Son mutaciones que afectan a la transducción de señales principalmente en genes tirosininasas (*FLT3, c-KIT, K-RAS, p53, N-RAS* (Kelly and Gilliland, 2002)).
- Mutaciones de clase II: que confieren capacidad de diferenciación hematopoyética afectando fundamentalmente la función de los factores de transcripción que regulan la hematopoyesis (*PML-RAR $\alpha$ , AML1-ETO, CBF $\beta$ -MYH11, MLL-ENL, AML1, CEBPA, MLL-PTD, NPM1*).

Recientemente, gracias al uso de nuevas técnicas genómicas de secuenciación (NGSs) y a los estudios realizados, se han observado mutaciones en genes que regulan factores epigenéticos como la metilación del ADN o la modificación de histonas (*DNMT3A, TET2, IDH2, ASXL1*), presentes ya en células madre hematopoyéticas preleucémicas y que ocurrirían prontamente en el desarrollo leucémico.

Estos factores epigenéticos modulan la expresión y transcripción de los genes, transitoria o permanentemente (O'Brien et al, 2014) y este hallazgo se postula como el **tercer factor** necesario para la leucemogénesis.

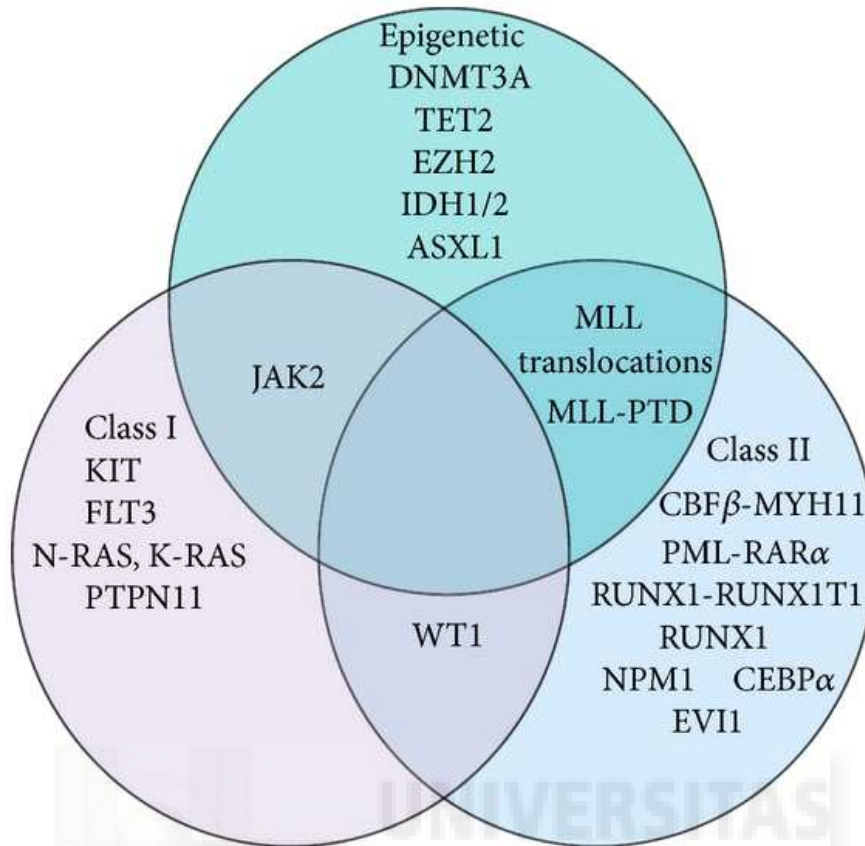


Figura 2. "Visión de la epigenética en la leucemia mieloide aguda. (O'Brien, et al, 2014).

#### 1.2.4 CLÍNICA

Las manifestaciones clínicas de la leucemia aguda mieloblástica son muy variadas y suelen derivar de la pancitopenia originada por la infiltración de la médula ósea por las células tumorales, así como de la infiltración de otros órganos y tejidos.

El paciente suele presentar: anemia, fatiga, fiebre, infecciones, hemorragias, trastornos de la coagulación, hipertrofia gingival y menos frecuentemente al diagnóstico, hepatoesplenomegalia, infiltración cutánea y a nivel de SNC.

Si existe hiperleucocitosis, la aparición de síndrome de lisis tumoral con aumento de LDH, hiperuricemia, hiperpotasemia, hipocalcemia e insuficiencia renal, agrava el cuadro clínico al diagnóstico.

#### 1.2.5 DIAGNÓSTICO

La muestra de sangre periférica orienta al diagnóstico inicial. En la mayoría de ocasiones, el paciente presenta en sangre periférica blastos circulantes observables con



un simple frotis. Pero es necesario un aspirado de médula ósea (esternal o cresta ilíaca) para llevar a cabo un buen proceso diagnóstico y para una correcta caracterización de la patología. En ocasiones, es precisa la biopsia de medular si el aspirado es seco. En términos generales, un porcentaje igual o superior al 20% de blastos sobre la celularidad total de la médula establece el diagnóstico de leucemia aguda.

El diagnóstico de la enfermedad se ha ido perfeccionando con el desarrollo de las diferentes técnicas que se utilizan en la actualidad. Así, en la década de los 70-80, la morfología y citoquímica eran la piedra angular del diagnóstico hematológico. Se basan en las características morfológicas utilizando técnicas de tinción que ponen de manifiesto diferentes estructuras celulares para identificar y clasificar a la célula tumoral. A partir de la década de los 90, empezaron a utilizarse de forma cotidiana otros métodos como:

- **CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA:** la expresión de diferentes antígenos de superficie (CD) en las células neoplásicas nos permite clasificar los diferentes tipos de leucemias.
- **CITOGENÉTICA CONVENCIONAL:** el estudio del cariotipo, de los 23 pares de cromosomas, mediante el análisis de metafases con bandas G (mínimo 20 metafases, para un estudio adecuado), nos permite detectar anomalías estructurales. La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) y técnicas derivadas proporcionan mayor sensibilidad y precisión al estudio.
- **BIOLOGÍA MOLECULAR:** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Array (CGH/SNP/Expresión-array) y más recientemente con las técnicas de secuenciación masiva (NGS) permiten de una manera más rápida y fiable estudiar todo el genoma, dándonos información de las distintas mutaciones presentes en la leucemia y estableciendo patrones de expresión génica relacionadas con alteraciones moleculares específicas y con el curso clínico de la enfermedad.

### **1.2.6 CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS**

Durante muchos años han existido diferentes clasificaciones de la leucemia en base a características etiológicas, morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas. En la década de los 70 la leucemia fue clasificada de acuerdo al sistema FAB (French-

American-British) que utilizaba criterios morfológicos y citoquímicos dando lugar a los diferentes subtipos de LAM: de M1 a M7.

Posteriormente, la WHO (World Health Organization) en colaboración con la EHA (European Association for Haematopathology), publican la tercera (2001) y cuarta edición (2008) de "The WHO Classification of Tumors Haematopoietic and Lymphoid Tissues" como parte de la serie de The WHO Classifications of Tumors "blue book" monograph. Esta nueva clasificación se establece en base a hallazgos citogenéticos y alteraciones moleculares, con la que se pretende incorporar estos aspectos de la enfermedad e interrelacionarlos con la morfología, buscando ser no sólo una herramienta útil desde el punto de vista diagnóstico sino también en la vertiente clínica al correlacionarse de forma más precisa con el pronóstico.

Recientemente se ha publicado la última revisión de 2016 (Arber et al 2016). Esta revisión incluye como novedades más relevantes dos entidades independientes, LAM NPM1 positivo y LAM CEBPA bialélico positivo y queda resumida en ésta tabla:

Tabla 1. Clasificación de la WHO 2016 y su correspondencia FAB.

CLASIFICACION DE LA OMS 2016	FAB
LMA con anomalías recurrentes LMA con t(8;21) (q22;q21); RUNX1-RUNX1T1 LMA con inv(16) (p13;q22) o t(16;16)(p13.1;q22);CBFb-MYH11 LPA con t(15;17) (q22;q21), PML-RARa LMA con inv(3)( q21;q26.2) o t(3;3) (q21;q26.2): RPN1-EVI LMA con t(6;9) (p23;q34); DEK-NUP214 LMA con t(9;11) (p22;q23); MLLT3-MLL LMA megacarioblástica con t(1;22) (p13;q13);RBM-MKL1 LMA con NPM1 mutado LMA con CEBPA bialélico mutado LMA asociada a BCR-ABL (entidad provisional) LMA con RUNX1 mutado (entidad provisional)	
LAM con cambios relacionados con mielodisplasia	
LAM y SMD relacionados con QT previa	
LAM no clasificable en los grupos anteriores LAM mínimamente diferenciada LAM sin maduración	M0 M1

LAM con maduración	M2
Leucemia mielomonocítica aguda	M4
Leucemia monoblástica y monocítica aguda	M5a/M5b
Leucemia eritroide aguda	M6a/M6b
Leucemia megacarioblástica aguda	M7
Leucemia basofílica aguda	
Panmielosis aguda con mielofibrosis	
SARCOMA mieloide	

Según esta clasificación, se establecen 7 categorías:

- LAM con anomalías citogenéticas recurrentes (11% de las LAM) que incluyen:
  - LAM con t(8;21) (q22;q22) con su gen de fusión RUNX1-RUNX1T1. Frecuente en pacientes jóvenes y presenta buen pronóstico. Los blastos poseen un citoplasma de color salmón característico, pueden contener bastones de Auer y expresan marcadores CD19 y CD56 positivos. Suelen presentar eosinofilia en médula ósea.
  - LAM con inv(16) (p13;q22) o t(16;16) (p13;q11) y gen de fusión CBFβ/MYH11. También de aparición clásica en pacientes jóvenes. Los blastos suelen presentar diferenciación granulocítica y monocítica con morfología característica de la leucemia mielomonocítica (M4). Se asocia a la presencia de eosinófilos en médula ósea con algún bastón de Auer y aumento de lisozima sérica.
  - LAM con t(15;17) (p21;q23) y gen de fusión PML-RARα que correspondería a la variante M3 FAB, con presencia de promielocitos atípicos. Son características las alteraciones de la hemostasia que presentan los pacientes al diagnóstico, con marcada hiperfibrinólisis y coagulopatía de consumo.
  - LAM con t(9;11) (p22;q23) y gen de fusión MLLT3-MLL (M4 o M5 FAB) más frecuente en niños y suele acompañarse de infiltración gingival o cutánea (sarcomas).
  - LAM con t(3;3) (q21;q26.2) o inv(3)(q21;q26.2) y gen de fusión RPN1-EVI1, se pueden presentar como LAM de *novo* o derivar de un SMD previo. Los blastos pueden mostrar una morfología característica de cualquier subtipo FAB menos

- M3. Los pacientes suelen presentar anemia con cifras normales o elevadas de plaquetas. En médula ósea existe un aumento de megacariocitos mono o bilobulados, (característico de las anomalías en 3q) y puede asociarse displasia multilineal y a monosomía 7 o delección (5q). Se asocia a mal pronóstico.
- LAM con t(6;9) (p23;q34) y gen de fusión DEK-NUP214, (M2 o M4). A menudo se asocia con displasia multilineal, es más frecuente en niños y tiene mal pronóstico.
  - LAM con t(1;22) (8p13;q13) RBM15-MKL1. En general, se acompaña de marcada hepatoesplenomegalia y se asocia a leucemia aguda en niños (sin Síndrome de Down) de edad inferior a 1 año.
  - LAM con NPM1 mutado: Constituye una tercera parte de las LAM (hasta ahora considerada como entidad provisional). Se asocia en la mitad de los casos a cariotipos normales y a buen pronóstico siempre y cuando no se asocie a FLT3-ITD. Los blastos presentan cromatina laxa e inmadura con depresión en forma de “huella digital”. Expresan frecuentemente CD de diferenciación monocítica (CD14, CD11b) junto con CD13, CD33 y MPO.
  - LAM con CEBPA bialélico mutado: Este gen es un factor de transcripción crítico que controla la expresión genética durante la hematopoyesis. Se encuentra mutado en 10% de las LAM (15-19% de la LAM con cariotipo normal) y confiere buen pronóstico.
  - Como entidades provisionales, la nueva clasificación de la WHO contempla: LAM asociada BCR-ABL y LAM con RUNX1 mutado (Arber et al, 2016).
  - LAM con displasia. Los criterios de inclusión en éste grupo son:
    - Historia previa de SMD o neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa.
    - Alteraciones citogenéticas relacionadas con la mielodisplasia.
    - Presencia de displasia en >50% de las células en >2 líneas mieloides.
  - LAM relacionada con tratamientos previos, sobre todo agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II, debido a su efecto mutagénico.
  - LAM no categorizado previamente: En este grupo se incluyen, entre otros, la mayoría de los subtipos LAM descritos por el grupo FAB basados en las características morfológicas de los elementos blásticos: LAM mínimamente diferenciada MO, LAM sin maduración M1, LAM con maduración M2, LAM

mielomonocítica M4, LAM monoblástica M5a o monocítica M5b, LAM eritroide M6, LAM megacarioblástica M7 y LA basofílica.

Dentro de este grupo, se incluye la Panmielosis aguda con mielofibrosis: Es una proliferación mielóide que se acompaña de una intensa fibrosis en la médula ósea, con marcada pancitopenia y evolución rápidamente progresiva. Se asocia a muy mal pronóstico debido a su mala respuesta al tratamiento

- Sarcoma mielóide: Consiste en una tumoración extramedular formada por blastos mieloides con o sin maduración. Pueden localizarse en todo el organismo aunque es más frecuente en piel, tracto gastrointestinal, ganglios linfáticos, hueso, tejidos blandos y a nivel testicular.
- Proliferaciones mieloides relacionadas con Síndrome de Down: Los pacientes con S. de Down presentan un riesgo entre 10-100 veces superior a presentar una LAM. Un 10% de los recién nacidos con este síndrome muestran una mielopoyesis anormal indistinguible de una LAM megacarioblástica y que suele remitir espontáneamente, pero en un 13-30% de los casos evoluciona a una verdadera LAM en 1 a 3 años. La LAM asociada al S. de Down en un 50% de los casos es la M7 que se asocia a trisomía 21 y mutación adquirida de GATA1.
- Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides. Se trata de una proliferación maligna y agresiva de los precursores de las células dendríticas plasmocitoides que se asocia con frecuencia a infiltración cutánea, de médula ósea y a diseminación leucémica. Es muy poco frecuente y su curso clínico es muy agresivo.

### 1.2.7 FACTORES PRONÓSTICOS:

Podemos dividirlos en tres grandes grupos:

- Los relacionados con el paciente:
  - La edad avanzada, pobre “performance status” y comorbilidades asociadas, que aumentan el riesgo de muerte precoz relacionada con el tratamiento.
  - Una cifra elevada de leucocitos al diagnóstico, padecer un síndrome mielodisplásico previo, haber recibido quimioterapia o radioterapia por otra neoplasia, predicen resistencia al mismo.

- Los relacionados con las características de la célula leucémica:
  - Citogenéticas y alteraciones moleculares de la LAM. Serán discutidas de forma más extensa a continuación ya que son la base de este trabajo.
- La respuesta al tratamiento:
  - Mediante la evaluación de la respuesta al tratamiento de inducción por Enfermedad Mínima Residual determinada por citometría de flujo y más recientemente por PCR, pendiente de ser validado en diferentes estudios. (Döhner et al, 2015). Igualmente serán desarrolladas más extensamente a continuación.

### 1.2.8 TRATAMIENTO

El tratamiento fundamental en pacientes candidatos al mismo, sigue basándose en la quimioterapia convencional con el apoyo, en aquellos casos que lo precisen, del trasplante alogénico o autólogo de progenitores hematopoyéticos. Actualmente se aplican protocolos basados en terapia adaptada al riesgo de recaída del paciente en función de los factores pronósticos anteriormente descritos.

El tratamiento de primera línea consta actualmente de dos fases bien definidas:

- INDUCCION a la remisión, que tiene por objetivo producir la mayor destrucción tumoral posible para restaurar la hematopoyesis normal. Hay diferentes esquemas o protocolos, todos incluyen combinación de antraciclinas durante tres días (idarrubicina o daunorrubicina) y citarabina durante siete días en infusión continua, esquema conocido como “3+7”. Dicho esquema es el administrado a pacientes menores de 65 años, candidatos a quimioterapia intensiva y con él se consiguen respuestas completas en torno al 65-85% (Othus et al, 2014; Burnett et al, 2015).

Esta cifra baja a un 40% cuando se trata de pacientes mayores de 65 años. Su pronóstico empeora no por la edad avanzada “*per se*”, sino porque presentan otros factores asociados, dependientes del paciente (peor tolerancia al tratamiento) y dependientes de la enfermedad (como la presencia de cariotipos adversos, observado frecuentemente en éstos pacientes añosos) que disminuyen las tasas de supervivencia global (Sorró et al, 2014).

Por este motivo, en este grupo de pacientes, dado que no se van a beneficiar de la quimioterapia intensiva estándar, se administran tratamientos atenuados o si es posible, se incluyen en ensayos clínicos, cuyos resultados ayudarán a establecer directrices futuras para conseguir mejores tasas de supervivencia (Löwenberg et al, 2013).

En función de la respuesta obtenida a este primer ciclo (respuesta completa, parcial o refractariedad al tratamiento), se dispone de varias opciones terapéuticas dentro de los protocolos establecidos en cada centro (Guías clínicas NCCN 2016, PETHEMA 2010, etc).

Si se obtiene una respuesta completa, cosa que sucede en una amplia mayoría de los enfermos, se continua con la siguiente fase:

- **CONSOLIDACIÓN-INTENSIFICACIÓN:** Eran conceptos clásicamente diferentes, pero hoy en día se superponen. Básicamente los pacientes son tratados con QT y/o TPH en función del riesgo de recaída.

En nuestro centro, seguimos protocolos del "Programa español de tratamiento de hemopatías malignas" (PETHEMA) en los que actualmente, en los protocolos intensivos en concreto, tras el tratamiento de INDUCCION común a todos los enfermos, los pacientes son estratificados en función del riesgo:

- Grupo favorable (cariotipo favorable, o cariotipo normal con NPM1+/FLT3-, o CEBPA bialélico+, que tras inducción tienen EMR-) son tratados con 2 ciclos de dosis altas de ARA-C y sometido a AUTO TPH si se puede.
- Grupo intermedio: Aquellos que no presentan ni factores de buen pronóstico ni de mal pronóstico. En éstos enfermos, continuamos con consolidación 1, quimioterapia intensiva (ciclo similar a la inducción) seguido de un ciclo de citarabina a dosis altas y tras QT de acondicionamiento, rescate mediante infusión de progenitores hematopoyéticos alogénico en caso de disponer familiar HLA idéntico (Vellenga et al, 2011) y si no se dispone realizamos trasplante autólogo.
- Grupo de alto riesgo: Incluimos en este grupo aquellos pacientes con citogenéticas de alto riesgo, FLT3+ con ratio >0.8, con EMR + (> 0,11%) y aquellos refractarios al primer ciclo de inducción. Reciben consolidación 1 y son llevados a alotrasplante y si el paciente no fuera candidato al mismo por sus características o no se disponga de donante, entonces se realizaría un autólogo.

Con respecto al trasplante de progenitores hematopoyéticos:

El alotrasplante, precedido de quimio y/o radioterapia de acondicionamiento, ofrece una elevada eficacia antitumoral mediante el efecto inmunológico del injerto contra la leucemia (donante contra receptor) pero también una mayor mortalidad relacionada con el procedimiento y las posteriores complicaciones derivadas del mismo, como la enfermedad injerto contra huésped y las infecciones.

Los resultados en cuanto supervivencia global y supervivencia libre de eventos difieren en función de la fuente de progenitores (sangre periférica o médula ósea), de los donantes de que se disponga (familiar HLA idéntico, donante no emparentado, haploidéntico o cordón) y del momento del trasplante.

Hoy en día la fuente de obtención más utilizada, por sus mejores resultados, son las células madre de sangre periférica tras movilización con quimioterapia y/o factores estimulantes de colonias granulocíticas. El “*harvest*” o la obtención directa de médula ósea mediante punción aspiración, ha quedado relegada básicamente para el alotrasplante en hemopatías no neoplásicas.

Por los motivos expuestos anteriormente debe ser relegado a pacientes de alto riesgo de recaída para obtener la mayor relación riesgo-beneficio (Gupta et al, 2011).

Como hemos comentado, el trasplante autólogo se realiza, bien por indicación o como alternativa al trasplante alogénico en muchos casos.

Los enfermos en los que no se realiza trasplante autólogo, por diferentes causas, como consolidación al tratamiento, reciben al menos 2 ciclos de ARA-C altas dosis.

La limitación de los tratamientos utilizados hasta ahora ha obligado a la búsqueda de nuevas alternativas. En los últimos tiempos, gracias al estudio de dianas moleculares y al desarrollo del concepto de terapia dirigida están en marcha numerosos protocolos y ensayos clínicos que ya incluyen el uso de nuevos fármacos capaces de bloquear o revertir alteraciones específicas (anticuerpos monoclonales ej. anti CD33; modificadores epigenéticos, ej. decitabina; inhibidores tirosinkinasa, inhibidores FLT3, kit, etc) (Döhner et al, 2015).

Los pacientes no candidatos a tratamiento quimioterápico intensivo, recibirán consolidaciones atenuadas o participarán en ensayos clínicos (Schlenk et al, 2014). Aunque en estos pacientes mayores las RC son mayores con los esquemas quimioterápicos intensivos "clásicos" (2+5) este hecho no se traduce en mejores tasas de SG, en torno a los 7-12 meses, debido a que presentan más mortalidad durante



inducción. Los esquemas semi-intensivos tipo FLUGA y hipometilantes se han posicionado en los últimos 2-3 años como una buena opción de tratamiento en pacientes mayores sobre todo si son pacientes de alto riesgo citogenético y con mucha expresión blástica. Reducen la mortalidad durante la inducción, la dependencia transfusional y la estancia hospitalaria, aportando buena calidad de vida al paciente y con unas SG superiores a las obtenidas con QT más intensiva (40 % vs 24%).

No obstante, los resultados en éstos pacientes siguen siendo insatisfactorios. Es por ello que hay en marcha numerosos ensayos clínicos con diferentes fármacos, que constituyen en muchas ocasiones la mejor opción terapéutica que podemos ofrecer (Döhner et al, 2017).

En cuanto a los pacientes no candidatos a ningún tipo de tratamiento por sus características y comorbilidades, reciben tratamiento paliativo con soporte transfusional, fármacos citorreductores (hidroxiurea o citarabina a bajas dosis) y manejo de complicaciones asociadas, fundamentalmente infecciosas.



### 1.3 CITOGENÉTICA.

En la actualidad, el análisis citogenético al momento del diagnóstico de la LMA es considerado como uno de los factores pronóstico más importantes. Son varios los estudios que demuestran de forma fehaciente que las alteraciones citogenéticas tienen una marcada influencia en la presentación y evolución de la LMA. Los hallazgos a nivel del cariotipo o su contrapartida molecular tienen un altísimo valor predictivo sobre las tasas de remisión completa (RC), la supervivencia libre de enfermedad (SLE), el riesgo de recaída (RR) y la supervivencia global (SG). El estudio citogenético, en forma de cariotipo o FISH para las alteraciones más importantes, se ha convertido en una herramienta necesaria para el manejo de la LMA y permite la diferenciación de tres grupos con pronóstico diferente: favorable, intermedio y alto (Grimwade, 2010; Saultz et al, 2015).

Dejando al margen la LPA, sólo dos alteraciones citogenéticas se asocian a un pronóstico favorable, la  $t(8;21)(q22;q22)$  y la  $inv(16)(p13;q22)$  (Cheeson et al, 2003). Representan en torno al 25% de las LAM. Ambas alteraciones tienen en común que resultan del "Core Binding Factor" (CBF), factor de transcripción heterodímero alfa/beta, involucrado en la regulación de la transcripción de la mayoría de los genes que participan en la hematopoyesis. La disrupción de CBF y las alteraciones estructurales posteriores dan lugar a dos transcritos que engloban los genes encargados de la codificación de los dos heterodímeros del CBF,  $CBF\alpha$  y  $CBF\beta$ . Dichos transcritos o genes de fusión son AML1/ETO y  $CBF\beta$ /MYH11, respectivamente.

Prácticamente todos los pacientes con  $t(8;21)$  alcanzan RC (98%) y muestran un RR y SG mejor que el resto de grupo. Aunque las tasas de RC en los pacientes con  $inv(16)$  es más baja parece que 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. Los pacientes con leucemias CBF tienen un riesgo de recidiva menor al observado en los grupos de riesgo intermedio y alto y parece que se benefician especialmente del tratamiento con altas dosis de citarabina durante la consolidación. La presencia de anomalías cromosómicas adicionales no empeora el pronóstico de estos pacientes.

En el extremo opuesto se sitúan los pacientes con cariotipo de alto riesgo portadores de alteraciones etiquetadas como de mal pronóstico: inv(3) o t(3;3) con gen de fusión GATA2-MECO(EVI1), t(6;9)DEK-NUP214, t(v;11)KMT2A reordenado, -5q o del(5q), -7 o del(7q) abn(17p) o cariotipo complejo (presencia de 3 o más anomalías cromosómicas). Estos pacientes muestran un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción con una elevada probabilidad de recidiva y en consecuencia una baja SG (5-14%). Cabe destacar que en la última clasificación MRC (Grimwade et al,2010) la t(6;9) está incluida en el grupo de pronóstico intermedio.

Los pacientes con cariotipo normal, con t(9;11) MLLT3-KMT2A o aquellos que son portadores de alteraciones no clasificables en los grupos de riesgo favorable o alto constituyen lo que se conoce como grupo de riesgo intermedio. Se trata de un grupo altamente heterogéneo, que comprende a la mayoría de pacientes con LMA en torno 45-60%. Las alteraciones de este grupo intermedio que vayan en compañía de alteraciones moleculares de buen pronóstico pasan a ser consideradas como favorables en esos casos y viceversa con las que se acompañan de alteraciones de mal pronóstico (FLT3, CEBPA y NPM1). Si bien la supervivencia libre de enfermedad en el grupo de riesgo intermedio es mejor que la observada en el grupo de mal pronóstico, existe una amplia variabilidad en la evolución clínica de estos pacientes. Por ello se hace necesario refinar el pronóstico de este subgrupo mediante el empleo de marcadores moleculares específicos, como se verá posteriormente.

Tabla 2. Clasificación pronóstica según cariotipo (MRC, Grimwade 1998).

Grupos Pronóstico	Alteraciones citogenéticas
Favorable	t(8;21) o equivalente molecular inv(16) o t(16;16) o equivalente molecular
Intermedio	Normal, t(9;11) o equivalente molecular, otras anomalías no clasificadas como favorables o desfavorables
Desfavorable	-5/del(5q), -7/del(7q), inv(3) o t(3;3) o equivalente molecular, abn(17p), t(v;11) o equivalente molecular, t(6;9) o equivalente molecular, t(9;22) o equivalente molecular, cariotipos complejos con > 3 anomalías

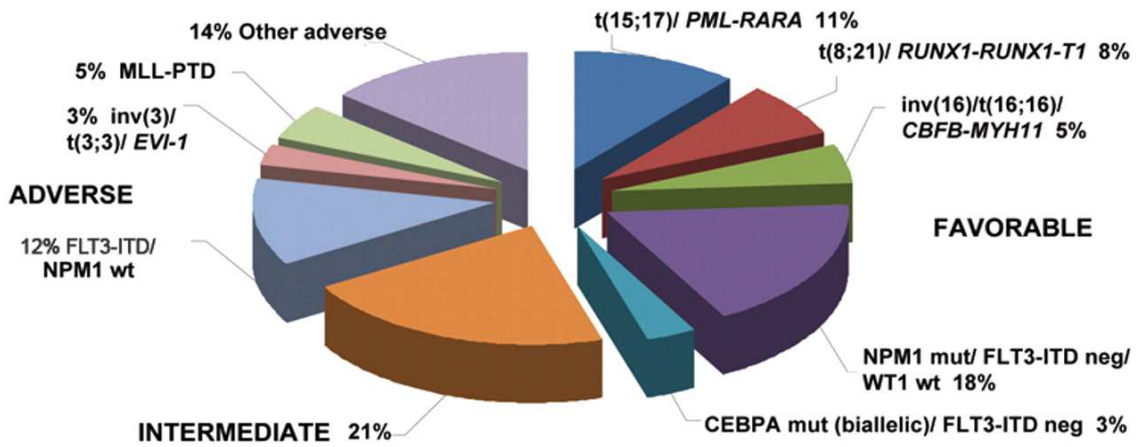


Figura 3: Frecuencia de los subgrupos pronósticos (Grimwade, ASH 2009).

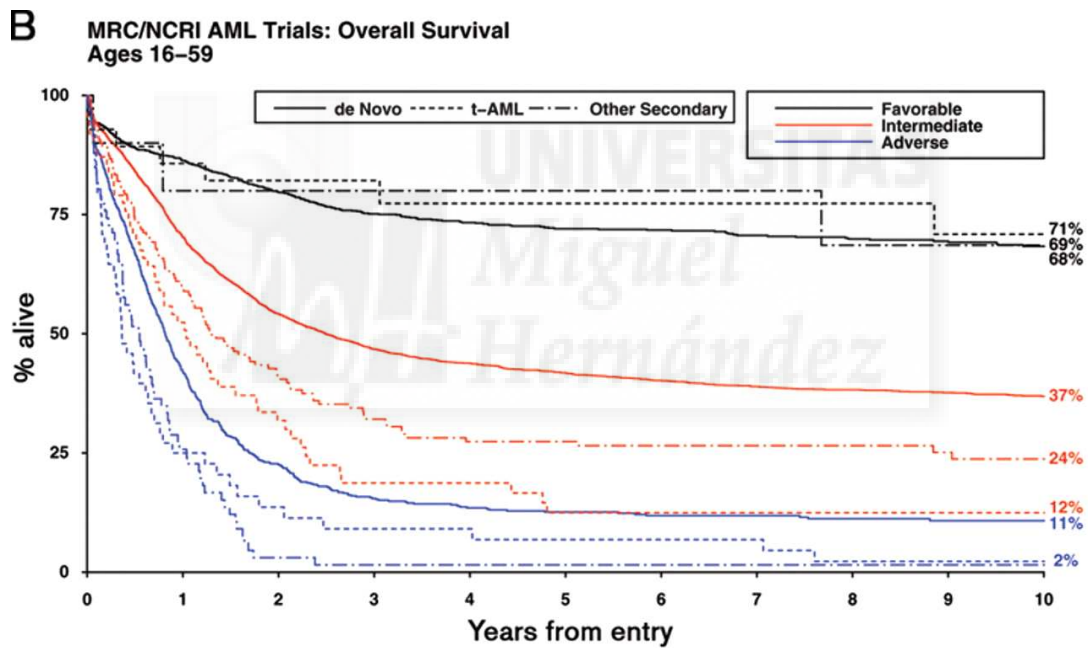


Figura 4. Supervivencia global en función del riesgo citogenético (Grimwade 2009).

## 1.4 BIOLOGÍA MOLECULAR

### 1.4.1 Diagnóstico

Gracias a las nuevas técnicas diagnósticas, se ha avanzado mucho en el terreno de la biología molecular en Oncohematología. En el año 2013 se publicó un estudio la secuenciación masiva de 200 adultos de LMA dentro del proyecto *Cancer Genome Atlas* (TCGA). De estos resultados se desprende que la leucemia en comparación con otros tumores sólidos presenta un número muy bajo de mutaciones, que muchas de las mismas ocurren en único paciente y que pocas son recurrentes (una media de 13 en los pacientes estudiados, de los cuales sólo 5 aparecen recurrentemente mutados).

Concluyen que un total de 23 genes se encuentran significativamente mutados en la LMA: *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH2*, *IDH1*, *TET2*, *RUNX1*, *TP53*, *NRAS*, *WT1*, *PTPN11*, *KIT*, *U2AF1*, *KRAS*, *SMC1A*, *SMC3*, *PHF6*, *STAG2*, *RAD21*, *FAM5C*, *EZH2* y *HNRNPK*.

Recientemente, Papaemmanuil et al (2016), han publicado un estudio en el que secuenciaron 111 genes de 1540 pacientes con leucemia mieloide aguda. Hallaron 5231 mutaciones *drivers* en 76 genes, de los cuales los más frecuentemente mutados eran los referidos en el estudio anteriormente citado, ratificando los resultados del mismo. Determinaron también que un 86% de los pacientes presentaban 2 o más mutaciones *drivers* adquiridas a lo largo de la evolución de la enfermedad (al igual que en el anterior estudio).

Algunas de estas mutaciones están relacionadas con factores epigenéticos del tumor: *DNMT3*, *ASXL1*, *IDH1/2* y *TET2*, se adquieren precozmente y aparecen mutados en personas mayores con hematopoyesis clonal incrementando el riesgo a padecer neoplasias hematológicas. Otras como *NPM1* aparecen como evento secundario en la mayoría de las leucemias.

De todo esto, se deduce la coexistencia de varios subclones celulares durante la evolución tumoral, con adquisición y pérdida de diferentes mutaciones que provocarán cambios en el curso clínico y pronóstico de la leucemia (Döhner et al, 2015; Papaemmanuil et al, 2016).

Actualmente, de todas las mutaciones mencionadas, sólo las que afectan a ***FLT3***, ***ITD***, ***NPM1*** y ***CEBPA*** bialélico, tienen repercusión en la práctica clínica a la hora de clasificar y tratar la leucemia, y por estos motivos su determinación se incluye

actualmente en el diagnóstico de las LAM, mientras que las restantes mutaciones deben ser consideradas desde un punto de vista investigacional.

Según el estudio de Papaemmanuil y revisiones recientes concluyen que las mutaciones en RUNX1, TP53, IDH2, DNMT3A, SRSF2, ASXL y MLL deberán ser incorporadas próximamente en las guías pronósticas debido a su repercusión clínica.

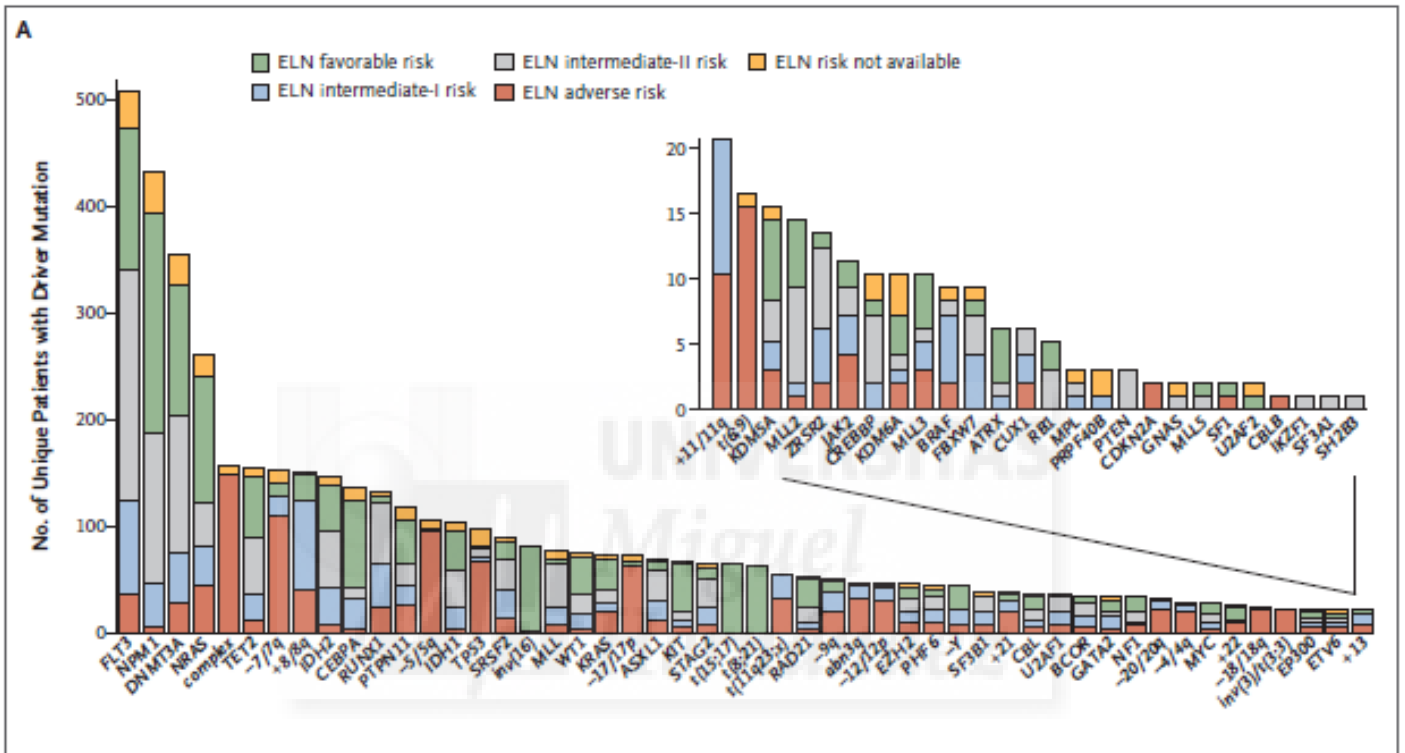


Figura 5. Muestra de los eventos “drivers” en 1540 pacientes con LAM. Cada columna representa una lesión driver diferente; la lesión incluye mutaciones genéticas, aneuploidías cromosómicas, genes de fusión y cariotipos complejos. Los colores en cada columna indican el riesgo molecular según la clasificación de ELN. Extraída de Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia (Papaemmanuil et al NEJM 2016).

### 1.4.2 Pronóstico

La incorporación de marcadores moleculares ha permitido mejorar la estratificación pronóstica de los pacientes y se hace necesaria en la actualidad para el manejo clínico de los enfermos.

Tabla 3. Clasificación pronóstica basada en la citogenética según la ELN (European Leukemia Net). (Döhner, Blood 2017).

Risk category	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22)or t(16;16)(13.1q;22) ;CBFB-MYH11
	Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD <sup>low</sup>
	Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD <sup>high</sup>
	Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD <sup>low</sup> (without adverse-risk genetic lesions)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i>
	–5 or del(5q); –7; –17/abn(17p)
	Complex karyotype, monosomal karyotype
	Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD <sup>high</sup>
	Mutated <i>RUNX1</i>
	Mutated <i>ASXL1</i>
	Mutated <i>TP53</i>

Como se ha visto anteriormente hay una serie de mutaciones descritas, de presentación aislada o asociadas entre sí, como patrones de expresión génica de la LAM, que van a condicionar de forma importante el pronóstico y curso clínico de la enfermedad, así como el tratamiento a administrar, ya que para muchas de estas mutaciones existen drogas específicas, que permiten llevar a cabo lo que se denomina “*targeted therapy*”.

En la actualidad sólo las duplicaciones en tándem de FLT3 (FLT3-ITD) y las mutaciones de NPM1 y CEBP $\alpha$  condicionan de manera importante el pronóstico de los pacientes con cariotipo de riesgo intermedio (que aparecen más frecuentemente asociados a cariotipos normales en un promedio de 30%, 50% y 17% respectivamente) y su estudio permite diferenciar distintos subgrupos en cuanto al riesgo estimado de recidiva y la supervivencia libre de enfermedad (Saultz et al, 2016; Dönher et al, 2016):

#### **1.4.3 El receptor Tirosin kinasa FMS-like (FLT3):**

Pertenece a la familia de los receptores tirosín kinasa de clase 3, conocido también como *stem cell kinase 1* (STK1) o kinasa fetal hepática 2 (flk2). El gen que codifica este receptor se encuentra en el cromosoma 13 (13q12).

El receptor FLT3 se expresa fundamentalmente en las células hematopoyéticas progenitoras y media la diferenciación y proliferación de las mismas. Entre las alteraciones más importantes destacan por su frecuencia e implicación pronóstica las duplicaciones internas en tándem de FLT3 (FLT3-ITD). FLT3-ITD se observa en la LMA con una prevalencia entre el 20 al 27%. La duplicación afecta a un segmento de la secuencia codificadora del dominio yuxtamembrana (exones 14 y 15) y sucede siempre sin afectar a la pauta de lectura (Reckzeh et al, 2012).

El otro tipo de alteraciones encontradas son las mutaciones puntuales de “Asp 835” afectando al dominio tirosín kinasa de FLT3. Estas suceden con una frecuencia en torno al 20% en los pacientes con LMA, aunque puede alcanzar hasta el 40% de los pacientes con cariotipo normal.

Aunque existen algunas discrepancias, casi todos los estudios publicados hasta la fecha coinciden en otorgar un papel pronóstico adverso para la presencia de FLT3-ITD (Martinelli et al, 2013). Por tanto, la peor evolución de los pacientes con mutaciones de



FLT3 vendría determinada fundamentalmente por un mayor RR y menor SLE. Un importante tema de discusión y debate en la actualidad debido a la incertidumbre que existe en torno al mismo, es el valor pronóstico que puede tener la cantidad de blastos portadores de la mutación FLT3-ITD, que parece estar confiriendo un pronóstico desfavorable, que podría incluso acentuarse cuanto mayor sea dicha cantidad. Diversos estudios empleando *GeneScan* establecieron una relación o ratio entre la cantidad del alelo mutado y el alelo "wild-type" y SG. Muestran como en los pacientes con ratios elevados, presentan peor pronóstico en cuanto SLE y SG, aunque el punto de corte para establecer qué pacientes tienen riesgo aumentado no está definitivamente definido (varían de 0.5-0.8) (Thiede et al, 2002; Blau et al, 2013; Pratcorona et al, 2013).

Debido a éste motivo, ni WHO ni ELN contemplan actualmente la ratio en la clasificación y pronóstico de la LAM en adulto (Arber et al, 2016).

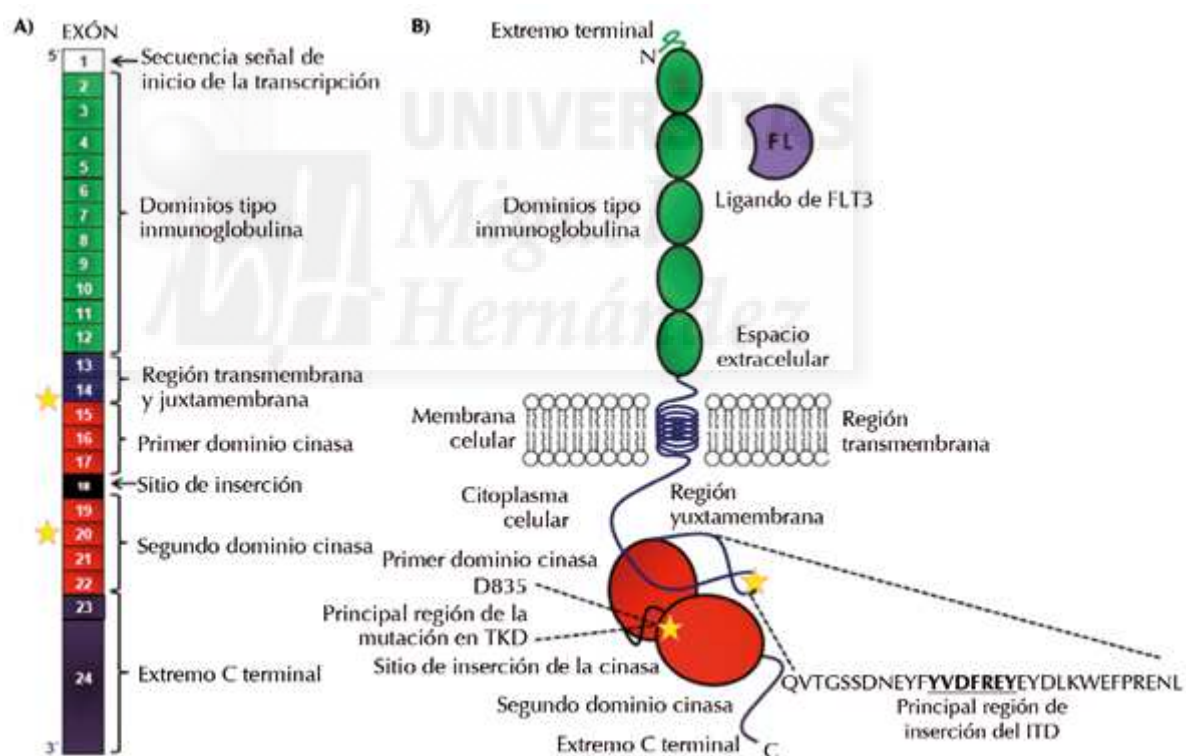


Figura 6. Las dos mutaciones en FLT3 se detallan con estrellas (Langer et al, 2015).

Por otro lado, a pesar de que los datos son en ocasiones contradictorios y el análisis difícil por su baja incidencia, las mutaciones FLT3-D835 parecen acompañarse también de un pronóstico adverso en los pacientes de riesgo citogenético intermedio o cariotipo normal (Grundler et al, 2005). Existen evidencias de que, aunque ambas

alteraciones suponen una activación constitutiva del receptor, la cascada de señales que originan y, por tanto, las vías sobre las que actúan, no son equivalentes (Choudhary et al, 2005).

En lo referente al tratamiento existe amplia experiencia, al menos en forma de ensayos clínicos fase I y II, con inhibidores de la proteína FLT3, dirigidos tanto a las mutaciones FLT3-ITD como a las FLT3-TKD como se referirá posteriormente.

#### 1.4.4 CEBPA bialélico

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia “*CCAAT/enhancer binding protein*” (CEBP) participan en el equilibrio entre proliferación celular y detención mitótica del crecimiento durante la diferenciación terminal. Dentro de esta familia de proteínas destaca CEBPA, proteína que regula un programa de genes críticos para el establecimiento de la identidad y diferenciación mieloide (Dufour et al, 2010; Nerlov et al, 2004).

El gen CEBPA se encuentra localizado en 19q31, posee un único exón sin tener intrones y codifica dos isoformas p30 y p42. Las mutaciones que afectan a este gen, causando la inactivación del mismo, ocurren en un 15-19% de los pacientes con LMA de cariotipo normal y en un 6-10% del total de casos de esta patología (Saultz et al, 2016) y han sido asociadas con pronóstico relativamente favorable, ganando interés como marcador pronóstico, aunque no se conozca todavía la razón.

Se asocian a los subtipos M1 y M2 de la FAB y no se detectan en LAM t(8;21), LAM inv(16) ni en LAP t(15;17). Los pacientes presentan cifras de hemoglobina normal, trombopenia y cifras elevadas de blastos en sangre periférica.

Hay una gran variedad de mutaciones, pero dos son las más frecuentes: las mutaciones en la región N-terminal, y las mutaciones en la región del dominio básico de leucina (bZIP) C-terminal (Dufour et al, 2010), localizadas en dos alelos diferentes.

Los pacientes con las dos mutaciones (CEBPA bialélico) presentan una mejor mediana de SG cuando se comparan con pacientes sin mutaciones en CEBPA (wtCEBPA) observándose también que el hecho de presentar dos mutaciones, no se asocia nunca con *NPM1* mutado y raramente con *FLT3-ITD*. Mientras que, los pacientes con una sola mutación (CEBPA monoalélico), presentan una frecuencia similar de *NPM1* mutado y una asociación significativamente mayor con *FLT3-ITD* en comparación con los pacientes sin mutaciones en CEBPA (Wouters et al, 2009).

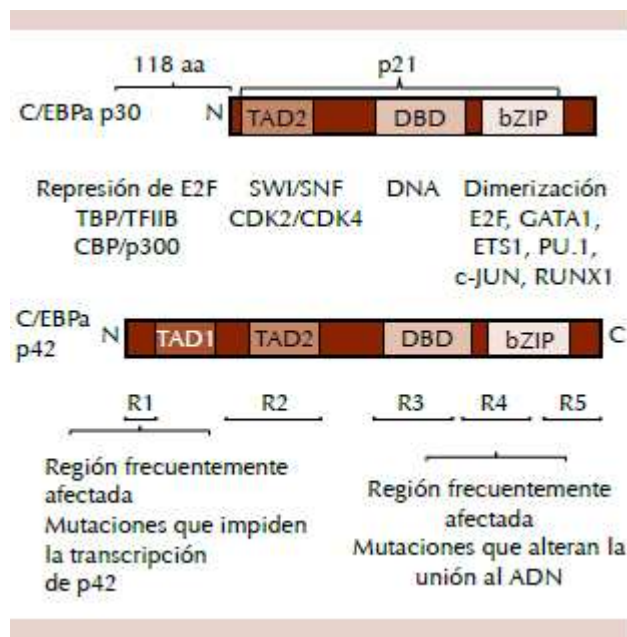


Figura 8. MUTACION CEBPA. Se observan las dos isoformas o alelos, p30 y p42 (Extraída de Rev Hem Mex, 2015).

#### 1.4.5 Otros genes:

A continuación, se reseñan otros genes importantes (de momento desde el punto de vista investigacional) que se pueden encontrar mutados en las LAM (Dönher et al, 2015):

- DNMT3 (frecuencia 18-22%): Factor epigenético implicado metilación de ADN y su mantenimiento; controla la regulación de la expresión génica. Su mutación genera alteración en la iniciación, evento precoz en la leucemogénesis y puede persistir durante la remisión. Su incidencia se incrementa con la edad y aparece en cariotipos normales, se piensa que confiere mal pronóstico cuando se asocia a mutaciones de NPM y FLT3 (Shlush et al, 2014; Gaidzik et al, 2013).
- TET2 (frecuencia 7-25%): El gen TET2 regula el desarrollo hematopoyético en las fases embrionarias mediante mecanismos epigenético. Las mutaciones de TET2 son autoexcluyentes con las mutaciones de IDH1 e IDH2, lo que sugiere un defecto epigenético similar. Todavía su significado pronóstico no está establecido. Al igual que DNMT3 es un evento precoz en la leucemogénesis y su incidencia se incrementa en pacientes mayores (Marcucci et al, 2010; Metzeler et al, 2011).

- IDH1, IDH 2 (frecuencia 7-19%): Su mutación genera el acúmulo de un metabolito que favorece la iniciación y progresión de la leucemia. Parece que asociadas (sobretudo IDH1) a LAM con cariotipo normal NPM mutado y FLT3 negativo, confieren peor pronóstico en este subgrupo (Fathi et al, 2015; Paschka et al, 2010).
- NRAS frecuencia 15%): Generan proteínas asociadas a la membrana que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis. El pronóstico de estas mutaciones es controvertido (Boissel et al, 2006).
- RUNX1 (frecuencia 5-15%): Puede ser activador o represor de los genes sobre los que actúa. Esta mutación se asocia a peores resultados porque predice resistencia a quimioterapia de inducción (Mendel et al, 2014).
- ASXL1 (frecuencia 5-17%): Este gen está involucrado en la regulación de la metilación de histonas, es un evento precoz en la leucemogénesis y suele presentarse en LAM secundarias y asociadas a mutaciones de RUNX (confiriendo peor pronóstico) SRSF2 e IDH2 (Alperman et al, 2015).
- TP53 (frecuencia 8-14%): Gen supresor tumoral. Las mutaciones y deleciones aparecen en LAM con cariotipo complejo y son raras en ausencia de deleciones cromosómicas. Se asocia a mal pronóstico debido a la quimiorresistencia que confiere a la célula (Haferlach et al, 2008).
- MLL (frecuencia 11%): Las más frecuentes engloban translocaciones que involucran a 11q23, siendo las más frecuentes t(9;11), t(11;19), t(6;11). Éstas y las duplicaciones parciales del gen que se asocian a trisomía 11 o a cariotipo normal, confieren peor pronóstico (Caligiuri et al, 1998).
- C-KIT (frecuencia <5%): Codifica unas proteínas de membrana que son receptores tirosín kinasas y juegan un papel importante en la hematopoyesis. Las mutaciones, se producen en los exones 8 y 17 aparecen en el 25-30% de las LAM CBF, proporcionan una ventaja proliferativa o de supervivencia a las células blásticas y confieren mal pronóstico especialmente a las LAM t(8;21). Se están desarrollando ensayos con Inhibidores de tirosinkinasa asociados a quimioterapia convencional para pacientes con mutaciones de c-kit (Paschka et al, 2006).

## 1.5 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

La persistencia o desaparición de blastos durante la inducción, tras ella, después de la consolidación y durante el seguimiento posterior se ha estudiado por técnicas más sensibles que las morfológicas, que consideran que un paciente está en remisión completa morfológica cuando en médula ósea presenta menos de 5% de blastos.

La enfermedad mínima residual se define como aquellas células blásticas que son indetectables mediante morfología, pero detectables gracias a otras técnicas diagnósticas, como la citometría de flujo multiparamétrica, con una sensibilidad para detectar una célula leucémica entre  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  células nucleadas. En los últimos años se está estandarizando el estudio de EMR por RT-qPCR, capaz de hallar una célula leucémica entre un millón (Freeman et al, 2008) y más recientemente mediante Next Generation Sequencing (NGS) en determinadas LAM aumentando así la sensibilidad diagnóstica con el fin de predecir con mucha antelación recaídas futuras (Grimwade et al, 2014)

La positividad y los valores de la enfermedad mínima residual tras el tratamiento de inducción (EMR negativa  $<0.01\%$ ) va a ser un factor pronóstico independiente y aumentará el riesgo de recaída leucémica de los pacientes (Perea et al, 2006), constituyendo una herramienta importante a la hora de estratificar al paciente en los distintos grupos de riesgo y elegir la estrategia a seguir adaptada a ese riesgo (Buccisano et al, 2010). Así mismo la EMR estudiada en diferentes momentos y con distintos puntos de corte durante el curso de la enfermedad, ayudará a predecir recaídas futuras (Venditti et al, 2000; Feller et al, 2004).

En la práctica clínica, la técnica más utilizada y estandarizada es la citometría de flujo multiparamétrica, ya que es prácticamente útil en todos los subgrupos de leucemia, aunque a veces su sensibilidad sea subóptima, por ejemplo, por aparición de inmunofenotipos aberrantes diferentes al inmunofenotipo de la clona al diagnóstico.

La detección de EMR por PCR de momento no tiene el mismo valor en todos los subtipos de LAM, aunque el grado de concordancia entre ambas técnicas puede ser hasta del 85%. Actualmente el seguimiento por PCR tiene mayor interés en la práctica clínica para determinar si la EMR aumenta, disminuye o permanece estable en el tiempo. Únicamente es en la leucemia aguda promielocítica donde tiene mayor relevancia.

## 1.6 MUTACIONES DE NPM1.

Es una alteración molecular con un marcado papel en la evolución de la LMA son las mutaciones de NPM1. Varios trabajos han analizado su impacto en el pronóstico de los pacientes con LMA, así como su relación con las distintas características clínico-biológicas. La incidencia de mutaciones de NPM1 oscila entre 25 y 53% de las LMA, siendo significativamente más frecuente en los pacientes con cariotipo normal (46-67%). Las mutaciones de NPM1 se asocian con los subtipos FAB M4 y M5 fundamentalmente, sin que se observen en la LMA M3. Suelen tener una cifra de leucocitos más alta, ser más frecuente en mujeres, asociarse a una cifra de plaquetas más elevada, una cifra mayor de blastos en médula ósea y una expresión menor de CD34.

El gen NPM1 contiene 12 exones y se encuentra localizado en el cromosoma 5 (5q35). Codifica una proteína, la nucleofosmina, que reside principalmente en el nucleolo, pero se transporta rápidamente hacia el citoplasma y que funciona como una histona chaperona que participa en diferentes e importantes vías celulares como el control de la formación del complejo ribosomal, estabilización de oncogenes supresores y regulación de la duplicación del centrosoma. (Fallini et al, 2005)

En condiciones normales, la importación de NPM1, es superior a la exportación hacia el citoplasma.

Las mutaciones de NPM1 se localizan más frecuentemente en el exón 12. Hay aproximadamente hasta 50 variante genéticas, pero la más frecuente (95% de los casos) se produce en la posición del nucleótido 960, que da lugar a una duplicación de los nucleótidos TCTG en las posiciones 956-959 y es conocida como variante A. Las variantes B y D también presentan mutaciones en exón 12 (Ragunas, 2015).

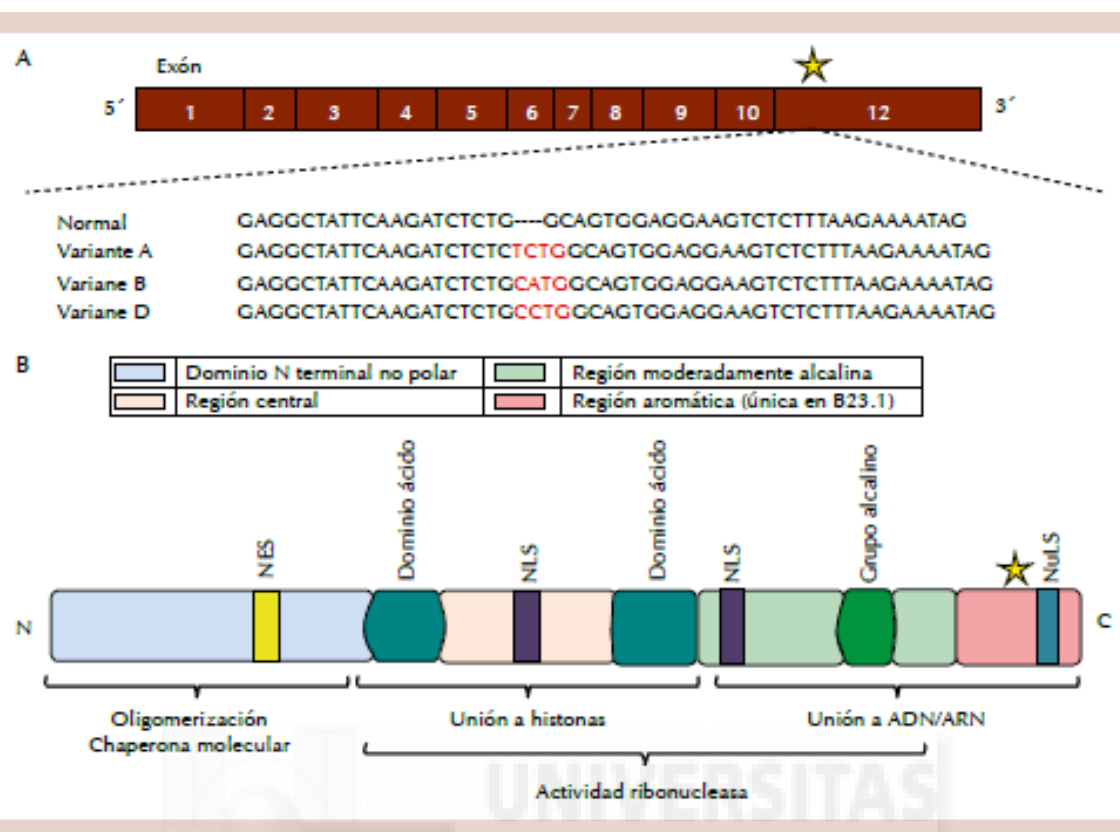


Figura 7. Mutaciones en el gen NPM1 (Extraída de Rev Hem Mex, 2015).A) El gen posee 12 exones, del 1-3 codifican el extremo N terminal donde se localiza la señal de exportación nuclear; el exón 4 contiene un dominio ácido de unión a metales (MB). El segmento entre los exones 5-7 codifica los dominios ácidos y la región de separación, la otra parte del exón 7 y del exón 8 presentan la señal de localización nuclear. Los exones 9-12 codifican el extremo C terminal, que contiene la señal de localización nucleolar. Las principales mutaciones asociadas con la LAM ocurren en el exón 12, sobretodo variante A. B) La proteína NPM1 es una histona chaperona nucleolar, las mutaciones descritas modifican la señal de localización nucleolar permitiendo que permanezca más tiempo dentro del citoplasma celular. El sitio de mutación se detalla con una estrella. NES: señal de exportación nucleolar. NLS: señal de localización nuclear. NuLS: señal de localización nucleolar.

Esta mutación A, da como resultado una proteína más larga con una secuencia aminoacídica diferente en el extremo C-terminal. Estas variaciones a nivel de C-terminal son las responsables de la localización citoplasmática de la proteína resultante, a través de la generación de dos nuevos motivos de señalización de exportación nuclear (NES) y a través de la pérdida de dos residuos de triptófano en las posiciones 288 y 290 que posibilitan el desplegamiento del dominio C-terminal y con ello la pérdida de la capacidad de mantenerse unida al nucleolo (Fallini et al, 2007).

Las mutaciones rara vez tienen lugar en otros exones como el exón 9 o el exón 11. En estos casos, no obstante, las proteínas mutadas se localizan igualmente en el



citoplasma en un proceso regulado por el mismo mecanismo que rige el que tiene lugar con las mutaciones del exón 12.

Las proteínas NPM1 mutadas citoplasmáticas contribuyen al desarrollo de la LMA a través de la inactivación de *p19Arf* mediante la deslocalización de la proteína supresora de tumores. El resultado es una actividad reducida para *p19Arf*, tanto en el caso de la dependiente de p53 como en el de la independiente. La estabilidad de p19Arf se ve comprometida con la proteína NPM1 mutada, capaz de ejercer un efecto regulador debilitador sobre la detención del ciclo celular dependiente de p53 (Colombo et al, 2006), es decir protege a las células hematológicas de la acción apoptótica de p53 (Li et al, 2005). A su vez, la proteína NPM1 mutada puede unirse a NF-kappaB, deslocalizarla al citoplasma e inducir su inactivación. Esta inactivación, parece ser la responsable de las altas tasas de respuesta a la quimioterapia que caracteriza a los pacientes con LMA y NPM1 mutado (Grandage et al, 2005).

Diversos autores han analizado la posible correlación entre la presencia de las mutaciones NPM1 y la presencia de mutaciones en otros genes, especialmente con FLT3 (Renneville et al, 2008), hasta en un 40 % de los casos (Saultz et al 2016) (Merino, 2010) Existen evidencias de que las mutaciones NPM1 son un evento anterior a la adquisición de mutaciones FLT3, sugiriendo que puedan ser un evento primario en la leucemogénesis (Gale et al, 2008). Se postulan como la lesión genética primaria en el 60% de las LMA, en cooperación con otras alteraciones secundarias que serían las de mayor peso en la leucemogénesis, tales como aberraciones cromosómicas (15% de los casos) (Fallini et al, 2005) y mutaciones (60% de los casos) en los genes FLT3 (FLT3-ITD y FLT3-TKD) NRAS, IDH1 y TET2. En el caso concreto de las mutaciones FLT3-ITD y FLT3-TKD, se ha visto que son menos estables que la mutación NPM1, perdiéndose en las recaídas en aproximadamente el 9% y 50% de los casos respectivamente (Shih et al, 2002).

En cuanto al buen pronóstico de los pacientes NPM1+, no sucede lo mismo con aquellos presentan al diagnóstico o que adquieren posteriormente FLT3+. Esta mutación induce vías antiapoptóticas y proliferativas en las células tumorales, especialmente vía STAT 5 (Thiede et al, 2006) que dominan el fenotipo leucémico, pasando a tener mal pronóstico, sobretodo y como hemos comentado anteriormente, en los pacientes con FLT3+ ratios>0.5-0.8.

Desde el descubrimiento de la LMA con mutaciones NPM1 en 2005, diversos estudios han permitido que se considere como entidad independiente en la clasificación



de las neoplasias mieloides de la OMS en 2016. Debido a trabajos recientes, se ha observado que la mutación es capaz de influir la hematopoyesis en modelos experimentales, que la alteración está ya presente en las células madre de los pacientes con este tipo de leucemias y que son mutuamente exclusivas de otras mutaciones, como las bialélicas de CEBPA. Ambas mutaciones NPM1 y CEBPA bialélico, definen dos subgrupos de LMA con un patrón de expresión génica diferente, con unas características genéticas, clínicas, patológicas, inmunofenotípicas y citogenéticas que difieren de las de otros tipos de LMA (Verhaak et al, 2005).

Desde el punto de vista de la evolución de los pacientes, la mayoría de trabajos han otorgado siempre un papel favorable a las mutaciones NPM1. No obstante, ese pronóstico favorable se observa fundamentalmente en los pacientes con mutaciones NPM1, pero sin FLT3-ITD, que alcanzan tasas de RC, SLE y SG superiores a las observadas en pacientes con mutaciones concomitantes de NPM1 y FLT3-ITD (Chou et al, 2006).

Hay trabajos que por el contrario otorgan un pronóstico desfavorable a las mutaciones NPM, debido a la influencia negativa del inmunofenotipo CD HLA-DR+, CD34+ y CD7+ de las células leucémicas (Chen et al 2013), independientemente de la presencia de FLT3.

Las mutaciones de NPM son muy estables, generalmente la pérdida de mutación se asocia con cambios de cariotipo de normal a anormal, por esta razón se sugiere el uso de NPM1 como marcador para vigilar enfermedad mínima residual (Ivey et al, 2016).

Por el hecho de que estas alteraciones representan la anomalía genética más frecuente conocida en esta patología y por el hecho de conllevar significación pronóstica, la mutación NPM1, al igual que sucede con FLT3, la convierten en una atractiva diana para el desarrollo de estrategias terapéuticas (adición de Gentuzumab o ATRA)



## 2. JUSTIFICACION

Los avances en la caracterización biológica de la LMA permiten en la actualidad realizar una estimación apropiada del riesgo de recidiva y probabilidad de supervivencia de diferentes grupos de pacientes según la expresión de distintos parámetros de la enfermedad. Los factores dependientes de la enfermedad, como el cariotipo, las alteraciones moleculares que afectan a determinados genes y los relacionados con la respuesta al tratamiento, como la enfermedad mínima residual por citometría de flujo y la respuesta al primer ciclo de inducción son variables que deben ser tenidas en consideración a la hora de planificar el tratamiento de primera línea de un paciente con LMA. También los factores dependientes del paciente (ECOG, edad, comorbilidades) parecen jugar un papel importante en el pronóstico. En este estudio observacional queremos corroborar que, en concreto, las LAM NPM1+ diagnosticadas en nuestra población a estudio asocian determinadas características clínico-biológicas y se comportan según la bibliografía referida.



### 3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS





### 3.1. HIPÓTESIS.

Las mutaciones de NPM1 son alteraciones moleculares implicadas en la leucemogénesis asociadas a buen pronóstico en determinados subgrupos de pacientes. Por ello, cabe suponer que la presencia de estas alteraciones pudiera definir un patrón de comportamiento biológico del clon leucémico, lo que tendría implicaciones pronósticas en el curso de la enfermedad.

Para verificar o no esta hipótesis hemos estudiado esta cohorte de pacientes de LAM, tratados en nuestro centro únicamente de forma asistencial y fuera de contexto de ensayos clínicos o de centros principalmente investigadores.



### 3.2. OBJETIVOS

- Analizar las características clínicas de las LAM con NPM1 mutado y buscar sus diferencias con el resto de pacientes con LAM.

- Observar la influencia de las mutaciones NPM1 en la supervivencia global y la supervivencia libre de evento de los pacientes y las posibles implicaciones terapéuticas asociadas.





# 4. MATERIAL Y METODOS





## 4.1 POBLACION A ESTUDIO

El Departamento de Salud de Alicante cuenta como recursos con el Hospital General Universitario de Alicante, once centros de salud, cinco consultorios, dos centros de especialidades y un punto de atención continuada. Su ámbito de actuación comprende a las localidades de Alicante (compartido con H. San Juan), San Vicente, Agost, Monforte del Cid, Moralet, La Canyada, La Alcoraya y Verdegás. La población a la que atiende asciende en 2015 aproximadamente a 270.000 habitantes (INE, 2016).

Sin embargo, para muchas patologías, como es el caso de la Leucemia Aguda, la población de referencia del Servicio de Hematología es la provincia de Alicante, desde finales de los años 60 del siglo pasado. Solamente por razones históricas y geográficas, algunos de los pacientes de los departamentos de Alcoy y Denia, son referidos a Valencia. Dado que la población de la provincia de Alicante supera los 1.700.000 habitantes, según el Instituto Nacional de Estadística (INE, 2016), nuestro cálculo es que la población a la que atendemos se sitúa alrededor del millón y medio de habitantes.

Según los datos referidos anteriormente, la incidencia de la Leucemia Aguda Mieloide se sitúa alrededor de  $3-4/10^5$ , con lo cual estimamos que en nuestra área se deben diagnosticar aproximadamente entre 45 y 60 casos por año. A nuestro hospital llegan aproximadamente 40 casos/año (ver gráfica). La diferencia entre la incidencia de casos en nuestro servicio y la esperada, estriba en que muchos de éstos pacientes son mayores y no aptos para tratamiento intensivo (con lo cual se tratan en sus hospitales de referencia) y otros son los niños hasta los 16 años, que son tratados por pediatría (aunque en estas edades la incidencia de LAM es muy baja).

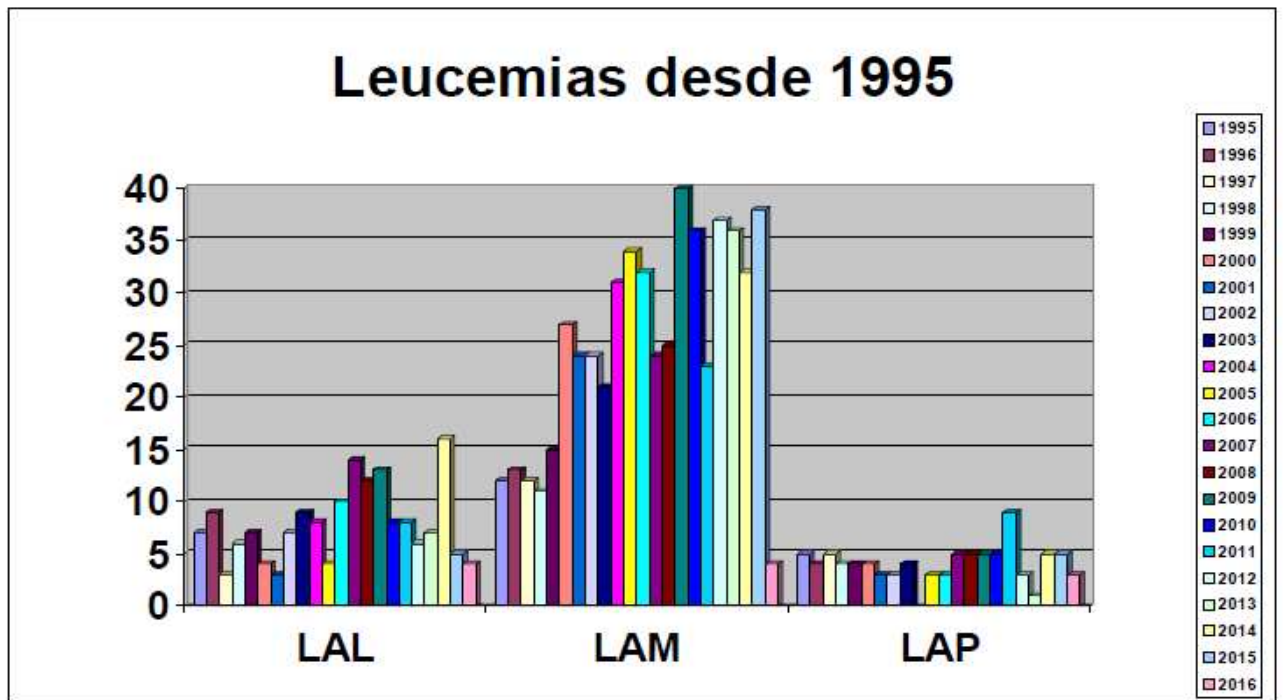
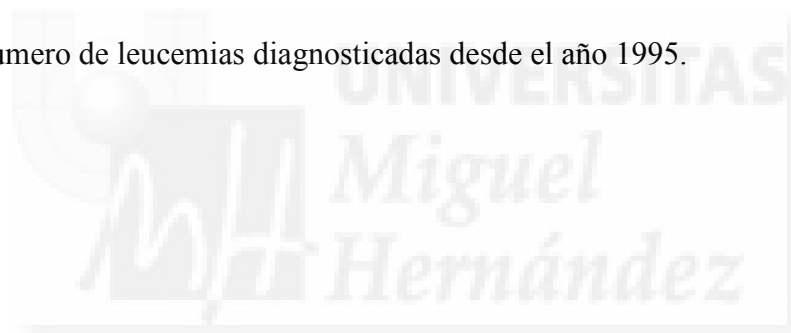


Figura 7. Número de leucemias diagnosticadas desde el año 1995.



## 4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO Y PARTICIPANTES

Estudio observacional retrospectivo de los pacientes con Leucemia Aguda Mieloide diagnosticados entre 2008-2016 en nuestro servicio que cumplen los siguientes criterios de inclusión:

- Edad superior a 16 años.
- Leucemia aguda mieloblástica “de novo“, es decir que no derive de patología hematológica previa (SMD/SMP).
- Pacientes con hemograma, citogenética y biología molecular (FLT3 y NPM1) realizada al diagnóstico.

Se excluyeron del estudio las leucemias agudas promielocíticas (10% de las LAM recibidas) por tener características clínicas y terapéuticas claramente diferenciadas.



### 4.3 VARIABLES

- Fecha de diagnóstico.
- Edad al diagnóstico.
- Sexo.
- ECOG (0-5) al diagnóstico

Valoración del "performance status" del paciente. Según la siguiente escala:

- ECOG 0: El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
- ECOG 1: El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
- ECOG 2: El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
- ECOG 3: El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.
- ECOG 4: El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
- ECOG 5: Fallecido.
- Recuento de leucocitos al diagnóstico.
- Se genera otra variable, cualitativa, calificando a los pacientes con recuento superior a 50.000 leucocitos por microlitro, como hiperleucocitarios.
- Cifra de hemoglobina al diagnóstico.
- Recuento de plaquetas al diagnóstico.
- Porcentaje de blastos en médula ósea al diagnóstico.
- Subtipo según la clasificación FAB

De M0 a M7, según descripción previa. En los casos en que no fue posible calificar los pacientes en estos grupos fueron denominados inclasificables. Se

incluyeron en este grupo leucemias muy inmaduras, o algunos casos diagnosticados por biopsia, en los cuales no se pueden clasificar por subtipo.

- Cariotipo en médula ósea, por técnicas convencionales al diagnóstico.
- Riesgo citogenético.  
Favorable, intermedio y desfavorable, según clasificación pronóstica según el MRC (1998). (ver tabla2).
- Mutaciones de FLT-3.  
Mutación puntual TKD en exón 835 o duplicación en tándem ITD (exones 14 y 15) y ratio entre alelo "wild type" y alelo mutado.
- Mutaciones NPM1.
  - Mutación en exón 12 (nucleótido 960).
  - Mutación A, duplicación TCTG (en el 95% de los casos).
  - Mutación B o D.
- Tratamiento de primera línea: (comentado en introducción más detalladamente como PETHEMA LAM 2007, LAM 2010 y LAM>65 años 2014)
  - INTENSIVO: Tratamiento con intención curativa; como inducción se administra el clásico 3+7 ó 2+5 (IDA+ARA-C) o FLAG-IDA (FLUDA+IDA+ARA-C).
  - ATENUADO: Tratamientos que sin renunciar a una posible curación, intenta una mejoría de la supervivencia y mantenimiento de la calidad de vida del paciente. Se incluyen esquema FLUGA e hipometilantes (VIDAZA Y DECITABINA)
  - PALIATIVO: cuyo objetivo es control sintomático mediante soporte transfusional y si hiperleucocitosis, hidroxiurea o citarabina a dosis bajas.
- Remisión completa tras inducción. (RC)  
Recuperación hemoperiférica, control de sintomatología y presencia de <5% blastos en médula ósea (Cheson et al, 2003; Döhner et al, 2016).
- Enfermedad mínima residual tras inducción en pacientes en RC.  
Más o menos de <0.1% de blastos respecto a la celularidad global, en médula ósea, medida por CMF multiparamétrica. A continuación, se detallará la técnica de estudio.
- Trasplante de médula ósea como consolidación o intensificación  
Trasplante o no. Dentro de los trasplantados, tipo de trasplante Autólogo o Alogénico.

- Recidiva de la enfermedad.  
En pacientes que habían tenido RC, presentar algunos de los siguientes (Cheson 2003)
  - Presencia de blastos en sangre periférica.
  - Reparición de displasia o más de 5% de blastos en médula ósea.
  - Presencia de leucemia extramedular.
- Fecha de la recidiva.  
Fecha de constatación de la recidiva.
- Fallecimiento.  
Fecha de fallecimiento.
- Fecha de constatación del fallecimiento.  
Fecha del último seguimiento.
- Fecha de la última revisión de los pacientes, y donde se pudo constatar si permanecía en remisión.
- Supervivencia global (SG)  
Se define como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el fallecimiento en los pacientes fallecidos, y en los supervivientes entre la fecha de diagnóstico y la fecha del último seguimiento.
- Supervivencia libre de evento (SLE)  
Se define como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta algún evento, considerando tal resistencia o recaída .



## 4.4 MEDIDAS

### 4.4.1 ESTUDIO CITOGENÉTICO

A partir de muestras de aspirado de médula ósea se practicó un cultivo, a corto plazo, según las recomendaciones del *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2005). Se estudiaron, al menos, 20 metafases por muestra. Se establecieron grupos de riesgo citogenético para los pacientes diagnosticados de LMA de acuerdo con los criterios de Medical Research Council (MRC) y establecidos en el correspondiente PNT.

La siembra se realiza en campana de flujo estéril, para asegurar la esterilidad debe limpiarse según IT Pautas básicas de trabajo en el laboratorio UDHEM-IT-5. (Anexo 1).

El sacrificio celular se realiza según el protocolo marcado en el UDHEM-PI-12 (Anexo 2) y la extensión y tinción siguiendo el protocolo del UDHEM-PI-13 (Anexo 3).

### 4.4.2 Estudios moleculares

Los métodos de estudio molecular realizados sobre muestra obtenida de médula ósea han sido: PCR convencional, RT, PCR cuantitativa en tiempo real (*qPCR*), DNA *fingerprinting* con endonucleasas de restricción, secuenciación automática de ácidos nucleicos y análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar.

#### 4.4.2.1 Detección de las duplicaciones parciales en Tándem (ITD) en FLT3: Ratio ITDmutado/ITDsalvaje.

La detección de las mutaciones ITD se efectúan siguiendo el método de Thiede et al. El método se fundamenta en la amplificación mediante PCR de los exones 11 y 12 del gen FLT3 en donde recaen las duplicaciones parciales en tándem, empleando primers marcados con fluorógenos (6-FAM).

Además, se analiza la ratio ITD mutante/salvaje mediante electroforesis capilar y el software Genemapper de Applied Biosystems.

Todo ello, siguiendo el protocolo marcado en el PNT correspondiente (Anexo 4).

#### *4.4.2.2 Detección de las mutaciones en el gen NPM1 mediante sondas de hibridación en el Light Cycler 2.0.*

El método empleado para la detección de mutaciones en el gen NPM1 se fundamenta en la utilización de sondas de hibridación marcadas con fluorógenos (sonda Sensor marcada con Fluoresceína y Anchor con Red 640), las cuales han sido diseñadas para el alelo normal, realizando una PCR en tiempo real con el sistema LightCycler siguiendo el método descrito por Schnittger et al. Este método tiene la ventaja de presentar una gran rapidez.

Para detectar las mutaciones empleamos cDNA como muestra (las sondas de hibridación diseñadas complementan en una región exón-intrón).

El método seguido está ilustrado en el correspondiente PNT (Anexo 5).

#### *4.4.2.3 Detección de la mutación FLT3/D835 en el Light Cycler.*

El método empleado se fundamenta en la utilización de sondas de hibridación marcadas con fluorógenos (Flt3 Sensor marcada con Fluoresceína y Flt3 Anchor con Red 640), las cuales han sido diseñadas para el alelo normal, realizando PCR en tiempo real con el sistema LightCycler empleando los cebadores descritos por Yamamoto et al. Este método tiene la ventaja de presentar una gran rapidez obteniéndose la misma especificidad que los métodos convencionales basados en PCR seguida de digestión con enzimas de restricción.

El procedimiento está descrito en el PNT correspondiente (Anexo 6)

### **4.4.3 ESTUDIO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL POR CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA**

Las muestras de médula ósea fueron procesadas y analizadas mediante el citómetro de flujo Facscanto II Beckton Dickinson California.

El estudio de enfermedad mínima residual se llevó a cabo analizando 5,000,000 de células y utilizando las mismas combinaciones de anticuerpos monoclonales empleados al diagnóstico según recomendaciones del consorcio Euroflow.

Mediante el análisis de dicha población celular se identificaron los diferentes inmunofenotipos aberrantes detectados en cada caso particular considerándose significativo el umbral de sensibilidad determinado por la presencia inequívoca de 50 células del fenotipo leucémico sobre las 5,000,000 de células totales analizadas (sensibilidad 1/100,000). Todo ello siguiendo el procedimiento establecido en el PNT

correspondiente: "Protocolo de estudio de enfermedad mínima residual en leucemias agudas por citometría de flujo" (Anexo 7).



#### 4.5 CALCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Dado que la muestra ha sido recogida sin cálculo de tamaño muestral previo, y son la totalidad de los casos diagnosticados, se ha determinado *a posteriori* si la muestra empleada es adecuada para los objetivos planteados.



## 4.6 ANALISIS ESTADISTICO

Se describieron las variables empleando frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas, mientras que para las cuantitativas se utilizaron medias y desviaciones estándar en caso de normalidad. Si la variable no se ajustaba a distribución normal, se utilizó mediana y rango intercuartílico. Para el estudio de normalidad se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para la comparación de variables cualitativas se utilizaron tablas de contingencia, comparadas con Chi-cuadrado de Pearson o Test Exacto de Fisher cuando las frecuencias esperadas en más del 20% de las casillas era inferior a 5%

Para comparación de variables continuas se utilizó T de Student, o U de Mann Whitney, o Kruskal-Wallis.

Todos los análisis se realizaron con un error tipo I del 5% y de cada parámetro relevante se calculó su intervalo de confianza asociado (CI).

Los estudios de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad se realizaron según las curvas de Kaplan-Meier. Para comparación se utilizó e Log Rank (Mantel-Cox).

Para análisis multivariante se utilizó la regresión de Cox.

Todos los cálculos se realizaron con Microsoft Office Excel 2007, IBM SPSS Statistics 22.0, Epidat versión 3.1 o R-Commander 3.3.1.

## 4.7 CUESTIONES ÉTICAS

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético para la Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, según las recomendaciones de la Conferencia de Helsinki 2008 y las regulaciones institucionales.

La recogida de datos de los pacientes ha sido posible gracias a la revisión de la historia clínica del paciente, informatizada o en formato papel.

Los datos recogidos fueron obtenidos de las pruebas que forman parte de la rutina clínica habitual y protocolizada en el diagnóstico, seguimiento y evaluación clínica de los pacientes durante el ingreso y seguimiento en consultas externas y han sido usados de forma anónima.



## 4. RESULTADOS.







## 4.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.

La muestra fue recogida durante los años 2008 a 2016, según la distribución que se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 4- Distribución de los pacientes según año de diagnóstico.

VALOR	Frecuencia	Porcentaje
2008	6	3,95
2009	12	7,89
2010	17	11,18
2011	16	10,53
2012	21	13,82
2013	25	16,45
2014	20	13,16
2015	26	17,11
2016	9	5,92
TOTAL	152	100,00

La muestra total ha estado formada por 152 pacientes, de los cuales 73 eran mujeres (48,0%). Durante este tiempo se han diagnosticado en nuestro centro 281 pacientes con leucemia aguda mieloblástica no promielocítica. Del total de pacientes fueron seleccionados únicamente aquellos que cumplían los criterios de inclusión-exclusión.

Al analizar la normalidad de las variables cuantitativas, se obtienen distribuciones para todas ellas que no cumplen la normalidad ( $p < 0,001$ ). Los valores de edad y parámetros sanguíneos están expresados en la siguiente tabla:

Tabla 5. Parámetros cuantitativos de la muestra total de pacientes (n=152).

Característica	Mediana (IQ)	(p)
Edad (años)	57,0(19,0)	<0,001
Leucocitos ( $\times 10^6/L$ )	13000(61520)	<0,001
Plaquetas ( $\times 10^6/L$ )	50000(59000)	<0,001
Blastos en médula ósea (%)	75(45)	<0,001
Hemoglobina (g/dl)	9,0(2,5)	0,011

El margen de edades ha sido entre los 18 a 83 años, para su evaluación como posible factor de riesgo, se ha optado por realizar dos grupos de edad: Grupo 1, edad < 65 años y grupo 2,  $\geq 65$  años, obteniéndose en el primer grupo una muestra de 106 y en el segundo de 46 pacientes. Del mismo modo, se han realizado dos grupos respecto al

recuento de leucocitos considerando hiperleucocitosis valores  $\geq 50.000 \times 10^6/L$ , quedando 43 pacientes con hiperleucocitosis.

Así mismo, las distribuciones de las variables cualitativas están expresadas en la siguiente tabla:

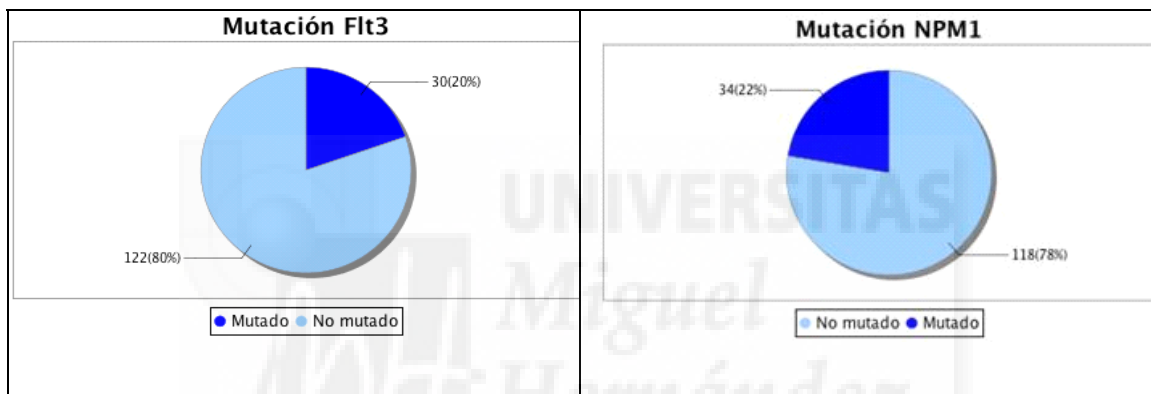
Tabla 6. Parámetros cualitativos de la muestra total de los pacientes LMA incluidos en el estudio (frecuencia absoluta, n; frecuencia relativa, %).

<b>Características</b>	<b>n (%)</b>
Mujeres	73(48,0)
Edad $\geq 65$ años	46(30,3)
Hiperleucocitosis ( $>50.000$ )	43(28,3)
ECOG:	
0	4(2,6)
1	86(56,6)
2	45(29,6)
3	14(9,2)
ausente	3(2,0)
Clasificación FAB	
M0	7(4,6)
M1	20(13,2)
M2	22(14,5)
M3	7(4,6)
M4	42(27,6)
M5	35(23,0)
M6	10(6,6)
M7	1(0,7)
Ausente	8(5,3)
Cariotipo:	
Normal	65(42,8)
Complejo	16(10,5)
Delección 7	5(3,3)
Inv 16	6(3,9)
Otras	26(17,1)
t(6;9)	2(1,3)
t(8;21)	9(5,9)
t(9;11)	4(2,6)
Trisomía 8	6(3,9)
No valorable	13(8,6)
Citogenética:	
Riesgo Favorable	15(9,9)
Riesgo Intermedio	96(63,2)
Riesgo Desfavorable	26(17,1)
No valorables	15(9,9)
Mutación FLT3	30(19,7)
Mutación NPM1	34(22,4)
Tratamiento:	
Intensivo	120(78,9)

Paliativo	15(9,9)
Atenuado	17(11,2)
Remisión completa	105(69,0)
EMR negativa (n=95)	38 (36,2)
Trasplante:	
Autólogo	15(9,9)
Alogénico	40(26,3)
No trasplante	97(63,8)
Recidiva	38(36,2)

Por su especial interés, se muestran gráficamente las distribuciones porcentuales de las mutaciones estudiadas en éste estudio:

Figura 8. Distribución porcentual de los pacientes con las mutaciones FLT3 y NPM1.



#### 4.1.2 ANALISIS DE ASOCIACION DE VARIABLES POR SU ESPECIAL RELEVANCIA.

##### 4.1.2.1 NPM1 Y FLT3

La presencia de la mutación NPM1 aumenta en las LAM de cariotipo normal, observándose en 40% en este grupo de pacientes. Ambas mutaciones aparecen frecuentemente asociadas entre sí, sobre todo en los pacientes con cariotipo normal, que en nuestro estudio alcanza 14% ( $p < 0.001$ ) La combinación de las dos está expresada en la siguiente tabla:

Tabla 7. Distribución de los pacientes según la combinación de las dos mutaciones analizadas (NPM1 y FLT3).

Combinación	Cariotipo normal (65) n(%)	Cariotipo alterado (n=74) n (%)
FLT3- NPM1-	30 (46,2)	61 (82,4)

<b>FLT3- NPM1+</b>	17 (26,2)	4 (5,4)
<b>FLT3+ NPM1+</b>	9 (13,8)	1(1,3)
<b>FLT3+ NPM1-</b>	9 (13,8)	8(10,8)

Chi cuadrado = 24,587; p<0,001

#### 4.1.2.2 RIESGO CITOGENÉTICO Y EDAD

El riesgo CG de los pacientes suele incrementarse con la edad de los pacientes. Aunque no sea estadísticamente significativo, observamos la tendencia que existe a presentar cariotipos desfavorables en pacientes mayores de 65 años.

Tabla 8. Distribución del riesgo citogenético según los dos grupos de edad en los pacientes con citogenética valorable (n=137).

<b>Riesgo citogenético</b>	<b>Edad &lt; 65 años n (%)</b>	<b>Edad ≥ 65 años n (%)</b>
Favorable	13(13,3)	2 (5,1)
Intermedio	69 (70,4)	27 (69,2)
Desfavorable	16 (16,3)	10(25,6)

Test Chi cuadrado = 4,986; p=0,173.

#### 4.1.2.3 RIESGO CITOGENÉTICO Y REMISION COMPLETA

De la misma manera, el riesgo CG también va a condicionar los resultados del tratamiento. Se observa como los riesgo CG favorables obtendrán resultados cercanos de RC a la totalidad de los pacientes, mientras que los desfavorables no alcanzan el 40%.

Tabla 9. Distribución del riesgo citogenético según la obtención de RC en los pacientes con citogenética valorable (n=137).

<b>Riesgo citogenético</b>	<b>RC n (%)</b>
Favorable (n=15)	14 (93)
Intermedio (n=96)	71 (73,4)
Desfavorable (n=26)	10 (38,5)

Test Chi cuadrado = 14,504; p<0,001

#### 4.1.2.4 TRATAMIENTO Y RESULTADOS

Casi el 70% de los casos obtuvieron remisión completa tras tratamiento de inducción. Ningún paciente con tratamiento paliativo, pero sí un tercio de los casos con tratamiento atenuado presentaron dicha remisión. A continuación, se muestran más detalladamente los resultados:

Tabla 10, Remisión completa según tipo de tratamiento.

Remisión completa	No	Sí
Intensivo	21(17,5)	99 (82,5)
Paliativo	15 (100)	0
Atenuado	11 (64,7)	6 (35,3)
TOTAL	47 (30,9)	105 (69,1)

Test Chi cuadrado;  $p < 0,001$

Por su especial interés, se muestra gráficamente el tratamiento y la remisión completa:

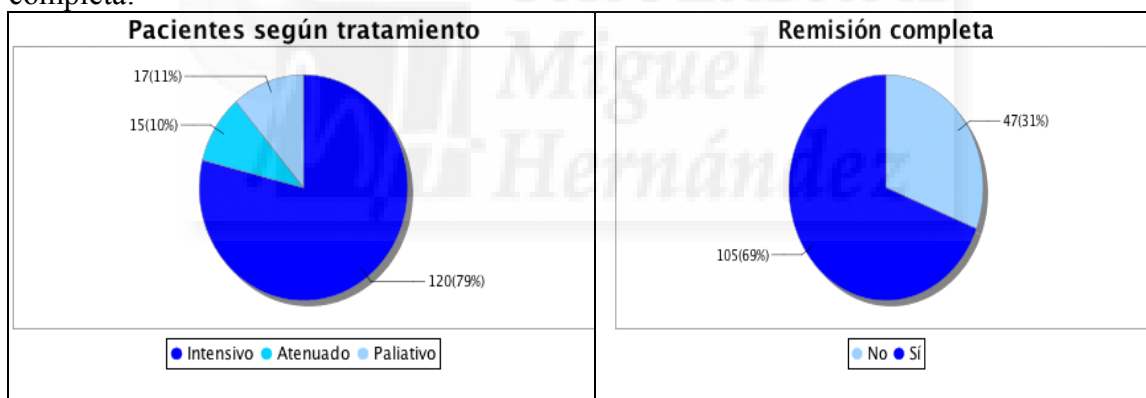


Figura 9. Distribución de los pacientes según tratamiento recibido y remisión completa.

En nuestra muestra, los pacientes con tratamientos intensivos alcanzaron mejores resultados en cuanto a EMR, tal y como observamos en la siguiente tabla, en la que se aprecia asociación estadísticamente significativa entre la obtención de EMR – y el tipo de tratamiento administrado.

Tabla 11. EMR, Recidiva y remisión tras recidiva en función del tratamiento administrado.

Característica	Tratamiento intensivo N=99 n (%)	Tratamiento Atenuado N=6 n (%)	Test Fisher (p)
Enf. mín. residual:			
Positivo	53 (53,5)	4 (66,7)	0,029
Negativo	38 (38,4)	0	
No reg.	8 (9,1)	2 (33,3)	
Recidiva:			
No	61 (61,6)	4 (66,7)	0,99
Sí	36 (36,4)	2 (33,3)	
No det.	2 (3,0)	0	
Remisión tras recidiva (n=36)			
No	29(80,6)	2(100)	1
Sí	7(19,4)	0	



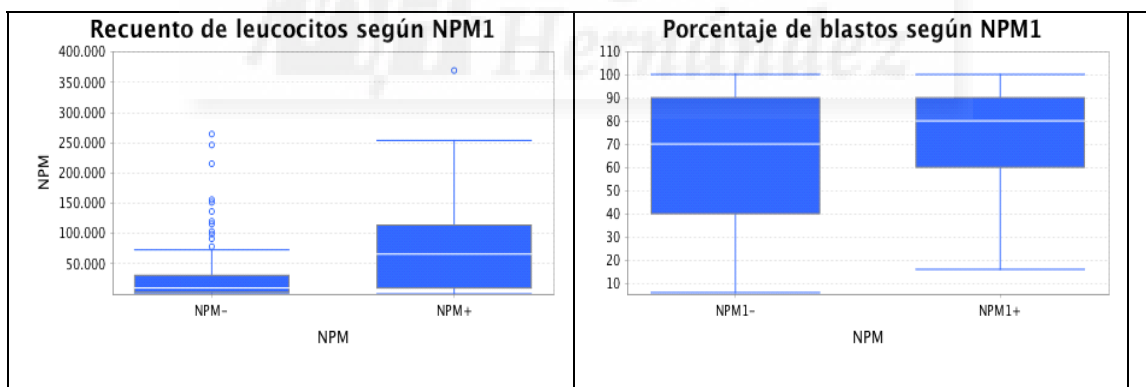
## 4.2 MUTACIÓN NPM1 CON EL RESTO DE VARIABLES

Respecto a las variables cuantitativas, los valores están expresados en la siguiente tabla, junto con el valor de p según el test U de Mann-Whitney, comparando pacientes con NPM1 mutado y NPM1 no mutado.

Tabla 12. Comparación de las variables cuantitativas (mediana e intervalo intercuartílico) entre los que tienen y no la mutación NPM1.

Variable	NPM1+	NPM1-	p
Edad (años)	56(18)	58(22)	ns
Leucocitos (x10 <sup>6</sup> /L)	66000(104170)	11000(29000)	<0,001
Hemoglobina (mg/dl)	9,0(2,9)	9,0(2,4)	ns
Plaquetas ( x10 <sup>6</sup> /L)	50(28)	50(70)	ns
Blastos médula ósea (%)	800(84)	70(50)	ns

Figura 10. Distribución de los valores de leucocitos y blastos según la presencia o no de la mutación NPM1.



En el análisis de asociación entre NPM1 y el resto de variables cualitativa estudiadas frente a la presencia de la mutación NPM1 se observan los siguientes datos:

Tabla 13. Análisis bivalente según presencia/ ausencia de la mutación NPM1.

VARIABLE	NPM1- (118) (77,6%)	NPM1+ 34 (22,4%)	OR (IC 95%)	p*
Edad < 65 años	106 (69,7)	25 (23,6)	1,3(0,5-3,0)	0,585
MUJERES	73(48,0)	21 (61,8)	2,1 (0,9-4,5)	0,069
ECOG:				
0	4(2,6)	0	-	
1	86(56,6)	16(47,1)	-	
2	15(13,2)	13(38,2)	-	
3	14 (9,2)	4(11,8)	-	0.529
Hiperleucocitarios	3 (28,3)	20 (58,8)	9 (2,6-13,4)	0.001
Clasificación FAB:				
M0	7 (4,6)	0	-	
M1	20 (13,2)	5 (14,7)	-	
M2	22 (14,5)	4 (11,8)	-	
M3	7 (4,6)	4 (11,8)	-	
M4	42 (27,6)	10 (29,4)	-	
M5	35 (23,0)	7 (20,6)	-	
M6	10 (6,6)	2 (5,9)	-	
M7	1 (0,7)	0	-	
Ausente o inclasificable	8 (5,3)	2 (5,9)	-	0,716
Cariotipo normal	65 (42,8)	26 (76,5)	1,6 (0,9-3,1)	0,128
Citogenética:				
RF	15 (9,9)	0	-	
RI	96 (63,2)	29 (85,3)	-	
RD	26 (17,1)	1 (2,9)	-	0,009
FLT3 +	30 (19,7)	11 (32,4)	2,3 (0,9-5,4)	0,062
Tratamiento 1ª línea:				
Intensivo	92 (60,5)	28 (82,4)	-	
Atenuado	13 (8,6)	2 (5,9)	-	
Paliativo	13 (8,6)	4 (11,8)	-	0,676
Remisión completa	105 (69,1)	29 (85,3)	3,2 (1,2-8,9)	0,020
EMR - (95/29)**	38 (40,0)	9 (31,0)	0,7 (0,3-1,9)	0,511
Trasplante de médula ósea	55 (36,2)	14 (41,2)	1,3 (0,6-2,9)	0,492
Tipo trasplante				
Autólogo	15 (27,3)	6 (42,9)	2,7 (0,7-9,7)	
Alogénico	40 (72,7)	8 (57,1)	0,4 (0,1-1,4)	0,129
Con Recidiva***	38 (25,0)	13 (38,2)	0,2 (0,1-0,4)	<0,001
Éxito	89 (58,6)	20 (58,8)	0,5 (0,2-1,1)	0,083

\* Test Chi cuadrado; \*\* 95 pacientes con EMR realizada, 29 de ellos NPM1+ ; \*\*\* 2 pérdidas de seguimiento.



## 4.3 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

### 4.3.1 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTO EN LA MUESTRA GLOBAL

La mediana de supervivencia global fue de 19,2 (IQ 24,9) meses y de supervivencia libre de evento de 17,0 (IQ 24,1) meses. La SG estimada a los 2 años es del 39% y la SLE del 36%. A partir de este momento se estabilizan con una fase de meseta.

A continuación, se muestran gráficamente los resultados.

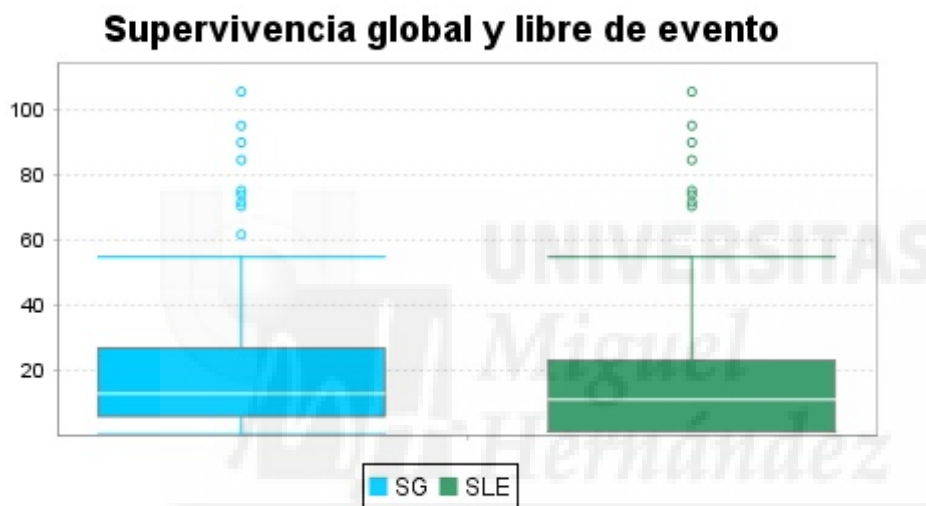


Figura 11. Valores de supervivencia global y libre de evento de los pacientes analizados.

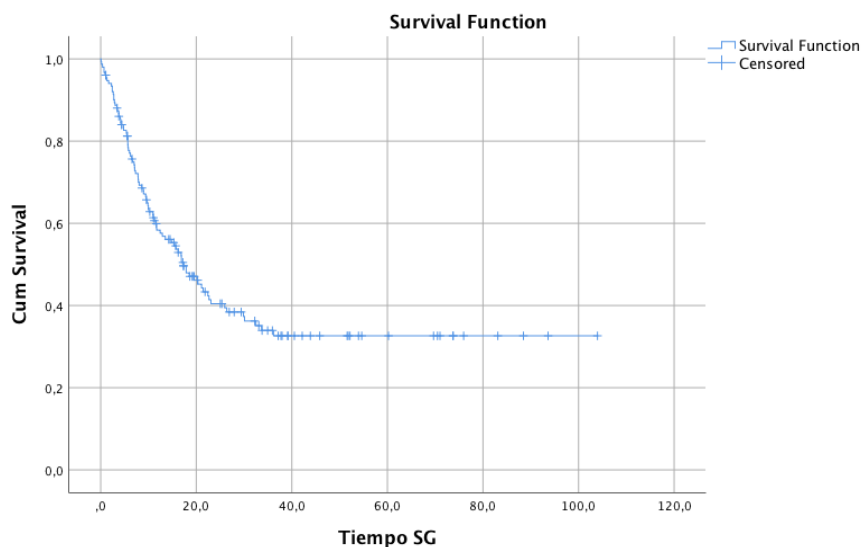


Figura 12. Evolución del porcentaje de supervivencia global con el tiempo de seguimiento.

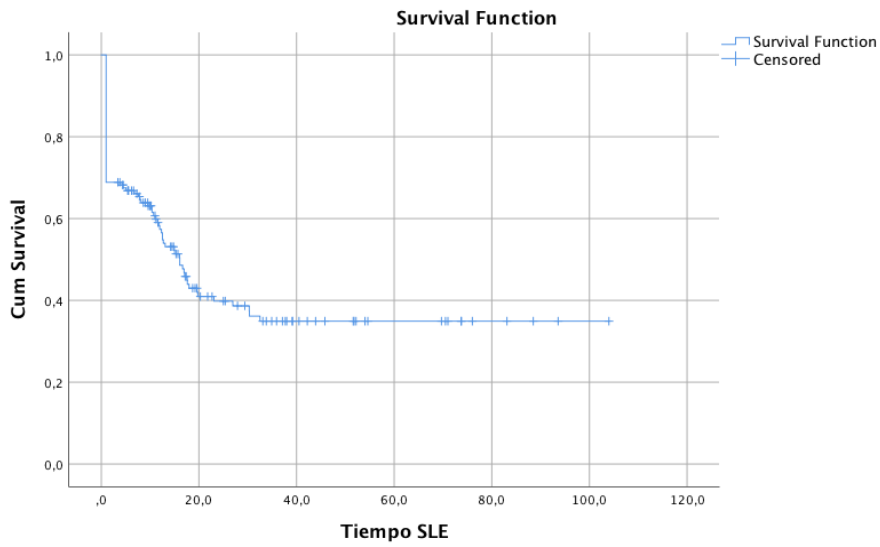


Figura 13. Evolución del porcentaje de supervivencia libre de evento con el tiempo de seguimiento.

Se ha analizado la supervivencia a los dos años y cinco años. Los porcentajes de supervivencia en cada uno de los plazos se han calculado respecto a los que se han podido seguir entre periodos consecutivos.

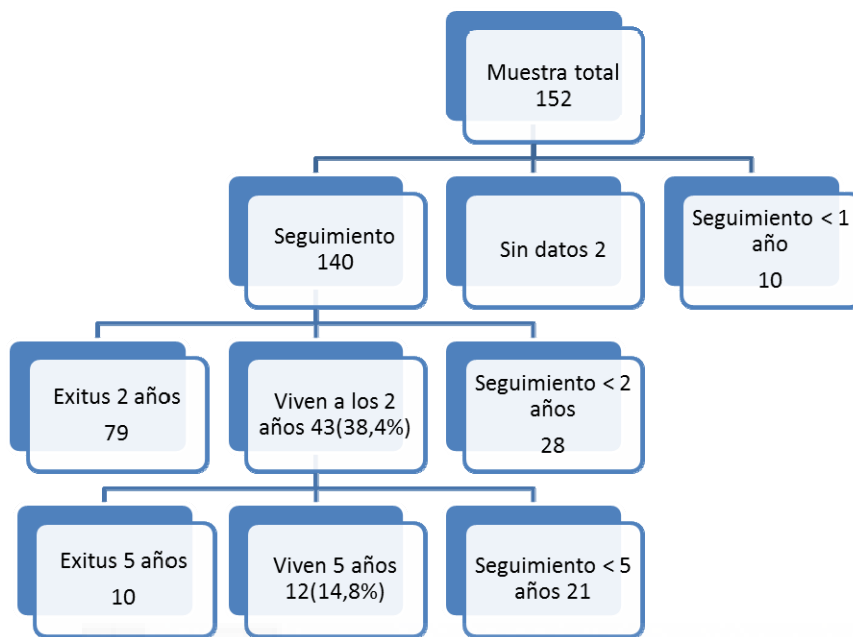


Figura 14. Esquema de los pacientes seguidos hasta los 5 años.

### 4.3.2 Relación de resto de variables con la supervivencia global.

#### 4.3.2.1 EDAD.

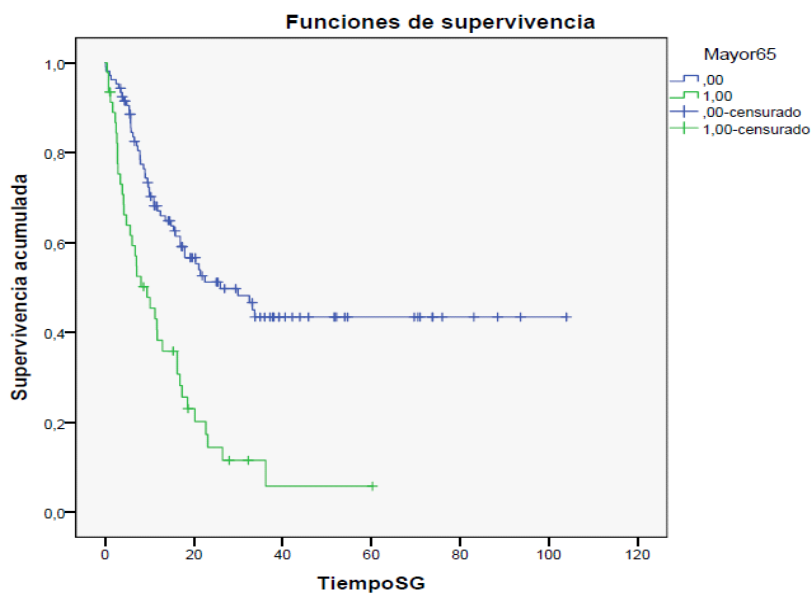


Figura 15. Curva de SG en función de edad  $\leq 65$  años.

La supervivencia global fue de 25,93 meses (IC 95% 14,16-37,70) para los  $\leq 65$  años (azul), mientras que para  $>65$  años (verde) la supervivencia fue tan sólo de 9,43 meses (IC 95% 4,64-14,183) ( $p < 0.001$ ).

#### 4.3.2.2 ECOG.

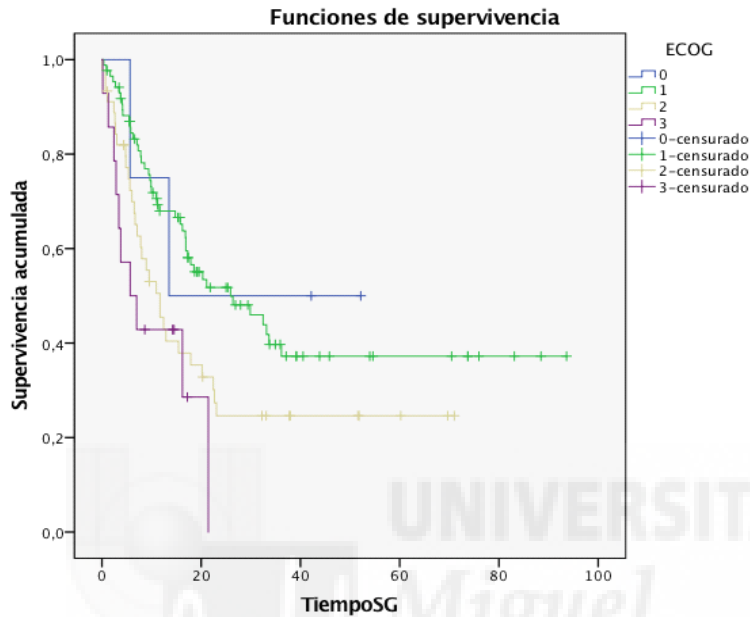


Figura 16. Curva de SG en función del ECOG del paciente al debut de la LAM.

La supervivencia global fue de 13,5 meses en el grupo ECOG 0, ECOG 1 25,93 meses (IC 95% 11,5-40,36), ECOG 2 11,7 meses (IC 95% 7,95-15,94) y ECOG 3 5,7 meses (IC 95% 0-11,6), con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.008$ ).

#### 4.3.2.3 CARIOTIPO Y RIESGO CITOGENETICO.

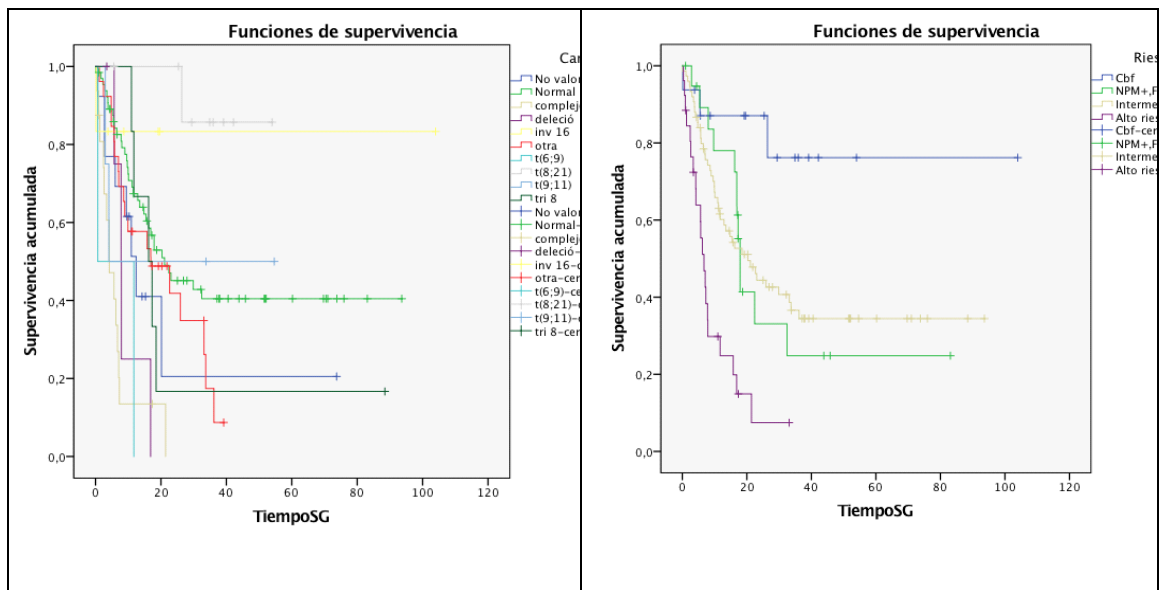


Figura 17. Curvas de supervivencia global en relación al cariotipo (izquierda) y al riesgo citogenético (derecha).

Los tiempos de supervivencia global no se pudieron analizar en el grupo de bajo riesgo al no existir ningún fallecimiento en este grupo, la mediana para los demás grupos fue, para el grupo de riesgo intermedio de una mediana de 20,3 meses (IC95% 11,7-28,9) y para el de alto riesgo de 6,7 meses (IC95% 4,5-8,9), con una diferencia muy significativa ( $p < 0,001$ ).

#### 4.3.2.4 TRATAMIENTO

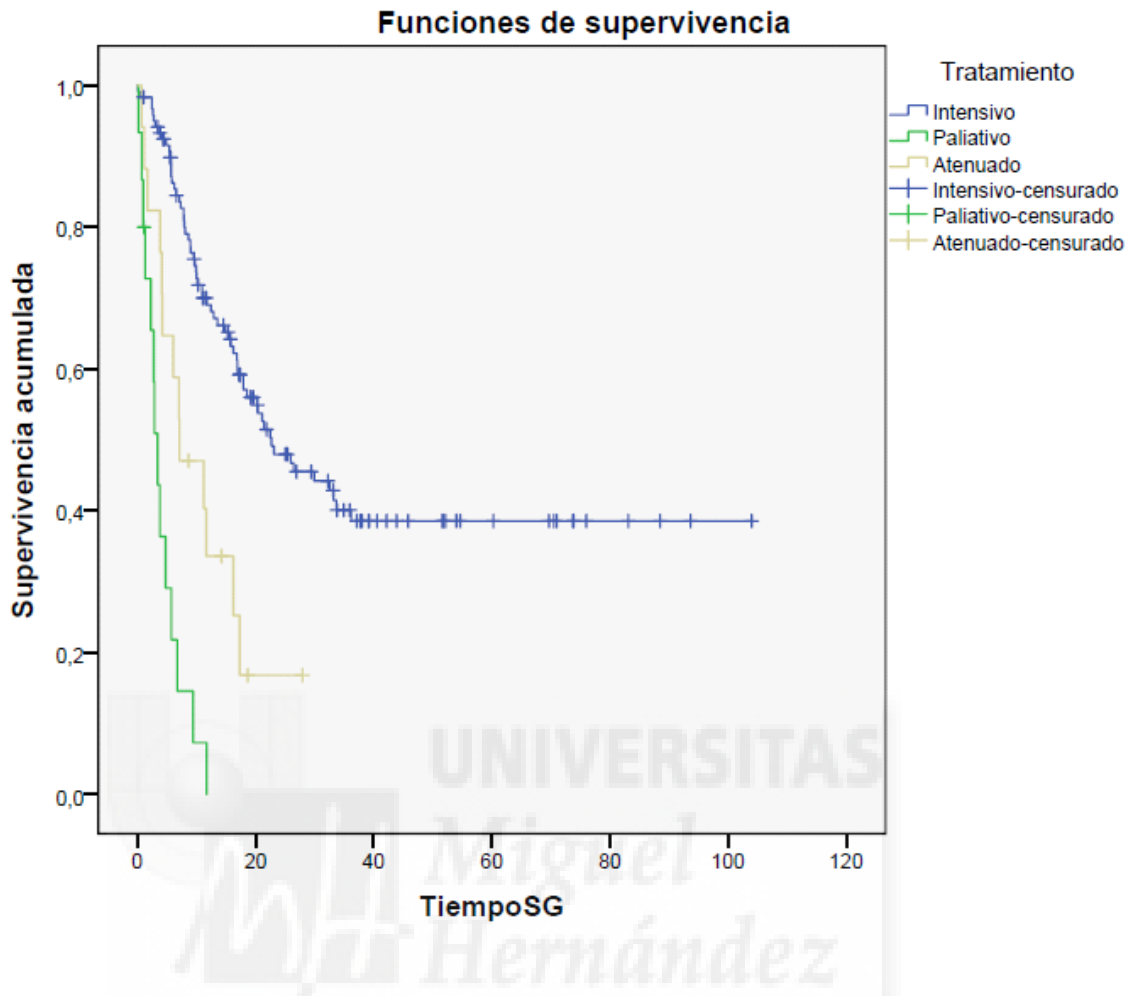


Figura 17. Curva de supervivencia global en función del tipo de tratamiento administrado.

Como se aprecia en la figura la SG fue claramente superior en los pacientes sometidos a tratamiento intensivo: 22,67 meses (IC 95% 13,31-32,02); 7,10 meses (IC 95% 0,45-13,73) para los pacientes con tratamiento atenuado y 3,4 meses (IC 95% 2,20-4,59) para los pacientes paliativos ( $p < 0.001$ )

#### 4.3.2.5 REMISION COMPLETA

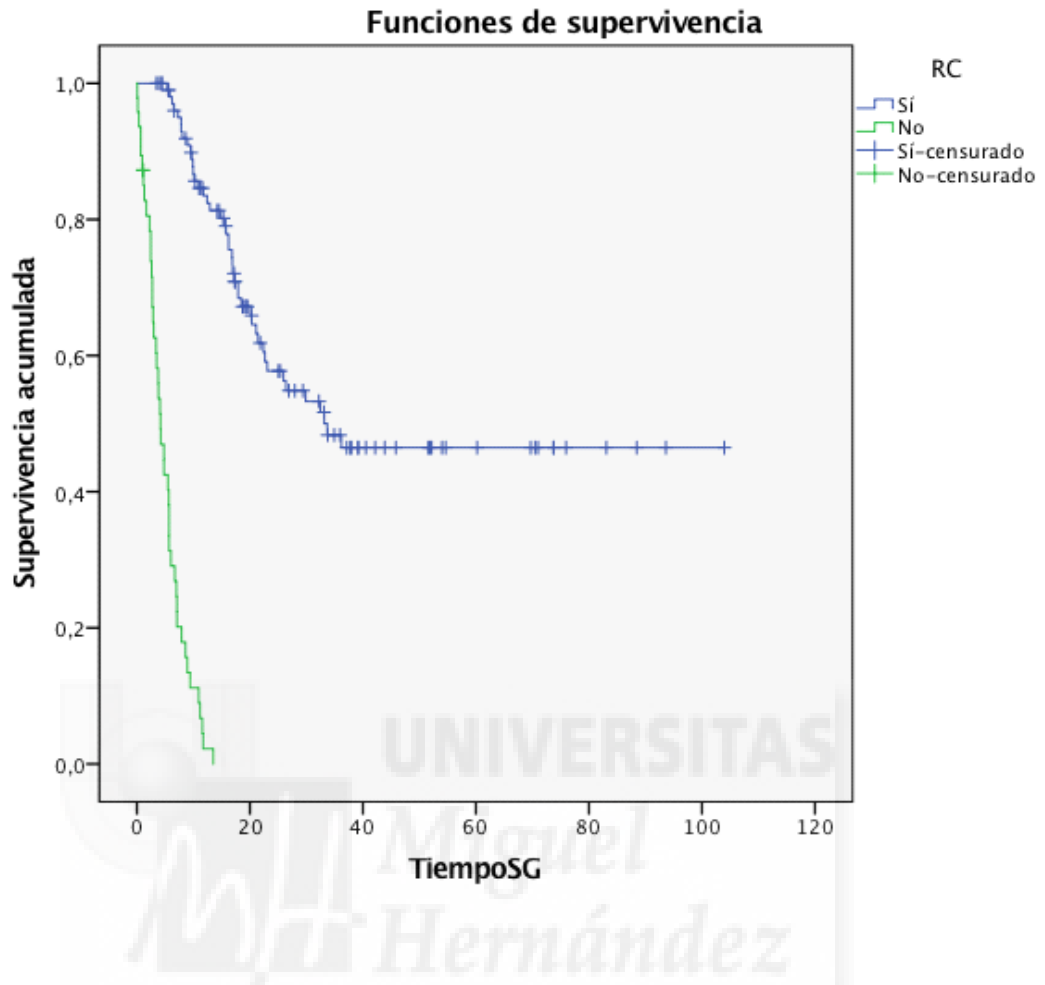


Figura 18. Curva de SG en función de la obtención de RC tras tratamiento de inducción.

La supervivencia global fue de 33,17 meses en el grupo que obtuvo RC frente a 4,17 meses en el grupo que no la consiguió (IC 95% 2,86-5,47) con una diferencia muy significativa ( $p < 0.001$ ).

#### 4.3.2.6 ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

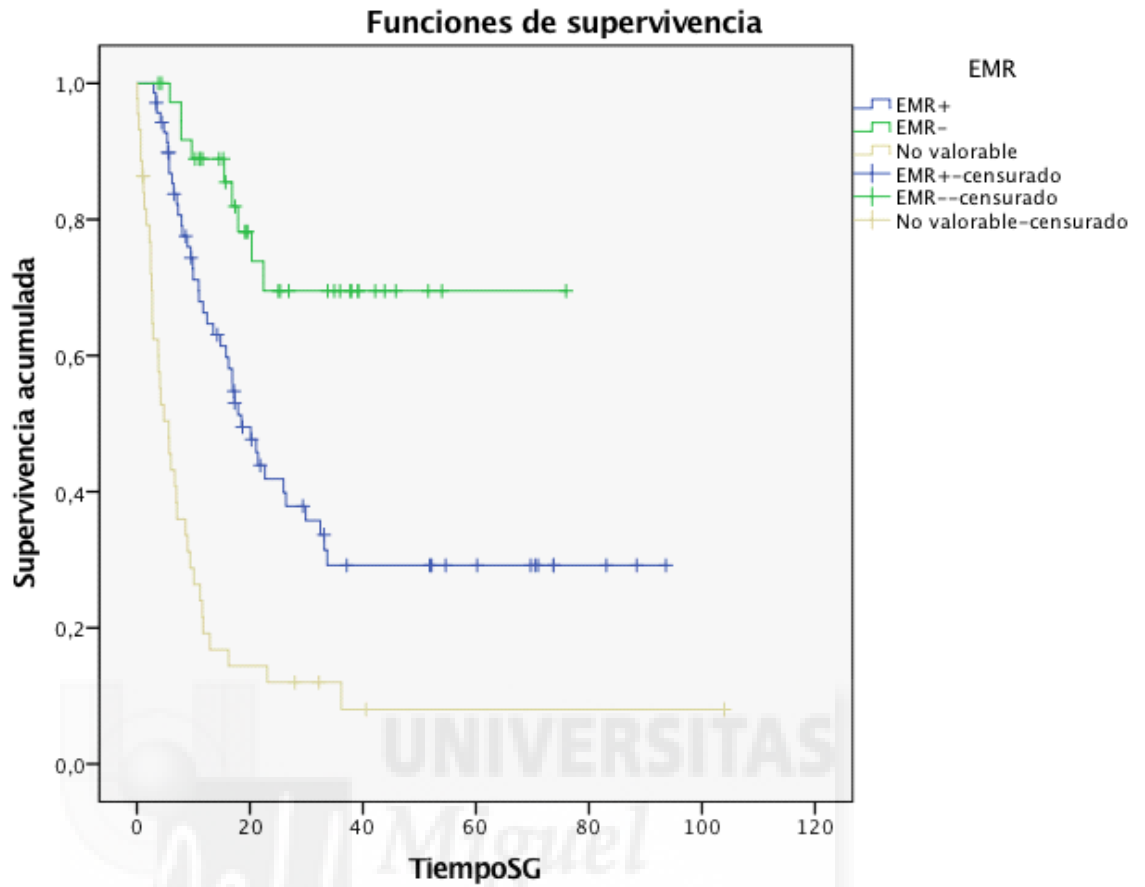


Figura 19. Curva de SG en función de la obtención de EMR- tras tratamiento de inducción.

La supervivencia global en el grupo de pacientes con EMR + fue de 18,53 meses (IC 95% 13,96-23,19), significativamente inferior que el grupo con EMR- que no ha alcanzado la mediana de supervivencia ( $p < 0.001$ ).



#### 4.3.2.7 TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS

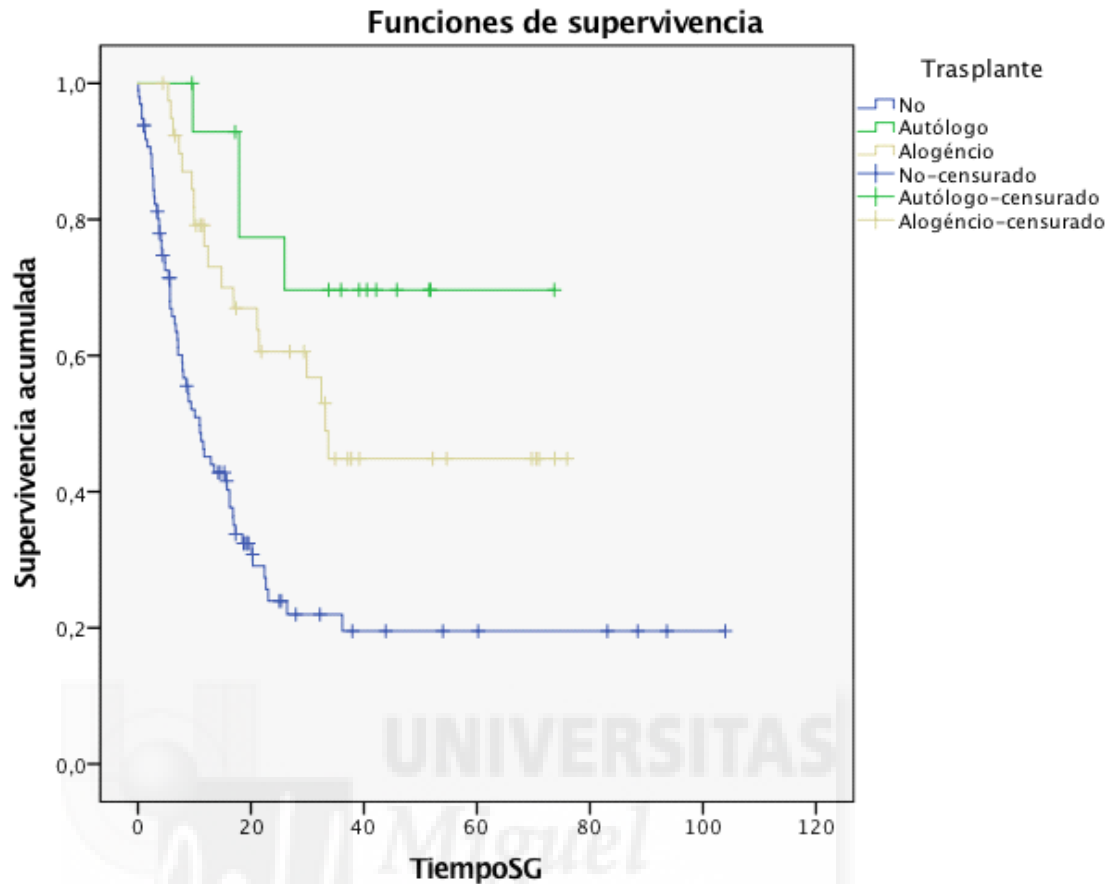


Figura 20. Curva de SG en función de la realización de trasplante de progenitores hematopoyéticos.

La supervivencia global fue de 10,93 meses (IC 95% 7,03-14,76) en el grupo que no fue sometido a trasplante; en el grupo de pacientes que recibieron trasplante alogénico fue de 33,17 meses (IC 95% 27,52-38,87). Con clara superioridad con respecto a los dos subgrupos se sitúa el trasplante autólogo, en el cual no se ha alcanzado la mediana de supervivencia ( $p < 0.001$ ).

#### 4.3.2.8 RECIDIVA

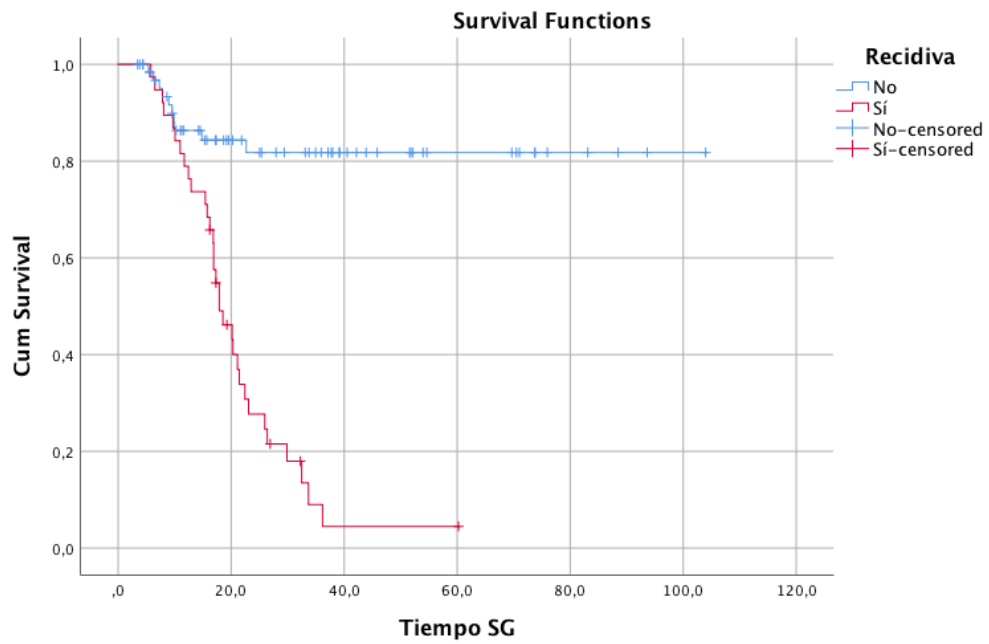


Figura 21. Curva de SG en función de recidiva tras RC.

La supervivencia global fue de 17,9 meses (IC 95% 15,52-20,27) en el grupo que recidivó, observándose en las curvas clara inferioridad con respecto al grupo que no ha recidivado, en el que no se ha alcanzado la mediana de supervivencia ( $p < 0.001$ ).

#### 4.3.3 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA RESPECTO A LA MUTACIÓN NPM1.

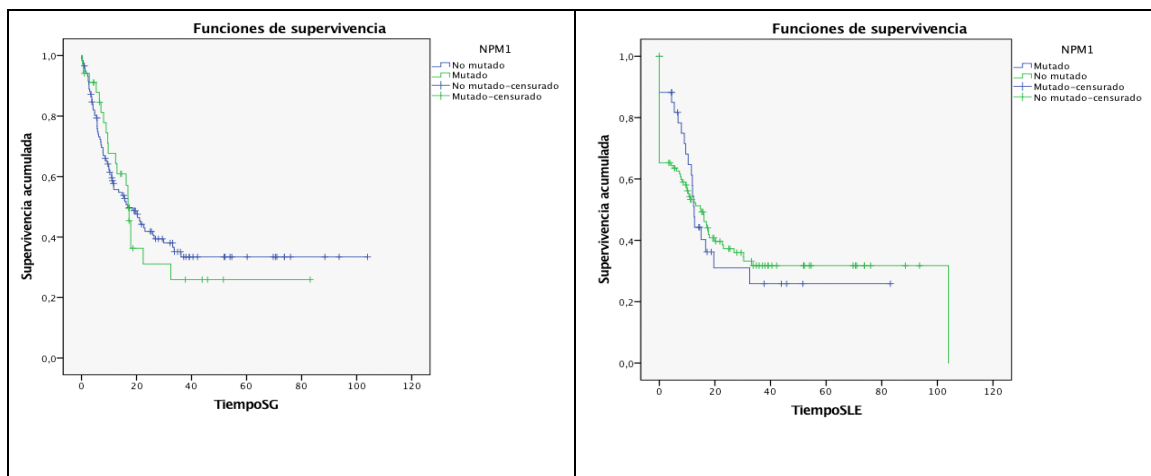


Figura 22. Curvas de supervivencia global y supervivencia libre de evento con y sin la mutación NPM1 (no se aprecia diferencias significativas ni en el tiempo de SG  $p=0,880$ ; ni en la de SLE  $p=0,928$ ).

La mediana de supervivencia global fue de 16,9 (IC 95% 19,1-43,8) meses en los mutados ( $n=34$ ) y de 16,8 (IC95% 33,7-51,4) meses en los que no tenían la mutación ( $n=118$ ) ( $p=0,880$ ).

Para poder determinar la influencia en éstos resultados en el estado mutacional de FLT3 y la asociación con NPM1 mutado y no mutado, analizamos la SG y SLE del subgrupo LAM con CN y tratamiento intensivo ( $n=64$ ), en función de los diferentes subgrupos mutacionales:

- Grupo A: NPM1+/FLT3+ ( $n= 8$ )SG: 37,7 meses (IC 95% 14,5- NA) ; SLE 11,9 meses (IC 95% 9- NA).
- Grupo B: NPM1+/FLT3- ( $n=17$ ) SG:43,9 (IC 95% 18,7-NA); SLE 16,7meses (IC 95% 10,4-NA).
- Grupo C: NPM1-/FLT3+ ( $n= 9$ ) SG 37,4 (IC 95%32,2-NA); SLE 30,3 meses (IC 95% 9,53-NA).
- Grupo D: NPM1-/FLT3- ( $n= 30$ ) 52,2 meses (IC95% 27,9-NA); SLE 14,8 meses (IC95% 5,1-NA).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ni en SG ( $p=0.230$ ) ni SLE ( $p=0.978$ ).

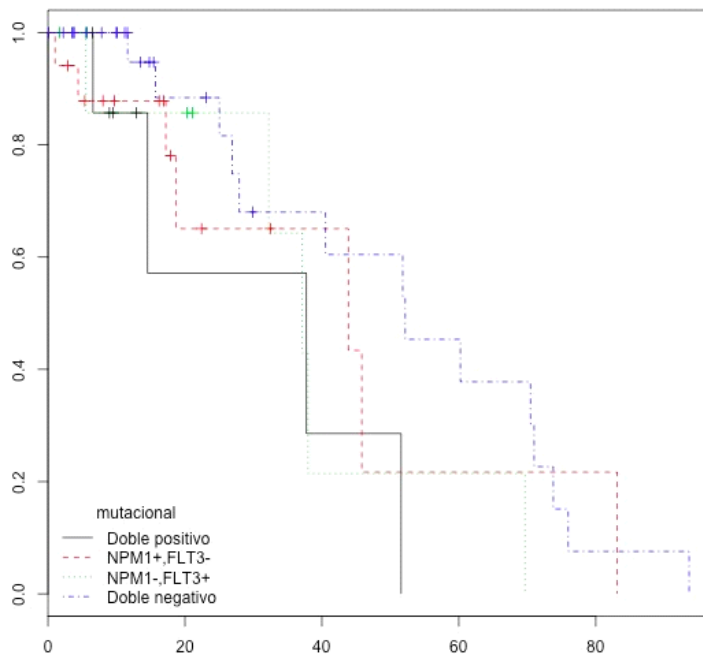


Figura 23. Curvas de supervivencia global de los distintos subgrupos mutacionales de pacientes con CN.

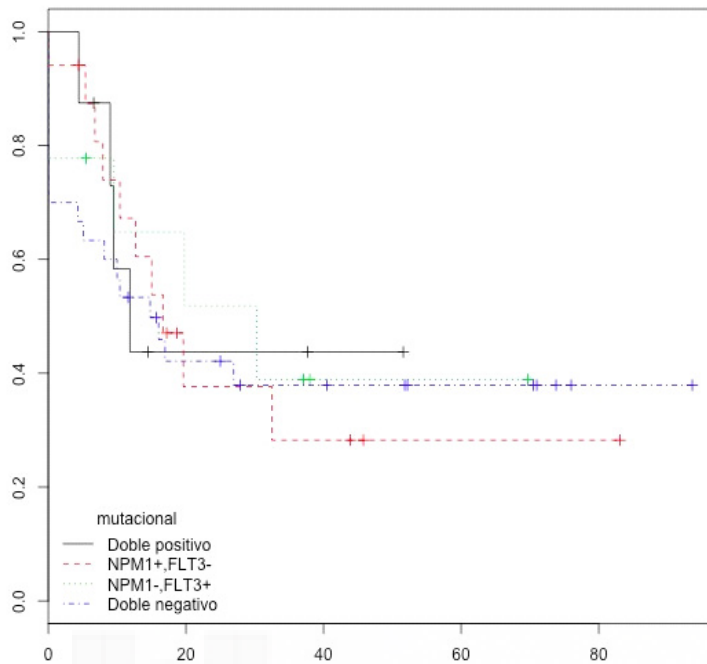


Figura 24. Curva de supervivencia libre de evento de los distintos subgrupos mutacionales en pacientes con CN.

Tras analizar éstos resultados diferentes a los esperados y para averiguar el peso que podrían tener las diferentes estrategias de tratamiento, comparamos SG entre subgrupos tratados con el mismo esquema para bajo riesgo según protocolo < 65 años, las LAM CBF con EMR negativa tras inducción y las LAM CN , NPM1+/FLT3- y con EMR también negativa

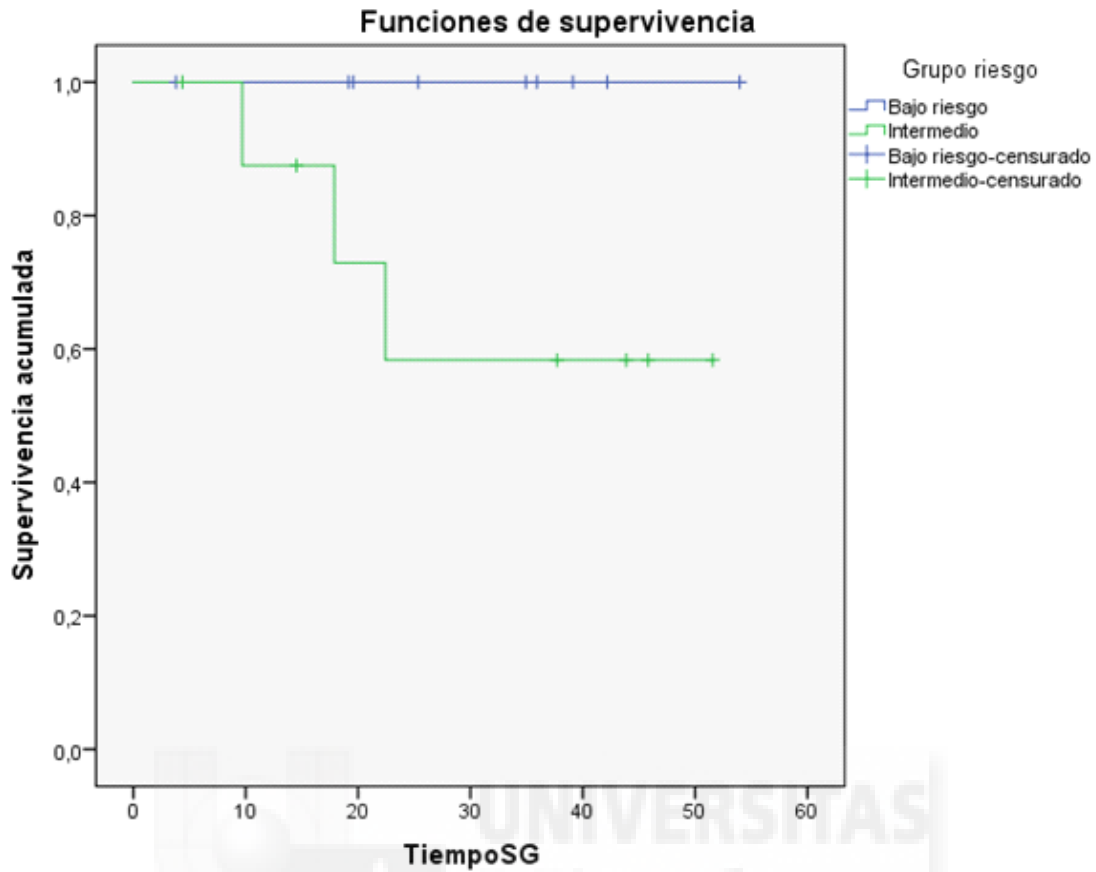


Figura 25. Curvas de SG de los pacientes con CN, EMR negativa y NPM1+/FLT3- (línea verde) con los pacientes con LAM CBF con EMR negativa (bajo riesgo, línea azul).

Como se observa en las curvas, la diferencia es casi estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p=0.061$ ), la SG de las CBF es 100% ( $n=8$ ) mientras que en el otro grupo de 66,7%. ( $n=9$ ).

#### 4.4 ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICOS

Para determinar qué variables podrían considerarse factores pronóstico independientes para la supervivencia, se llevó a cabo un análisis multivariante mediante el modelo de regresión de Cox considerando como variables a estudio: edad  $\leq 65$  años, riesgo citogenético, NPM1 y FLT3. Siendo el modelo claramente significativo, obtenemos los siguientes resultados:

Tabla 14. Análisis multivariante mediante modelo de regresión de Cox.

VARIABLE	EXB (IC 95%)	p*
<65 años	0.366 (0,237-0,565)	<0.001
Riesgo bajo	0.165 (0.035-0,773)	0.022
Riesgo intermedio	0,731 (0,361-1,513)	0,404
Riesgo desfavorable	2,576 (1,165-5,697)	0,019
Npm1+	1,274 (0,744-2,183)	0,377
Flt3-	1,392 (0,818-2,370)	0,223

\*Chi cuadrado =53,438 (p<0.001)

En la serie global de pacientes la variable edad  $\leq 65$  años y el riesgo CG bajo son factores protectores mientras que el riesgo CG desfavorable aumenta el riesgo de mortalidad de los pacientes.

## 5. DISCUSSION.







## 5.1 RESUMEN.

La leucemia mieloide aguda constituye una de las patologías neoplásicas hematológicas con peor pronóstico, aunque poco frecuentes en los adultos. Gracias al avance en el conocimiento de la genética y la biología molecular durante los últimos años, ha sido posible la identificación de numerosos reordenamientos y mutaciones, los cuales, además de constatar la heterogeneidad que tiene esta enfermedad, han abierto la puerta a una mejor caracterización de la misma. Estas alteraciones no sólo han contribuido a poder determinar de una manera más óptima el pronóstico de la patología, sino que además permiten identificar dianas moleculares sobre las que desarrollar y dirigir tratamientos específicos.

Hemos recogido en este estudio una muestra total de 152 pacientes, tratados desde 2008-2016, que cumplían criterios de inclusión-exclusión descritos en apartado "Material y métodos", de un total de 281 LAM no promielocíticas diagnosticadas en nuestro hospital durante ese mismo período. Los pacientes excluidos lo fueron básicamente por no disponer al diagnóstico de los estudios citogenéticos y/o moleculares pertinentes.

En esta tesis, hemos determinado la supervivencia global, supervivencia libre de evento y factores pronósticos de las LAM de nuestra muestra.

Posteriormente hemos analizado éstas mismas variables en el subgrupo formado por las LAM NPM1+, dado su interés clínico en los últimos tiempos, recientemente clasificadas por la OMS como entidad aparte dentro de las leucemias con alteraciones genéticas recurrentes.

Esta mutación se halla asociada frecuentemente a LAM con cariotipos normales y con FLT3 (ITD/D835) confiriendo en éste último caso peor pronóstico, sobre todo si la ratio ITD wt/mut > 0.5-0.8.

Cuando NPM1 mutado aparece en pacientes con cariotipos normales sin asociarse a FLT3 o esta presenta ratios bajas, confiere buen pronóstico y se incluye en el grupo de leucemias de bajo riesgo (Döhner et al, 2017), permitiendo que actualmente se traten, en caso de EMR- postinducción, de forma similar a las LAM CBF.

Según nuestro estudio:

Las leucemias agudas mieloblásticas "de novo" no promielocíticas estudiadas presentan características diferentes a las de la población general: menor incidencia global, edad de presentación en los pacientes inferior a la media habitual y similar

incidencia en ambos sexos. Nuestra muestra de pacientes está sesgada fundamentalmente debido a las características de los pacientes que son recibidos en nuestro centro y a las particularidades demográficas en nuestra provincia, por lo que no es una muestra representativa de las LAM en la población general. En lo que se refiere al resto de variables los resultados son similares a la bibliografía revisada.

La SG Y SLE se asemejan a lo reportado en la literatura y las únicas variables que se asocian de manera independiente son la edad y el riesgo citogenético.

En cuanto al grupo estudiado de LAM NPM1 mutadas, observamos que se asocian significativamente con hiperleucocitosis, cariotipo intermedio (por asociación con cariotipo normal) y con la presencia de mutación FLT3. Igualmente hay una tendencia a presentar mayor porcentaje de blastos en médula ósea y predominio en sexo femenino, ambos en el límite de la significación estadística. Con respecto a la respuesta al tratamiento, obtenemos mayor porcentaje de RC que las LAM NPM1 neg, de forma significativa, pero no hay diferencia en el porcentaje de EMR negativa. Es decir, obtenemos altos índices de RC, pero no se alcanzan en muchos casos EMR negativa, lo que condiciona alta tasas de recidivas. En todo lo descrito anteriormente los resultados son similares a lo esperado según literatura al respecto.

En nuestra muestra la presencia de mutación NPM1+ no confiere mejor pronóstico en estudio uni o multivariante, incluso descartando los pacientes FLT3+, en la SG n SLE. Este hallazgo difiere de los resultados aportados según bibliografía, ya que la presencia de esta mutación (NPM1), particularmente en éstos pacientes con FLT3 no mutados, confiere buen pronóstico y mejores resultados en cuanto a supervivencia.

Hemos obtenido también, peores resultados en cuanto supervivencia comparando los pacientes NPM1 + y EMR- con respecto las LAM CBF y EMR-, estratificadas también como de bajo riesgo y tratadas con los mismos esquemas; lo que nos hace hipotetizar acerca de las causas y sus posibles soluciones.

## 5.2 FORTALEZAS Y LIMITACIONES

Con respecto a la mayoría de estudios publicados, el tiempo de seguimiento en nuestro estudio es amplio, lo que nos permite estudiar supervivencias globales a los 5 años, no sólo a 2 años como la mayoría.

Cabe destacar a favor de éste trabajo que, los pacientes reportados han sido tratados en un mismo centro y casi en un 80% de los casos con el mismo protocolo, lo que homogeniza más la población a estudio, comparada con la población de los diferentes estudios retrospectivos multicéntricos, en los que los enfermos han recibido a veces hasta tres y cuatro tipos de esquemas de tratamiento (Miyawaki et al, 2011; Mrozek et al, 2011; Estey et al, 2013). Éstas son las principales fortalezas de nuestro estudio.

Entre sus limitaciones, destacamos que, en comparación con los estudios similares publicados, el número de pacientes estudiados es menor en nuestro trabajo, al ser un estudio realizado en un solo centro; en consecuencia, también es menor el número de pacientes con la mutación NPM1 a estudio (ya de por sí con baja incidencia en las LAM). Esto resta potencia estadística al mismo, obteniendo resultados clínicamente relevantes, aunque a veces no consistentes estadísticamente.

Otra limitación en cuanto al número de pacientes incluídos ha sido la ausencia de otros estudios mutacionales, en muchos de ellos, ya que ha sido una técnica de implantación progresiva en el último decenio. Por este motivo, no se han incluído como variables a estudio otras mutaciones importantes cuya significación clínica va adquiriendo relevancia (sobre todo según recientes estudios) relacionadas con la NPM1, como DNMT3, p53 e IDH1/2, ya que en la mayoría de los pacientes no se han realizado, punto a tener en cuenta en las conclusiones del trabajo. Gracias al almacenamiento de muestras en los biobancos, éste estudio podría realizarse posteriormente.

## 5.3 COMPARACIÓN CON OTROS ESTUDIOS

### 5.3.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

#### 5.3.1.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES POR AÑO DE DIAGNÓSTICO.

Según los datos anteriormente expuestos, la incidencia de LAM en nuestro hospital  $1.7/10^5$  habitantes/año, inferior a la incidencia esperada según registros internacionales que se sitúa  $3,6/10^5$  habitantes/año (SEER 2013). SEER CANCER STATISTICS REVIEW [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/)

Como se puede observar en la tabla 4, los casos por año reseñados en la misma son el número de leucemias incluidas en el estudio, es decir, aquellas que cumplían criterios de inclusión. El número de pacientes ha ido incrementándose progresivamente desde 2008 hasta ahora. Esto no significa que se diagnostiquen más casos o que la incidencia haya aumentado, si no que la realización de técnicas diagnósticas moleculares se han ido implantando de forma generalizada en los últimos años, disponiendo de citogenética y biología molecular (NPM1 y FLT3, sobre todo, junto con otras mutaciones no incluidas como variables).

#### 5.3.1.2 ANÁLISIS DE VARIABLES CUANTITATIVAS Y CUALITATIVAS

La mediana de edad de presentación de nuestros pacientes se sitúa en torno a los 57 años, ligeramente inferior a la recogida en la literatura, que está en torno a los 60-65 años, incrementándose su incidencia de forma progresiva con la edad.

Esta menor incidencia global, comentada anteriormente, y menor media de edad de nuestros enfermos al diagnóstico puede ser debida a que a los pacientes mayores de 65-70 años suelen tratarse en su hospital de referencia con tratamientos atenuados ya que no son candidatos, según protocolos vigentes a recibir tratamiento intensivo. (Deschler et al, 2006). Por otra parte, los pacientes susceptibles únicamente de soporte paliativo, generalmente los mayores de 70 años, también son tratados en su hospital comarcal, no acudiendo a nuestro hospital.

En cuanto a datos analíticos, casi un tercio de los pacientes presentaba leucocitos  $>50.000 \times 10^6$ . Clásicamente la hiperleucocitosis se ha asociado a un incremento en la mortalidad en la inducción y en la tasa de recaídas (Greenwood et al. 2006). El valor del recuento leucocitario por encima del cual el pronóstico empeora no se ha establecido

con precisión, lo que limita su aplicación clínica en la toma de decisiones. Se suelen utilizar como valores de corte 20,50 o  $100.000 \times 10^6$ .

La incidencia de LAM en nuestro estudio por sexos es de  $1.7 \times 10^5$  en ambos grupos a diferencia de la recogida por diferentes estudios estadísticos poblacionales en la que esta patología es más frecuente en hombres ( $5.6 \times 10^5$ ) que en mujeres ( $3.8 \times 10^5$ ) (SEER, 2013). Aunque no disponemos en nuestro país registros demográficos concretos de este tipo de leucemias para poder comparar con nuestra población real. Un argumento probable para poder explicar ésta diferencia puede ser el siguiente: si tenemos en cuenta las características demográficas de nuestra población, observamos que en nuestra provincia hay ligeramente mayor proporción de mujeres que de hombres y que éstas presentan mayor esperanza de vida, lo que favorece un incremento notable de población femenina susceptible de LAM .  
(documentacion.diputacionalicante.es/pr\_pobl.asp)

La mayoría de nuestros enfermos debutan con mínima sintomatología, presentando un ECOG 1 (56,6%) en el momento del diagnóstico y es de suponer que es debido al motivo anteriormente expuesto (selección de pacientes para tratamiento intensivo), no hay pacientes con ECOG 4, observados según literatura en un 9% en paciente jóvenes y 28,7% en mayores (Juliussen et al, 2009).

En cuanto a la clasificación FAB, las variedades morfológicas más comunes fueron M4 (27,6% similar a la descrita en la literatura) y M5 (23,0%, notablemente superior que se estima en torno 2-10%). El subtipo M2, el más frecuente según la bibliografía (25-30%) constituye tan sólo el 14,47% de los casos (Bennet et al, 1985). Se diagnosticaron morfológicamente 7 casos como M3, leucemia promielocítica, sin alteraciones citogenéticas y/o moleculares características, por lo que pensamos que pudieran corresponder a M5b, aumentando el porcentaje de este subgrupo. Tras la aparición de las diferentes técnicas citogenéticas y moleculares, esta clasificación hoy en día se ha quedado obsoleta y es utilizada meramente desde punto de vista académico más que por su utilidad clínica.

En cuanto al estudio citogenético, los pacientes con cariotipo normal constituyeron el 42,8% y las anomalías citogenéticas más frecuentes fueron: cariotipo complejo 10,5 %, t(8; 21) en 6 % e inv16 en 4%, porcentajes similares a los observados en los estudios publicados (Grimwade et al, 2001; Grimwade et al, 2010).

La distribución de nuestros pacientes según grupos de riesgo fue la esperada: Riesgo Favorable 10%, Riesgo Intermedio 63% y Riesgo Desfavorable 18% (Patel et al,

2012). Cabe destacar que, en pacientes mayores de 65 años, la frecuencia de riesgo desfavorable se incrementa al 26%, debido a que la presencia de mayores anomalías genéticas aumenta con la edad del paciente (Sanderson et al, 2006) mientras que la frecuencia de citogenéticas favorables es tan sólo del 5%.

Las mutaciones NPM 1 y FLT3 ITD /D835 se observaron en un 22 % y 20 % de los pacientes respectivamente, coincidiendo con las frecuencias descritas de aparición en las LAM en los diferentes estudios publicados (Döhner et al 2015; Papaemmanuil et al, 2016). Se presentan más frecuentemente dentro del subgrupo de pacientes con cariotipo normal, donde en nuestro estudio hallamos NPM mutado en 40% de las mismas.

Como se sabe, desde el punto de vista de la evolución de los pacientes con cariotipo normal, la mayoría de trabajos han otorgado siempre un papel favorable a las mutaciones NPM1. No obstante, ese pronóstico favorable se observa fundamentalmente en los pacientes con mutaciones NPM1, pero sin FLT3-ITD, que alcanzan tasas de RC, SLE y SG superiores a las observadas en pacientes con mutaciones concomitantes de NPM1 y FLT3-ITD (Chou et al, 2006). Por tanto, la presencia de FLT3 cambia el pronóstico de estos pacientes. En nuestra muestra, en el grupo de pacientes con cariotipo normal, encontramos en el 14% esta asociación, porcentajes inferiores a los hallados en la literatura.

En cuanto a tratamiento administrado, los pacientes recibieron quimioterapia intensiva con intención curativa en un 80% de los casos, un 10% recibieron tratamiento atenuado y un 11% únicamente medidas paliativas. El porcentaje tan elevado de pacientes que reciben tratamiento intensivo es debido a que, como hemos referido antes en anteriores apartados, en nuestra muestra un 70% son menores de 65 años, susceptibles a priori de tratamientos con intención curativa. El 10% restante corresponden a pacientes de 65-70 años con citogenéticas favorables, sin comorbilidades y/o ECOG 0-1, es decir aptos para este tipo de protocolos.

Los pacientes fueron sometidos a trasplante de médula como tratamiento de intensificación, en un 36% de los pacientes, similar a la media nacional en LAM, que se sitúa en torno al 26-35 %. Con respecto al tipo de trasplante efectuado un 10% fueron autólogos y un 26% fueron alogénicos (familiar HLA idéntico, donante no emparentado, cordón y recientemente donante haploidéntico) constituyendo un 70% del global de los pacientes trasplantados. Con respecto a estos datos, las cifras son similares

a lo esperado según estadística (ONT 2015), (<http://www.ont.es/infesp/Memorias>), cumpliendo de esta manera con las indicaciones establecidas.

El mayor porcentaje de trasplante alogénico se debe a que el trasplante autólogo está indicado únicamente en pacientes con leucemias de bajo riesgo (un 10% en nuestra población total a estudio) y en aquellos de riesgo intermedio que no dispongan de familiar HLA idéntico. Si tenemos en cuenta el bajo porcentaje de pacientes de bajo riesgo y que la posibilidad de encontrar hermano HLA idéntico es de un 30%, podemos explicar la diferencia tan amplia a favor del trasplante alogénico, tanto en nuestro estudio como en la literatura (Cornelissen et al, 2007).

Los pacientes obtienen una remisión completa global en torno al 70%. Las diferencias de resultados en cuanto al tipo de tratamiento administrado son estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). Los pacientes sometidos a quimioterapia intensiva alcanzan tasas de remisión post tratamiento de inducción en torno al 82,5%, similar a la literatura (Ravandi et al, 2007; Döhner et al, 2015). Entre los pacientes con tratamiento atenuado, se consiguió un apreciable porcentaje de RC (35%), situándose entre las reportadas por los diferentes estudios publicados, que varían entre 15% y 40 % en función de los diferentes tipos de tratamiento administrado como hipometilantes, esquemas con FLU+ARA-C, LD ARA-C, u otros (Quintás et al, 2012). Así mismo, los peores resultados en cuanto a RC se obtienen en pacientes con riesgo CG desfavorable (tabla 9) que, por otra parte, son también los de mayor edad. Los pacientes con soporte paliativo no alcanzaron remisión lógicamente.

Dentro de los pacientes que alcanzaron RC, se realizó estudio EMR postinducción en un 91% de los casos, siendo negativa ( $EMR < 0.01\%$ ) en el 36% de los pacientes, similar porcentaje a lo esperado según literatura (San Miguel, 2001). Los pacientes sometidos a tratamientos atenuados no obtuvieron EMR-. Los casos en los que no disponemos datos de la EMR son pacientes con resultados no valorables o en los que no se realizó por diferentes motivos. Cuanto menor sea la EMR menor riesgo de recidiva leucémica. Los pacientes con tratamiento intensivo en RC, presentaron una EMR negativa en 38% mientras que los pacientes con tratamientos atenuados no lograron negativizarla aun consiguiendo RC. Es decir, el tratamiento intensivo en nuestro estudio proporciona mejores resultados ( $p < 0.043$ ) en ese sentido como era de esperar. Por otra parte, en los protocolos atenuados no se halla como objetivo la obtención de una EMR negativa, cosa que en los intensivos sí.



Del 70% de pacientes que alcanzaron RC (de los cuales un 96% fueron pacientes tratados de forma intensiva), recidivaron un 36% de los mismos. Según los diferentes estudios publicados (US IN, EORTC/GIMEMA AML 8, AML10, GOELAM, MRC AML 10) éstas cifras varían entre 25%-60% dependiendo si los pacientes reciben únicamente quimioterapia, trasplante autólogo o alogénico. (Dobrysk, 2004); los mejores resultados en cuanto a menores tasas de recidiva, de forma global, se obtienen tras alotrasplante de progenitores hematopoyéticos.

#### *5.3.1.3 SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTO*

La mediana de supervivencia global (SG) fue de 12,6 meses (IQ 95% 0-104) y de supervivencia libre de evento (SLE) de 10,9 meses (IQ 95% 0-104). La SG y SLE a los 2 años fue de 39% y 36% respectivamente.

Estos datos se encuentran dentro de los obtenidos según los diferentes estudios randomizados realizados a lo largo de las dos últimas décadas por distintas entidades (GOELAM 1997, BGMT 1996, MRC 1998, EORTC- GIMEMA 1995/2003, ECOG 1998, US Intergroup 1998, Hovon-SAKK 2007, Burnett, 2002; Cornelissen, 2007) y algo superiores a los aportados por SEER (2012), CANCER STATISTICS REVIEW [http://seer.cancer.gov/csr/1988\\_2012](http://seer.cancer.gov/csr/1988_2012)), que estiman una supervivencia global a los 2 años de 29,3%, esto es debido a que la población incluida en nuestro estudio presenta una mediana de edad más similar a las de los estudios randomizados referidos, que a la edad de pacientes de SEER, que incluyen enfermos de hasta edades superiores a los 85 años.

#### *5.3.1.4 RELACION DEL RESTO DE VARIABLES CON LA SUPERVIVENCIA GLOBAL Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTO*

La SG y SLE se asociaron de forma estadísticamente significativa en nuestra muestra con la edad, ECOG, cariotipo y RCG, tipo de tratamiento administrado, RC, EMR negativa, trasplante y recidiva ( $p < 0.001$ ). No se apreció asociación con fecha de diagnóstico, sexo, leucocitos, tipo FAB, mutación NPM1 ni mutación FLT3. Dado que SG y SLE se comportan de la misma manera, nos referiremos a SG para describir las asociaciones con el resto de variables.

La mediana de la SG en función de la edad, fue de 26 meses en los  $\leq 65$  años y de 9,4 meses en los  $>65$  años. La supervivencia a 57% y 19% a los 2 años, respectivamente, similar a lo recogido en SEER (2012), cuyas cifras de SG son 48% y



12% respectivamente. Esta diferente de tasa de supervivencias tan importante, como se observa en las curvas, es debida a que los pacientes mayores presentan menor respuesta biológica a los tratamientos y menor capacidad para sobrevivir a la intensidad de dichos esquemas quimioterápicos; en relación a esto, los pacientes con peores índices ECOG (2-3) tienen menor supervivencia estadísticamente significativa ( $p=0.008$ ).

La SG también varía notoriamente en función del riesgo citogenético: así cariotipos de bajo riesgo o favorables  $t(8;21)$  e  $inv16$  presentan cifras de SG a los 2 años de 100-80%; pacientes de riesgo intermedio que presentan cariotipo normal (45%) o  $t(9;11)$  (40%); y los pacientes con citogenéticas desfavorables, con cariotipos complejos alcanzan 18% de supervivencia mientras que los pacientes con deleciones 7q, 5q o  $t(6;9)$  no consiguen alcanzar los 20 meses. Estos resultados, similares a los aportados por la literatura (Grimwade, 2010), dejan patente cómo, a pesar de la intensificación del tratamiento en función de riesgo, no se igualan las cifras de SG a las obtenidas en los pacientes con CG favorables.

Dependiendo del tipo del tratamiento administrado (intensivo, atenuado o paliativo) la supervivencia también variará notablemente: así pacientes sometidos a tratamiento intensivo alcanzan supervivencias a los dos años de 48%, mientras que los pacientes con tratamientos atenuados o paliativos difícilmente llegarán al año.

Obviamente la supervivencia de los pacientes es mayor cuando se alcanza remisión completa tras la inducción 57% a los 2 años, mientras aquellos que no la obtienen fallecen antes de los 14 meses tras diagnóstico.

En cuanto a la determinación de EMR por citometría de flujo, en aquellos pacientes que alcanzan remisión completa tiene en gran valor pronóstico. La EMR negativa mejora la supervivencia, pero no asegura la curación (San Miguel, 1997; San Miguel, 2001). En nuestro estudio los pacientes con EMR negativa alcanzan supervivencias a los dos años de 70%, mientras que como era de esperar, la supervivencia de aquellos con EMR positivas desciende al 41%.

En relación al tratamiento tras inducción, los pacientes sometidos a trasplante autólogo presentan tasas de supervivencia a los dos años de 60%, los trasplantados alogénicos de 77% y los no trasplantados sobreviven tan sólo 24%. Las diferencias son tan amplias porque en el grupo de los no trasplantados están incluidos también pacientes sometidos a tratamiento atenuado y paliativo.

### 5.3.1.5 ANALISIS DE VARIABLES EN RELACION A NPM1

En el estudio de las variables cuantitativas con respecto a la mutación NPM1, observamos que se asocian a leucocitosis ( $p < 0,001$ ) y tendencia a presentar elevado porcentaje de blastos en médula ósea ( $p = 0,09$ ) (Thiede et al, 2006).

Con respecto al análisis bivariante apreciamos una tendencia a la asociación de la mutación NPM1 con el sexo femenino ( $p = 0,069$ ). Con respecto a éste hallazgo hay cierta controversia en la bibliografía revisada, existiendo estudios con resultados similares al nuestro (Thiede et al, 2006; Fallini et al, 2011) y otros en los que no se observan diferencia entre ambos sexos (Suzuki et al, 2005, Boissel et al, 2005). Existen abiertas líneas de investigación en éste sentido que intentan dilucidar si existen factores dependientes del sexo en los mecanismos de desarrollo leucémico.

Asimismo, NPM1 mutada presenta en nuestro trabajo tendencia a ir acompañada de FLT3 ITD/D835 mutado ( $p = 0,062$ ). En cuanto a la presencia en los pacientes con cariotipo normal, en nuestro estudio no hay diferencia significativamente estadística ( $p = 0,128$ ) pero sí encontramos que hay 1,6 veces más de probabilidades de asociación que en los pacientes que no lo presentan, tal y como está descrito en toda la literatura al respecto, donde aparece en un 40% de los casos. Donde sí se observa asociación es en pacientes incluidos en el grupo de riesgo citogenético intermedio ( $p = 0,009$ ). Estos resultados son similares a los aportados por los diferentes estudios revisados y citados anteriormente.

En nuestro estudio no existe asociación con edad, ECOG al debut ( $p = 0,529$ ) ni con ningún subtipo FAB ( $p = 0,714$ ), probablemente por el bajo número de pacientes. Según la bibliografía revisada, las M4 y M5, subtipos con componente mielomonocíticos, son los más frecuentemente asociados (Schnittger et al, 2005; Döhner et al, 2005; Merino, 2010). Cabe destacar en nuestra serie la presencia de 4 pacientes NPM1+ con subtipo M3 según estudios morfológicos, inmunocitoquímicos e inmunofenotípicos iniciales. En todos los trabajos revisados no hallamos ninguna LAP M3 al estar excluidas de los mismos. El porqué de ésta inclusión inicial en nuestro estudio es el siguiente: Las LAM NPM1+ comparten en ocasiones características morfológicas ("CUP LIKE" o núcleo con forma de huella digital), citoquímicas (peroxidasa positiva) e inmunofenotípicas (DR y CD 34 negativos) con la variante M3 hipogranular dificultando el diagnóstico en ausencia de resultados citogenéticos y moleculares que confirmen o no ausencia de PML-RARa y variantes (Oelschlaegel et

al, 2009; Falini et al, 2011; Park et al, 2013). Es por ello que fueron clasificadas en un principio como M3 cambiando el diagnóstico inicial tras confirmar negatividad por citogenética y PCR.

No observamos asociación estadísticamente significativa entre NPM1+ y ser tratado de forma intensiva, atenuada o paliativa ( $p=0,676$ ) ni encontramos asociación con recibir trasplante de progenitores hematopoyéticos ( $p=0,492$ ), ni alogénico (no indicado actualmente en primera remisión completa en pacientes con CN, EMR- y NPM1+/FLT 3 -) ni con autólogo ( $p=0,129$ ).

En cuanto a los resultados de tratamiento en primera línea, los pacientes con NPM1+ presentan mayores tasas de remisión completa tras la inducción (85%) que los que no la presentan (60,5%) ( $p=0,020$ ), evidenciando coincidencia con la literatura revisada (Döhner et al, 2005; Falini et al, 2007; Cilloni et al, 2008). Esta buena respuesta inicial contrasta con la alta tasa de recidivas que presentan en comparación con las LAM que no presentan la mutación (38,2% vs 25% ;  $p<0,001$ )

Parece ser que NPM1 mutado favorece la presencia aberrante de la nucleofosmina en el citoplasma celular. Ésta juega un papel fundamental en la supresión de tumores a través de la activación de p53, haciendo más quimiosensibles a las células neoplásicas, obteniéndose por éste motivo altas tasas de RC. No obstante, parece que la NPM1 desarrolla un papel multifuncional en la patogénesis de la LAM estando involucrada en la proliferación de las células neoplásicas bloqueando su diferenciación a través de otros genes como HOX y JAG1, manteniendo así la célula madre leucémica, sobretudo en presencia de FLT3 mutado. Esta hipótesis podría explicar las tasas elevadas de recaída que se observan en la literatura (Suzuki et al, 2005; Falini et al, 2011). Los mecanismos complejos por los cuales se produce éste fenómeno todavía son desconocidos.

Por otra parte, se están desarrollando estudios que intentan averiguar el papel que juegan otras mutaciones como IDH1/IDH2 y DNMT3 en las LAM CN (Paschka et al, 2010; Döhner et al, 2014). Las líneas de investigación, por tanto, para encontrar dianas terapéuticas son numerosas y variadas en la actualidad.

Como consecuencia de los anteriores resultados, y siendo quizás lo más relevante de éste estudio, encontramos diferencias notables con respecto a lo esperado:

La mediana de SG fue de 16,9 meses (IC 95% 19,1-43,8) en los mutados y de 16,8 (IC95% 33,7-51,4) meses en los que no tenían la mutación ( $p=0,880$ ) y la mediana

de SLE en los mutados fue de 12,5 meses (IC 95% 11,4-13,6) y en los no mutados de 15,0 (IC 95% 9,4-20,5) ( $p=0,928$ ).

La SG del grupo con NPM1 mutado se encuentra dentro de lo esperado pero los resultados en cuanto a SG y SLE del grupo no mutado son superiores a lo reportado (Thiede et al, 2006), no obteniendo, por tanto, diferencias estadísticamente significativas. En la mayoría de la bibliografía revisada, la presencia de ésta mutación confiere buen pronóstico con respecto al grupo no mutado, sobre todo si no va acompañada de mutación FLT3 o ésta se presenta con ratios bajos  $< 0.5$  (NMP1+/FLT3) (Pratcorona et al, 2013; Estey et al, 2013). Resultados similares a los nuestros encontramos en dos estudios de características parecidas (Boissel et al, 2005; Suzuki et al, 2005).

En nuestra muestra tras analizar por subgrupos mutacionales a los pacientes con CN y tratamiento intensivo: A (NPM1+/FLT3+), B(NPM1+/FLT3-), C(NPM1-/FLT3+) y D(NPM1-/FLT3-) observamos en general ,que obtienen mejores tasas de SG y SLE que la bibliografía revisada, pero tampoco encontramos en ningún subgrupo superioridad sobre los otros en cuanto a SG ( $p=0,23$ ) ni en SLE ( $p=0,978$ ) a diferencia de lo reportado, en la que el subgrupo NPM1+/FLT3- obtiene mejores resultados que el resto (Gallagher et al, 2005; Schnittger et al, 2005; Thiede et al, 2006).

Estas discrepancias, sobre todo con respecto a las NPM1+/FLT3- pueden obedecer a la estratificación del tratamiento en función del riesgo, desescalando en cuanto a la intensidad (retirada de antraciclinas en consolidación) del tratamiento quimioterápico actual administrado en este subgrupo (A) e intensificándolo en el resto de subgrupos ( B,C y D )según nuestro protocolo actual, vigente desde 2010, avalado por las guías internacionales y con el que han sido tratados la mayoría de pacientes de éste estudio. En éste protocolo, tras la inducción, si obtenemos una EMR negativa en pacientes con NPM1 mutado, cariotipo normal y ausencia de FLT3, son considerados de bajo riesgo y se consolidan con 2 ciclos de ARA-C AD en monoterapia seguido de trasplante autólogo, como las LAM CBF EMR-.

El diseño de éste protocolo se estableció en base a las conclusiones extraídas de los diferentes estudios realizados hasta ese momento:

1-Superioridad en cuanto a resultados del uso ARA-C AD con respecto a regímenes que incluyen combinaciones de fármacos (Schnaich et al, 2013), sobre todo en las LAM CBF (Löwenberg et al, 2013; Miyawaki et al, 2011).

2-Inclusión de las LAM con cariotipo normal NPM1+/FLT3- o bajo ratio dentro de las LAM de bajo riesgo citogenético (Patel et al, 2012; Estey et al, 2013; Pratcorona et al, 2013; Döhner et al, 2017), tras observar en varios estudios que obtenían similares resultados en cuanto a supervivencias que las CBF.

Pero una diferencia sustancial no destacada es que en la mayoría de estos estudios, los tratamientos administrados incluían varios ciclos de consolidación con ARA-C AD combinada con antraciclinas o con otros fármacos, algunos en ensayo clínico (Mrozek et al, 2012) e incluso aloTPH es decir, tratamientos más intensivos.

Para comparar resultados con respecto al mismo tratamiento, analizamos éstos dos subgrupos de nuestra muestra, pacientes con CN,EMR- y NPM1+/FLT3- y las LAM CBF EMR- incluidos en la misma rama de tratamiento de riesgo favorable. Observamos superioridad en cuanto a SG de las CBF (100%, notablemente superiores que las cifras reportadas según literatura (Schlenk et al, 2004; Marcucci et al, 2004) frente al otro grupo (66,7%) aunque la diferencia estadísticamente no fue significativo ( $p=0,061$ ), quizá por el tamaño muestral tan pequeño .

En base a nuestros resultados ésta menor supervivencia de las NPM1+/FLT3-EMR- con respecto a LAM de bajo riesgo podría deberse a la alta tasa de recidivas que presentan las NPM1+ y a la disminución en cuanto a intensidad de tratamiento recibido, al considerarlas entidades con similar comportamiento biológico y pronóstico. Asimismo, los buenos resultados obtenidos en el resto de pacientes son bastante satisfactorios. Necesitaríamos estudios con mayor número de pacientes, prospectivos y randomizados para extraer conclusiones más consistentes.

Para determinar qué variables podrían considerarse factores pronóstico independientes para la supervivencia en la muestra global, se realizó análisis multivariante mediante el modelo de regresión de Cox, considerando como variables a estudio las más significativas: edad  $\leq 65$  años, riesgo citogenético, NPM1 y FLT3. En nuestra muestra se observa que la edad y el riesgo citogenético fueron las únicas variables significativamente estadísticas. No pudimos establecer asociación pronóstica con las mutaciones NPM1 y FLT3 como refiere la literatura probablemente por el bajo número de pacientes.

## 5.4 IMPLICACIONES PARA LA INVESTIGACION Y LA PRACTICA

Según nuestro estudio, en nuestra muestra las LAM NPM1+/FLT3- tratadas como riesgo bajo según protocolo no obtienen tan buenos resultados en cuanto a SG y SLE con respecto de las LAM CBF tratadas de forma similar, al estar incluidas dentro de bajo riesgo citogenético.

Necesitaríamos realizar estudios con mayor tamaño muestral, para confirmar o no éstas diferencias con el fin de obtener datos más consistentes.

Asimismo, serían también necesarios estudios randomizados que nos permitieran establecer mejoras en cuanto a estrategia de tratamiento a seguir.

En lo referente a la biología de las LAM NPM1+, son importantes las vías de investigación destinadas a conocer las implicaciones de otros genes y mutaciones en la supervivencia de la célula leucémica que puedan influir negativamente en el pronóstico del paciente, fundamentalmente para decidir si intensificar más el tratamiento en este grupo y obtener mejores resultados.

En cuanto al seguimiento, dadas las altas tasas de recidivas de las NPM1+, sería necesario implantar en los protocolos de tratamiento técnicas cada vez más sensibles para su detección precoz, tal y como sucede en otro tipo de leucemias. En éste sentido, hay numerosos estudios que pretenden estandarizar técnicas de seguimiento de EMR por qt-PCR e incluso por NGS, que permitan adecuar mejor el tratamiento a seguir.

## 6 CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio, la incidencia de las LAM, así como su edad de presentación es menor que en la población general, por las características particulares de la muestra descritas.

2. Los subtipos FAB más frecuentes son M4 y M5; los pacientes presentan un riesgo citogenético intermedio en su mayoría, con cariotipos normales, asociando frecuentemente NPM1 mutado, acompañado en 1/3 de ocasiones de FLT3 mutado.

3. En un 70% del total de pacientes tratados se obtiene remisión completa. Los pacientes con tratamientos intensivos alcanzan remisión completa en un 80% con enfermedad mínima residual negativa en un 36%.

4. Los pacientes con tratamientos atenuados consiguen buenos resultados en cuanto a tasas de remisión completa, un 35%, aunque sin conseguir negativizar enfermedad mínima residual en ningún caso.

5. Una menor edad y el riesgo citogenético favorable fueron factores pronósticos independientes favorables para supervivencia global. El pronóstico empeora a medida que aumenta la edad del paciente y así como presentar citogenéticas de alto riesgo, circunstancias asociadas frecuentemente.

6. Las LAM con NPM1 mutado son más frecuentes en mujeres, se asocian a elevado número de leucocitos, se presentan en pacientes con riesgo citogenético intermedio, tendencia a presentar elevado porcentaje de blastos en médula ósea e ir acompañada de FLT3 mutado.

7. Las LAM con NPM1 mutado tienen tasas de remisión completa superiores a las que no presentan la mutación, pero no de enfermedad mínima residual, lo que condiciona altas tasas de recidivas.

8. No se observa mayor supervivencia global ni supervivencia libre de evento en los pacientes con NPM1 mutado con respecto a los no mutados.

9. En los pacientes con cariotipo normal, los resultados de supervivencia global y libre de evento son mejores que los reportados en la literatura, pero no hay diferencias entre ellos según su estado mutacional.

10. Los pacientes que presentan NPM1+/FLT3-, estratificados como de bajo riesgo, obtiene peores resultados que las LAM CBF tras ser tratados con el mismo esquema terapéutico.





# 7 BIBLIOGRAFÍA

- Arber D, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau ML et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; blood-2016-03-643544.
- Bejanyan N, Weisdorf DJ, Logan BR, Wang HL, Devine SM, de Lima M et al. Survival of patients with acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a center for international blood and marrow transplant research study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015; 21:454-9.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan CA. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Intern Med*. 1985; 103:620-5.
- Blau OI, Berenstein R, Sindram A, Blau IW. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013; 54:145-52.
- Burnett AK Current controversies: which patients with acute myeloid leukaemia should receive a bone marrow transplantation?--an adult treater's view. *Br J Haematol*. 2002; 118:357-64.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002; 100:4325-4336
- Cheson BD1, Bennett JM, Kopecky KJ International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003; 21:4642-9.

- Chien-Yuan Chen,<sup>1</sup> Wen-Chien Chou,<sup>1,2</sup> Woei Tsay,<sup>1</sup> Jih-Luh Tang,<sup>1</sup> Ming Yao,<sup>1</sup> Sheng-Yi Huang,<sup>1</sup> and Hwei-Fang Tien<sup>1</sup>PMCID: PMC3599624 Hierarchical cluster analysis of immunophenotype classify AML patients with NPM1 gene mutation into two groups with distinct prognosis. *BMC Cancer*. 2013; 13: 107.
- Chou WC<sup>1</sup>, Tang JL, Lin LI, Yao M, Tsay W, Chen CY, Wu SJ, Huang CF, Chiou RJ, Tseng MH, Lin DT, Lin KH, Chen YC, Tien HF. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):3310-6. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Journal clinical oncology* 2003 Dec 15;21(24):4642-9.
- Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H. AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*. 2005; 106:265-73.
- Colombo E1, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, Volorio S, Bernard L, Pruneri G, Alcalay M, Pelicci PG. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res*. 2006; 66:3044-50.
- Deschler B1, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006; 107:2099-107.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2016; 8:733196.
- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute yeloide leukemia. *N Engl J Med* 2015; 373:1136-1152.
- Döhner K, Paschka P. Intermediate-risk acute myeloid leukemia therapy: current and future. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.34ASH Education Book December 5, 2014 vol. 2014 no. 1 34-43
- Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996; 10: 588-599.
- Drobysk WR. The role of allogeneic transplantation in high-risk acute myelogenous leu-kemia *Leukemia*. 2004; 18:1565–1568.

- Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2010; 28:570-7.
- Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet.* 2006; 368:1894-907. Review.
- Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2013; 88:318-27.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L et al. GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005; 352:254-66.
- Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood.* 2007; 109:874-85.
- Farag SS, Archer KJ, Mrozek K, et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood.* 2006; 108:63-73.
- Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, et al. Cytogenetics and age are the main determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood.* 2006; 108:3280-3288.
- Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005; 23:6285-95.
- Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stölzle A, Späth D, Kuendgen A et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). *Blood.* 2013; 121(23):4769-77.
- Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, Linch DC; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1

- mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111:2776-84.
- Gorello, G Cazzaniga, F Alberti et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying NPM1 gene mutation. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002; 3:179-98. Review. *Leukemia* March 2006; 1-6.
  - 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.
  - Greenwood MJ, Seftel MD, Richardson C, Barbaric D, Barnett MJ, Bruyere H et al. Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47:1245-52.
  - Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood*. 2014; 124:3345-55.
  - Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH et al. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010; 116:354-65.
  - Grimwade D, Walker H, Harrison G et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001; 98:1312-1320.
  - Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on out-come 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*. 1998; 92:2322-2333.
  - Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J. FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 2005; 105:4792-4799.

- INE Padrón de habitantes 2016. Disponible en: [http:// www. INE.es](http://www.INE.es)
- Ivey A, Hills RK, Phil D, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A et al. UK National Cancer Research Institute AML Working Group. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML *N Engl J Med* 2016; 374:422-433.
- Jan J. Cornelissen, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? . *Blood* 2007; 109:3658-3666.
- Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009; 113:4179-87.
- Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002; 3:179-98.
- Lagunas –Rangel et al. FLT3, NPM1 y C/EBP $\alpha$  como marcadores de pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda. *Rev Hematol Mex* 2015; 16:152-167.
- Li J, Zhang X, Sejas DP, Pang Q. Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leuk Res*. 2005; 29:1415-23.
- Löwenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 121:26-28.
- Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010; 28:2348-55.
- Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Maharry K, Kolitz JE, Moore JO et al. Bloomfield 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* 2004; 22:3741-50.

- Martelli MP, Sportoletti P, Tiacci E, Martelli MF, Falini B..Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: biological and clinical implications. *Blood Rev.* 2013; 27:13-22.
- Merino A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Revista del Laboratorio Clínico* año; 3:139-147.
- Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2011; 29:1373-81.
- Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui Net al. A randomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSGAML201 Study. *Blood.* 2011; 117:2366-72.
- Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D. Prognostic Significance of the European LeukemiaNet Standardized System for Reporting Cytogenetic and Molecular Alterations in Adults With Acute Myeloid Leukemia *Clin Oncol.* 2012; 30: 4515–4523.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-1918.
- Nerlov C. *C/EBP $\alpha$*  mutations in acute myeloid leukaemias *Nature Reviews Cancer* 2004; 4, 394-400.
- O'Brien E1, Prideaux S1, Chevassut T. The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol.* 2014; 103175.
- Oelschlaegel U, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Kroschinsky F, Illmer Tet al. HLA-DRneg patients without acute promyelocytic leukemia show distinct immunophenotypic, genetic, molecular, and cytomorphologic characteristics compared to acute promyelocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009; 76:321-7.

- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016; 374:2209-21.
- Park BG, Chi HS, Jang S, Park CJ, Kim DY, Lee JH et al. Association of cup-like nuclei in blasts with FLT3 and NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Ann Hema-tol*. 2013; 92:451-7.
- Patel J., Gönen M., Ph.D., Figueroa M., M.D., Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1079-1089.
- Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R et al. Grupo Cooperativo Para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas Mieloblásticas. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013; 121:2734-8.
- Quintás-Cardama A, Ravandi F, Liu-Dumlao T, Brandt M, Faderl S, Pierce S et al. Epigenetic therapy is associated with similar survival compared with intensive chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012; 120:4840-5.
- Ravandi F, Burnett AK, Agura ED, Kantarjian HM. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2007; 110:1900-1910.
- Reckzeh K, Bereshchenko O, Mead A, Rehn M, Kharazi S, Jacobsen SE et al. Molecular and cellular effects of oncogene cooperation in a genetically accurate AML mouse model. *Leukemia*. 2012; 26:1527-36.
- Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008; 22:915-31.
- San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification *Blood*. 2001; 98:1746-51.

- San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Leukemia*. 2008; 22:915-31.
- Sanderson RN, Johnson PR, Moorman AV, Roman E, Willett E, Taylor PR et al. Population-based demographic study of karyotypes in 1709 patients with adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006; 20:444-50
- Saultz J, Garzon R. Acute myeloid Leukemia: a concise review. *J Clin Med*. 2016; 5:33.
- Schaich M, Parmentier S, Kramer M, Illmer T, Stölzel F, Röllig C et al. High-dose cytarabine consolidation with or without additional amsacrine and mitoxantrone in acute myeloid leukemia: results of the prospective randomized AML2003 trial. *J Clin Oncol*. 2013; 31:2094-102.
- Schaich M, Röllig C, Soucek S, Kramer M, Thiede C, Mohr B et al. Cytarabine dose of 36 g/m<sup>2</sup> compared with 12 g/m<sup>2</sup> within first consolidation in acute myeloid leukemia: results of patients enrolled onto the prospective randomized AML96 study. *J Clin Oncol*. 2011; 29:2696-702.
- Schlenk R F, Benner A, Krauter J, Büchner T, Sauerland C, Ehninger G et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22:3741-50.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* Dec 2005; 106:3733-9.
- Schuringa, J. "Mechanism involved in HSC self-renewal and haematopoietic lineage commitment". Disponible en: <http://www.rug.nl/research/internal-medicine/haematologie>
- SEER CANCER STATISTICS REVIEW. 2013. Disponible en: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013))
- Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of



bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002; 100:2387-92.

- Shlush LI, Zandi S, Mitchell A. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014; 506:328-33.
- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000; 96:4075-83.
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel 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.
- Thomas X, Elhamri M, Raffoux E, Renneville A, Pautas C, de Botton S et al. Comparison of high-dose cytarabine and timed-sequential chemotherapy as consolidation for younger adults with AML in first remission: the ALFA-9802 study. *Blood*. 2011; 118:1754-62.
- Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005; 106:3747-54.
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*. 2001; 61:7233-9.
- Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009; 113:3088-91.

- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*. 2001; 97:2434-9.



## 8. ANEXOS





## PROTOCOLO DE ESTUDIO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIAS AGUDAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

**Citómetro FACSCanto™ y reactivos utilizados Becton Dickinson.  
Software de análisis: *Infinicyt versión 1.8 (Cytognos)*.**

### **Resumen de estrategia de análisis para estudio de EMR:**

- 1.-Comprobar la validez de la muestra (adecuada celularidad, representativa de las 3 series, criterios de RC)
2. Análisis de 5 millones de células nucleadas por tubo
3. Selección inicial de población mieloide inmadura ("*live gate*") con los parámetros comunes FSC, SSC, CD45, CD34, CD117, HLADR
4. Identificación de inmunofenotipos aberrantes en dicha población, con criterios orientados según el inmunofenotipo original, que nos servirá para seguimiento de EMR del paciente.

Tras los procedimientos pertinentes diarios de calibración del citómetro ,procedemos a procesar la muestra de médula ósea:

A-Homogeneizar con pipeta Pasteur de forma muy suave, realizar 2-3 aspiraciones para disgregar los grumos y evitar una lisis excesiva de las células . Fitrar y realizar recuento de la celularidad para ajustar la cantidad de muestra (de 50 hasta 300  $\mu$ L) a la cantidad de anticuerpo monoclonal a conjugar

B-Los aspirados de sobrenadante se realizarán con pipeta Pasteur, muy cuidadosos para evitar aspirar células del botón.

C-Aplicar las siguientes técnicas de marcaje :

### **MARCAJE DE SUPERFICIE CON PANEL SELECCIONADO EN FUNCION DE IF DEL PACIENTE\***

1. AGITAR MUESTRA EN VORTEX
2. INCUBAR 20 MIN EN OSCURIDAD
3. VORTEX Y LISIS (FACSLYSING) 4mL, 5 MINUTOS
4. CENTRIFUGAR 5'a 1800 rpm- DECANTAR- VORTEX
5. LISIS (FACSLYSING) 2 mL, 5 MINUTOS
6. CENTRIFUGAR- DECANTAR- VORTEX
7. RESUSPENDER EN 3000 mcrL PBS
8. ADQUIRIR EN CMF ,NO MAS DE 1.800 evt/seg. Habitualmente unos 5 minutos a velocidad LOW, 5 minutos MEDIUM y 10 minutos HIGH

ADQUIRIR COMPLETAMENTE LAS MUESTRAS PARA CONTAR 5.000.000 DE EVENTOS CD45+.

**LA PRESENCIA MÁS DE 50 EVENTOS PATOLÓGICOS DEFINE UNA EMR POSITIVA EN UMBRAL DE  $10^{-5}$ . INICIAR EL GRABADO DE EVENTOS UNA VEZ PASADO 10 SEGUNDOS DE ADQUISICIÓN.**

\*COMBINACIONES DE AC. UTILIZADAS: PANEL MIELOIDE EUROFLOW (7 tubos con diferentes combinaciones de anticuerpos)

	<b>FITC</b> 30 mcrL	<b>PE</b> 30 mcrL	<b>PerCP 5.5</b> 30 mcrL	<b>PC7</b> 15 mcrL	<b>APC</b> 15 mcrL	<b>APCH7</b> 15 mcrL	<b>V450</b> 15 mcrL	<b>V500</b> 15 mcrL
<b>LEUCEMIA AGUDA MIELOBLASTICA</b>								
0	Muestra lisada y lavada sin marcar							
1	CD16	CD13	<b>CD34</b>	<b>CD117</b>	CD11b	CD10	<b>HLADR</b>	<b>CD45</b>
2	CD35	CD64			IREM2	CD14		
3	CD36	CD105			CD33	CD71		
4	CD2	CD56			CD7	CD19		
5	CD15	CDN62			CD22	CD38		
6	CD42a /CD61	CD203c			CD123	CD4		
7	CD41	CD25			CD42b	CD9		



**PROCEDIMIENTO DE CULTIVO**

**UDHEM - PI- 11**

**REV1(9/2015)**

**PROCEDIMIENTO DE CULTIVO**

UNA VEZ IMPRESO ES COPIA NO CONTROLADA



**PROCEDIMIENTO DE CULTIVO**

**UDHEM - PI- 11**

**REV1(9/2015)**

**1. OBJETO:**

Describir la técnica de cultivo de las muestras para realizar el estudio citogenética convencional de las neoplasias hematológicas.

**2. ALCANCE:**

Afecta al cultivo de las muestras de médula ósea y sangre periférica que se reciben en el laboratorio de citogenética de la Unidad de Diagnóstico Hematológico del Hospital UiP La Fe

**3. DESCRIPCIÓN:**

**Tipo de muestra:** Médula ósea, sangre periférica o biopsias ganglionares.

**Material necesario:**

- Campana de flujo laminar
- Gasas de celulosa y espuma detergente desinfectante para uso sanitario
- Guantes de vinilo
- Contenedor de desechos
- Gradilla
- Micropipetas
- Puntas de micropipetas
- Pipetas pasteur estériles
- Pipetas pasteur no estériles
- Fracos de cultivo con medio RPMI
- Tubos cónicos con PBMAX
- Baño termostático a 37°
- Tubo de hemólisis 3ml
- Estufa de cultivo a 37° con 5% co2
- TPA





**PROCEDIMIENTO DE CULTIVO**

**UDHEM - PI- 11**

**REV1(9/2015)**

**Técnica:**

La siembra se realiza en campana de flujo estéril, para asegurar la esterilidad debe limpiarse según IT *Pautas básicas de trabajo en el laboratorio UDHEM-IT-5*.

a) Siembra y cultivo de médula ósea o sangre periférica en casos patológicos

1. Descongelar los frascos de cultivo con RPMI necesarios, en el baño a 37°.
2. Identificar los frascos de cultivo con una etiqueta de Gestlab y rotular el día de finalización de cultivo, si lleva TPA y poner un punto si lleva 1h de colcemid (esta información estará registrada en Gestlab o en la hoja de registro de valores preanalíticos UDHEM-M-11).
3. Sembrar con la micropipeta en uno o dos frascos de cultivo, según la cantidad de muestra disponible.  
 SP: 0.5ml  
 MO: los µl que se indican en la hoja de registro de valores preanalíticos UDHEM-M-11 [que serán 20 millones (20 x 10<sup>6</sup>) células/ml de médula ósea o 0.5ml en caso de no poder realizarse el contaje celular]
4. Si lleva TPA, añadir una alícuota “TPA SOLUCIONES DE TRABAJO” a cada cultivo.
5. Según el diagnóstico de la muestra, incubar en estufa entre 24-72h con el tapón abierto (esta información estará registrada en Gestlab o en la hoja de registro de valores preanalíticos UDHEM-M-11)

b) Siembra y cultivo de sangre periférica para estudio de fragilidad cromosómica

1. Comprobar que se ha solicitado la mitomicina c a farmacia según *Procedimiento de registro de muestras en I. citogenética UDHEM-PI-10*
2. Descongelar 8 tubos con medio de cultivo PBMAX en el baño a 37°.
3. Identificar los tubos con una etiqueta de Gestlab y rotular el día de finalización de cultivo, rotular dos tubos como 72, dos como DEB, dos como MMC10 y dos como MMC40.
4. Sembrar 0.4ml de sangre total en cada uno con la micropipeta.
5. Incubar en estufa 24 horas a 37° con el tapón abierto.
6. A las 24h, justo antes de añadirlo al cultivo, diluir el stock de Diepoxibutano hasta 10µg/ml (procedimiento de preparación de reactivos UDHEM-IT-4).
7. En los tubos rotulados como DEB, añadir 50µl de solución de Diepoxibutano para que queden con una concentración final de 0.1µg/ml.



**PROCEDIMIENTO DE CULTIVO**

**UDHEM - PI- 11**

**REV1(9/2015)**

8. Mezclar bien el contenido de los tubos y dejarlos nuevamente en estufa a 37° con el tapón abierto
9. A las 48h se sacarán cuatro tubos de cultivo (distintos de los que hemos añadido el DEB) para tratarlos con mitomicina c (que recibiremos de farmacia en el momento de usarla).
10. Adoptar las medidas de seguridad necesarias para trabajar con citostáticos según la NPT 740: doble guante, bata y mascarilla.
11. Hacer una dilución 1:100 de la MMC con RPMI. (10µl MMC+ 990 RPMI)
12. En los tubos MMC10 añadir 5µl de la dilución 1:100 de MMC para que haya 10ng/ml.
13. En los dos tubos MMC40 pondremos 20 µl de la dilución 1:100 de MMC para que haya 40ng/ml (ver cálculos en anexo1).
14. Dejarlos incubando nuevamente en estufa a 37° con el tapón abierto.
15. Desechar en el contenedor de residuos XXX el vial de mitomicina, la pipeta, los guantes y la mascarilla. Retirar la bata.
16. A las 72h proceder al sacrificio según el procedimiento UDHEM-PI-12.

c) Siembra y cultivo de sangre periférica para cariotipo constitucional (SP en tubo de 10ml con heparina sódica)

1. Descongelar los tubos de cultivo con PBMAX necesarios, en el baño a 37°.
2. Identificar los tubos con una etiqueta de Gestlab y rotular el día de finalización de cultivo.
3. Sembrar 0.4ml de sangre total con la micropipeta.
4. Dejar 72h en estufa a 37°C con el tapón abierto, moviendo suavemente al menos una vez al día.

		UNIDAD DIAGNÓSTICO HEMATOLÓGICO
<b>PROCEDIMIENTO DE CULTIVO</b>		
<b>UDHEM - PI- 11</b>	<b>REV1(9/2015)</b>	

#### 4. REGISTROS:

Se registrará en Gestlab en “protocolo de cultivo” la realización de la siembra, eligiendo del desplegable de “estado”: sin sembrar, en proceso, finalizado 72h, finalizado 24h o no procede.

#### 6. DOCUMENTOS:

IT Pautas básicas de trabajo en el laboratorio UDHEM-IT-5  
Hoja de registro de valores preanalíticos UDHEM-M-11  
Procedimiento de registro de muestras en el laboratorio de citogenética UDHEM-PI-10

#### 6. ANEXOS:

Anexo 1 Cálculos de la MMC

#### 7. REVISIONES:

REV1 (9/2015) Primera edición.

UNA VEZ IMPRESO ES COPIA NO CONTROLADA



ANEXO 1 CÁLCULO DE LA MITOMICINA

$$1\text{mg/ml} = 1\mu\text{g}/\mu\text{l} = 1000\text{ng}/\mu\text{l}$$

**10ng/ml = 50ng/5ml**

$$1000\text{ng} \cdots \cdots 1\mu\text{l}$$

$$50\text{ng} \cdots \cdots x$$

$$x = 0.05 \mu\text{l} = 5\mu\text{l de una dilución } 1/100 \text{ (10 } \mu\text{l de mitomicina stock} + 990 \mu\text{l de medio)}$$

**40ng/ml = 200ng/5ml**

$$1000\text{ng} \cdots \cdots 1\mu\text{l}$$

$$200\text{ng} \cdots \cdots x$$

$$x = 0.2 \mu\text{l} = 20\mu\text{l de una dilución } 1/100 \text{ (10 } \mu\text{l de mitomicina stock} + 990 \mu\text{l de medio)}$$

UNA VEZ IMPRESO ES COPIA NO CONTROLADA



**PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO**

**UDHEM - PI- 12**

**REV2(9/2015)**

**PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO**

UNA VEZ IMPRESO ES COPIA NO CONTROLADA



**PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO  
UDHEM - PI- 12**

**REV2(9/2015)**

**1. OBJETO:**

Definición de las actividades reguladas por el documento y el propósito de las mismas.

**2. ALCANCE:**

Ámbito de aplicación del documento y áreas afectadas.

**3. DESCRIPCIÓN:**

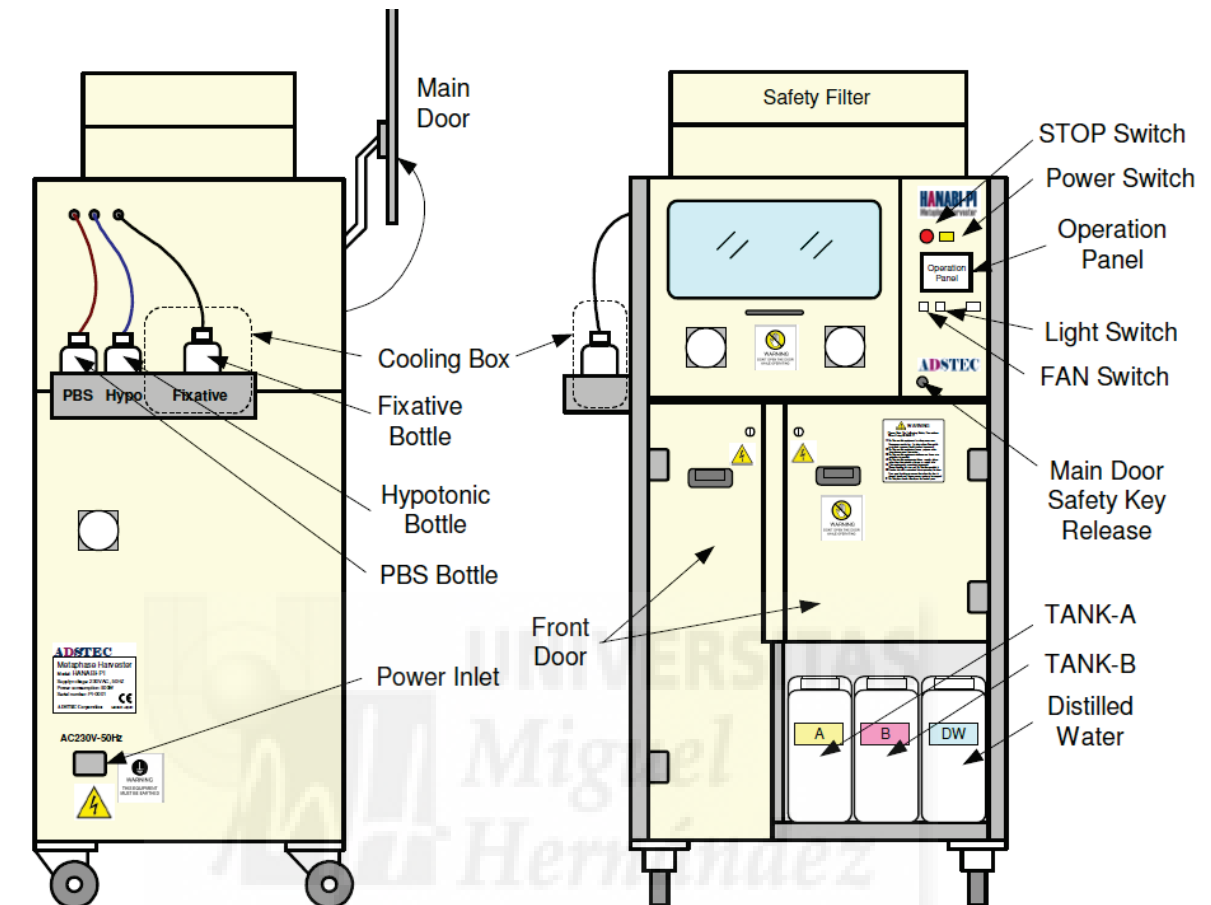
**SACRIFICIO AUTOMÁTICO DE LOS CULTIVOS (HANABI-P1)**

1. Añadir 0,1 ml del antimetabólico colcemid al frasco de cultivo, mezclar bien.
2. Dejar en estufa de CO2 durante:  
1 hora las linfoblásticas (SLPC, LNH). Frasco de cultivo de tapón azul o de tapón rojo marcados con un punto.  
30m las mieloblásticas (LMA, LMC, SMD, SMPC).
3. Transferir el contenido a un tubo cónico y poner en el HANABI.



**PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO  
 UDHEM - PI- 12**

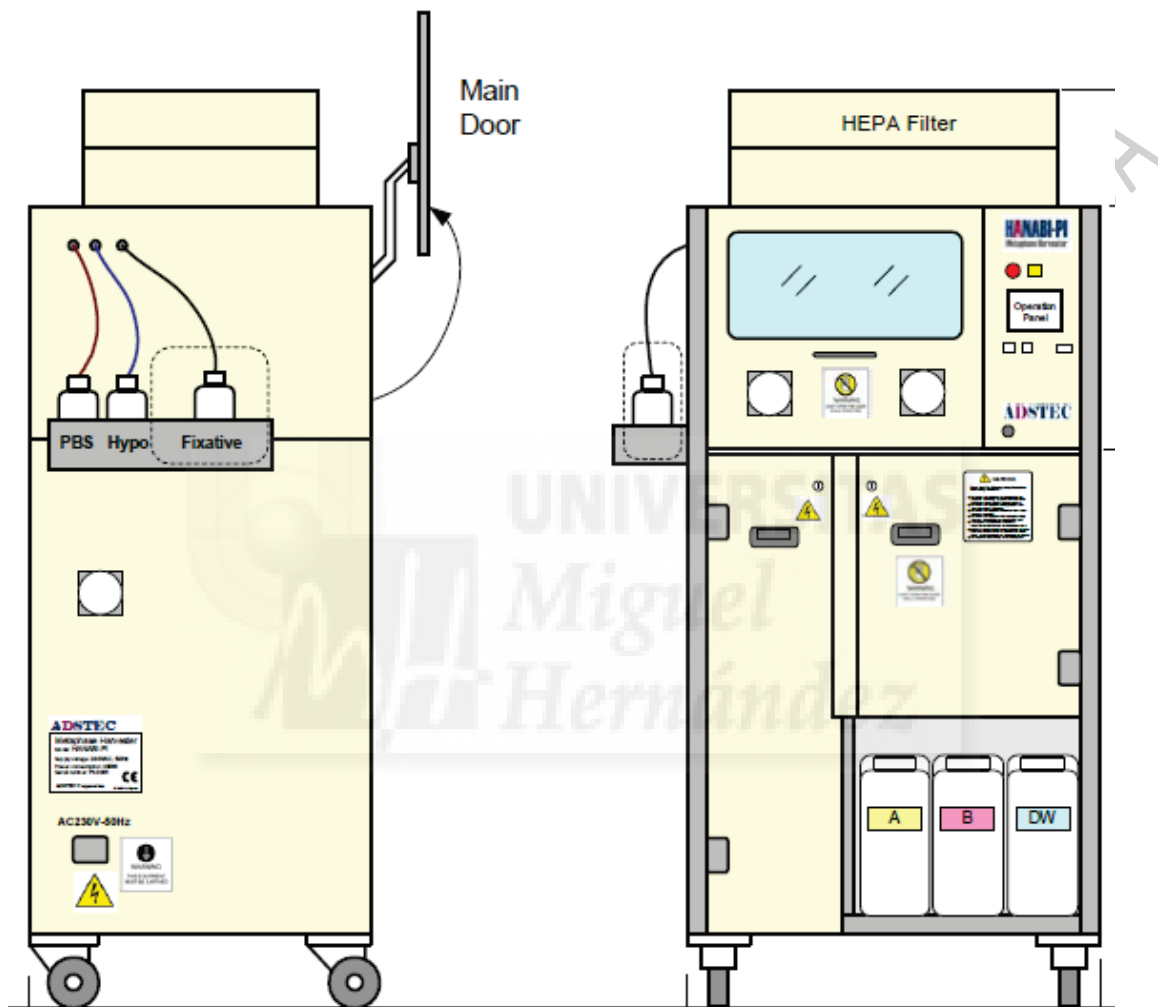
**REV2(9/2015)**



UNA VEZ IMPRESO ES



### 6.1 Encendido de la máquina.



1. Pulsar el botón POWER.
2. Comprobar las garrafas de la parte inferior.
  - a. La garrafa DW “Distilled wáter” (H<sub>2</sub>O destilada) debe estar completamente llena.
  - b. La garrafa A “Rinse” (donde la maquina desecha el líquido de lavado de puntas) debe estar completamente vacía.
  - c. La garrafa B “Fixative” (donde la máquina desecha el sobrenadante de los tubos) debe estar completamente vacía.





**PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO  
UDHEM - PI- 12**

**REV2(9/2015)**

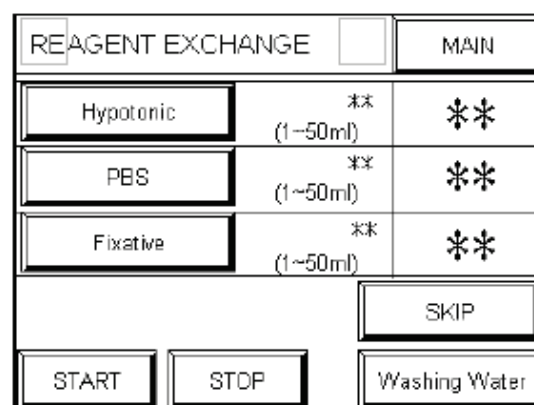
- Preparar el CLK y el CARNOY según tabla adjunta teniendo en cuenta el número de tubos a procesar y cambiar las botellas de H<sub>2</sub>O, situadas en el lateral izquierdo, que se usan para el proceso de limpieza, por las de Hipotónico (CIK) y Fijador (Carnoy) haciendo coincidir cada botella con su correspondiente tubo (está indicado).

MUESTRAS	CARNOY	(METANOL +	ÁCIDO A.)
1	40	(30+	10)
2	80	(60+	20)
3	110	(90+	30)
<b>4</b>	<b>160</b>	<b>(120+</b>	<b>40)</b>
5	200	(150+	50)
6	240	(180+	60)
7	280	(210+	70)
<b>8</b>	<b>320</b>	<b>(240+</b>	<b>80)</b>
9	360	(270+	90)
10	400	(300+	100)
11	440	(330+	110)
<b>12/16</b>	<b>480</b>	<b>(360+</b>	<b>120)</b>




- Encender el ventilador **FAN** y la luz **LIGHT**, son dos interruptores situados debajo de la pantalla táctil que deben pasar a **ON**.

### 6.3.2 Puesta en funcionamiento

- Ir a la pantalla táctil. Debe usarse siempre con el lápiz que hay situado al lado de la pantalla. En la mayoría de los procesos parpadeará la opción adecuada para facilitar el uso.
- Seleccionar **REAGENT EXCHANGE**.
- Seleccionar **HYPOTONIC** y **START**  
(se lava el tubo del CIK).
- Seleccionar **FIXATIVE** y **START**  
(se lava el tubo de Carnoy).
- Seleccionar **PBS** y **SKIP** (para saltar este paso).





6. Seleccionamos **SELECT PROTOCOL**.
7. Seleccionamos el protocolo **A** y .
8. Seleccionar **MAIN PROCESS** y .
9. Seleccionar el número de cultivos (4, 8, 12 ó 16) que vamos a procesar. Si no coincide con ninguna de las opciones se coge el número mayor y se rellenan con agua destilada) y .
10. Seleccionar **SET SAMPLES** y abrir la puerta exterior.
11. En este paso, la pantalla nos indicará donde deben situarse los tubos para que estén equilibrados. Seleccionamos **SET START** y cuando la máquina emita una señal acústica y se ilumine un piloto verde situado en la pared del interior abrimos la puerta de la centrifuga hasta el fondo.
12. Delante tendremos el **ST1** donde colocar los tubos. La pantalla indica las posiciones correctas y confirmará que están bien puestos cambiando la posición a color azul. Cuando el **ST1** está completo se colorea el **OK** (situado en la esquina superior izq).
13. Se cierra la tapa de los tubos y se cierra el botón negro que se debe encajar y apretar hacia abajo (se oye clic).
14. Se cierra la tapa de la centrifuga y parpadea la opción **NEXT** que tendremos que seleccionar.
15. En este momento la centrifuga pasa al ST2. Volverá a encenderse la luz verde cuando podamos abrir. Se repiten los pasos igual que en ST1. Si en este ST no hubiera que colocar tubos hay que asegurarse que el botón negro esté bien cerrado (este paso es muy IMPORTANTE). Presionar **NEXT**.
16. Esto se repite con los 4 ST.
17. Cerrar la puerta delantera y seleccionar **MAIN START** durante 5seg.
18. El equipo empezará a procesar y tardará en torno a 1,30-2,00h.
19. Cuando ha terminado emite una señal acústica y parpadea **START**.

		UNIDAD DIAGNÓSTICO HEMATOLÓGICO
<b>PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO</b>		
<b>UDHEM - PI- 12</b>	<b>REV2(9/2015)</b>	

20. Pulsar **START** y retirar los tubos mediante el mismo procedimiento que para ponerlos (**Pasos del 11 al 14**).
21. Una vez terminado se puede volver a poner o pasar a limpiar el equipo (Anexo 1)
22. Los tubos pasan automáticamente al protocolo de extensiones.

### Sacrificio manual de los cultivos MO

- Transferir el contenido a un tubo de centrifuga y centrifugar a 1200rpm durante 10 minutos.
- Decantar el sobrenadante dejando el botón y agitar el tubo para que se resuspenda.
- Choque osmótico: añadir gota a gota con una pipeta pasteur, unos 8mL de CLK 0.075M, agitando al mismo tiempo. Dejar actuar 30 minutos al baño maría a 37° C.
- Centrifugar de nuevo, decantar el sobrenadante y añadir 5mL del fijador Carnoy (metanol: ácido acético 3:1) gota a gota y con agitación suave continua en el vórtex. Dejar actuar a temperatura ambiente 10 minutos.
- Centrifugar y decantar el sobrenadante, añadir 5 ml del fijador Carnoy y dejar en nevera 30 minutos.
- Centrifugar y decantar, añadir 1mL de fijador Carnoy, resuspender el botón, pasar a un tubo NUC debidamente identificado con pegatinas y pasar a hacer las extensiones.

### Sacrificio SP fragilidad y constitucional

- Transferir el contenido a un tubo cónico y centrifugar a 1500 rpm. durante 5 minutos.
- Decantar el sobrenadante dejando el botón y agitar el tubo para que se resuspenda.
- Choque osmótico: añadir gota a gota con una pipeta pasteur, unos 8ml de CLK 0.075M, agitando al mismo tiempo. Dejar actuar 15 minutos a temperatura ambiente.



**PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO**

**UDHEM - PI- 12**

**REV2(9/2015)**

- Añadir 0.5mL de Carnoy (metanol: ácido acético 3:1) gota a gota y con agitación suave continua en el vórtex y agitar con una pipeta (primera fijación).
- Centrifugar de nuevo 1500 rpm. durante 5 minutos, decantar el sobrenadante.
- Añadir 5mL del fijador Carnoy y dejar actuar a temperatura ambiente 10 minutos (segunda fijación).
- Centrifugar de nuevo 1500 rpm. durante 5 minutos y decantar el sobrenadante.
- Añadir 5mL del fijador y dejar 10 minutos (tercera fijación).
- Centrifugar de nuevo 1500 rpm. durante 5 minutos y decantar el sobrenadante.
- Añadir 5mL del fijador y dejar 20 minutos en la nevera (cuarta fijación).
- Centrifugar de nuevo 1500 rpm. durante 7 minutos y decantar el sobrenadante.
- Añadir 1mL de fijador, resuspender el botón y realizar las extensiones inmediatamente (ver protocolo). La muestra sobrante serán transferidas a un tubo NUC debidamente identificadas y comprobando que la pegatina de identificación corresponde con la muestra. Se deben archivar almacenándolas a -80°C.

**5. REGISTROS:**

Se registrará el sacrificio en gestlab, en el protocolo de cariotipos

**5. DOCUMENTOS:**

Manual de instrucciones del Hannabi Harvester

**6. ANEXOS:**

ANEXO 1 Limpieza y mantenimiento del Hannabi

**7. REVISIONES:**

REV1(9/2015) Primera edición.



## ANEXO 1 LIMPIEZA Y MANTENIMIENTO DEL HANNABI

Este procedimiento debe realizarse siempre al finalizar el día. La función es eliminar el **HYPOTONIC** y el **FIXATIVE** de los tubos y agujas y cambiarlos por **H<sub>2</sub>O**. Por ello siempre que se haya hecho el proceso de inicialización (**aunque no se haya usado**) hay que hacerlo.

1. Seleccionar **MAIN**.
2. Seleccionar **REAGENT EXCHANGE**.
3. Cambiar las botellas de **HYPOTONIC** y **FIXATIVE** por las de **H<sub>2</sub>O destilada**.
4. Seleccionar **HYPOTONIC** y **START** (se lava el tubo del CIK).
5. Seleccionar **FIXATIVE** y **START** (se lava el tubo de Carnoy).
6. Seleccionar **PBS** y **SKIP** (para saltar este paso).
7. Seleccionar **NEEDLE WASHING**.
8. Seleccionar **REAGENT SET** y poner 4 tubos con H<sub>2</sub>O destilada y pulsar **START**.  
Este proceso limpiará las agujas de aspiración.
9. En la pantalla parpadea **REMOVE**. Pulsar y sacar los tubos.
10. Automáticamente se pone en marcha el proceso **PUMP DRYING** (tardará 300seg).  
Este proceso es para el secado de la centrifuga.
11. Durante este procedimiento se puede vaciar las garrafas A y B y rellenar la de H<sub>2</sub>O destilada.
12. Cuando termine **POWER**.

Una vez a la semana (LUNES) se debe purgar el compresor:

1. Abrir la puesta inferior. El compresor es la bomba situada en la parte inferior izquierda.
2. Desenrollar el tubo de plástico que sale del compresor y colocarlo dentro de una garrafa.



**PROCEDIMIENTO DE SACRIFICIO  
UDHEM - PI- 12**

**REV2(9/2015)**

3. Abrir la llave de paso del compresor poco a poco para que vaya vaciando el agua que tiene en el interior.
4. A la derecha del compresor hay una pequeña ampolla de cristal (con letras chinas). En la parte inferior tiene una pequeña bolita que hay que presionar dos o tres veces con un papel para que absorba el agua que sale.

**PBS / Hypotonic Solutions**

ABC	No.	Items	Vol. [ ml ]	Proc. Times	Number of Samples			
					4	8	12	16
1	1	Reagent exchange	40	1	40	40	40	40
	2	Injection	5	1	20	40	60	80
	3	Refresh injection line	25	1	25	25	25	25
	4	Amount of reserve	50	1	50	50	50	50
Total volume (ml)					<b>139</b>	<b>163</b>	<b>187</b>	<b>211</b>

**Fixative Solutions**

IJK	No.	Items	Vol. [ ml ]	Proc. Times	Number of Samples			
					4	8	12	16
4	1	Reagent exchange	30	1	30	30	30	30
	2	G process Injection	0.5	1	2	4	6	8
	3	Injection	5	4	80	160	240	320
	4	Refresh injection line	12	4	48	48	48	48
	5	Amount of reserve	50	1	50	50	50	50
Total volume (ml)					<b>210</b>	<b>292</b>	<b>374</b>	<b>456</b>



UNA VEZ IMPRESO ES COPIA NO CONTROLADA







**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN**

**UDHEM - PI- 13**

**REV1(9/2015)**

**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN**

UNA VEZ IMPRESO ES COPIA NO CONTROLADA





**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN**

**UDHEM - PI- 13**

**REV1(9/2015)**

**1. OBJETO:**

Describir el procedimiento para realizar las extensiones y teñirlas.

**2. ALCANCE:**

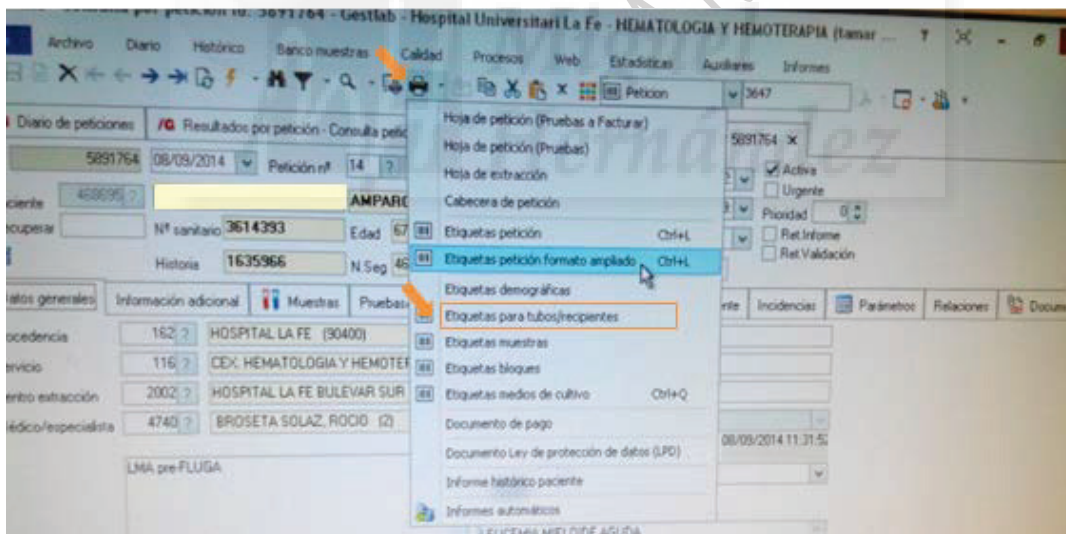
Afecta a las extensiones y tinción de muestras realizadas en el laboratorio de Citogenética de la UDHEM.

**3. DESCRIPCIÓN:**

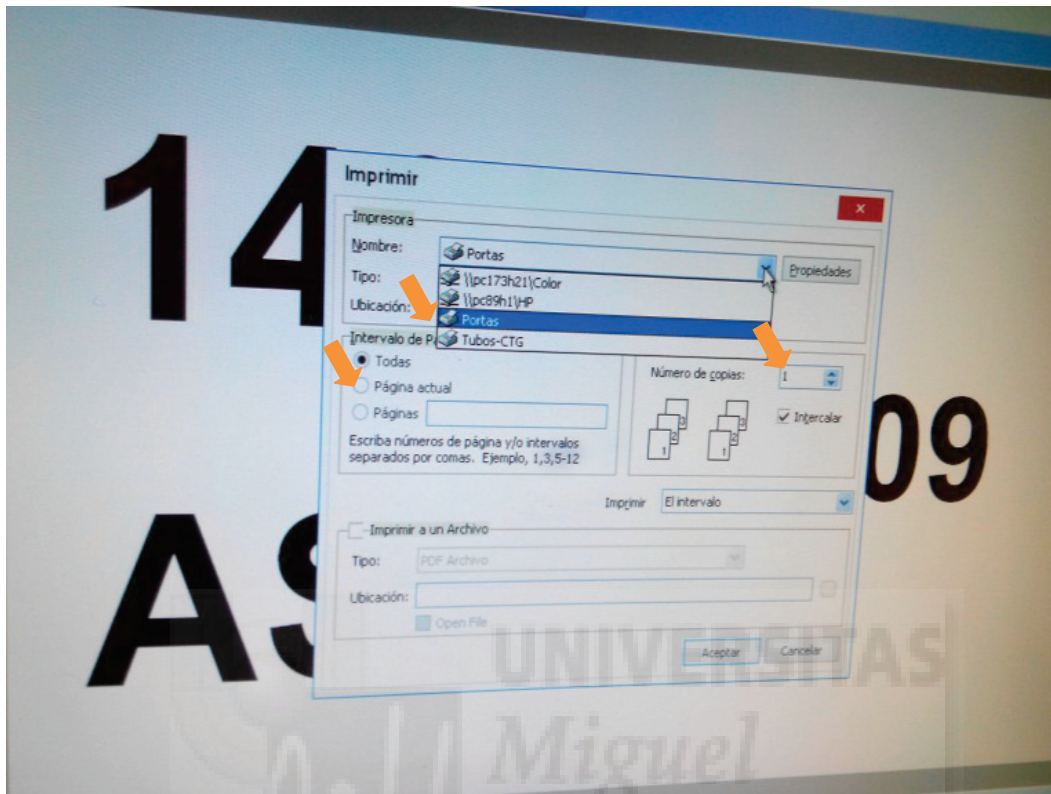
**3.1 Etiquetas de gestlab para extensiones:**

Sacaremos la lista de trabajo para ver las extensiones que hay que hacer. Y sacaremos etiquetas de esos casos de la siguiente manera:

- En el teclado, pulsaremos F2 (barra superior)
- En la pantalla que se abrirá haremos clic sobre la impresora.
- Haremos clic sobre *“Etiquetas para tubos/recipientes”*: se abrirá la ventana de impresión.



- En el apartado **impresora**, elegir *“portas”*
- En **Intervalo de página**, elegir *“página actual”*
- En **Número de copias**, poner el número de etiquetas necesario (5 para cariotipo, para FISH, en función del nº de portas)



### 3.2 Extensión automática ( Hanabbi Spreader)



1. Pulsar el botón **POWER** para encender el equipo.
2. **Comprobar** que la cubeta situada en la parte posterior tiene H<sub>2</sub>O destilada hasta la marca.
3. Pulsar el botón **READY**.
4. Si las muestras están recién procesadas pasar a realizar las extensiones (Paso 9).

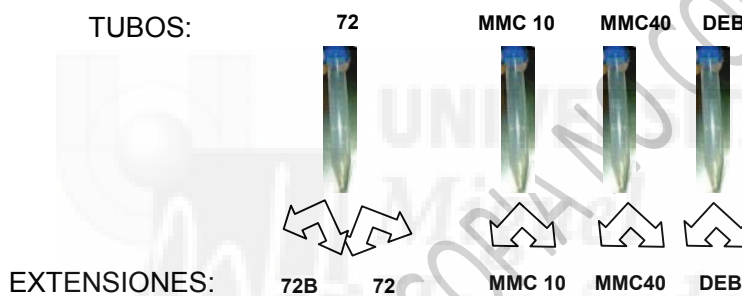


**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN**

**UDHEM - PI- 13**

**REV1(9/2015)**

5. Si son de días anteriores, centrifugar las muestras que se van a procesar a 1200rpm 10 min o 1500rpm 5min.
6. Quitar el sobrenadante y añadir entre 0,5 y 1,0mL (según el pelet) de fijador Carnoy recién hecho.
7. Comprobar que las temperaturas de **BASE**, **BATH** (baño) y **WALL** (pared) están en 10,0.
8. Comprobar que **DRY IND** está entre 8,5 y 9,0. Según la morfología de las metafases podemos modificar el DRY IND entre estos valores para mejorarla.
9. Etiquetar los portas correspondientes y numerarlos con lápiz.  
En los casos de fragilidad se escribirá con lápiz 72B, 72, M10, M40 y DEB.



10. Abrir la tapa y colocar la gradilla de portas en su posición.
11. Cerrar la tapa y pulsar **READY**.
12. Cuando el piloto verde (**OPTIMUM**) está encendido se abre la puerta corredera superior y se añaden en cada uno de los agujeritos 20µL de muestra.
13. Cerrar la puerta y pulsar **DRYING** que pasará a color rojo.
14. Cuando el **DRYING** se apague abrir la puerta grande y sacar la gradilla de portas.
15. Realizar este proceso con cada uno de los casos a procesar.
16. Cuando se acabe vaciar el recipiente de H2O y limpiar con un paño húmedo.
17. Mirar en el microscopio invertido para ver la densidad celular y la extensión de los cromosomas.
  - En caso de que estén aglomeradas las células, añadir dos gotas más de fijador Carnoy a la suspensión celular en el NUC o tubo cónico.
  - Si no se ven células ni metafases, centrifugar NUC o tubo cónico a 1500rpm 5 min., quitar el sobrenadante de fijador Carnoy y resuspender el botón con menos cantidad de fijador Carnoy.

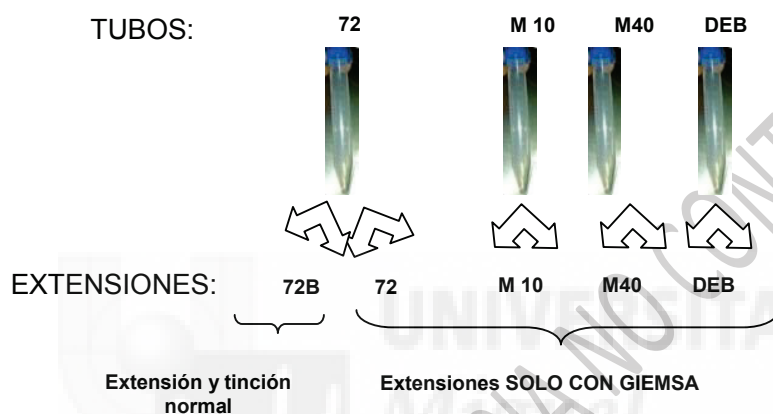


**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN**

**UDHEM - PI- 13**

**REV1(9/2015)**

18. Se deben realizar 2 extensiones para cariotipo (4 si no hay metafases o son escasas) más las de FISH correspondientes.
19. Para las muestras de fragilidad, las dos extensiones marcadas como 72B se seguirá el proceso normal. Las otras dos de 72h, y las 6 de M10, M40 y DEB continuarán en el paso 5 del apartado de Tinción (no las pondremos en horno, ni en tripsina)



20. Dejar envejecer las preparaciones 1 hora en horno de desecación a 90°C o toda la noche a 60°.
21. Sacarlos del horno de desecación 10 minutos antes de la tinción para que se atemperen.





**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN**

**UDHEM - PI- 13**

**REV1(9/2015)**

### 3.3 Tinción

1. Preparar un vaso con 100ml de PBS.
2. Preparar la tripsina (ha de estar en nevera al menos una hora antes de la tinción).
3. Teñir un primer porta de cada caso sumergiéndolo en la solución de Tripsina alrededor de 10 segundos (ajustar en función de las condiciones ambientales del laboratorio) sin dejar de agitar el porta durante ese tiempo.
4. Lavar con PBS (no más de 3 segundos)
5. Sumergir en el Coplin con Giemsa 3 minutos.
6. Extraer el porta con unas pinzas y lavar con agua
7. Dejar secar el porta al aire, inclinado en una bandeja
8. Limpiar el porta por el reverso para quitar restos de colorante
9. Observar al microscopio, buscar una metafase y ver si tienen bandas y no están desflecados. Si la tinción es correcta, teñir el resto con los mismos tiempos y dejar secar al aire.
10. Si están desflecados reducir el tiempo de tripsina 1 segundo/cada vez.
11. Si no están bandeados aumentar el tiempo de Giemsa al 5% durante 1 minutos/cada vez.
12. Si están muy bandeados reducir el tiempo de Giemsa al 5% durante 1 minutos/cada vez.
13. Una vez están secos hay que cubrirlos: Se ponen dos gotas de pegamento Eukit en cada porta y se cubren con un cubre de 60x24.
14. Se dejan reposar unos 10 minutos y después con una punta de pipeta o similar se eliminan las burbujas poco a poco.

### 3.3 Pegado del cubre para portaobjetos

Se cubrirán las extensiones para cariotipo, una vez estén secas.





## PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN

UDHEM - PI- 13

REV1(9/2015)

1. Con el cuentagotas preparado con Eukit y Xilol (ver procedimiento de preparación de reactivos UDHEM-IT-4) pondremos dos gotas en los extremos de cada porta, lo suficientemente grandes como para cubrir todo el campo microscópico, sin crear espacios vacíos o de aire entre el cubre y la muestra.
2. Pondremos un cubre de 24x60mm encima, asegurándonos de que solo hay uno, ya que si se pone doble no se podrá leer en el metafer. Si se forman burbujas de aire, las retiraremos haciendo presión con una punta de Micropipeta para que se elimine por los bordes.
3. Limpiaremos el excedente de Eukit con un pañuelo si hay restos.
4. Esperaremos de 15 minutos a 1 hora de sellado y prepararemos los portas para introducirlos en el Metafer según la Instrucción de uso del Metasystem UDHEM-IT-3.
5. En caso de ser necesario se puede limpiar el Eukit con Xilol.

### 3.4 Extensión de forma manual (cariotipo)

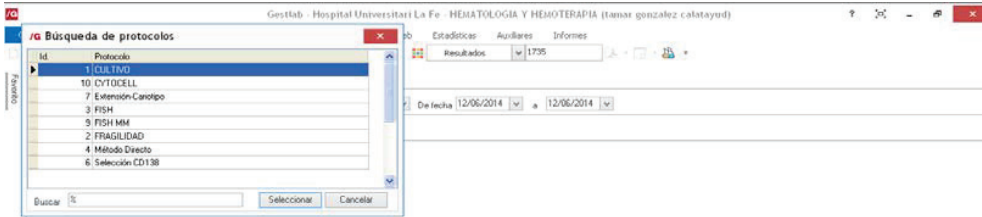
1. Coger un portaobjetos previamente guardado a 4°C con metanol
2. Secar el porta, cubrirlo con fijador y al mismo tiempo que se decanta el fijador se tiran 1 ó 2 gotas de la preparación, se flamea y se deja secar. Alternativamente, secar en plancha a 38°C.
3. Seguir en el punto 9 del apartado 3.1 (Extensión automática, spreader)

## 4. REGISTROS:



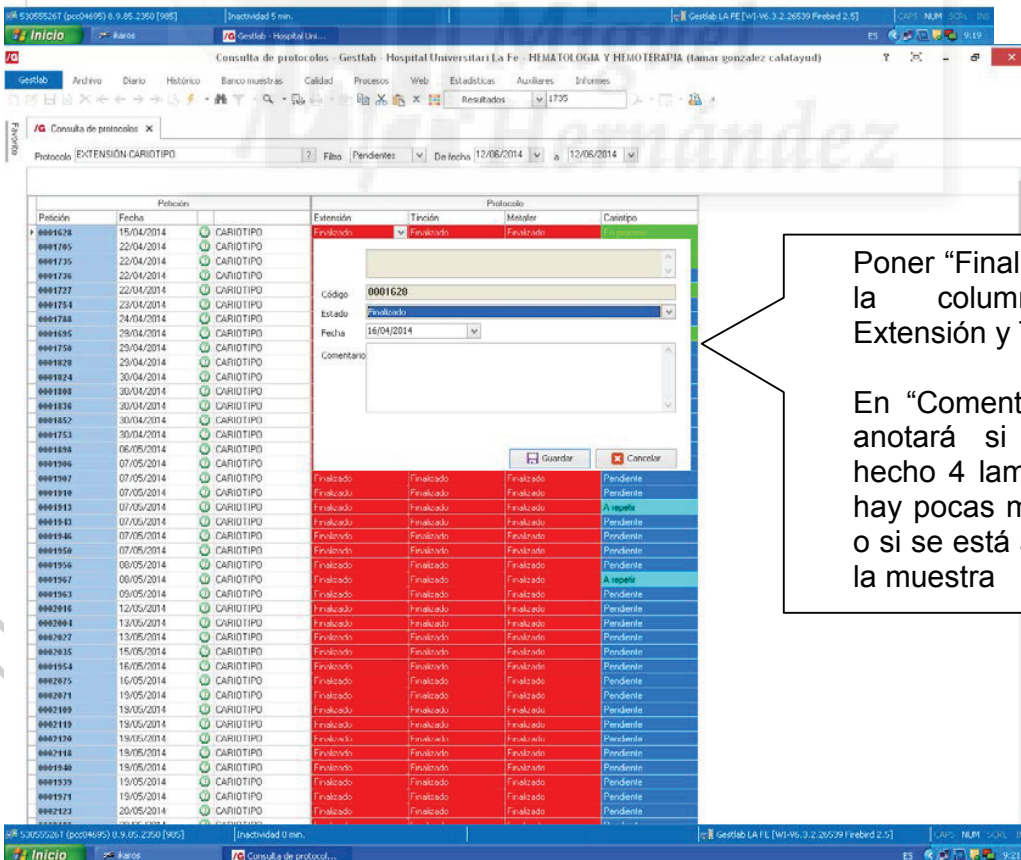
**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN  
UDHEM - PI- 13**

**REV1(9/2015)**



Registrar en Gestlab en el protocolo 7  
Extensión-Cariotipo.

PLADA



Poner "Finalizado" en la columna de Extensión y Tinción.

En "Comentarios" se anotará si se han hecho 4 laminillas, si hay pocas metafases o si se está agotando la muestra



**PROCEDIMIENTO DE EXTENSIÓN Y TINCIÓN**

**UDHEM - PI- 13**

**REV1(9/2015)**

**5. DOCUMENTOS:**

NP

**6. ANEXOS:**


NP

**7. REVISIONES:**

REV1 (9/2015) Primera edición.


UNA VEZ IMPRESO ES COPIA NO CONTROLADA



 Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS DUPLICACIONES PARCIALES EN TANDEM (ITD) en FLT3: RATIO ITDmutado/ITDsalvaje	PNT-58
		Rev.: A
		Fecha: 10-08-2012
		Página 1 de 6

MODIFICACIONES		
REVISIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
A	22/10/07	DETECCIÓN DE LA DUPLICACIONES PARCIALES EN TANDEM (ITD) en FLT3: RATIO ITDmutado/ITDsalvaje. Primera edición
A	10/08/2012	DETECCIÓN DE LA DUPLICACIONES PARCIALES EN TANDEM (ITD) en FLT3: RATIO ITDmutado/ITDsalvaje. Segunda edición

PREPARADO	RESPONSABLE	APROBADO
Eva Barragán	Eva Barragán	Eva Barragán

 Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS DUPLICACIONES PARCIALES EN TANDEM (ITD) en FLT3: RATIO ITDmutado/ITDsalvaje	PNT-58
		Rev.: A
		Fecha: 10-08-2012
		Página 2 de 6

## INTRODUCCIÓN

El 40-50% de las Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA) presentan cariotipo normal. En este grupo se hacen necesarios nuevos marcadores moleculares específicos que contribuyan a estratificar de una manera más eficaz a los pacientes en nuevos grupos y subgrupos de riesgo. Entre estos marcadores se encuentra el gen *FLT3* (*FMS*-Tyrosine Kinase 3), localizado en 13q12, que codifica para un receptor de factores de crecimiento. Este gen desempeña un papel importante en la supervivencia de las *stem cell* y la diferenciación mieloide. El análisis de blastos leucémicos en pacientes con LMA, ha permitido la identificación de dos mutaciones somáticas para el gen *FLT3* que proporcionan información pronóstica independiente: las duplicaciones internas en tándem (ITD) y la mutación puntual en la posición Asp835 (D835).

Las duplicaciones internas en tándem (ITD) están presentes en aproximadamente el 20% de las LMA (5-16% en la leucemia infantil), y tienen lugar en los exones 11 y 12 del gen, en una región que codifica el dominio yuxtamembrana de la proteína. Las duplicaciones consisten en una secuencia insertada entre los aminoácidos 575 y 613 que induce la activación constitucional de la proteína y la cascada de señales downstream asociada a ella (STAT5, MAP kinasas, Ras...).

En general, estas mutaciones se asocian con cifras elevadas de leucocitos y mal pronóstico, en especial en aquellos casos en los que el ratio para la relación área alelo mutado/área alelo wild-type supera el valor 0.78. En estos casos, los pacientes presentan menor supervivencia global y libre de enfermedad y mayor riesgo de recaída.


El otro tipo de alteración a destacar es la mutación puntual 835, presente en el 7% de las LMA. Esta alteración también provoca la activación constitucional de la proteína pero tiene lugar en el loop de activación en el segundo dominio tirosín –quinasa (TKD). Se asocia con una tendencia a tener menor supervivencia libre de enfermedad aunque el valor pronóstico no está del todo claro.

El estudio de mutaciones de *FLT3* está indicado para todas aquellos pacientes con LMA al diagnóstico o en recaída.

### PCR características del ensayo

La detección de la mutaciones ITD se efectúan siguiendo el método de Thiede *et al.* (Blood 2002; 99:4326-35). El método se fundamenta en la amplificación mediante PCR de los exones 11 y 12 del gen *FLT3* en donde recaen las duplicaciones parciales en tándem, empleando primers marcados con fluorógenos (6-FAM).

Además, se analiza el ratio ITD mutante/salvaje mediante electroforesis capilar y el software Genemapper de Applied Biosystems.

 Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS DUPLICACIONES PARCIALES EN TÁNDEM (ITD) en FLT3: RATIO ITDmutado/ITDsalvaje	PNT-58
		Rev.: A
		Fecha: 10-08-2012
		Página 3 de 6

## DETECCIÓN DE LAS DUPLICACIONES PARCIALES EN TÁNDEM (ITD) DE FLT3

### PROCEDIMIENTO


#### Programa de PCR

Etapa		T (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		95	11 min
Ciclos x27	Desnaturalización	94	30 s
	Hibridación	57	1 min
	Elongamiento	72	2 min
Extensión final		94	30 s
		60	45 min (para adicionar colas poli A a las moléculas)

Programa ITDFAM Termociclador Mastercycler

#### Mezcla de reactivos.

Reactivo	Volumen en $\mu$ l	Concentración final
DNA	2 (5ng)	5 ng
Ampli TaqGold (5 U/ $\mu$ l)	0.2	1 U
Tampón TaqGold 10x	5	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3	1.5 mM
Cebador 6-FAM-11F (5 pmol/ $\mu$ l)	5	0.5 $\mu$ M
Cebador 12R (5 pmol/ $\mu$ l)	5	0.5 $\mu$ M
dNTPs (10 mM)	1	0.2 mM
H <sub>2</sub> O estéril	28.8	
TOTAL	50	

 Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS DUPLICACIONES PARCIALES EN TANDEM (ITD) en FLT3: RATIO ITDmutado/ITDsalvaje	PNT-58
		Rev.: A
		Fecha: 10-08-2012
		Página 4 de 6

## TESTADO

---

Se realiza el testado de 10 µl de los productos de PCR en minigel de agarosa Nusieve al 3% empleando el Marcador de pesos moleculares φX174 DNA/Hinfl Marker (MBI Fermentas).

Los resultados del testado son:

Una banda de 330 pb correspondiente al salvaje

Una banda de más de 330 pb correspondiente al alelo mutado (el tamaño del amplificado puede variar en función de la repetición)

Las muestras que resultan positivas son las que se utilizan para el análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar, donde se establecerá el ratio entre las áreas del alelo salvaje y el alelo mutado.

## Electroforesis Capilar

---

Para el análisis de fragmentos se toman 0.5µl del producto de PCR y se mezclan con 12µl de formamida desionizada y 0.5µl del marcador GS ROX 500. Las muestras se corren por triplicado en el ABI 3130 según las condiciones descritas en la tabla.


Módulo Carrera	Tiempo Inyección	Tiempo Carrera	Filtro	Polimero
FragmentAnalysis_POP7	12	30 min	D	POP7

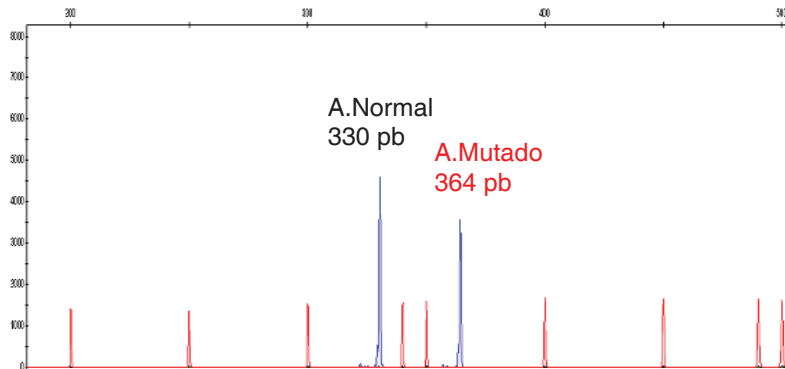
En general se debe observar que el pico dominante (normal o mutado) debe tener un valor por encima de 2000 unidades arbitrarias e inferior a 8000 ua (ya que en caso de saturación el programa no puede calcular el área). El ruido de fondo no debe exceder las 20ua. Para ajustar estas condiciones podemos modificar alguno de los parámetros anteriores especialmente el tiempo de inyección (si la señal es baja se puede aumentar el tiempo de inyección a 16 s).

Los resultados se analizan con el programa Genemapper v3.7 de Applied

El alelo normal genera un pico de 330 pb, si existe mutación se verá un pico mayor, de tamaño variable en función del número de duplicaciones insertadas

---

 Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	<b>DETECCIÓN DE LAS DUPLICACIONES  PARCIALES EN TANDEM (ITD) en FLT3:  RATIO ITDmutado/ITDsalvaje</b>	PNT-58
		Rev.: A
		Fecha: 10-08-2012
		Página 5 de 6



Dye/Sample Peak	Sample File Name	Marker	Allele	Size	Height	Area	Data Point
B,23	ITD-12270.fsa			330.38	4596	28301	4228
B,25	ITD-12270.fsa			364.27	3568	23917	4594

Area Mutado 23917/Area Salvaje 28301= 0.84

### SECUENCIAS DE LOS CEBADORES

Nombre	Secuencia	Stock
11F <sup>1</sup>	5'-6-FAM-GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC-3'	100 μM
12R <sup>1</sup>	5'-CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC -3'	100 μM

Cebadores Caja 3

### REACTIVOS Y EQUIPO REQUERIDO

AmpliTaQGold 5 U/uL }  
Buffer TaqGold 10 mM } Applied Biosystems manufactured by Roche  
MgCl<sub>2</sub> 25 mM }


Cebador 6-FAM-11F }  
Cebador 12R } TIB MolBiol

Termociclador Eppendorf MasterCycler Personal

POP7 }  
GS 500 ROX } Applied Biosystems  
Formamida Desionizada }


Secuenciador ABI 3130 de Applied Biosystems

Genemapper Software version 3.7 de Applied Biosystems

 Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS DUPLICACIONES PARCIALES EN TANDEM (ITD) en FLT3: RATIO ITDmutado/ITDsalvaje	PNT-58
		Rev.: A
		Fecha: 10-08-2012
		Página 6 de 6

<sup>1</sup>Thiede C *et al.* Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99:4326-35



 Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3/D835 EN EL LIGHTCYCLER.	PNT-
		Rev.: A
		Fecha: 10-08-2012
		Página 1 de 8

<i>MODIFICACIONES</i>		
REVISIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
A	22/10/05	DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3/D835 EN EL LIGHTCYCLER Primera edición
A	10/08/2012	DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN FLT3/D835 EN EL LIGHTCYCLER. Segunda edición

PREPARADO	RESPONSABLE	APROBADO
Eva Barragán	Eva Barragán	Eva Barragán

## **DETECCIÓN MOLECULAR DE LA MUTACIÓN D835 EN EL *FLT3* CON EMPLEO DE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER**

---

### **INTRODUCCIÓN**

---

*FLT3/FLK2/STK1* se localiza en el 13q12 y codifica un receptor de membrana tirosina-kinasa tipo III que se expresa preferentemente en células progenitoras hematopoyéticas<sup>1</sup>. La activación del receptor, tras la unión de su ligando (FL), produce su dimerización con la consiguiente fosforilación de los residuos tirosina-kinasa. Esta activación induce vías de señalización celular que intervienen en la proliferación y apoptosis<sup>2</sup>.

En el gen *FLT3* se han detectado mutaciones puntuales D835 en el dominio tirosina-kinasa (TK2) que consisten mayoritariamente en sustituciones de nucleótidos. Estas mutaciones se encuentran asociadas con las LMA y síndromes mielodisplásicos (SMD) observándose en un 7% de las LMA y se asocian a una tendencia a peor supervivencia libre de enfermedad (DFS) pero no se han podido relacionar con la hiperleucocitosis o un peor pronóstico<sup>3</sup>.

El método empleado se fundamenta en la utilización de sondas de hibridación marcadas con fluorógenos (*Flt3* Sensor marcada con Fluoresceína y *Flt3* Anchor con Red 640), las cuales han sido diseñadas para el alelo normal, realizando PCR en tiempo real con el sistema LightCycler empleando los cebadores descritos por Yamamoto et al.<sup>4</sup> Este método tiene la ventaja de presentar una gran rapidez obteniéndose la misma especificidad que los métodos convencionales basados en PCR seguida de digestión con enzimas de restricción.



## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Depositar el número de capilares necesarios (en cada ensayo se incluyen las muestras a analizar, controles positivos y un control de reactivos en el que se sustituye la muestra por agua.) en los adaptadores del bloque metálico previamente enfriado en la nevera.
2. Preparar la mezcla de reactivos en un tubo Eppendorf de 0,5 ml (volumen respecto n° de muestras a analizar + 1) según se indica en la **Tabla I**.
3. Añadir a cada capilar 8  $\mu$ l de la mezcla de reactivos.
4. Añadir a cada capilar 2  $\mu$ l del Cdna o DNA de las muestras, controles positivos y/o H<sub>2</sub>O estéril.
5. Tapar los capilares y centrifugarlos en sus adaptadores a 2000 r.p.m durante 5 segundos en una micro centrífuga.
6. Colocar los capilares en el rotor del LightCycler.

**Tabla I.** Mezcla de reactivos.

Reactivos	Volume [ $\mu$ l]	[Final]
H <sub>2</sub> O esteril	4.1	
17F (5 $\mu$ M)	1	0.5 $\mu$ M
17Rc /17 R (5 $\mu$ M)	1	0.5 $\mu$ M
Flt3 Anchor (5 $\mu$ M)	0.45	0.2 $\mu$ M
fLT3 Sensor (5 $\mu$ M)	0.45	0.2 $\mu$ M
LightCycler Fast PLUS	1	x1
cDNA/DNA	2	
<b>Volumen Total</b>	<b>10</b>	

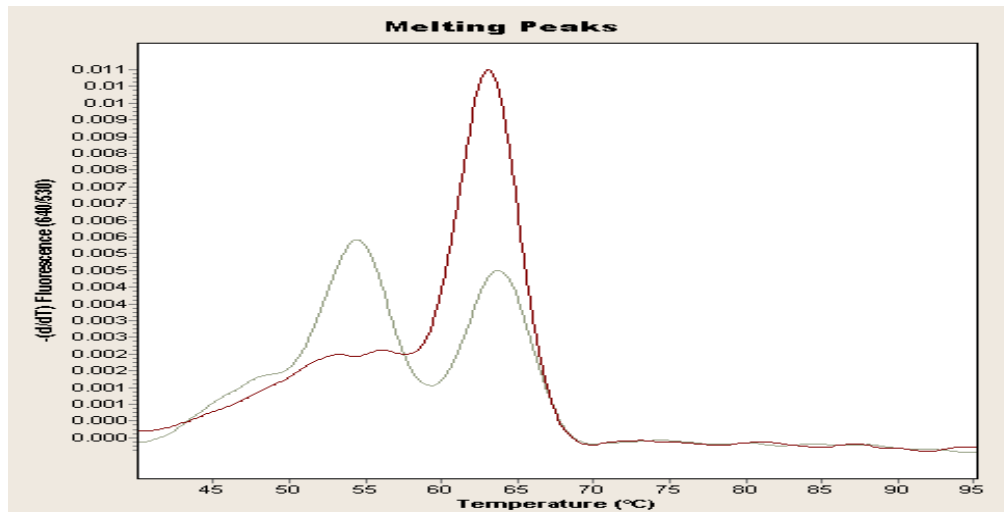
## PROGRAMA PCR

El programa del termociclador LightCycler consta de las etapas de desnaturalización (Programa 1), amplificación (Programa 2), análisis de curvas de fusión o de *melting* (Programa 3) y el enfriamiento (Programa 4) siguiendo los parámetros tal como a continuación se indica.

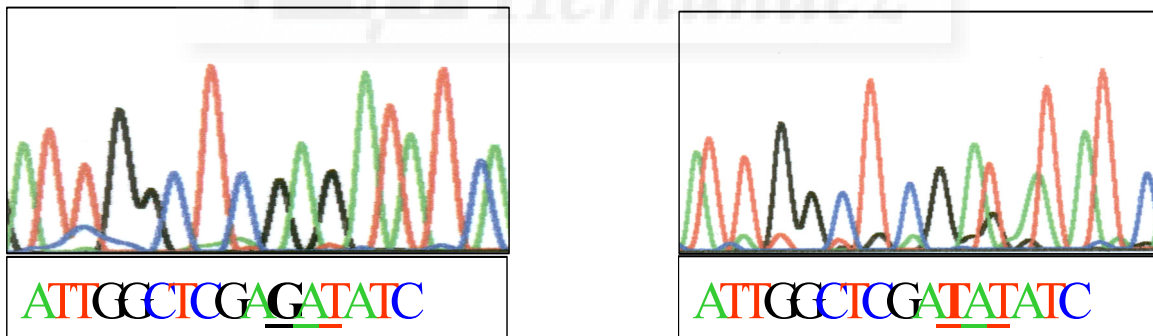
FLT3/D835										
Parámetros	Progr. 1	Prog. 2			Prog. 3					Prog.4
N.Ciclos	1	45			1					1
Denominación	Desnatura.	Amplifica.			Fusión					Enfria.
		Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 4	Seg 5	Seg 1
Target temperature [°C]	95	95	58	72	95	60	45	40	75	40
Incubation time [s]	600	5	10	15	20	30	30	60	0	60
Temperature transition rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	20	20	0.15	20
Acquisition mode	None	None	Single	None	None	None	None	None	Cont.	None

**Nota.-** El melting puede repetirse con un incremento de 0.2° C/seg cuando los picos no resulten muy nítidos. Canal de lectura F2/F1.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

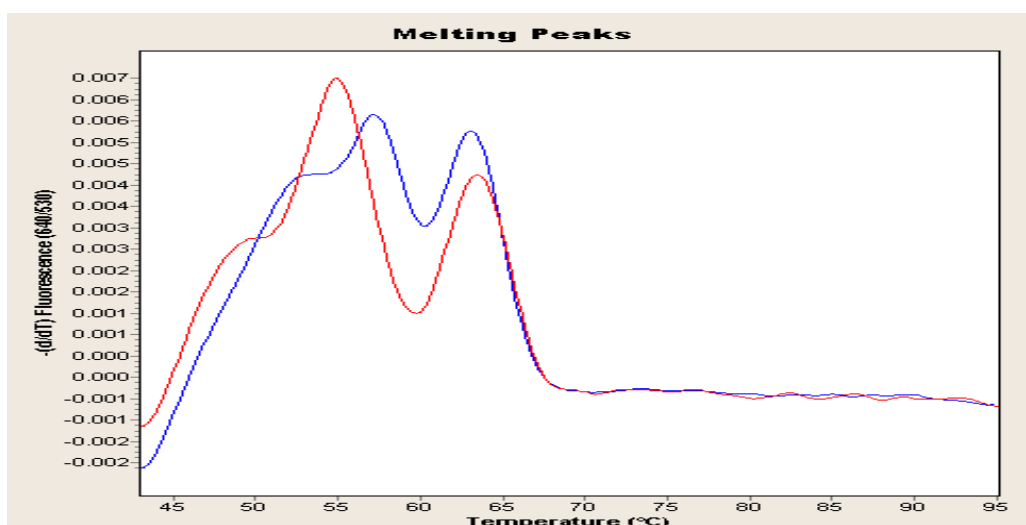


**Fig.1.** Curvas de Fusión del genotipo normal (**rojo**) y heterocigoto (**gris**). El alelo normal origina un pico a 63° C, mientras que el alelo mutado presenta un pico a 54°C. Obsérvese cómo la muestra que presenta la mutación presenta el pico normal y el propio de la mutación. Esta mutación D835Y correspondería a una sustitución en el codón 835 de una guanina por una timina, incorporándose el aminoácido tirosina (Tyr) en lugar del aminoácido correspondiente, ácido aspártico.



Asp → Tyr

**Fig.2.** Secuenciación de la mutación D835Y.



**Fig.3.** Curvas de Fusión de los dos tipos de mutaciones más frecuentes. La muestra que presenta la mutación D835Y (**rojo**) presenta el pico normal a 63°C y el propio de la mutación a 54°C, en cambio la muestra que presenta la mutación D835V (**azul**) presenta el pico del alelo normal a 63°C y el pico del alelo mutado a 57°C, en el que se ha sustituido una adenina por una timina, incorporándose el aminoácido valina. Ambas muestras presentan una mutación puntual en el codón 835 del gen *Flt3*.

## CEBADORES / SONDAS

**TablaII.** Cebadores y Sondas empleados en la amplificación de cDNA.

FLT3 (Genbank Acc N° 409572 )						
	Secuencias	Gen	Posición	Tamaño	%CG	Tm(°C)
<b>Primers</b>						
17F	5' CCgCCAggAACgTgCTTg 3'	FLT3	2495-2512	18	66.7	67.54
17Rc	5' gCAgACgggCATTgCCCC 3'	FLT3	608-2591	18	72.2	70.13
<b>Sondas hibridación</b>						
Flt3 anchor	5' AAgTCACATATCTTCACCACTTTCCCGT 3'	FLT3	2519-2546	28	42.9	68.94
Flt3 sensor	5' TCATgATATCTCgAqCCAATCC 3'	FLT3	2569- 2548	22	45.5	62.78

**Tabla III.** Cebadores y Sondas empleados en la amplificación de DNA.

FLT3 (Genbank Acc N° 12686292 )						
Secuencias	Gen	Posición	Tamaño	%CG	Tm(°C)	
<b>Primers</b>						
17F	5' CCgCCAggAACgTgCTTg 3'	FLT3	1624-1807	18	66.7	67.54
17R	5' gCAgCC TCACAT TgCCCC 3'	FLT3	1711-1728	18	66.7	67.42
<b>Sondas hibridación</b>						
Flt3 anchor	5' AAgTCACATATCTTCACCACTTTCCCGT 3'	FLT3	2519-2546	28	42.9	68.94
Flt3 sensor	5' TCATgATATCTCgAgCCAATCC 3'	FLT3	2569- 2548	22	45.5	62.78

## PREPARACIÓN DE CEBADORES Y SONDAS

**Stock cebadores:** Los cebadores se preparan a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  almacenándose a  $-20^\circ\text{C}$  (caja de cebadores en activo n° 2). La solución de trabajo se prepara en alícuotas a 5  $\mu\text{M}$ .

**Stock de sondas:** Las sondas se preparan a una concentración 20  $\mu\text{M}$  y se reparten en alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  que se almacenan a  $-20^\circ\text{C}$ . A cada una de estas alícuotas se añaden 15  $\mu\text{l}$  de agua estéril con lo que resulta una concentración final de trabajo de 5  $\mu\text{M}$  que se almacenan en nevera ( $4^\circ\text{C}$ ) durante su uso.

## EQUIPO Y REACTIVOS

- **LightCycler Instrument** (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, n° cat. 2 011 468).
- **Light Cycler-Capillaries** (Roche Molecular Biochemicals, n° cat. 1 909 339).
- **LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes.** (Roche Molecular Biochemicals, n° cat. 3 003 248).

**BIBLIOGRAFIA**

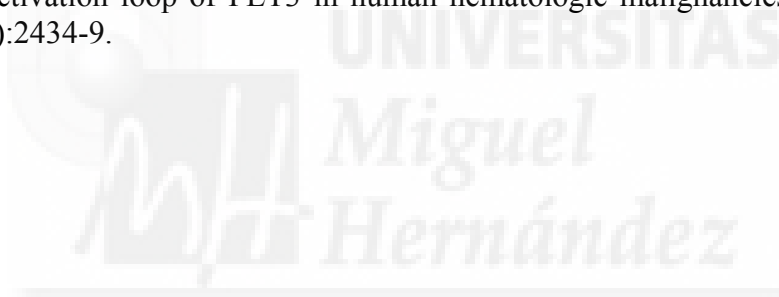
---

<sup>1</sup> Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1911-1918.

<sup>2</sup> Drexler HG. Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia* 1996; 10: 588-599.

<sup>3</sup> Whitman SP, Archer KJ, Feng L, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7233-9.

<sup>4</sup> Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001 Apr 15;97(8):2434-9.





Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 1 de 9

MODIFICACIONES		
REVISIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
A	13/02/08	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0
A	11/04/11	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0

PREPARADO	RESPONSABLE	APROBADO
Sandra Ballester	Eva Barragán	Eva Barragán
Eva Barragán	Eva Barragán	Eva Barragán



Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 2 de 9

## DETECCIÓN MOLECULAR DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

El gen *Nucleofosmina-1* se localiza en el 5q35 y codifica una fosfoproteína nucleolar de 294 aminoácidos que actúa de lanzadera entre el núcleo y citoplasma e interviene además de la síntesis ribosomal, en la regulación de la transcripción del gen *p53* a través de la proteína ARF.<sup>1</sup> En el exón 12 del gen NPM1 que codifica los últimos 39 aa del extremo C-terminal de la proteína se han detectado varios tipos de mutaciones heterocigotas. Prácticamente todas las mutaciones consisten en la inserción de cuatro bases, resultando una localización citoplasmática de la proteína mutada en lugar de su distribución normal en el nucleolo.

La detección de la mutación NPM1 tiene un gran interés puesto que las alteraciones genéticas que se dan en este gen son las más frecuentes y específicas en las leucemias mieloides agudas con cariotipo normal<sup>2</sup> lo que nos permitirá estratificar mejor a los pacientes en diferentes grupos de riesgo, así como la monitorización de la enfermedad mínima residual y por tanto poder adecuar mejor la terapéutica empleada.

El método empleado para la detección de mutaciones en el gen *NPM1* se fundamenta en la utilización de sondas de hibridación marcadas con fluorógenos (sonda Sensor marcada con Fluoresceína y Anchor con Red 640), las cuales han sido diseñadas para el alelo normal, realizando una PCR en tiempo real con el sistema LightCycler siguiendo el método descrito por Schnittger et al<sup>3</sup>. Este método tiene la ventaja de presentar una gran rapidez. Para detectar las mutaciones empleamos cDNA como muestra (las sondas de hibridación diseñadas complementan en una región exón-intrón).





Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 3 de 9

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Depositar el número de capilares necesarios (en cada ensayo se incluyen las muestras a analizar, controles positivos y un control de reactivos en el que se sustituye la muestra por agua.) en los adaptadores del bloque metálico previamente enfriado en la nevera.
2. Preparar la mezcla de reactivos en un tubo Eppendorf de 0,5 ml (volumen respecto nº de muestras a analizar + 1) según se indica en la **Tabla I**.
3. Añadir a cada capilar 9 µl de la mezcla de reactivos.
4. Añadir a cada capilar 1 µl del cDNA de las muestras, controles positivos y/o H<sub>2</sub>O estéril.
5. Tapar los capilares y centrifugarlos en sus adaptadores a 2000 r.p.m durante 5 segundos en una micro centrífuga.
6. Colocar los capilares en el rotor del LightCycler.

**Tabla I.** Mezcla de reactivos.

MIX	Volume [µl]	[Final]
H <sub>2</sub> O esteril	3.2	
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	1.2	3mM
NPM1 F (5µM)	1	0.5µM
NPM1 R (5µM)	1	0.5µM
NPM1 anchor (5µM)	0.8	0.4µM
NPM1 sensor (5µM)	0.8	0.4µM
LightCycler Fast Start Hyb Probes	1	x1
cDNA	1	
<b>Volumen Total</b>	<b>10</b>	



Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0			2147
				PNT-63
				Rev.: A
				Fecha: 11/04/2011
				Página 4 de 9

## PROGRAMA PCR

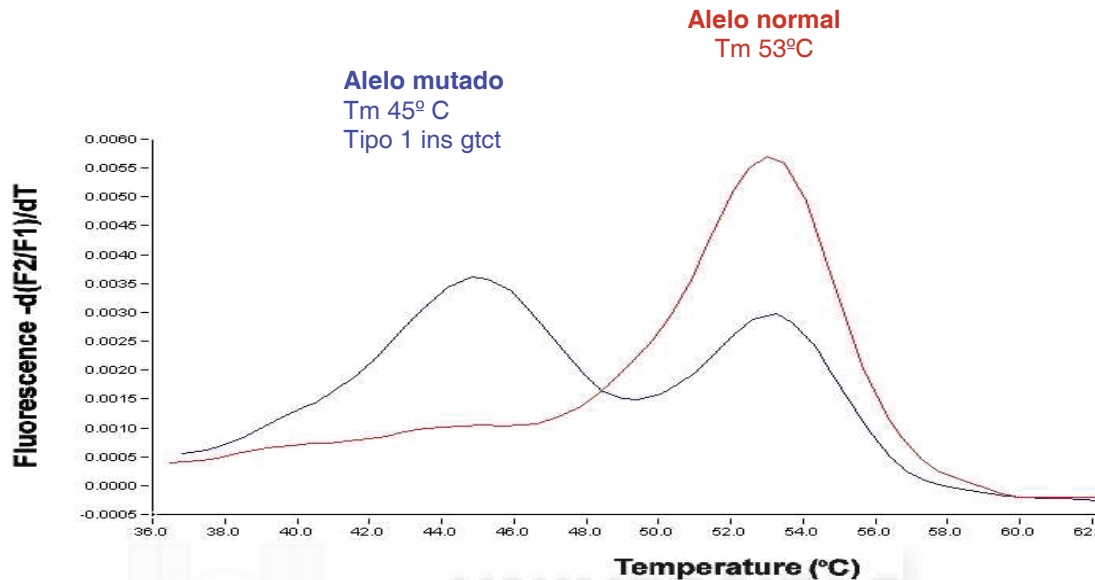
El programa del termociclador LightCycler **NPM.EXP** consta de las etapas de desnaturalización (Programa 1), amplificación (Programa 2), análisis de curvas de fusión o de *melting* (Programa 3) y el enfriamiento (Programa 4) siguiendo los parámetros tal como a continuación se indica.

Parámetros	Progr. 1	Prog. 2			Prog. 3			Prog.4
N.Ciclos	1	45			1			1
Denominación	Desnatur.	Amplifica.			Fusión			Enfria.
		Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 1	Seg 2	Seg 3	Seg 1
Target temperature [°C]	95	95	55	72	95	34	70	40
Incubation time [s]	600	1	8	10	0	1	0	30
Temperature transition rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.25	20
Acquisition mode	None	None	Single 640/530	None	None	None	Cont.	None

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 5 de 9



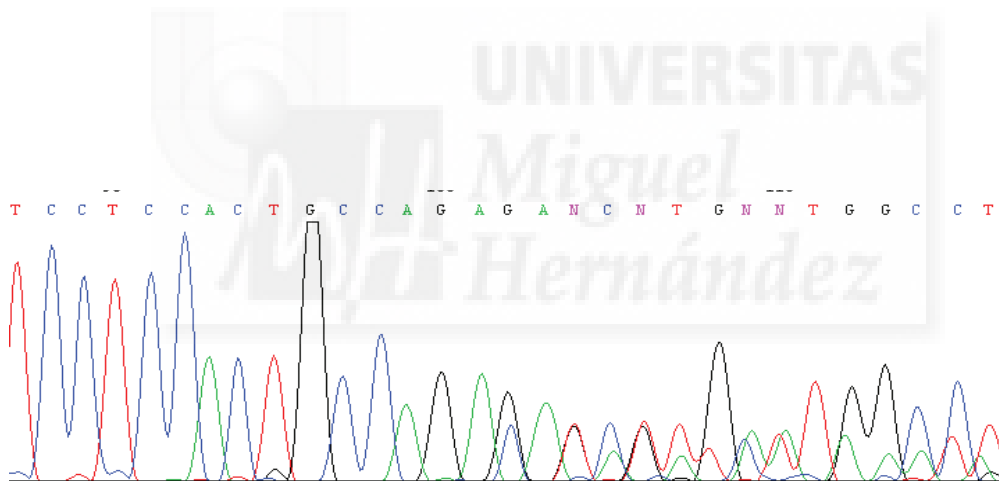
**Fig.1.** Curvas de Fusión del genotipo normal (**rojo**) y heterocigoto (**azul**). El alelo normal origina un pico a 53°C, mientras que el alelo mutado presenta un pico a una Tm menor, la cual varía dependiendo del tipo de mutación que presenta. En la **Tabla II** se puede observar las diferentes temperaturas de fusión para las mutaciones más frecuentes. Posteriormente a la PCR en tiempo real caracterizamos la mutación para aquellas muestras positivas mediante secuenciación conociendo así el tipo de mutación que presenta (la secuenciación de las mutaciones tipo A y D no es necesario puesto que presentan picos bien diferenciados).



Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 6 de 9

**Tabla II.** Inserciones más frecuentes su Tm correspondiente.

<b>TIPO MUTACIÓN</b>	<b>TM (°C)</b>
<b>A:</b> TCTG	45
<b>B:</b> CATG	39
<b>P<sub>M</sub>:</b> CTTG	40
<b>D:</b> CCTG	43
<b>K<sub>M</sub>:</b> CCGG	40



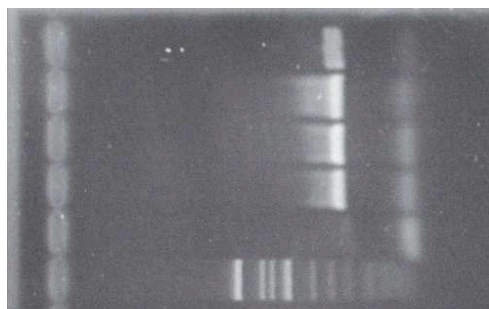
**Fig.2.** Cromatograma resultante tras la secuenciación.

Eventualmente puede realizarse una electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR donde se pueden observar dos bandas en aquella muestra que presenta la mutación, si por el contrario dicha muestra no presenta mutación aparecerá una sola banda correspondiente a un tamaño de 206 pb.



Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 7 de 9

1: NPM1+



**Fig.3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR en tiempo real.

#### CEBADORES / SONDAS

**Tabla II.** Cebadores y Sondas empleados para la detección de la mutación NPM1.

NPM1 (Genbank Acc N° 40353732)						
	Secuencias	Gen	Posición	Tamaño	%CG	Tm(°C)
<b>Primers</b>		Npm1				
NPM1F	5'TCCCAAAGTGAAGCC 3'		879-895	16	56.3	52
NPM1R	5'GGAAAGTTCTCACTCTGC 3'		1067-1085	18	50	50.5
<b>Sondas hibridación</b>		Npm1				
NPM1 anchor	5'CGGATGACTGACCAAGAGGCTATTCA--FL 3'		925-951	26	50	59.5
NPM1 sensor	5'RED640-ATCTCTGGCCGTGGAGG—PH 3'		953-970	17	64.7	46.5



Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 8 de 9

## PREPARACIÓN DE CEBADORES Y SONDAS

**Stock cebador:** Los cebadores se preparan a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  almacenándose a  $-20^\circ\text{C}$  (caja de cebadores en activo n<sup>o</sup> 2). La solución de trabajo se prepara en alícuotas a 5  $\mu\text{M}$ .

**Stock de sondas:** Las sondas se preparan a una concentración 20  $\mu\text{M}$  y se reparten en alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  que se almacenan a  $-20^\circ\text{C}$ . A cada una de estas alícuotas se añaden 15  $\mu\text{l}$  de agua estéril con lo que resulta una concentración final de trabajo de 5  $\mu\text{M}$  que se almacenan en nevera ( $4^\circ\text{C}$ ) durante su uso.

## EQUIPO Y REACTIVOS

- **LightCycler Instrument** (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, n<sup>o</sup> cat. 2 011 468).
- **Light Cycler-Capillaries** (Roche Molecular Biochemicals, n<sup>o</sup> cat. 1 909 339).
- **LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes.** (Roche Molecular Biochemicals, n<sup>o</sup> cat. 3 003 248).

## BIBLIOGRAFIA

<sup>1</sup> Falini B, Mercucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med 2005; 352:254-66.

<sup>2</sup> P Gorello, G Cazzaniga, F Alberti et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying NPM1 gene mutation. Leukemia March 2006; 1-6.



Laboratorio de Biología Molecular Dept. Biopatología Clínica Hospital Universitario La Fe	DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN NPM1 MEDIANTE SONDAS DE HIBRIDACIÓN EN EL LIGHTCYCLER 2.0	2147
		PNT-63
		Rev.: A
		Fecha: 11/04/2011
		Página 9 de 9

<sup>3</sup> Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. Blood Dec 2005;106(12):3733-9.



(Ref. CEIC PI2017/26)

## INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

Reunidos los miembros del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Alicante, en su sesión del día 26 de Abril de 2017, y una vez estudiada la documentación presentada por el **Dr. Pascual Fernández Abellán**, Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital General Universitario de Alicante, tiene bien a informar que el proyecto de investigación titulado "**Leucemia aguda mieloide NPM1+: Estudio, supervivencia a largo plazo, supervivencia libre de progresión y factores pronósticos**", se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Alicante con fecha quince de Mayo de dos mil diecisiete.



Fdo. Mayte Domenech Varón  
Secretaria del CEIC